

**Die Expression von LMP1, LMP2A und
CD30 in B-Zellen zur Analyse physiologischer und
pathogener Effekte**

Dissertation der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München
zur Erlangung des Doktorgrades

Petra Fiedler

April 2011

Erstgutachter: Prof. Dr. Dirk Eick

Zweitgutachterin: Prof. Dr. Elisabeth Weiß

Tag der Einreichung: 14. April 2011

Tag der mündlichen Prüfung: 7. Dezember 2011

Für meine Familie

INHALTSVERZEICHNIS	I-V
ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS	VI-VII
ABKÜRZUNGEN	VIII-X
1 EINLEITUNG	1
1.1 Das Immunsystem	1
1.2 B-Zellen und die humorale Immunantwort	2
1.2.1 B-Zellentwicklung der B2-Zellen.....	2
1.2.2 B1-Zellen	5
1.2.3 B-Zellaktivierung.....	6
1.3 B-Zell-Lymphome	9
1.4 Das Hodgkin Lymphom	10
1.5 Das Epstein-Barr-Virus.....	12
1.5.1 Die viralen Proteine LMP1 und LMP2A.....	14
1.6 CD30.....	17
1.7 Das Modellsystem zur Untersuchung von LMP1 und/oder LMP2A in B-Zellen	18
2 ZIELSETZUNG.....	21
3 ERGEBNISSE	22
3.1 Der Einfluss der viralen Proteine LMP1 und LMP2A auf B-Zellen.....	22
3.1.1 Die Expressionsstärke von LMP1 und LMP2A mit und ohne Doxycyclin-Induktion	23
3.1.2 Die Expression von LMP1 und LMP2A induziert typische Merkmale einer Hodgkin-Reed-Sternberg-Zelle.....	24
3.1.3 LMP1- und LMP2A-induzierte Signalwege	29
3.1.4 Die Expressionsstärke des Protoonkogens c-Myc	37
3.1.5 Die Expression der Tumorsuppressoren A20, p53 und Rb	38
3.2 Die konditionale Expression von CD30 in B-Zellen zur Analyse physiologischer und pathogener Effekte	41
3.2.1 Das Fusionsprotein LMP1/CD30.....	41
3.2.2 Integration der Transgene in das Genom embryonaler muriner Stammzellen.....	42

3.2.3	Identifizierung homolog rekombinierter ES-Zell-Klone	45
3.2.4	Generierung der Mausstämmе	48
3.3	Die Expression von CD30 während der B-Zellentwicklung und B-Zellproliferation <i>in vivo</i>.....	48
3.3.1	Die Expression der Transgene LMP1/CD30 und CD30 in murinen B-Zellen	49
3.3.2	Das konstitutive Signal von CD30 führt zu einer Zunahme von B-Zellen in der Milz	50
3.3.3	Die frühe B-Zellentwicklung wird durch die Expression von CD30 oder LMP1/CD30 nicht beeinflusst	52
3.3.4	Die Expression von LMP1/CD30 führt zu einer Zunahme von B1-Zellen	53
3.3.5	Die Expression von LMP1/CD30 führt zu einer starken Zunahme von B-Zellen in der Peritonealhöhle.....	58
3.3.6	Die Follikelstruktur von CD30-exprimierenden Mäusen bleibt erhalten.....	60
3.3.7	Die Expression von LMP1/CD30 führt zu einer B-Zellaktivierung	61
3.3.8	Das konstitutive CD30-Signal führt zu einer Zunahme von Plasmazellen	63
3.3.9	Die Expression von LMP1/CD30 führt zu erhöhten Immunglobulintitern	64
3.4	Der Einfluss von CD30 auf die T-Zell-abhängige Immunantwort	65
3.4.1	LMP1/CD30-exprimierende Mäuse können keine Keimzentren bilden.....	65
3.4.2	Plasmazellbildung nach Immunisierung.....	67
3.4.3	NP-spezifische Immunglobulintiter	69
3.5	Hinweise auf Tumorentstehung.....	70
4	DISKUSSION.....	72
4.1	Der Einfluss von LMP1 und LMP2A auf B-Zellen.....	72
4.1.1	LMP1 und LMP2A induzieren typische HL-Merkmale.....	72
4.1.2	LMP1- und LMP2A-induzierte Signalwege	74
4.1.3	Die Expression der Tumorsuppressoren.....	78
4.2	Generierung der Mausstämmе CD30^{fSTOP} und LMP1/CD30^{fSTOP}	79
4.3	Die aberrante Expression von CD30	79
4.4	Das konstitutiv aktive CD30-Signal in B-Zellen führt zu einer Expansion von B1-Zellen	81
4.5	Das konstitutiv aktive CD30-Signal in B-Zellen führt zu einer Zunahme von Plasmazellen	83
4.6	LMP1/CD30- und CD30-Mäuse haben eine normale Follikelstruktur in der Milz	83
4.7	Das konstitutive CD30-Signal blockiert die Keimzentrumsreaktion	84
4.8	LMP1/CD30 und Tumorentstehung.....	85

5	ZUSAMMENFASSUNG.....	87
6	MATERIAL.....	89
6.1	Plasmide	89
6.2	Sonden für Southern Blot Analyse.....	91
6.3	Bakterien.....	91
6.4	Zelllinien	91
6.5	Mausstämme	93
6.6	Oligonukleotide	93
6.7	Antikörper für Western Blot	94
6.8	Antikörper für Immunhistochemie.....	95
6.9	Antikörper für ELISA und ELISPOT	95
6.10	Chemikalien, Plastikware, Geräte, Reagenzien	96
6.11	EDV.....	97
7	METHODEN.....	98
7.1	DNA-präparative Techniken.....	98
7.1.1	DNA-Isolation, Aufreinigung und Isolation von Plasmiden aus Bakterien	98
7.1.2	Plasmidisolierung und Aufreinigung der Zielvektoren für die Transfektion in die ES-Zellen	98
7.1.3	DNA-Präparation von ES-Zellen-Klonen aus 96-Loch-Platten	99
7.1.4	DNA-Präparation von ES-Zellen aus 6 cm Platten	99
7.1.5	DNA-Isolation aus Mausschwanzspitzen	99
7.1.6	Phenol-Chloroform-Extraktion von DNA.....	100
7.1.7	Enzymatische Spaltung von Plasmid-DNA.....	100
7.1.8	Enzymatische Spaltung genomischer DNA aus ES-Zellen	100
7.1.9	Southern Blot nach Southern, E.M.	101
7.1.10	Polymerase- Kettenreaktion (PCR)	102
7.2	Klonierung der Zielvektoren.....	104
7.3	RNA-präparative Techniken.....	105
7.3.1	Isolierung von Gesamt RNA aus Zellen.....	105
7.3.2	Herstellen von cDNA.....	105

7.3.3	Quantitative RT-PCR.....	106
7.4	Proteintransfer und immunologischer Nachweis von Proteinen.....	107
7.4.1	Präparation von Proteinen aus Zellen	107
7.4.2	Proteinquantifizierung	107
7.4.3	SDS-PAA-Gelelektrophorese	107
7.4.4	Western-Blot.....	108
7.4.5	Spezifischer Proteinnachweis mittels Antikörpern	109
7.5	Kernfärbung.....	110
7.6	Zellkultur	110
7.6.1	Allgemeine Zellkulturtechniken	110
7.6.2	Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	112
7.6.3	Kultivieren der EREB2-5-Zelllinien und die Inaktivierung von EBNA2.....	112
7.6.4	Kultivieren von embryonalen Fibroblastenzellen (EF-Zellen).....	112
7.6.5	Kultivierung von embryonalen Stammzellen (ES-Zellen).....	113
7.6.6	Transfektionen	113
7.6.7	Selektion stabiler ES-Klone.....	114
7.7	Funktionale Tests.....	116
7.7.1	LUC-Assay.....	116
7.7.2	Deletion der STOP-Kassette in ES-Zellen.....	116
7.8	Blastozysten-Injektion	117
7.9	Mausversuche.....	117
7.9.1	Mäuse	117
7.9.2	Isolierung von Lymphozyten	117
7.9.3	Durchflusszytometrie (FACS).....	118
7.9.4	Immunisierung der Mäuse.....	119
7.9.5	Immunhistochemie von Gefrierschnitten.....	119
7.9.6	Präparation von Blutserum aus Mäuseblut.....	120
7.9.7	ELISA.....	120
7.9.8	Elispot	121
8	LITERATUR.....	123
	DANKSAGUNG	132-133
	VERÖFFENTLICHUNGEN	134

ERKLÄRUNG..... 135-136

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1 Frühe B-Zellentwicklung mit den unterschiedlichen Entwicklungsstadien.	3
Abbildung 2 Aufbau der Follikel.	4
Abbildung 3 Die humorale Immunantwort.	7
Abbildung 4 NF- κ B-Aktivierung.	12
Abbildung 5 LMP1-induzierte Signalwege.	15
Abbildung 6 LMP2A-induzierte Signalwege.	16
Abbildung 7 LMP1- und LMP2A-exprimierende B-Zellen.	20
Abbildung 8 Nachweis der Doxycyclin-induzierten Expression von LMP1 und LMP2A.	23
Abbildung 9 Nachweis der EBNA2-unabhängigen Expression von LMP1 und LMP2A.	24
Abbildung 10 Morphologie von EREB-LMP1/2A-Zellen.	25
Abbildung 11 Polykaria-Formation von EREB-LMP1- und EREB-LMP1/2A-Zellen.	26
Abbildung 12 Die Expression von CD30, Notch2 und des Notch-Liganden Jagged1.	27
Abbildung 13 Expressionslevel von Notch1 und Notch2.	28
Abbildung 14 Expression von Ig μ , Ig β und Ig α .	29
Abbildung 15 Die Aktivität von ERK, JNK und Akt.	30
Abbildung 16 Aktivierung der Kinasen nach Doxycyclin-induzierter Expression von LMP1 und LMP2A.	31
Abbildung 17 Aktivierung des kanonischen NF- κ B-Signalwegs.	32
Abbildung 18 Aktivierung des kanonischen NF- κ B-Signalwegs.	33
Abbildung 19 Aktivierung des nicht-kanonischen NF- κ B-Signalwegs.	34
Abbildung 20 Expression von <i>NFKB2</i> .	35
Abbildung 21 Analyse und Vergleich der Aktivierung von ERK, JNK, Akt und NF- κ B in den HL-Zelllinien L428 und KMH2 sowie EREB-LMP1/2A-Zellen an Tag 8 nach Östrogenentzug.	36
Abbildung 22 Expression von c-Myc.	38
Abbildung 23 Die Expression der Tumorsuppressoren A20 und p53.	39
Abbildung 24 Durch die Expression von LMP1 und/oder LMP2A kann Rb nicht hyperphosphoryliert werden.	40
Abbildung 25 Das Fusionsprotein LMP1/CD30 kann in HEK293-Zellen NF- κ B aktivieren.	42
Abbildung 26 Der Mausstamm CD30 ^{flSTOP} .	43
Abbildung 27 Der Mausstamm LMP1/CD30 ^{flSTOP} .	44
Abbildung 28 Identifizierung von ES-Zellklonen mit positiver Integration der Transgene CD30 und LMP1/CD30.	46
Abbildung 29 Expression des Reporters hCD2 und CD30 in homolog rekombinierten ES-Zellen.	47
Abbildung 30 Die Expression von hCD2 und CD30 in murinen B-Zellen.	49
Abbildung 31 Nachweis der Proteine CD30 und LMP1/CD30 in murinen B-Zellen.	50
Abbildung 32 Milzgewichte.	51
Abbildung 33 Die B-Zell-spezifische Expression von LMP1/CD30 führt zu einer Zunahme der B-Zellen in der Milz.	52
Abbildung 34 Durch die B-Zell-spezifische Expression von CD30 und LMP1/CD30 wird die frühe B-Zellentwicklung nicht gestört.	53
Abbildung 35 Analyse der IgM- und IgD-Expression auf B-Zellen in CD30- und LMP1/CD30-Mäusen.	54
Abbildung 36 Zellzahlen der transitionalen (AA4.1 ⁺) B-Zellen.	55
Abbildung 37 Die Expression von LMP1/CD30 führt zu einer stark erhöhten Zellzahl einer CD21 ^{niedrig} CD23 ^{niedrig} -B-Zellpopulation.	56
Abbildung 38 Das konstitutive CD30-Signal führt zu einer starken Zunahme der B1-Zellpopulation.	57
Abbildung 39 LMP1/CD30 führt zu einer starken Zunahme der B1a- und B1b-Zellen.	58
Abbildung 40 Erhöhte Zellzahlen im Bauchraum LMP1/CD30-exprimierender Mäuse.	59
Abbildung 41 Zunahme der B1a-, B1b- und B2-Zellen in der Peritonealhöhle von LMP1/CD30-Mäusen.	60
Abbildung 42 Milzstruktur.	61
Abbildung 43 Die aberrante Expression des CD30-Rezeptors und das konstitutive CD30-Signal führen zu einer Größenzunahme der B-Zellen.	62
Abbildung 44 Die Expression von LMP1/CD30 führt zu einer Hochregulierung von Aktivierungsmarkern.	63
Abbildung 45 Die Expression von LMP1/CD30 führt zu erhöhten Plasmazellzahlen.	64
Abbildung 46 Erhöhte Immunglobulintiter.	65
Abbildung 47 Nachweis von Keimzentrumzellen.	66
Abbildung 48 Nachweis von Keimzentren.	66

Abbildung 49 In LMP1/CD30-exprimierenden Mäusen konnten nach Immunisierung mehr Plasmazellen in der Milz und im Knochenmark detektiert werden. .	67
Abbildung 50 Anzahl der NP-spezifischen Plasmazellen nach TD-Immunisierung.	68
Abbildung 51 Nachweis NP-spezifischer IgM- und IgG1-Immunglobulintiter.	69
Abbildung 52 Hinweise auf Tumorenstehung in LMP1/CD30-exprimierenden Mäusen.	70
Abbildung 53 Aufbau Southern Blot.	101
Tabelle 1 Identifizierung von ES-Klonen, die die Zielvektoren über homologe Rekombination in den <i>rosa26</i> -loкус inseriert haben.	45
Tabelle 2 Verwendete Primer zur Etablierung der Mausstämmе	93
Tabelle 3 Verwendete Primer für die Genotypisierung	94
Tabelle 4 Verwendete Primer für die quantitative PCR	94
Tabelle 5 Antikörper Western Blot	94
Tabelle 6 Antikörper für Immunhistochemie	95
Tabelle 7 Chemikalien, Plastikware, Geräte, Reagenzien	96
Tabelle 8 PCR zur Genotypisierung	104

Abkürzungen

cHL	klassisches Hodgkin-Lymphom
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure(n)
BAFF	B-Zell-aktivierender Faktor
BCR	B-Zell-Rezeptor („B cell receptor“)
BL	Burkitt-Lymphom
bp	Basenpaar(e)
bpA	Bovines Polyadenylierungssignal
BSA	Rinder-Serum Albumin („bovine serum albumine“)
cDNA	copy-DNA
CSR	Klassenwechsel („class switich recombination“)
CTAR	C-terminale Aktivierungsregion
DAB	3'3-Diaminobenzidine Tetrahydrochloride
DLBCL	Diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom
DMEM	Dulbeccos Modifikation des „Eagle“-Mediums
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
EBNA	Epstein-Barr virales Kern Antigen („EBV-nuclear-antigen“)
EBV	Epstein-Barr Virus
EDTA	Ethylen-Diamin-tetra-Acetat
EF-Zellen	embryonale Feeder-Zellen
ELISA	„enzym-linked immuno sorbent assay“
ERK	extrazelluläre Signal-regulierte Kinase
ES-Zellen	embryonale Stammzellen
et al.	und andere („et alii“)
FACS	Fluoreszenz-assoziierte Durchflusszytometrie
FCS	fötales Kälberserum („fetal calf serum“)
FDC	follikuläre dendritische Zellen
fl.	flox (von loxP-Seiten umgebender Bereich)
FoB	follikuläre B-Zellen
g	Gramm
G418	Geneticin
h	Stunde(n)
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HEPES	4-2-hydroxyethyl-1-piperazine-ethanesulfonic acid
HL	Hodgkin-Lymphom
HRP	Meeretich-Peroxidase
HRS-Zellen	Hodgkin-Reed-Sternberg-Zellen
Ig	Immunglobulin
IgH	Immunglobulin der schweren Kette
IgL	Immunglobulin der leichten Kette
IRES	interne ribosomale Eintittsstelle („internal ribosomal entry site“)
ITAM	„immunoreceptor tyrosine-based activation motif“
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
kDa	Kilodalton

KSHV	Karposi Sarkoma Virus
l	Liter
lacZ	Gen der β -Galaktosidase
LCL	Lymphoblastoide Zelllinie
LIF	Leukämie inhibierender Faktor
LMP	latentes Membranprotein
loxP	Orte der Überschneidung im Phagen P1
M	molar
MACS	„Magnetic associated cell sorting“ Zellsortierung nach magnetischer Markierung
MAPK	Mitogen-aktivierte Protein Kinase
mg	Milligramm
min	Minute(n)
mM	Millimol
MMC	Mitomycin C
MOMA	Monozyten, Makrophagen
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	Boten-RNA („messenger RNA“)
mV	Millivolt
MZB-Zellen	Marginalzonen-B-Zellen
n.s.	nicht spezifisch
Neo	Neomycin
NF- κ B	Kernfaktor- κ B („nuclear factor- κ B“)
Ng	Nanogramm
NK-Zelle	natürliche Killerzelle
Nm	Nanometer
NP-CGG	4-Hydroxy-3-nitrophenylacetyl-hapten konjugiertes „Chicken Gamma Globulin“
OD	optische Dichte
PALS	Periarterielle lymphatische Scheide
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PEL	Primäres Effusionslymphom
Pre-BCR	Pre-B-Zell-Rezeptor
PVDF	Polyvinyliden Fluoride
qPCR	quantitative PCR
RNA	Ribonukleinsäure
Rpm	Umdrehungen pro Minute („rounds per minute“)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat („Sodium dodecyl sulphate“)
SHM	somatische Hypermutation
STAT	Signaltransduktions-aktivierter Transkriptionsfaktor
TCR	T-Zell-Rezeptor
TD	T-Zell-abhängig
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N,N-Tetramethylen Diamine
T _H -Zelle	Helfer-T-Zelle
TI	T-Zell-unabhängig

TNF	Tumornekrosefaktor
TNFR	Tumornekrosefaktor-Rezeptor
TRAF	TNF-Rezeptor assoziierter Faktor
TV	Targeting Vektor (Zielvektor)
U	„Units“ Enzym Einheit
ÜN	über Nacht
V	Volt
Wt	Wildtyp
x g	x-fache Erdbeschleunigung
μ-Kette	schwere Kette des Immunglobulins
μF	Mikrofaraday
μg	Mikrogramm

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem setzt sich aus einer Reihe von hoch spezialisierten Zellen zusammen und dient dem Organismus als Schutz vor Pathogenen. Man unterscheidet zwischen der angeborenen und adaptiven Immunität, welche den Körper gemeinsam schützen sollen, die sich jedoch hinsichtlich ihrer Spezifität voneinander unterscheiden. Die angeborene Immunität vermittelt eine schnelle und relativ unspezifische Immunantwort gegen Pathogene. Die erworbene Immunität zeichnet sich zum einen durch ihre hohe Spezifität aus und zum anderen durch ihr immunologisches Gedächtnis, was dem Organismus hilft, bei einer erneuten Infektion mit demselben Pathogen schneller zu reagieren. Die adaptive Immunantwort ist außerdem durch eine hohe Vielfalt an Antigenrezeptoren gekennzeichnet, welche einen breiten Schutz vor vielen Pathogenen gewährleistet. In Säugern entstehen die Zellen des Immunsystems aus den pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark. Die hämatopoetischen Stammzellen differenzieren zunächst in myeloide und lymphoide Vorläuferzellen. Aus den myeloiden Vorläuferzellen können Granulozyten, Monozyten und dendritische Zellen entstehen, welche in der angeborenen Immunität eine große Rolle spielen. B- und T-Zellen entstehen aus den gemeinsamen lymphoiden Vorläuferzellen und sind der adaptiven Immunantwort zugeordnet. Sowohl B-Zellen als auch T-Zellen durchlaufen eine Reihe von Differenzierungs- und Selektionsprozessen, welche Zellen mit unterschiedlicher Antigenspezifität generieren. Die adaptive Immunantwort ist wiederum in die zellvermittelte und die humorale Immunantwort gegliedert. Die zellvermittelte Immunantwort richtet sich gegen intrazelluläre Pathogene, beispielsweise Viren, aber auch gegen Tumorzellen und wird durch die zytotoxischen T-Zellen vermittelt. Die humorale Immunantwort wird von antigenaktivierten B-Zellen und den von ihnen sezernierten Antikörpern ausgeführt (Janeway, 2007).

1.2 B-Zellen und die humorale Immunantwort

1.2.1 B-Zellentwicklung der B2-Zellen

B-Zellen entwickeln sich aus hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark. Sie durchlaufen eine Reihe von Differenzierungsstufen, bis sie als unreife B-Zellen in die Peripherie entlassen werden. Unreife B-Zellen müssen einen funktionellen, jedoch nicht gegen körpereigene Antigene gerichteten B-Zell-Rezeptor (BCR), exprimieren. Der BCR-Komplex besteht aus einer schweren Immunglobulinkette (IgH) und einer leichten Immunglobulinkette (IgL) sowie den zwei assoziierten Signalmolekülen $Ig\alpha$ und $Ig\beta$. Die Bindung der Antigene erfolgt über die variablen Regionen der schweren und leichten Kette und die Signalweiterleitung über die Signalmoleküle $Ig\alpha$ und $Ig\beta$. Um eine hohe Diversität Antigen-erkennender B-Zellen zu erhalten, werden zunächst in den Pro-B-Zellen die V-,D- und J-Segmente der schweren Kette umgelagert (somatische Rekombination) (Abbildung 1). Die Rekombination der Gensegmente der Immunglobulin-Loci (Ig-Loci) wird von den Enzymen RAG1 und RAG2 katalysiert (Oettinger et al., 1990). Die Desoxyxynukleotidyl-Transferase (TdT) fügt sogenannte N-Nukleotide an die Rekombinationsenden, welche, neben der somatischen Rekombination selbst, die Diversität der BCR erhöht (Gilfillan et al., 1993). Nach der erfolgreichen Umlagerung der schweren Kette exprimieren die Pre-B-Zellen den Pre-BCR-Komplex, der aus der erfolgreich umgelagerten schweren Kette und einer vorübergehenden leichten Ersatz-Kette besteht. Durch die Signalweiterleitung des Pre-BCR-Komplexes wird die Umlagerung der leichten Kette induziert. Eine erfolgreich umgelagerte leichte Kette paart sich mit der schweren Kette und verdrängt die Ersatz-Kette. Dadurch entsteht ein funktioneller BCR auf der Oberfläche der B-Zellen (Bossy et al., 1991).

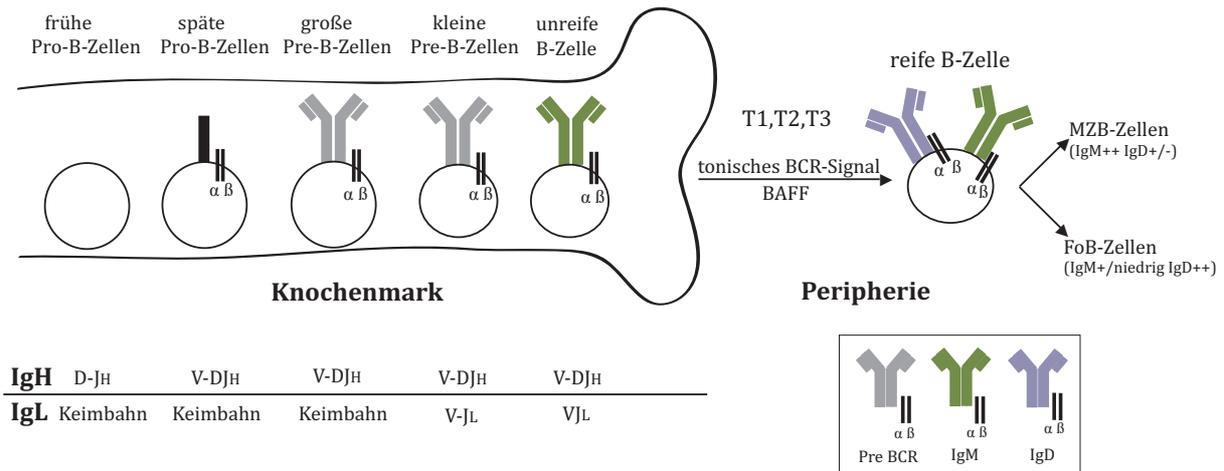


Abbildung 1 Frühe B-Zellentwicklung mit den unterschiedlichen Entwicklungsstadien. In der frühen B-Zellentwicklung kommt es zur Umlagerungen der Ig-Loci im Knochenmark sowie zur B-Zellentwicklung in der Peripherie. Unreife B-Zellen wandern als transitionale B-Zellen (T1, T2, T3) in die Milz, wo sie sich zu folliculären B-Zellen (FoB) und Marginalzonen-B-Zellen (MZB) weiterentwickeln können.

Sobald die schwere oder leichte Kette erfolgreich umgelagert worden ist, werden weitere Umlagerungen auf dem zweiten Allel verhindert, um zu garantieren, dass jede B-Zelle nur einen spezifischen BCR exprimiert („allelic exclusion“) (Alt et al., 1984, Rajewsky, 1996). Führt die Rekombination auf dem 1. Allel zu keiner erfolgreichen Umlagerung der schweren und leichten Kette, wird eine erfolgreiche Umlagerung der Ig-Gene auf dem 2. Allel versucht. B-Zellen, deren Rekombinationsprozess zu keinem funktionellen BCR führen, werden durch Apoptose negativ selektioniert. Außerdem darf der BCR keine körpereigenen Strukturen erkennen. B-Zellen, welche Selbstantigene erkennen, werden entweder durch Apoptose (klonale Deletion) eliminiert, als anerge Zellen in die Peripherie entlassen oder durch erneute Umlagerungen der Gensegmente („Rezeptor-Editing“) umprogrammiert (Edry and Melamed, 2004). Von den täglich 2×10^4 neu gebildeten B-Zellen in der Maus werden nur 10 % positiv selektioniert und können das Knochenmark als unreife B-Zellen verlassen (Gay et al., 1993, Radic et al., 1993, Tiegs et al., 1993).

Unreife B-Zellen wandern als sogenannte transitionale B-Zellen zuerst in die Milz, wo sie, sofern sie die richtigen Überlebenssignale erhalten, sich zu langlebigen B-Zellen entwickeln. Das Überleben von B-Zellen in der Peripherie hängt neben dem tonischen BCR-Signal, welches unabhängig von der Bindung eines Antigens vermittelt wird

(Lam et al., 1997, Kraus et al., 2004), von Signalen des BAFF-Rezeptors ab (Moore et al., 1999, Schneider et al., 1999, Hsu et al., 2002).

Die Milz besteht zu großen Teilen aus der roten Pulpa, in der rote Blutkörperchen abgebaut werden. Die Lymphozyten umgeben die Arteriolen, die in die Milz eintreten, und bilden die weiße Pulpa.

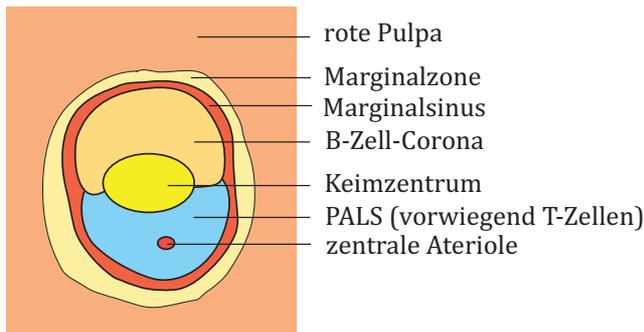


Abbildung 2 Aufbau der Follikel. In die Milz eintretende Arteriolen werden von der PALS-Region umgeben, die zum größten Teil aus T-Zellen sowie aus antigenträgenden dendritischen Zellen besteht. An die PALS-Region („periarterielle lymphatische Scheide“) ist die B-Zell-Zone angeordnet. Nach T-Zell-abhängiger Immunantwort sind in den Sekundärfollikeln Keimzentren zwischen der B- und T-Zell-Zone ausgebildet. Die Follikel sind durch den Marginalsinus und der Marginalzone von der roten Pulpa abgegrenzt (nach Janeway).

Die Follikel der weißen Pulpa sind in eine B- und T-Zell-Zone gegliedert (Abbildung 2). In den Sekundärfollikeln findet man nach T-Zell-abhängiger Immunantwort sogenannte Keimzentren zwischen der B- und T-Zell-Zone. Die Follikel grenzen sich durch den Marginalsinus, an dessen inneren Seite spezialisierten Makrophagen und dessen äußeren Seite die Marginalzonen-B-Zellen sitzen, von der roten Pulpa ab.

Reife B-Zellen werden in die folliculären B-Zellen (FoB-Zellen) und Marginalzonen-B-Zellen (MZB-Zellen) unterteilt. Die FoB-Zellen stellen mit ca. 75 % die Haupt-B-Zellpopulation dar und zirkulieren kontinuierlich durch den Blutstrom und die sekundären lymphoiden Organe. In den Follikeln der Milz und der Lymphknoten erhalten die B-Zellen von folliculären dendritischen Zellen Signale, die ihnen helfen sich zu langlebigen Zellen zu etablieren (Kosco and Gray, 1992). Die MZB-Zellen dagegen zirkulieren nicht durch den Blutstrom, sondern halten sich an der Grenze der weißen und roten Pulpa nahe dem Marginalsinus der Milz auf. Diese B-Zellen haben eine verminderte Antigenspezifität und spielen eine essentielle Rolle in der humoralen Immunantwort gegen Pathogene des Bluts. Neben den bisher erwähnten B-Zell-Populationen, die im allgemeinen als B2-Zellen bezeichnet werden, existieren sogenannte B1-Zellen.

1.2.2 B1-Zellen

B1-Zellen kommen hauptsächlich im Bauchraum von Mäusen vor und sind nur selten in Milz und Lymphknoten vertreten und werden von B2-Zellen durch die Expression von Oberflächenmarkern unterschieden. Im Gegensatz zu den B2-Zellen exprimieren die B1-Zellen CD43 und niedrige Mengen der B-Zellmarker B220, IgD und CD23. Außerdem exprimieren die im Bauchraum vorkommenden B1-Zellen im Gegensatz zu den B1-Zellen der Milz den Oberflächenmarker Mac-1. Die B1-Zellen werden in die zwei Subpopulationen B1a (CD5⁺) und B1b (CD5^{niedrig}) untergliedert. Die Antikörper, die von B1-Zellen sezerniert werden, werden als niederaffin und polyreaktiv beschrieben und erkennen oft Selbstantigene wie beispielsweise Phosphatidylcholin, DNA und Membranproteine auf Erythrozyten und Thymozyten (Fagarasan et al., 2000). Auch 27 Jahre nach ihrer Entdeckung ist die Herkunft der B1-Zellen nicht geklärt. Es gibt vier Theorien über ihre Entstehung: (i) Die sogenannte Linien-Hypothese geht davon aus, dass B1- und B2-Zellen unterschiedliche Vorläufer haben und damit zwei verschiedenen Zelllinien angehören. Diese Theorie basiert auf adoptiven Transferstudien, die zeigten, dass durch den Transfer fötaler Leberzellen das B1- und B2-B-Zell-Kompartiment in bestrahlten Mäusen rekonstituiert werden konnte, während adulte Knochenmarkszellen nur zur Generierung von B2-Zellen führen (Berland and Wortis, 2002). Neuere Studien unterstützen diese Theorie und beschreiben sogenannte B1-B-Zellvorläufer in fötalen und adulten Geweben (Montecino-Rodriguez et al., 2006, Tung et al., 2006). (ii) Die zweite Theorie geht davon aus, dass die BCR-Spezifität über die Differenzierung in B1-Zellen entscheidet. Diese Theorie basiert auf Studien, die zeigten, dass B1-Zellen nur ein bestimmtes Repertoire an BCR aufweisen. Außerdem haben *in vivo* Studien gezeigt, dass die Expression der Ig-Transgene V_H12-V_K4 und V_H11-V₉, die vor allem von B1-Zellen exprimiert werden, die B1-Zellentwicklung fördert (Arnold et al., 1994, Chumley et al., 2000). (iii) Die Antigen-induzierte Differenzierungshypothese schlägt vor, dass die B1-Zellen aus B2-Zellen-Vorläufern entstehen, die durch ein T-Zell-unabhängiges Typ-II-Antigen stimuliert worden sind (Fagarasan et al., 2000). Diese Hypothese wird durch *in vitro* Studien gestützt, welche beschreiben, dass durch Antigenstimulierung aus B2-Zellen Zellen mit einem B1-B-Zell-Phänotyp entstehen können (Cong et al., 1991). (IV) Eine weitere Theorie ist, dass die Stärke des BCR-Signals einen Einfluss auf die B1-B-Zell-Entstehung hat. Diese Theorie basiert auf Experimenten

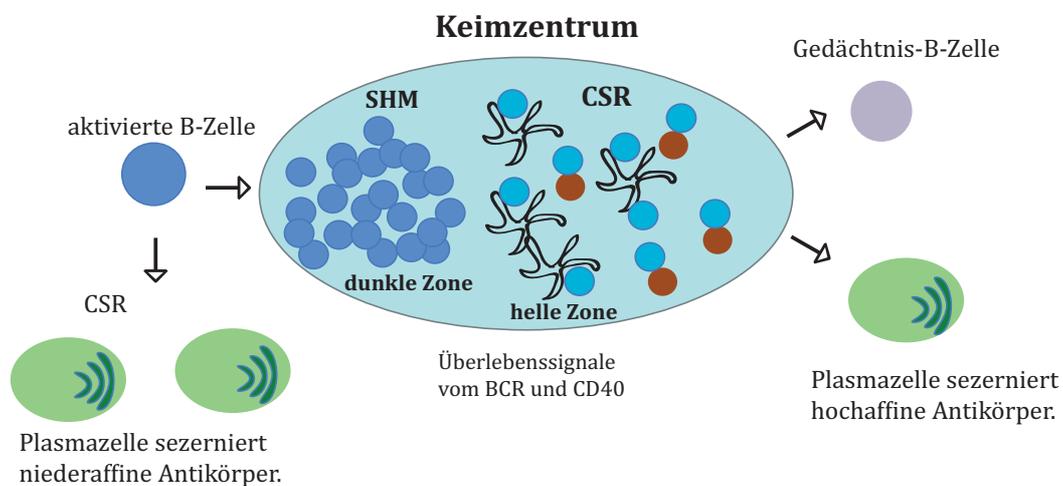
mit LMP2A-transgenen Mäusen, die anstelle des BCR das Epstein-Barr virale Protein LMP2A exprimieren, welches ein funktionelles Homolog des BCR darstellt und diesen ersetzen kann (Casola et al., 2004, Caldwell et al., 1998). Die Gruppe von Klaus Rajewsky konnte zeigen, dass ein schwaches konstitutives LMP2A-Signal vor allem die Bildung von FoB- und MZB-Zellen unterstützt, während ein starkes LMP2A-Signal hauptsächlich zur Entstehung von B1-Zellen führt (Casola et al., 2004). Diese Daten werden von Studien unterstützt, die zeigen, dass die genetische Inaktivierung von Genen, die das BCR-Signal positiv beeinflussen wie z.B. CD19, CD21 oder Btk, einen negativen Einfluss auf die Bildung von B1-Zellen hat (Inaoki et al., 1997, Ahearn et al., 1996, Khan et al., 1995). Dagegen konnten in Mäusen, in denen negative Regulatoren des BCR-Signals mutiert waren wie beispielsweise SHP-1 (Pao et al., 2007) oder Lyn (Chan et al., 1997), und damit das BCR-Signal verstärkt war, vermehrt B1-Zellen beobachtet werden.

1.2.3 B-Zellaktivierung

Reife ruhende B-Zellen werden durch die Bindung eines Antigens aktiviert. B-Zellen können, abhängig von dem Antigen auf das sie treffen, eine T-Zell-abhängige (TD) oder T-Zell-unabhängige (TI) Immunantwort ausführen. Die TD-Immunantwort beginnt in der Milz an der „periarteriellen lymphatischen Scheide“ (PALS), wo B-Zellen auf T-Zellen treffen. Nach der Bindung von TD-Antigenen durch den BCR wird das Antigen internalisiert, prozessiert und anschließend durch den MHC-II-Komplex auf der Oberfläche von B-Zellen präsentiert. CD4⁺-Helfer-T-Zellen mit derselben Spezifität für ein bestimmtes Antigen werden zunächst durch dendritische Zellen aktiviert. Anschließend treffen die B- und T-Zellen an der Grenze zwischen der folliculären B-Zell-Zone und der T-Zell-Zone aufeinander, an der die aktivierten T-Zellen nun B-Zellen mit derselben Antigenpezifität aktivieren können (Parker, 1993). Der TCR bindet das MHC-II-Molekül und das präsentierte Antigen auf B-Zellen. Die Aktivierung der B-Zelle erfolgt zum einen durch die von T-Helferzellen ausgeschütteten Zytokine und zum anderen durch die direkte Interaktion mit den T-Zellen über die von diesen gebildeten Liganden wie z.B. dem CD40-Liganden (CD40L), der mit dem CD40-Rezeptor (CD40) der B-Zelle interagiert. Die aktivierten B-Zellen wandern zur Grenze der T-Zell-Zone, wo sie stark proliferieren (klonale Expansion) und den sogenannten Primärfocus bilden. Einige

aktivierte B-Zellen wandern in extrafollikuläre Bereiche, wo es zum Klassenwechsel des Immunglobulin-Lokus kommt (Abbildung 3). In diesem Prozess erfolgt durch nicht-homologe-Rekombination der „Switch“-Region ein Wechsel der Ig-Isotypen von IgM zu IgG1 (Gray et al., 1996). Diese Zellen differenzieren zu sogenannten extrafollikulären Plasmazellen, die niederaffine Antikörper sezernieren und für eine schnelle, jedoch nicht sehr spezifische Immunantwort sorgen (MacLennan et al., 2003).

Andere aktivierte B-Zellen bilden Keimzentren aus, um hochspezifische Antikörper zu bilden.



extrafollikuläre Differenzierung



Abbildung 3 Die humorale Immunantwort. Diese Abbildung zeigt, dass aktivierte B-Zellen entweder an der Keimzentrumsreaktion teilnehmen oder extrafollikulär zu Plasmazellen differenzieren können. Extrafollikulär gebildete Plasmazellen sezernieren niederaffine Antikörper. In der Keimzentrumsreaktion finden der Klassenwechsel und die Affinitätsreifung von Antikörpern statt. Das Keimzentrum gliedert sich in die dunkle Zone mit den stark proliferierenden B-Zellen (Zentroblasten) und in die helle Zone, in der follikuläre dendritische Zellen FDCs den sich nicht mehr teilenden B-Zellen (Zentrozyten) Antigene präsentieren. In der hellen Zone treffen die B-Zellen außerdem auf T-Zellen, die B-Zellen mit einem hochaffinen BCR-Rezeptor über CD40 Überlebenssignale vermitteln, während niederaffine B-Zellen durch Apoptose sterben. B-Zellen verlassen das Keimzentrum als Plasmazellen, welche hochaffine Antikörper sezernieren, oder als Gedächtnis-B-Zellen.

Die Keimzentrumsreaktion kann in der Milz, den Lymphknoten und den Peyer's Patches einige Tage nach Kontakt mit dem TD-Antigen stattfinden. Sie ist essentiell für die Produktion hochaffiner Antikörper. In der ersten Phase der Keimzentrumsreaktion kommt es zu einer starken Proliferation der B-Zellen (dunkle Zone). Diese schnell proliferierenden B-Zellen werden als Zentroblasten bezeichnet. In ihnen kommt es zur somatischen Hypermutation (SHM), bei welcher die Gene der variablen Region der Ig-Gene mit einer Mutationsrate von 10^{-3} /Nukleotid verändert werden, um die Spezifität für ein Antigen zu erhöhen (Liu et al., 1997). Außerdem kommt es in der Keimzentrumsreaktion zum Klassenwechsel (CSR) der Ig. Beim Klassenwechsel wird die konstante Region μ durch eine andere konstante Region (γ , α oder ϵ) ersetzt. Es entstehen Antikörper mit verschiedenen konstanten Regionen, die jedoch die gleiche Antigenspezifität besitzen. Die verschiedenen Ig-Isotypen vermitteln unterschiedliche Effektorfunktionen und agieren an unterschiedlichen Orten. Das Enzym AID (Activation-Induced Cytidine Deaminase) ist sowohl für die SHM als auch für die CSR essentiell (Revy et al., 2000, Muramatsu et al., 2000). Die SHM kann neben der Bildung hochspezifischer Antikörper auch zum Verlust oder zur Verschlechterung der Antigenerkennung führen. Daher gibt es im Keimzentrum einen Selektionsprozess, der gewährleistet, dass nur B-Zellen mit einem hochaffinen gegen ein Fremdantigen gerichteten BCR die Keimzentrumsreaktion verlassen können. Follikuläre dendritische Zellen (FDCs) präsentieren den B-Zellen (Zentrozyten) im Keimzentrum Antigene, wodurch die Affinität des BCRs getestet wird. Überlebenssignale für B-Zellen im Keimzentrum werden neben dem BCR-Signal durch CD40-Signale von T-Helferzellen (Th) vermittelt. Niederaffine B-Zellen bekommen im Keimzentrum keine Überlebenssignale und werden durch Apoptose eliminiert (Wolniak et al., 2004). Hochaffine B-Zellen verlassen die Keimzentrumsreaktion entweder als Antikörperproduzierende Plasmazellen oder als langlebige Gedächtnis-B-Zellen. Die Plasmazellen wandern zum Knochenmark, in dem sie für lange Zeit persistieren und hochaffine Antikörper sezernieren (Slifka et al., 1998). Gedächtnis-B-Zellen sind langlebige B-Zellen, die sich in sekundären lymphoiden Geweben der Peripherie aufhalten. Sie stellen die Haupteffektorzellen der sekundären Immunantwort dar (McHeyzer-Williams and McHeyzer-Williams, 2005). Im Gegensatz zur TD-Immunantwort wird bei der TI-Antwort weder eine Affinitätsreifung des BCR induziert, noch werden

Gedächtnis-B-Zellen generiert. Vor allem MZB- und B1-Zellen führen diese schnelle, jedoch unspezifische TI-Immunantwort aus, wohingegen die FoB-Zellen hauptsächlich eine TD-Immunantwort ausführen (Rajewsky, 1996, Martin et al., 2001, Martin and Kearney, 2002).

1.3 B-Zell-Lymphome

Ca. 95 % aller Lymphome haben einen B-Zellursprung. Die malignen B-Zellen können aus verschiedenen B-Zelldifferenzierungsstufen entstehen. Allerdings stammen die meisten B-Zell-Lymphome von Keimzentrums- oder Post-Keimzentrums-B-Zellen ab, da die im Keimzentrum stattfindenden Rekombinationsprozesse ein hohes Risiko für eine Transformation von B-Zellen darstellen. Es kommt beim Klassenwechsel und bei der somatischen Hypermutation zu Doppelstrangbrüchen der DNA, welche das Risiko für genetische Aberrationen erhöhen. Lymphome sind oft durch die Translokation von Genen in die schwere oder leichte Kette der Ig-Loci charakterisiert. Sogenannte Protoonkogene werden dadurch unter die Kontrolle der Ig-Loci gestellt und damit dereguliert und konstitutiv exprimiert, was zu einer unkontrollierten Proliferation der Zellen führen kann. So ist das Burkitt-Lymphom durch die Translokation von *c-Myc* in die Ig-Loci gekennzeichnet. Im diffusen großzelligen B-Zell-Lymphom (DLBCL) wurden Translokationen von *c-Myc*, *Bcl2* und *Bcl6* nachgewiesen. Aber auch die Rekombination der VDJ-Gene in der frühen B-Zellentwicklung im Knochenmark stellt ein Risiko für Translokationen von Genen in die Ig-Loci dar (z.B. *Bcl2* im folliculären Lymphom). Außerdem können durch die SHM auch Gene außerhalb der Ig-Loci mutiert werden, die dann Einfluss auf die Tumorentstehung haben. In vielen Tumoren konnten inaktivierende Mutationen von *CD95* detektiert werden, welche den Zellen einen Überlebensvorteil bieten, da *CD95*-Signale normalerweise Apoptose vermitteln (DLBCL, MALT-Lymphom, Multiples Myelom). Aber auch Viren wie z.B. das Epstein-Barr-Virus (EBV) oder das humane Herpesvirus 8 werden in Zusammenhang mit der Transformation von B-Zellen gebracht. Das bekannteste Beispiel ist EBV, welches in fast allen Fällen des endemischen Burkitt-Lymphoms und in ca. 40 % des klassischen Hodgkin Lymphoms nachgewiesen wurde (Kuppers, 2005).

1.4 Das Hodgkin Lymphom

Das Hodgkin Lymphom (HL) ist eines der häufigsten Lymphome der westlichen Welt. Man unterscheidet hierbei das lymphozytenprädominante HL, welches 5 % der Erkrankungen ausmacht, von dem klassischen HL (cHL). Das cHL wird wiederum in die nodulär-sklerotisierende Form (60 %), die gemischtzellige Form (30 %) und die lymphozytenreiche oder lymphozytenarme Form eingeteilt. Die Tumorzellen des cHL werden als Hodgkin-Reed-Sternberg-Zellen (HRS-Zellen) bezeichnet. Die malignen B-Zellen des HL machen nur ca. 1 % des Tumorgewebes aus, während der Rest des Tumorgewebes aus eingewanderten Zellen des Immunsystems besteht (Kuppers, 2009). Da die Expression der Oberflächenmarker von HRS-Zellen keinem eindeutigen Zelltyp zugeordnet werden kann, war der Ursprung der Tumorzellen lange unklar. Der Nachweis, dass in HRS-Zellen die Ig-Gene umgelagert und deren V-Regionen mutiert sind, zeigte schließlich, dass die Tumorzellen von B-Zellen, die eine Keimzentrumsreaktion durchlaufen haben, abstammen (Kuppers et al., 1996, Kanzler et al., 1996). HRS-Zellen sind durch den Verlust der Expression von BCR-Komponenten, eine hohe NF- κ B-Aktivität und eine hohe Expression von Notch-Rezeptoren und Notch-Liganden gekennzeichnet. Sie grenzen sich von anderen B-Zell-spezifischen Lymphomen vor allem dadurch ab, dass sie die meisten B-Zell-spezifischen Gene nicht mehr exprimieren. Mögliche Gründe könnten sein, dass Transkriptionsfaktoren wie OCT-2, BOB1 oder PU.1, die für die Expression B-Zell-spezifischer Gene verantwortlich sind, in den Tumorzellen nicht mehr exprimiert werden (Re et al., 2001, Jundt et al., 2002b, Stein et al., 2001). Die genauere Analyse von HRS-Zellen zeigte, dass in einem Viertel der Tumore sogar sogenannte „nonsense“-Mutationen (Verschiebung des Leserasters oder STOP-Kodons) in den Ig-Loci vorliegen, die zum vollständigen Verlust der Ig-Expression führen (Kanzler et al., 1996). Normalerweise werden solchen Zellen in der Keimzentrumsreaktion durch Apoptose eliminiert (Liu et al., 1997). Es wird angenommen, dass die konstitutiv hohe NF- κ B- und Notch-Aktivität in HRS-Zellen die negative Selektion dieser Zellen verhindert und sie in einem proliferativen Stadium halten (Jundt et al., 2002a). Die Ursache für die hohe NF- κ B-Aktivität in HRS-Zellen könnte die hohe Expression von Mitgliedern der TNFR-Superfamilie wie CD40 und CD30 sein (Carbone et al., 1995, Fiumara et al., 2001, Schwab et al., 1982). Die infiltrierten Immunzellen, welche die Tumorzellen des HL

umgeben, exprimieren die Liganden für CD40 und CD30, was theoretisch zur konstitutiven NF- κ B-Signalweiterleitung von CD40 und CD30 führen kann (Carbone et al., 1995, Molin et al., 2001, Pinto et al., 1996), sowie zur Aktivierung von PI3K/Akt, ERK und JNK, die ebenfalls in HRS-Zellen dereguliert sind (Dutton et al., 2005, Mathas et al., 2002, Zheng et al., 2003).

CD30 und CD40 aktivieren sowohl den kanonischen als auch nicht-kanonischen NF- κ B-Signalweg (Abbildung 4). Die Aktivierung des kanonischen NF- κ B-Signalwegs wird durch die Aktivierung des IKK-Komplexes, der aus IKK γ , IKK α und IKK β besteht, über RIP1 eingeleitet (Zhang et al., 2000, Poyet et al., 2000). Der aktivierte IKK-Komplex führt zur Phosphorylierung und Degradierung des Inhibitors I κ B α , welcher normalerweise die Komponenten des kanonischen Signalwegs p65, p50 und c-Rel im Zytoplasma hält. Nach Degradierung von I κ B α können die Komponenten des kanonischen Signalwegs als p50/c-Rel- oder p50/RelA-Dimere in den Kern wandern und die Transkription ihrer Zielgene starten. P50 wird durch die konstitutive Prozessierung des Vorläuferproteins p105 gebildet. Die Aktivierung des nicht-kanonischen NF- κ B-Signalwegs erfolgt über die Aktivierung der Kinase NIK, die über IKK α zur Phosphorylierung und damit Prozessierung von p100 zu p52 führt. Dadurch können die Dimere p52/RelB in den Kern wandern und die Expression ihre Zielgene einleiten (Pomerantz and Baltimore, 2002).

Eine weitere mögliche Ursache für die hohe NF- κ B-Aktivität in HRS-Zellen ist die Amplifikation des c-Rel-Gens, das in fast der Hälfte der Tumoren zur verstärkten Expression von c-Rel führt (Barth et al., 2003). Mutationen in *NFKBIA*, welche I κ B α inaktivieren (Cabannes et al., 1999, Emmerich et al., 1999, Jungnickel et al., 2000), und Mutationen in *TNFAIP3*, das Gen für A20, (Schmitz et al., 2009) werden ebenfalls für die hohe NF- κ B-Aktivität verantwortlich gemacht. A20 inhibiert die NF- κ B-Signalweiterleitung durch das Entfernen der K63-Ubiquitinketten von RIP1, welche für dessen Aktivität notwendig ist, sowie durch K48-Ubiquitinierung, welche den proteasomalen Abbau von RIP1 induziert (Wertz et al., 2004). In 50 % der HRS-Zellen konnte das Epstein-Barr-Virus (EBV) nachgewiesen werden. Das Virus exprimiert im HL die Proteine LMP1 und LMP2A, die CD40 und den BCR imitieren und damit zur Rettung der pro-apoptotischen B-Zellen beitragen könnten (Brauninger et al., 2006).

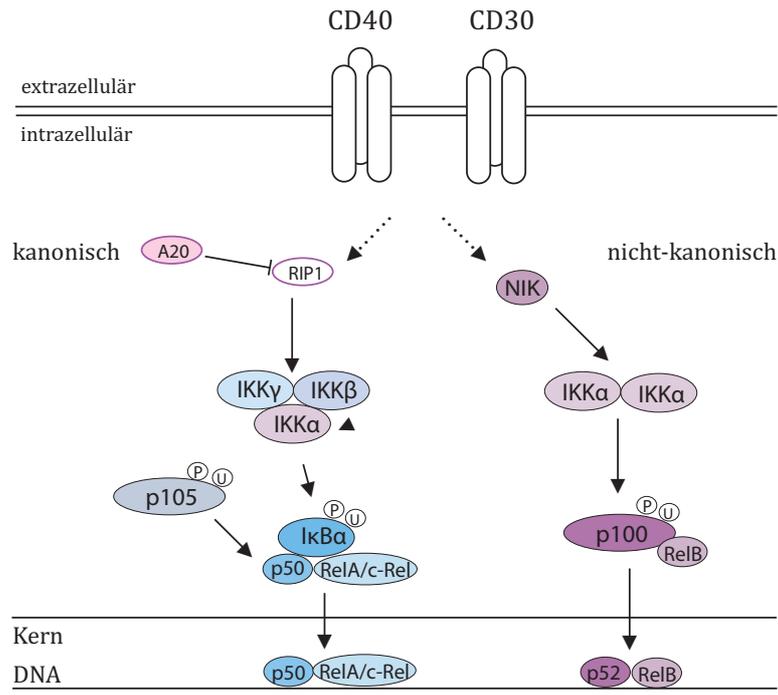


Abbildung 4 NF-κB-Aktivierung. Diese Abbildung zeigt, dass die Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptoren (TNFR) CD30 und CD40 den kanonischen und nicht-kanonischen NF-κB-Signalweg aktivieren. Rezeptoren der TNFR-Familie aktivieren den kanonischen NF-κB-Signalweg über RIP1, das zur Aktivierung des IKK-Komplexes führt. A20 kann zur Inaktivierung und zum Abbau von RIP1 führen und damit NF-κB gegen regulieren. Die Aktivierung des nicht-kanonischen NF-κB-Signalwegs erfolgt über die Kinase NIK.

1.5 Das Epstein-Barr-Virus

EBV gehört zur Familie der γ -Herpes-Viren und wurde erstmals 1964 als mögliche Ursache von Burkitt-Lymphomen (BL) beschrieben (Epstein et al., 1964). Inzwischen wird EBV in Zusammenhang mit vielen B-Zell-Lymphomen gebracht. Ca. 95 % der BL in Afrika und ca. 50 % der HL sind EBV-positiv. Aber auch die Posttransplantations-Lymphoproliferative Erkrankung (PLTD) oder das primäre Effusionslymphom (PEL) sind teilweise mit EBV-Infektionen korreliert. Ca. 95 % der erwachsenen Bevölkerung sind mit dem Virus infiziert. Die Infektion erfolgt meistens asymptomatisch im Kindesalter, wobei das Virus hauptsächlich ruhende reife B-Zellen befällt (Young and Rickinson, 2004). Das Virus wird über den Speichel übertragen und infiziert zunächst B-Zellen in oder unterhalb des Epithels des Oropharynx. Das Virus wird über den Komplement-Rezeptor CR2/CD21 mittels Endozytose in die B-Zellen aufgenommen. Die Virus-DNA wird in der Zelle zirkularisiert, amplifiziert und episomal an die Tochterzellen

weitergegeben. Nach der Infektion kommt es zur einer Expansionsphase der infizierten B-Zellen, in der das Virus das sogenannte Latenzprogramm III exprimiert. Auch *in vitro* kann EBV ruhende B-Zellen infizieren und diese zur Proliferation anregen, was zur Etablierung lymphoblastoider Zelllinien (LCL) führt, in denen ebenfalls das Latenzprogramm III exprimiert wird. In diesem Latenzstadium III werden 9 virale Proteine (EBNA1-EBNA6, LMP1, LMP2A, LMP2B) und die zwei nicht polyadenylierten RNAs EBER1 und -2 sowie die BARTSs („highly spliced BamA rightward transcripts“) exprimiert, die alle mehr oder weniger zur Immortalisierung der B-Zellen beitragen. EBNA2 ist das Schlüsselprotein in der Latenz III, da es die Expression der anderen in der Latenz III exprimierten viralen Gene induziert. *In vivo* wachsen jedoch die Zellen nicht unbegrenzt weiter, da proliferierende EBV-infizierte Zellen vom Immunsystem erkannt und eliminiert werden. Jedoch scheinen einige EBV-positive B-Zellen dieser Immunantwort durch das Abschalten fast aller viralen Proteine zu entgehen. In den langlebigen Gedächtnis-B-Zellen liegt das Virus in der Latenz I/O vor, indem entweder nur EBNA1 und die EBERs oder keine viralen Gene exprimiert werden. In diesem Zustand kann das Virus der Immunantwort entgehen und eine lebenslange Persistenz etablieren (Babcock et al., 1998). Thorley-Lawson postulierte, dass EBV-infizierte Zellen die Keimzentrumsreaktion durchlaufen müssen, um das Latenzstadium II zu erreichen. Die Theorie basiert auf Studien, die zeigten, dass die Latenz III nur in naiven B-Zellen, die Latenz I/O in Gedächtnis-B-Zellen und die Latenz II als ein Übergangsstadium in Keimzentrums-B-Zellen exprimiert wird. In der Latenz II werden nur 3 virale Proteine, EBNA1, LMP1 und LMP2A exprimiert. Die Gruppe um Thorley-Lawson postuliert, dass LMP1 und LMP2A in Keimzentrums-B-Zellen Überlebens- und Proliferationssignale vermitteln können und damit solchen B-Zellen, welche normalerweise negativ selektioniert werden, helfen zu überleben (Thorley-Lawson, 2001). Da fast alle HRS-Zellen mit „nonsense“-Mutationen in den Ig-Loci EBV positiv sind, und das Virus in den Tumorzellen des HL das Latenz II Programm exprimiert, vermutet man, dass die Expression der viralen Proteine LMP1 und LMP2A solchen Keimzentrums-B-Zellen Überlebenssignale vermittelt. EBNA1 ist in allen EBV-positiven, proliferierenden Zellen exprimiert (Hochberg et al., 2004) und für die Replikation der zirkulären viralen DNA während der Mitose und die Verteilung auf die Tochterzellen von Bedeutung.

1.5.1 Die viralen Proteine LMP1 und LMP2A

1.5.1.1 LMP1

LMP1 wird als ein funktionelles Homolog des aktiven CD40-Rezeptors angesehen. Sowohl die Expression von LMP1 als auch die Aktivierung von CD40 führt in B-Zellen zur Proliferation und rettet B-Zellen vor der Apoptose (Zimber-Strobl et al., 1996). Das CD40 Signal kann in LCLs die Expression von LMP1 ersetzen und Proliferation und Überleben vermitteln (Kilger et al., 1998). Außerdem können beide Proteine mit den Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor-assoziierten Faktoren (TRAFs) interagieren und ähnliche Signalwege wie ERK, JNK, p38 und NF- κ B induzieren (Lam and Sugden, 2003).

Durch *in vivo* Experimente wurde gezeigt, dass die Expression von LMP1 das CD40 Signal nur teilweise ersetzen kann. Die Expression von LMP1 führt zwar zur extrafollikulären B-Zelldifferenzierung, aber im Gegensatz zu CD40 kann LMP1 nicht die Keimzentrumsreaktion induzieren (Uchida et al., 1999). Einer der größten Unterschiede ist die Liganden-unabhängige konstitutive Signalweiterleitung von LMP1, die durch die Selbstaggregation der 6 membrandurchspannenden Regionen von LMP1 vermittelt wird (Gires et al., 1997). Außerdem interagieren LMP1 und CD40 nicht exakt mit den gleichen Molekülen. So bindet LMP1, aber nicht CD40, die Proteine TRADD und RIP (Izumi et al., 1999).

Im Gegensatz zu CD40 wurde das virale Protein LMP1 als ein Onkogen beschrieben, da es zur Immortalisierung von primären Rattenfibroblasten führt und essentiell für die Immortalisierung von EBV-infizierten B-Zellen ist (Wang et al., 1985, Kaye et al., 1993). In Mäusen führte die Expression von LMP1 zur Lymphomentstehung (Kulwichit et al., 1998). Da *in vivo* Studien unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass auch ein konstitutiv aktives CD40-Signal (in Form des Fusionsproteins LMP1/CD40) im Gegensatz zur Expression einer CD40-ligandenabhängigen zytoplasmatischen Region von LMP1 (in Form des Fusionsproteins CD40/LMP1) zu Lymphomen führt, geht man davon aus, dass die konstitutive Signalweiterleitung, und nicht die Signaldomäne per se, für das onkogene Potential von LMP1 verantwortlich ist (Homig-Holzel et al., 2008, Rastelli et al., 2008).

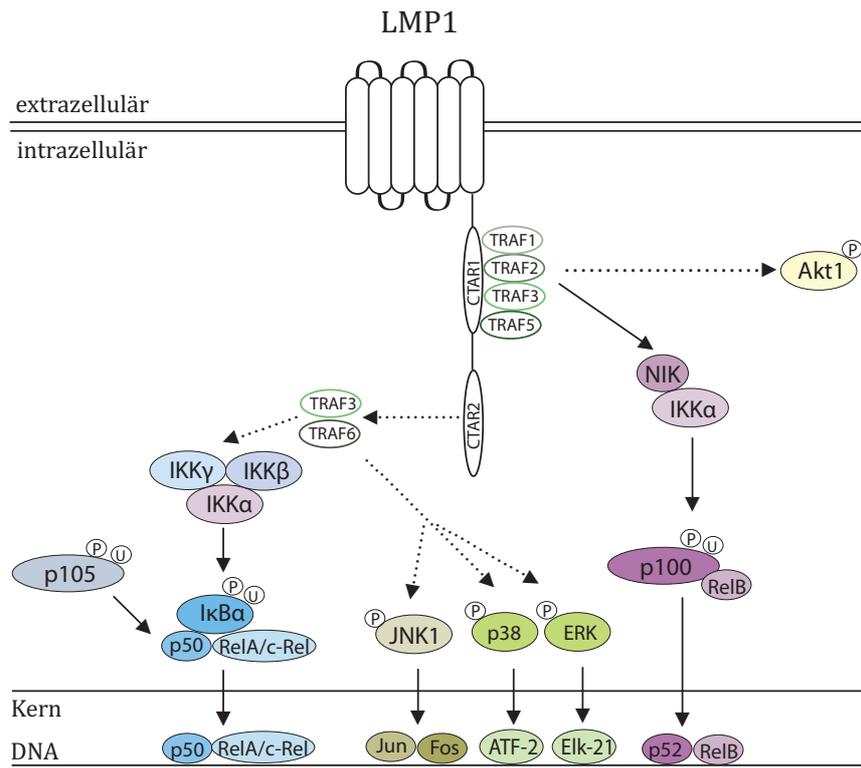


Abbildung 5 LMP1-induzierte Signalwege. LMP1 kann den kanonischen und den nicht-kanonischen NF- κ B-Signalweg über die Domäne CTAR2 oder CTAR1 aktivieren. Außerdem ist bekannt, dass LMP1 zur Aktivierung von JNK1, p38 und ERK und Akt führen kann.

Die zytoplasmatische Domäne von LMP1 wird in die Regionen CTAR1 und CTAR2 unterteilt, die zur Aktivierung verschiedener Signalwege führt (Abbildung 5). Durch die Domäne CTAR1 wird der nicht-kanonische NF- κ B-Signalweg aktiviert, während durch CTAR2 der kanonische NF- κ B-Weg induziert wird (Devergne et al., 1996, Floettmann and Rowe, 1997, Huen et al., 1995, Eliopoulos et al., 2003, Atkinson et al., 2003, Saito et al., 2003, Luftig et al., 2004). Die Aktivierung von JNK1 erfolgt ebenfalls über die CTAR2-Region (Kieser et al., 1997, Eliopoulos and Young, 1998). Außerdem konnte in Fibroblastenzellen durch die Expression von LMP1 die Aktivierung des PI3K-Signalwegs beobachtet werden (Dawson et al., 2003, Mainou et al., 2005). Durch das Fusionsprotein CD40/LMP1 wurde gezeigt, dass ERK durch die zytoplasmatische Domäne von LMP1 aktiviert werden kann (Rastelli et al., 2008).

1.5.1.2 LMP2A

Da LMP2A in B-Zellen, die über keinen funktionellen BCR verfügen, BCR-ähnliche Überlebenssignale vermittelt, wird es als ein konstitutiv aktives, funktionelles Homolog des BCR angesehen (Caldwell et al., 1998, Mancao et al., 2005). LMP2A ist ein Transmembranprotein mit 12 membrandurchspannenden Domänen, durch welche es selbst aggregieren und damit liganden-unabhängig Signale weiterleiten kann. Die zytoplasmatische Domäne enthält wie die Signalmoleküle $Ig\alpha$ und $Ig\beta$ des BCRs ITAM-Motive, welche im phosphorylierten Zustand Lyn und Syk rekrutieren können (Fruehling et al., 1998) (Abbildung 6). Da LMP2A in nasopharyngealen Tumoren und im HL exprimiert wird, vermutet man, dass es einen Einfluss auf die Entstehung EBV-assoziiierter Tumore hat. Es konnte gezeigt werden, dass LMP2A epitheliale Zellen transformieren kann (Scholle et al., 2000) während die Expression von LMP2A nicht essentiell für die Immortalisierung von B-Zellen ist (Longnecker et al., 1992, Brielmeier et al., 1996). Man vermutet, dass LMP2A einen Einfluss auf EBV-assoziierte B-Zell-Tumore hat, da LMP2A pro-apoptotischen B-Zellen im Keimzentrum Überlebenssignale vermitteln kann (Chaganti et al., 2005, Mancao et al., 2005, Bechtel et al., 2005).

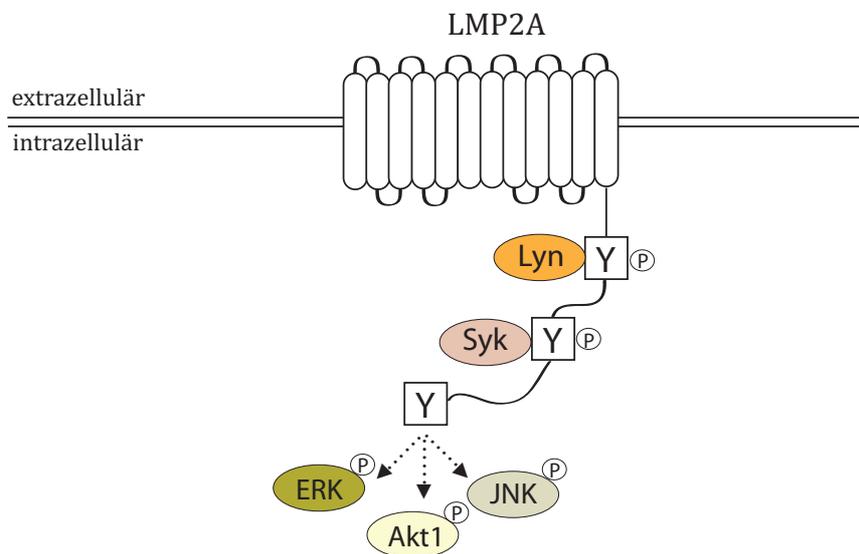


Abbildung 6 LMP2A-induzierte Signalwege. In murinen B-Zellen konnte eine konstitutive Aktivierung des Akt-Signalwegs beobachtet werden. In LMP2A-exprimierenden Epithelzellen wurde außerdem eine Aktivierung von ERK und JNK nachgewiesen.

Studien mit murinen LMP2A-exprimierenden B-Zellen zeigten, dass LMP2A konstitutiv den Ras/PI3K/Akt-Signalweg induzieren kann, welcher oft in Tumoren aktiv ist (Portis and Longnecker, 2004). In Epithelzellen wurde durch die Expression von LMP2A die Aktivierung von ERK, JNK und p38 vermittelt (Chen et al., 2002).

1.6 CD30

Der Rezeptor CD30 wurde ursprünglich als typischer Marker für HL beschrieben, konnte später aber auch auf vielen Non-Hodgkin-Lymphomen (z.B. BL, Mediastinale Große B-Zell-Lymphome, Anaplastisches Großzellige Lymphome) nachgewiesen werden. Der Beitrag von CD30 zur Tumorentstehung ist jedoch nicht bekannt. CD30 wird auch auf der Oberfläche virusinfizierter Zellen und auf Lymphozyten nach mitogener Stimulation exprimiert (Schneider and Hubinger, 2002). CD30, ein Mitglied der TNFR-Superfamilie, ist ein Typ I Transmembran Rezeptor (Smith et al, 1993). Im Gegensatz zum humanen CD30-Rezeptor mit einer Länge von 595 Aminosäuren ist der murine CD30-Rezeptor mit 498 Aminosäuren etwas kürzer (Bowen et al., 1996). Die extrazelluläre Domäne besteht aus 6 Cystein-reichen Regionen, die in humanen Zellen dupliziert vorkommt. In der zytoplasmatischen Domäne von CD30 konnte keine katalytische Domäne nachgewiesen werden, obwohl potentielle Phosphorylierungsstellen existieren. Die Signalweiterleitung erfolgt über Signalmediatoren, wie beispielsweise den TRAF-Molekülen. Die zytoplasmatische Region des CD30-Rezeptors wird in die membran-proximale Domäne (D1) und die carboxyterminale Domäne unterteilt. Die carboxyterminale Domäne enthält 2 TRAF-Bindestellen (D2, D3) für TRAF1, TRAF2, TRAF3 und TRAF5. Für die Domäne D1 konnte keine Bindung von TRAF-Molekülen nachgewiesen werden (Lee et al., 1996, Aizawa et al., 1997, Boucher et al., 1997, Duckett et al., 1997, Horie et al., 1998). Die Interaktion von CD30 mit seinem Liganden, der unter anderem auf aktivierten T-Zellen exprimiert wird, führt zur Trimerisierung des Rezeptors und zur Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs und Aktivierung der MAP-Kinasen JNK, ERK und p38 (Schneider and Hubinger, 2002). In normalen Geweben wird CD30 nur auf wenigen lymphoiden Zellen exprimiert, welche in den parafollikulären Regionen und am Rand von Keimzentren gefunden wurden (Stein et al., 1985, Durkop et al., 1997). Bei diesen Zellen handelt es sich wahrscheinlich um aktivierte B- und T-Lymphozyten (Gerdes et al., 1986). Expressionsstudien legen außerdem nahe,

dass CD30 auch auf B1-Zellen exprimiert wird (<http://www.immgen.org>). Obwohl CD30 schon vor über 20 Jahren beschrieben wurde, ist seine biologische Funktion noch nicht vollständig verstanden. Die Signale führen, abhängig vom Zelltyp, entweder zur Proliferation und verbesserten Überleben oder zur Apoptose und zum Zelltod. Die Analyse von konventionellen CD30-Knockout-Mäusen zeigte einen partiellen Defekt in der negativen Selektion von Thymozyten (Amakawa et al., 1996) und in der Aufrechterhaltung von Keimzentren, die wiederum zu einer gestörten sekundären Immunantwort führt (Gaspal et al., 2005). Die Autoren führten die gestörte Keimzentrumsreaktion und Immunantwort auf das Fehlen von CD4⁺-Gedächtniszellen zurück, lassen jedoch eine mögliche Rolle von CD30 in B-Zellen außer Acht. In murinen B-Zellen wurde beschrieben, dass die Stimulierung des CD30-Rezeptors zur Proliferation und erhöhten Antikörper-Produktion führte (Shanebeck et al., 1995). Im Gegensatz dazu wurde in humanen Zellen gezeigt, dass die Expression von CD30 den CD40-induzierten Klassenwechsel und die Antikörperproduktion hemmt (Cerutti et al., 1998). Da die Tumorzellen des HL von CD30-Ligand-exprimierenden Zellen umgeben sind, ist anzunehmen, dass CD30-Signale zur Deregulierung von Signalwegen im HL beitragen. Jedoch steht der experimentelle Beweis, dass deregulierte CD30-Signale bei dem Transformationsprozess von B-Zellen eine Rolle spielen, noch aus.

1.7 Das Modellsystem zur Untersuchung von LMP1 und/oder LMP2A in B-Zellen

Um die Effekte der Co-Expression von LMP1 und LMP2A unabhängig von EBNA2 und anderen durch EBNA2-induzierten Proteinen in B-Zellen zu untersuchen, transfizierte Julia Rastelli stabil episomal replizierende Tet-On-Expressionsplasmide (Bornkamm et al., 2005) für LMP1 und LMP2A einzeln und in Kombination in die Zelllinie EREB2-5 (Rastelli, 2007). EREB2-5-Zellen sind konditional EBV-immortalisierte lymphoblastoide humane B-Zellen (LCL), in welchen die Funktion des viralen Proteins EBNA2 östrogenabhängig ist (Kempkes et al., 1995). EBNA2 spielt eine Schlüsselrolle in der Latenz III und induziert die Expression der anderen Proteine der Latenz III. In den EREB2-5-Zellen kann durch Östrogenentzug die Funktion von EBNA2 abgeschaltet und

damit das Latenz III-Programm abgestellt werden. B-Zellen, in denen EBNA2 inaktiviert wurde, verhalten sich wie ruhende B-Zellen und sterben nach ca. 5 Tagen. Durch die Transfektion der Expressionsplasmide war es nun möglich, auch nach Abschalten der Latenz III, also EBNA2 unabhängig, LMP1 und LMP2A in B-Zellen zu exprimieren und somit ihren Einfluss auf B-Zellen zu untersuchen. EBNA1 war auf allen Expressionsplasmiden kodiert und ist für die Erhaltung der episomalen Vektoren von Bedeutung.

Es wurden 4 verschiedene Zelllinien von Julia Rastelli generiert (Abbildung 7):

- 1) EREB-EBNA1: Nach Inaktivierung von EBNA2 wird nur EBNA1 exprimiert. Diese Zelllinie diente als Negativkontrolle, da nach Östrogenentzug weder LMP1 noch LMP2A exprimiert werden.
- 2) EREB-LMP2A: Nach Östrogenentzug wird LMP2A von einem bidirektionalen Doxycyclin-induzierbaren Promotor exprimiert.
- 3) EREB-LMP1: Nach Abschalten von EBNA2 wird LMP1 von dem bidirektionalen Doxycyclin-induzierbaren Promotor exprimiert.
- 4) EREB-LMP1/2A: Nach Östrogenentzug kommt es durch den bidirektionalen Doxycyclin-induzierbaren Promotor zur EBNA2-unabhängigen Co-Expression von LMP1 und LMP2A.

Julia Rastelli untersuchte das Überleben und die Proliferation der 4 verschiedenen Zelllinien nach Östrogenentzug. Sie konnte zeigen, dass die Zelllinien EREB-EBNA1 und EREB-LMP2A keinen Überlebensvorteil hatten und nach ca. 6 Tagen starben. Die Expression von LMP1 führte zu einem verlängerten Überleben bis ca. 14 Tage nach Abschalten von EBNA2. Die Co-Expression von LMP1 und LMP2A verstärkte den Überlebenseffekt bis zu 30 Tage nach Östrogenentzug, führte jedoch nicht zur Immortalisierung der B-Zellen. Außerdem wurde nach Östrogenentzug in den EREB-LMP1/2A-Zellen im Vergleich zu den EREB-LMP1-Zellen die Proliferation länger Aufrecht erhalten.

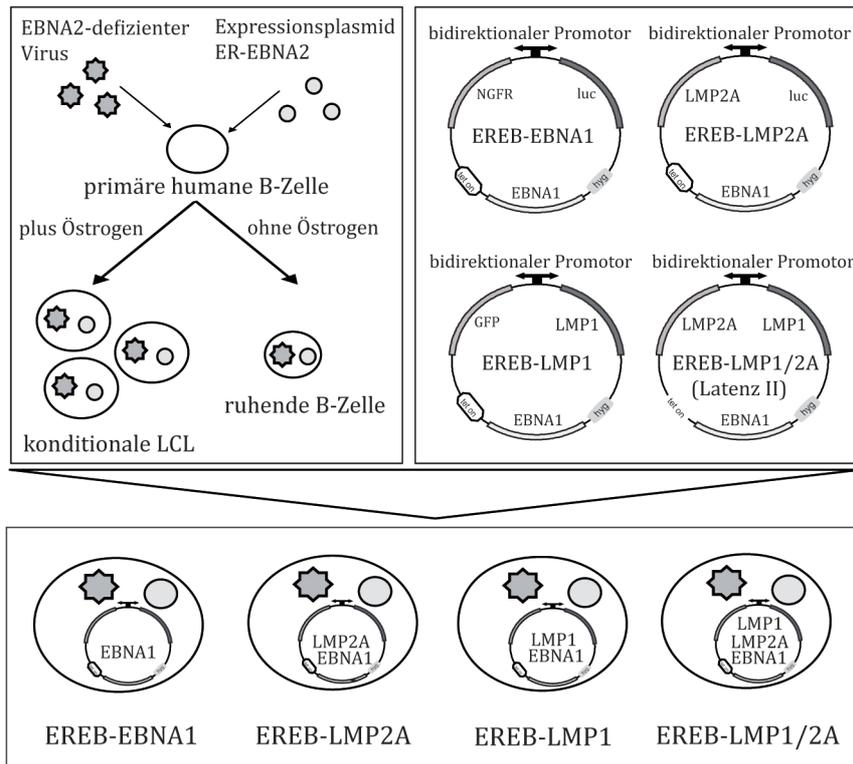


Abbildung 7 LMP1- und LMP2A-exprimierende B-Zellen. EREB2-5-Zellen wurden mit verschiedenen Vektoren stabil transfiziert, um eine EBNA2-unabhängige Expression von LMP1 und LMP2A oder die Co-Expression von LMP1 und LMP2A zu erhalten.

2 Zielsetzung

HRS-Zellen sind durch die Expression von CD30 charakterisiert und in EBV-positiven Fällen werden die viralen Proteine LMP1 und LMP2A exprimiert. Ein möglicher Beitrag dieser Proteine zur Tumorentstehung ist jedoch bis jetzt nicht geklärt. Diese Arbeit soll dazu beitragen, mehr über den Einfluss dieser Proteine auf die B-Zell-Aktivierung und deren Beitrag zur Tumorentstehung zu erfahren.

Die Arbeit gliedert sich in zwei Teile:

Im ersten Teil sollte in dem Zellsystem EREB2-5 der Einfluss der viralen Proteine LMP1 und LMP2A auf den Phänotyp reifer B-Zellen analysiert werden. Ziel war es zu prüfen, ob die Co-Expression von LMP1 und LMP2A in B-Zellen einen HRS-Zell-ähnlichen Phänotyp induzieren kann. Außerdem sollten die von LMP1- und/oder LMP2A-induzierten Signalwege charakterisiert werden um zu klären, wie das stark verlängerte Überleben in EREB-LMP1- und EREB-LMP1/2A-Zellen vermittelt werden kann. Diese Analyse sollte ebenfalls klären, inwiefern die Proteine LMP1 und/oder LMP2A zur Aktivierung von Signalwegen in HRS-Zellen beitragen können.

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollten zwei konditional transgene Mausstämme generiert und analysiert werden, in denen CD30 bzw. konstitutiv aktives CD30 (LMP1/CD30) in unterschiedlichen Stadien der B-Zell-Entwicklung abhängig vom Cre/LoxP System aktiviert werden kann. Mit Hilfe dieser Mäuse sollte die physiologische Rolle von CD30 in der B-Zellentwicklung und -aktivierung untersucht werden. Die B-Zell-spezifische Expression von CD30 und LMP1/CD30 sollte durch Einkreuzen mit CD19Cre-Mäusen erfolgen. In CD30-Mäusen wird CD30 dadurch nicht nur auf aktivierten B-Zellen, sondern bereits ab dem Pro-B-Zell-Stadium exprimiert. In einer zweiten Maus sollte die Wirkung eines konstitutiven CD30-Signals in B-Zellen untersucht werden. Da LMP1 Liganden-unabhängig Signale weiterleiten kann, sollte durch die Fusion der zytoplasmatischen Domäne von CD30 mit der Transmembrandomäne von LMP1 (LMP1/CD30) ein konstitutives CD30-Signal erzeugt werden.

3 Ergebnisse

3.1 Der Einfluss der viralen Proteine LMP1 und LMP2A auf B-Zellen

Das Epstein-Barr Virus (EBV) wird in Zusammenhang mit vielen Tumorerkrankungen gebracht. So sind ca. 50 % der Hodgkin-Lymphome (HL) EBV-positiv. In den Tumorzellen des HL befindet sich das Virus im Latenz II Programm, das durch die Expression der 3 viralen Proteine EBNA1, LMP1 und LMP2A charakterisiert ist. Sowohl LMP1 als auch LMP2A stehen in Verdacht bei der HL-Entstehung eine Rolle zu spielen. Um den Einfluss der in der Latenz II exprimierten viralen Proteine LMP1 und LMP2A auf das Überleben und die Transformation von B-Zellen zu untersuchen, hat Julia Rastelli in ihrer Doktorarbeit die 4 Zelllinien EREB-EBNA1, EREB-LMP1, EREB-LMP2A und EREB-LMP1/2A etabliert (Rastelli, 2007). In diesen Zelllinien kann durch Östrogenentzug EBNA2 inaktiviert werden, wodurch alle in der Latenz III exprimierten viralen Gene abgeschaltet werden. Die EBNA2-unabhängige Expression von LMP1 und/oder LMP2A erfolgt nach Abschaltung von EBNA2 von transfizierten episomalen Vektoren, die unter Kontrolle eines bidirektionalen Doxycyclin-induzierbaren Promotors LMP1 und LMP2A einzeln oder in Kombination exprimieren. Als Kontrolle wurde die Zelllinie EREB-EBNA1 verwendet, die nach Östrogenentzug nur das virale Protein EBNA1, welches zur Erhaltung des episomalen Vektors von Bedeutung ist, exprimiert.

Um zu untersuchen, ob die beiden viralen Proteine zum Phänotyp von Hodgkin-Reed-Sternberg (HRS)-Zellen beitragen können, wurden neben morphologischen Veränderungen die Expression typischer Oberflächenmarker von HRS-Zellen geprüft. Außerdem wurden die von LMP1- und LMP2A-induzierten Signalwege untersucht, um zu klären, inwiefern die viralen Proteine zur Deregulierung von Signalwegen in HRS-Zellen beitragen können, und durch welche Signalwege der von LMP1 und LMP2A vermittelte Überlebenseffekt in B-Zellen vermittelt werden könnte.

3.1.1 Die Expressionsstärke von LMP1 und LMP2A mit und ohne Doxycyclin-Induktion

In Western Blot-Analysen wurde die EBNA2-unabhängige Expressionsstärke von LMP1 und LMP2A in diesen Zelllinien untersucht. Um zu testen, ob durch die Zugabe steigender Doxycyclin-Konzentrationen die Expression der viralen Proteine verstärkt werden kann, wurde in den Zelllinien EREB-LMP2A, EREB-LMP1 und EREB-LMP1/2A das Östrogen ausgewaschen und anschließend die Expression von LMP1 und LMP2A durch steigende Doxycyclin-Konzentrationen für 4 Tage induziert.

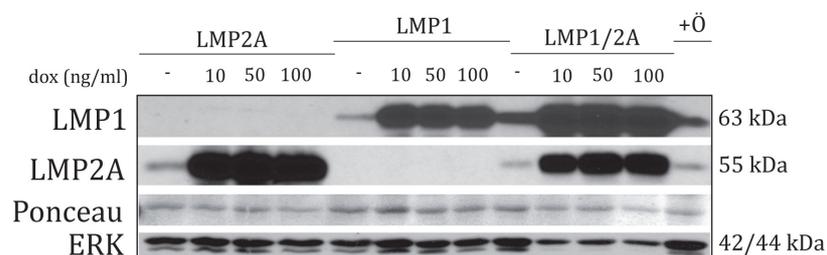


Abbildung 8 Nachweis der Doxycyclin-induzierten Expression von LMP1 und LMP2A. Die Zelllinien EREB-LMP2A, EREB-LMP1 und EREB-LMP1/2A wurden vom Östrogen ausgewaschen und anschließend für 4 Tage ohne oder mit verschiedenen Doxycyclin-Konzentrationen kultiviert und Gesamtextrakte angefertigt. Der Western Blot zeigt die Proteinmengen von LMP1 und LMP2A mit oder ohne Doxycyclin-Induktion nach Östrogenentzug sowie in Gegenwart von Östrogen. Als Ladekontrollen wurde ein Ponceau-gefärbtes Protein sowie die Proteinlevel von ERK verwendet. In den EREB-LMP1/2A-Zellen konnten durch Induktion von LMP1 und LMP2A mit Doxycyclin verminderte ERK-Mengen detektiert werden. Dies ist wahrscheinlich auf das verminderte Überleben dieser Zellen zurückzuführen.

Die Analyse zeigte, dass nachweisbare Mengen von LMP1 und LMP2A auch ohne Doxycyclin exprimiert werden, was durch eine bereits beschriebene „Leakiness“ des Vektorsystems verursacht wird (Bornkamm et al., 2005, Rastelli, 2007). Wie erwartet konnte nach Östrogenentzug LMP1 in den Zelllinien EREB-LMP1 und EREB-LMP1/2A und LMP2A in den EREB-LMP2A und EREB-LMP1/2A nachgewiesen werden (Abbildung 8). LMP1 war in den EREB-LMP1/2A-Zellen etwas stärker als in der Linie EREB-LMP1 nachweisbar, während die Menge von LMP2A in den Zellen, die nur LMP2A exprimierten, höher als in den EREB-LMP1/2A-Zellen war. Durch die Induktion mit Doxycyclin konnte die Expression von LMP1 und LMP2A deutlich verstärkt werden. Die Ergebnisse zeigten, dass bereits bei der geringsten Konzentration (10 ng/ml) die maximale Expressionsstärke erreicht war. Die Proteinmengen von LMP1 und LMP2A nach Doxycyclin-Zugabe waren um ein Vielfaches höher als die durch EBNA2 regulierten

endogenen Mengen (Kontrolle + Östrogen). Da die Doxycyclin-unabhängige Expression von LMP1 und LMP2A am ehesten den EBNA2-induzierten Proteinmengen entsprach, habe ich mich entschlossen, die weiteren Versuche in Abwesenheit von Doxycyclin durchzuführen. Anschließend wurde die Expressionsstärke von LMP1 und LMP2A sowie die Expression von EBNA1 an Tag 4 und an Tag 8 nach Östrogenentzug untersucht und mit Kontrollzellen in Anwesenheit von Östrogen verglichen.

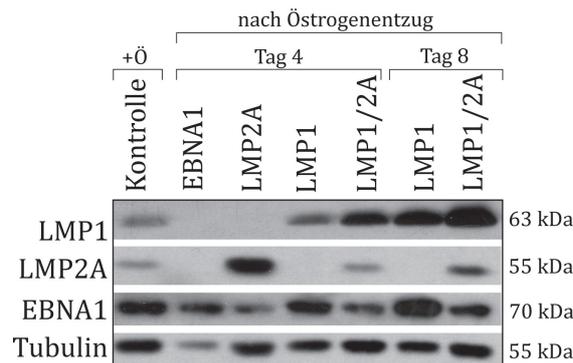


Abbildung 9 Nachweis der EBNA2-unabhängigen Expression von LMP1 und LMP2A. Die verschiedenen Zelllinien EREB-EBNA1, EREB-LMP2A, EREB-LMP1 und EREB-LMP1/2A wurden vom Östrogen ausgewaschen. An Tag 4 und 8 nach Östrogenentzug wurden von den Zellen Proteinextrakte angefertigt und die Proteinmengen von EBNA1, LMP1 und LMP2A untersucht. Als Ladekontrolle wurde Tubulin verwendet. Die Kontrolle zeigt die EBNA2-induzierte Expression von LMP1 und LMP2A in EREB-EBNA1-Zellen, die in Anwesenheit von Östrogen kultiviert wurden. Von den Zelllinien EREB-EBNA1 und EREB-LMP2A konnten keine Extrakte an Tag 8 hergestellt werden, da diese Zelllinien zu diesem Zeitpunkt bereits zu wenige lebende Zellen aufwiesen.

EBNA1 konnte in allen Zelllinien nach Östrogenentzug nachgewiesen werden, da EBNA1 auf allen 4 episomalen Vektoren kodiert ist (Abbildung 9). Nach der Auswaschung war die Expression von LMP1 an Tag 8 stärker als an Tag 4. Außerdem konnte auch in diesem Western Blot die verstärkte Expression von LMP1 in den EREB-LMP1/2A-Zellen beobachtet werden, während die Expression von LMP2A in der Zelllinie EREB-LMP2A am stärksten war.

3.1.2 Die Expression von LMP1 und LMP2A induziert typische Merkmale einer Hodgkin-Reed-Sternberg-Zelle

HRS-Zellen sind durch eine Zunahme der Zellgröße und die Polykaria-Formation (Mehrkernigkeit) charakterisiert. Sie exprimieren typischerweise die Oberflächenmarker CD30, Notch1 und Notch2 (Stein et al., 1983, Jundt et al., 2002a).

Kürzlich konnte auf transkriptioneller Ebene auch die Expression des Notch1-Liganden Jagged1 in HRS-Zellen beobachtet werden (Kochert et al.). Weitere Merkmale von HRS-Zellen sind die starke Herunterregulierung von B-Zell-spezifischen Genen sowie die konstitutiv hohe NF- κ B-Aktivität. Da LMP1 und LMP2A in HRS-Zellen co-exprimiert werden, wurde untersucht, welchen Einfluss die beiden viralen Proteine auf den Phänotyp von B-Zellen haben.

3.1.2.1 Die Co-Expression von LMP1 und LMP2A verändert die Zellstruktur

Um zu untersuchen, ob die Expression der viralen Proteine LMP1 und LMP2A einen Einfluss auf die Morphologie der Zellen hat, wurde die Zellgröße der EREB-LMP1/2A-Zellen in An- und Abwesenheit von Östrogen im Mikroskop beurteilt (Rastelli, 2007).

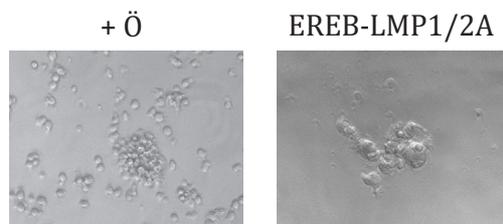


Abbildung 10 Morphologie von EREB-LMP1/2A-Zellen. EREB-LMP1/2A-Zellen wurden in Anwesenheit von Östrogen (+Ö) und 20 Tage nach Östrogenentzug (ERE B-LMP1/2A) in derselben Vergrößerung fotografiert (Rastelli, 2007).

In Gegenwart von Östrogen waren die Zellen aller 4 EREB2-5-Zelllinien relativ klein und bildeten große Zellklumpen, die typisch für EREB2-5 sind (Kempkes et al., 1995). In Abwesenheit von Östrogen konnte beobachtet werden, dass die Zellgröße vieler, aber nicht aller LMP1- und LMP1/2A-co-exprimierender Zellen während der Dauer des Östrogenentzugs kontinuierlich zunahm (Abbildung 10). Die EBNA2-unabhängige Expression von EBNA1 und LMP2A hatte keinen Einfluss auf die Zellen. Die EREB-LMP1- und EREB-LMP1/2A-Zellen bildeten im Vergleich zu den anderen beiden Zelllinien auch nach Östrogenentzug Zellklumpen.

Um zu untersuchen, ob in den großen EREB-LMP1- und EREB-LMP1/2A-Zellen auch die für HRS-Zellen typische Mehrkernigkeit induziert wird, wurden EREB-LMP1- sowie EREB-LMP1/2A-Zellen 14 Tage nach Östrogenentzug und Kontrollzellen in Anwesenheit von Östrogen auf Objektträger fixiert und mit dem Farbstoff Wrights Eosin-Methylenblau angefärbt, um die Kerne sichtbar zu machen.

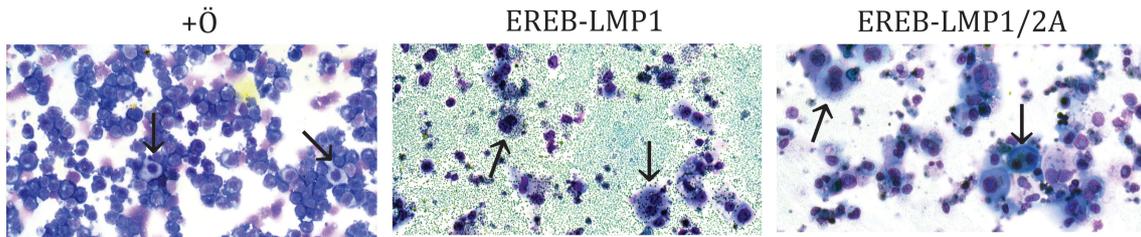


Abbildung 11 Polykaria-Formation von EREB-LMP1- und EREB-LMP1/2A-Zellen. EREB-LMP1- und EREB-LMP1/2A-Zellen wurden in Anwesenheit von Östrogen und 14 Tage nach Östrogenentzug mit Wrights Eosin-Methylenblau gefärbt. Durch die Färbung werden die Kerne dunkellila und das Zytoplasma grau violett bis blau gefärbt. Bei den dunklen Granuli in den EREB-LMP1 und EREB-LMP1/2A-Zellen nach Östrogenentzug handelt es sich wahrscheinlich um Reste toter Zellen. Mit Pfeilen sind Zellen gekennzeichnet, in denen entweder 1 oder 2 Kerne in den Zellen zu erkennen sind. 20 -fache Vergrößerung.

In Anwesenheit von Östrogen konnten nur einkernige Zellen beobachtet werden. Hingegen konnten nach Östrogenentzug sowohl in EREB-LMP1- als auch in EREB-LMP1/2A-Zellen 2 oder mehr Kerne beobachtet werden (Abbildung 11). Die Polykaria-Formation wurde in vielen, jedoch nicht allen Zellen detektiert.

Die Ergebnisse zeigen, dass in Abwesenheit von Östrogen die Expression von LMP1 und die Co-Expression von LMP1 und LMP2A zu einer Zunahme der Zellgröße und zur Polykaria-Formation in B-Zellen führen, die typische Charakteristika einer HRS-Zelle sind.

3.1.2.2 Die Expression der Hodgkin-Lymphom-Marker CD30, Notch1, Notch2 und Jagged1

Um zu untersuchen, ob die Expression von LMP1 und LMP2A weitere Charakteristika von HRS-Zellen induzieren kann, wurde die Expression der typischen HL-Marker CD30, Notch2 und Jagged1 in den stabil transfizierten EREB2-5-Zellen auf Proteinebene geprüft. Als Kontrollen dienten EREB2-5-Zellen, die in Gegenwart von Östrogen kultiviert wurden, und die beiden HL-Zelllinien KMH2 und L428.

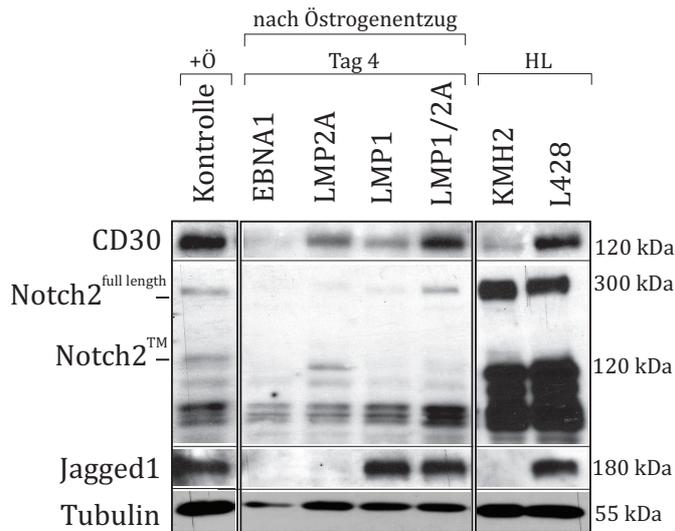


Abbildung 12 Die Expression von CD30, Notch2 und des Notch-Liganden Jagged1. Dieser Western Blot zeigt an Hand von Gesamtproteinextrakten die Expressions-Induktion der typischen HRS-Markerproteine CD30 und Notch2 durch die EBNA2-unabhängige Expression von LMP1 und LMP2A im Vergleich zu den HL-Zelllinien KMH2 und L428 und den EREB2-5 Zellen in Gegenwart von Östrogen. Außerdem ist untersucht worden, ob der Notch1-Ligand Jagged1 nach Östrogenentzug exprimiert wird.

In Gegenwart von Östrogen wurde in Kontrollzellen CD30 und Jagged1 vergleichbar hoch wie in der HL-Linie L428 exprimiert (Abbildung 12). Erstaunlicherweise konnte in der HL-Linie KMH2 nur eine geringe Expression von CD30 und Jagged1 nachgewiesen werden. Nach Östrogenentzug konnte in der Negativkontrolle EREB-EBNA1 keine Expression von CD30 und Jagged1 detektiert werden, was darauf hinweist, dass die in der Latenz III exprimierten viralen Gene zur Expression dieser beiden Proteine beitragen. Es konnte beobachtet werden, dass sowohl die Expression von LMP2A als auch von LMP1 die Expression von CD30 induziert, während Jagged1 von LMP1 induziert wurde. In den EREB-LMP1/2A-co-exprimierenden Zellen konnte eine vergleichbare Expression von CD30 und Jagged1 wie in der HL-Zelllinie L428 und den Kontrollzellen in Gegenwart von Östrogen gezeigt werden. Die Proteine LMP1 und LMP2A scheinen somit gemeinsam die Expression von CD30 und LMP1 die Expression von Jagged1 in B-Zellen zu induzieren.

Im Vergleich zu den HL-Zelllinien konnte in der Kontrolle in Anwesenheit von Östrogen nur eine schwache Expression von Notch2 detektiert werden (Abbildung 12). Die als Notch2TM bezeichnete Bande spiegelt die prozessierte, in der Membran lokalisierte Form wieder, während die mit „full length“-Notch2 bezeichnete Bande der neu synthetisierten, unprozessierten Form von Notch2 entspricht, die im Zytoplasma lokalisiert ist. In Abwesenheit von Östrogen war weder Notch2TM noch Notch2^{full length} nachweisbar, wohingegen in den EREB-LMP1/2A-Zellen eine schwache Expression des

„full-length“-Notch2 beobachtet werden konnte. Die Stärke dieser Bande war vergleichbar mit der in den Kontrollzellen in Anwesenheit von Östrogen, aber viel schwächer als in den beiden HL-Zelllinien. Um zu überprüfen, ob in EREB-LMP1/2A-Zellen nach Abschalten von EBNA2 Notch2 im Vergleich zu den Kontrollzellen verstärkt exprimiert wird, wurden zusätzlich quantitative RT-PCR-Analysen durchgeführt. Diese Analyse zeigte, dass vor allem LMP1 einen positiven Einfluss auf die Notch2-Transkription hat (Abbildung 13). Der Nachweis der Notch1-Expression, einem weiteren typischen HL-Marker, konnte nicht mit einem Western Blot gezeigt werden, da kein funktioneller Antikörper zur Verfügung stand. Aus diesem Grund wurde die Expression von Notch1 nur auf transkriptioneller Ebene mit einer quantitativen RT-PCR untersucht.

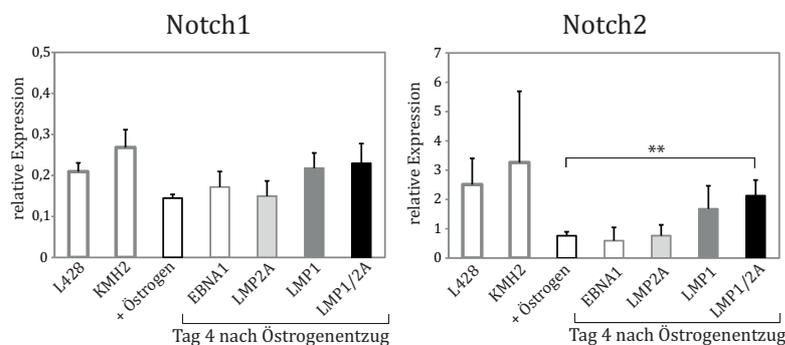


Abbildung 13 Expressionslevel von Notch1 und Notch2. Die mRNA Mengen wurden mittels quantitativer PCR bestimmt und auf die Expression der mRNA des ribosomalen Proteins L23a standardisiert. Es ist die relative Expression von Notch1 und Notch2 in EREB2-5-Zellen in Gegenwart von Östrogen und in den 4 verschiedenen EREB2-5-Zelllinien 4 Tage nach Östrogenentzug sowie in den HL-Linien L428 und KMH2 gezeigt. ** $p < 0,01$ EREB-LMP1/2A an Tag 4 nach Östrogenentzug im Vergleich zur Kontrolle in Anwesenheit von Östrogen.

Die Notch1 RNA-Mengen waren in allen untersuchten Zelllinien ähnlich und scheinen damit in diesem System nicht reguliert zu werden (Abbildung 13).

3.1.2.3 LMP2A reduziert der Expression von $Ig\mu$, $Ig\beta$ und $Ig\alpha$

Ein weiteres typisches Merkmal von HRS-Zellen ist die Herunterregulierung typischer B-Zell-spezifischer Gene, wie beispielsweise dem BCR (IgM) und dessen Signalmoleküle $Ig\beta$ und $Ig\alpha$. Deshalb wurden die Expressionslevel von $Ig\mu$, $Ig\beta$ und $Ig\alpha$ auf transkriptioneller Ebene mittels quantitativer RT-PCR in den stabil transfizierten EREB2-5-Zellen untersucht und mit den mRNA-Mengen von den HL-Linien L428 und KMH2 sowie EREB2-5-Zellen in Gegenwart von Östrogen verglichen.

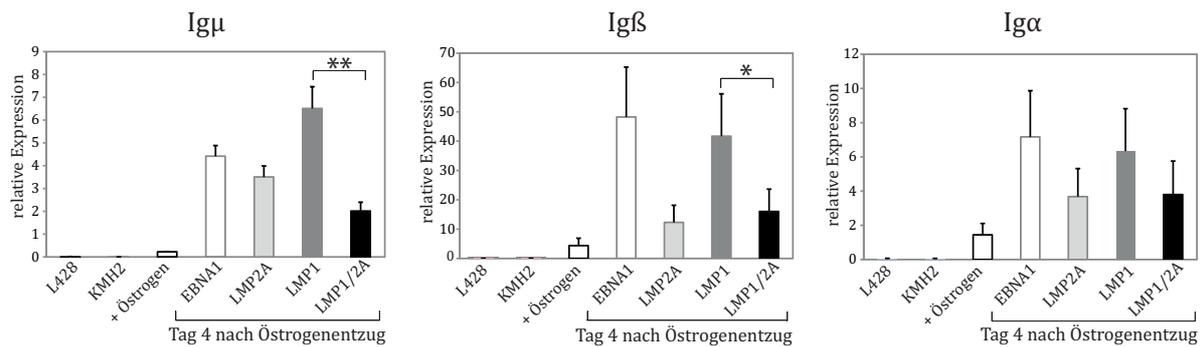


Abbildung 14 Expression von Ig μ , Ig β und Ig α . Die mRNA Mengen wurden mittels quantitativer RT-PCR bestimmt und auf die Expression der mRNA des ribosomalen Proteins L23a standardisiert. Es ist die relative Expression von Ig μ , Ig β und Ig α von EREB-Zellen in Gegenwart von Östrogen und 4 Tage nach Östrogenentzug sowie von den HL-Linien L428 und KMH2 gezeigt. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ EREB-LMP1 im Vergleich zu EREB-LMP1/2A.

Die Expression von Ig μ , Ig β und Ig α konnte in den HL-Linien, wie erwartet, nicht detektiert werden (Abbildung 14). Es ist bekannt, dass in LCLs die Expression des BCR durch das Latenz III Programm negativ reguliert wird. Für die negative Regulation wurde hauptsächlich EBNA2 verantwortlich gemacht (Jochner et al., 1996). Dies ist im Einklang mit unseren Beobachtungen, dass in Anwesenheit von Östrogen (Latenz III) sowohl IgM, Ig β als auch Ig α nur schwach exprimiert und nach Inaktivierung von EBNA2 hochreguliert werden. Die Expression von LMP2A führte zu einer signifikanten Erniedrigung der Ig μ - und Ig β - sowie einer tendenziellen Abschwächung der Ig α -Expression. Diese Daten weisen darauf hin, dass neben EBNA2 auch das virale Protein LMP2A in B-Zellen einen negativen Einfluss auf die Expression von Ig μ , Ig β und Ig α hat und damit teilweise zur Herunterregulierung dieser Gene in HRS-Zellen beitragen könnte.

3.1.3 LMP1- und LMP2A-induzierte Signalwege

HRS-Zellen sind durch eine hohe NF- κ B-Aktivität charakterisiert. Aber auch andere Signalwege wie der ERK-, JNK- und Akt-Signalweg wurden als typisch deregulierte Signalwege in den Tumorzellen des HL beschrieben. In den stabil transfizierten EREB2-5-Zellen sollte deshalb untersucht werden, inwieweit die viralen Proteine LMP1 und LMP2A zur Deregulierung dieser Signalwege beitragen können. Außerdem sollte die

Analyse aufklären, durch welche Signalwege der von LMP1- und LMP2A-induzierte Überlebenseffekt in B-Zellen vermittelt werden kann.

3.1.3.1 Die Aktivierung der Kinasen ERK, JNK und Akt

Es gibt bereits Daten aus verschiedenen Zellsystemen, die zeigen, dass LMP1 oder LMP2A die Aktivierung der Kinasen ERK, JNK und Akt vermitteln können. Es wurde untersucht, inwiefern LMP1 und/oder LMP2A zur Aktivierung dieser 3 Kinasen beitragen. Mit Hilfe eines Western Blots wurden die stabil transfizierten EREB2-5-Zellen in der Latenz III und die 4 verschiedenen Zelllinien an Tag 4 und 8 nach Abschalten von EBNA2 untersucht. Die Aktivität der Kinasen ist jeweils durch die phosphorylierte Form der Kinasen gezeigt.

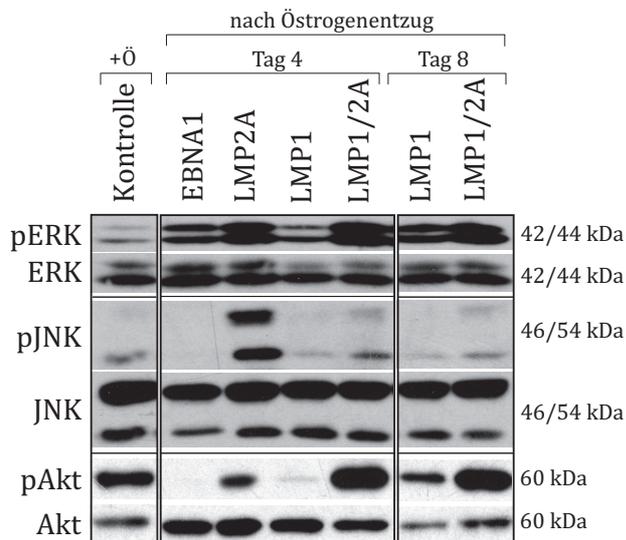


Abbildung 15 Die Aktivität von ERK, JNK und Akt. Es sind Zellysate von EREB2-5-Zellen in Gegenwart von Östrogen gezeigt sowie von den verschiedenen EREB2-5-Zelllinien an Tag 4 und Tag 8 nach Östrogenentzug. Der Western Blot zeigt die Aktivierung der Signalwege ERK, JNK und Akt durch die entsprechende Phosphorylierung der Proteine (pERK, pJNK, pAkt). Darunter sind jeweils die Gesamtmengen der Proteine (ERK, JNK, Akt) dargestellt. Bei der Phosphorylierung von Akt handelt es sich um die Phosphorylierung von Serin 473.

In EREB2-5-Zellen konnte im Latenz III-Programm (+Ö) phosphoryliertes Akt, ERK und JNK nachgewiesen werden (Abbildung 15). Nach Abschalten von EBNA2 (ERE-EBNA1 nach Östrogenentzug) blieb die Phosphorylierung von ERK erhalten, jedoch konnte keine Akt- und JNK-Phosphorylierung mehr detektiert werden. Die Expression von LMP2A führte nach Abschalten von EBNA2 zu einer Steigerung der ERK-Phosphorylierung im Vergleich zu den ERE-EBNA1-Zellen. Außerdem konnte in den ERE-LMP2A-Zellen die phosphorylierte Form von Akt und eine sehr starke Aktivierung von JNK beobachtet werden. Im Gegensatz dazu konnte durch die Expression von LMP1 nur wenig phosphoryliertes JNK detektiert werden, und die phosphorylierten ERK-Level waren im

Vergleich zu den EREB-EBNA1-Zellen nur leicht erhöht (Abbildung 15, Tag 8). Die Aktivierung von Akt wurde durch die Co-Expression von LMP1 und LMP2A im Vergleich zu den Zellen, in denen LMP1 oder LMP2A alleine exprimiert wurde, verstärkt, wohingegen die durch LMP2A induzierte starke JNK-Phosphorylierung durch die zusätzliche Expression von LMP1 vermindert wurde.

Um zu untersuchen, ob die stark erhöhte Expression von LMP1 und LMP2A zu einer verstärkten Aktivierung der Kinasen ERK, JNK und Akt führt, wurden die Zellen nach Östrogenentzug mit Doxycyclin behandelt. Es wurden 4 Tage nach Östrogenentzug Proteinextrakte von EREB-LMP1- und EREB-LMP2A-Zellen angefertigt, welche mit 10 ng/ml Doxycyclin induziert wurden. Die Aktivität der Kinasen wurde ohne und mit Doxycyclin-Zugabe miteinander verglichen.

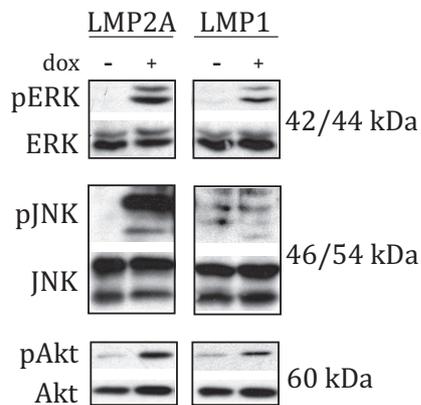


Abbildung 16 Aktivierung der Kinasen nach Doxycyclin-induzierter Expression von LMP1 und LMP2A. Die Zelllinien EREB-LMP1 und EREB-LMP2A wurden vom Östrogen ausgewaschen und mit 10 ng/ml Doxycyclin induziert, um die Expression von LMP1 und LMP2A in den Zellen zu verstärken. Die Proteinextrakte wurden 4 Tage nach der Auswaschung angefertigt. Die aktivierte Form von ERK und JNK konnte in diesem Blot in den uninduzierten Zellen nicht detektiert werden, da die uninduzierten Zellen im Vergleich zu den induzierten Zellen so wenig aktiviertes ERK und JNK exprimierten, dass dies bei dieser Exposition unter die Detektionsgrenze fiel.

Nach Doxycyclin-Zugabe konnte sowohl in der LMP1- als auch in der LMP2A-exprimierenden Zelllinie eine Steigerung der ERK- und Akt-Aktivität nachgewiesen werden (Abbildung 16). Im Gegensatz dazu führte nur die verstärkte LMP2A-Expression, nicht aber die verstärkte Expression von LMP1, zu einer Steigerung der Phosphorylierung von JNK. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Expression von LMP2A konzentrationsabhängig die Phosphorylierung von ERK, JNK und Akt induziert. Eine verstärkte Expression von LMP1 scheint dagegen nur die Aktivierung von ERK und Akt, aber nicht von JNK, zu erhöhen.

3.1.3.2 Die Aktivierung von NF- κ B

Man unterscheidet hierbei den kanonischen Signalweg mit den Komponenten p65, p50 und c-Rel von dem nicht-kanonischen Signalweg mit den Komponenten p52 und RelB. Nach Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs werden die Komponenten hauptsächlich als p50/p65 und p50/c-Rel, oder als p52/RelB-Heterodimere in den Kern transloziert, wo sie die Transkription ihrer Zielgene induzieren.

Zunächst wurde die Aktivität des kanonischen NF- κ B-Signalwegs mit Hilfe eines Western Blots analysiert. Der Inhibitor $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ hält die Komponenten des kanonischen NF- κ B-Signalwegs (p65, c-Rel, p50) außerhalb des Kerns im Zytoplasma zurück und hält damit diesen Signalweg inaktiv. Erst nach Phosphorylierung von $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ kann der Inhibitor ubiquitinyliert und anschließend degradiert werden. Die Komponenten des kanonischen Signalwegs können nun in den Kern wandern, um dort die Expression ihrer Zielgene zu induzieren. Die Phosphorylierung von $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ zeigt somit die Aktivität des kanonischen NF- κ B-Signalwegs an. Ebenso zeigt eine Reduktion des $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -Gesamtproteins die Aktivität des kanonischen NF- κ B-Signalwegs an, da $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ nach Phosphorylierung degradiert wird.

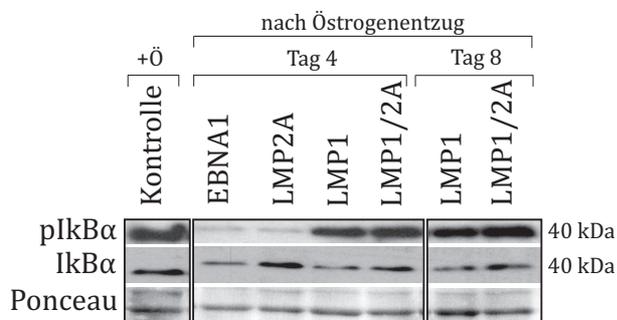


Abbildung 17 Aktivierung des kanonischen NF- κ B-Signalwegs. Der Western Blot zeigt die Aktivierung des kanonischen NF- κ B-Signalwegs. Die Aktivierung führt zur Phosphorylierung und Degradierung von $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$. Es sind Zelllysate von proliferierenden EREB2-5-Zellen in Gegenwart von Östrogen gezeigt sowie von den verschiedenen stabil transfizierten EREB2-5-Zelllinien an Tag 4 und 8 nach Östrogenzug.

Sowohl in der Kontrolle + Ö als auch in den beiden LMP1-exprimierenden Zelllinien nach Östrogenzug konnte die phosphorylierte Form von $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ und somit die Aktivierung des kanonischen NF- κ B-Signalwegs nachgewiesen werden (Abbildung 17). Im Gegensatz dazu konnte in den beiden Zelllinien EREB-EBNA1 und EREB-LMP2A keine Phosphorylierung von $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ detektiert werden. In den Zelllinien EREB-LMP1 und EREB-LMP1/2A konnten im Vergleich zu EREB-LMP2A-Zellen verminderte $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -Level beobachtet werden, was ebenfalls die Aktivierung des kanonischen NF- κ B-Wegs in den

LMP1-exprimierenden Zellen zeigt. LMP2A, das funktionelle Homolog des BCR, kann damit im Gegensatz zum BCR den kanonischen NF- κ B-Signalweg nicht aktivieren.

Durch Kernfraktionierungsexperimente wurde untersucht, welche Komponenten des kanonischen NF- κ B-Signalwegs durch LMP2A bzw. LMP1 in den Kern transloziert werden. P105 ist der inaktive Vorläufer von p50, der proteasomal zu p50 abgebaut wird.

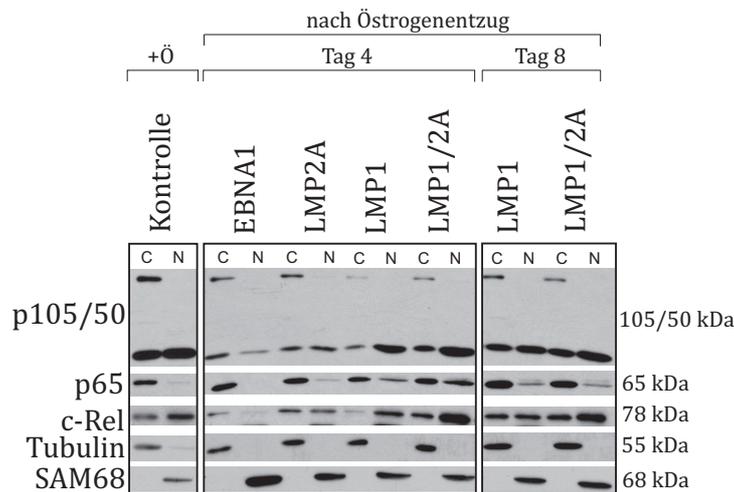


Abbildung 18 Aktivierung des kanonischen NF- κ B-Signalwegs. Durch eine Fraktionierung der Kerne (N) und des Zytoplasmas (C) wurde die Aktivität des NF- κ B-Signalwegs genauer untersucht. Die Menge der einzelnen Faktoren im Kern gibt Aufschluss über den Beitrag von p50, p65 und c-Rel zur Aktivierung des kanonischen NF- κ B-Signalwegs. Es sind Extrakte von EREB2-5-Zellen in Gegenwart von Östrogen gezeigt sowie von den verschiedenen stabil transfizierten EREB2-5-Zelllinien an Tag 4 und Tag 8 nach Östrogenentzug.

Die Kernfraktionierung zeigte, dass in den proliferierenden EREB2-5-Zellen in Gegenwart von Östrogen p50 und c-Rel im Kern vorhanden war, während p65 nahezu nicht detektiert werden konnte (Abbildung 18). 4 Tage nach Östrogenentzug konnten in der Kontrollzelllinie EREB-EBNA1 deutlich weniger p50 und c-Rel im Kern detektiert werden als in den proliferierenden EREB2-5-Zellen. Die Expression von LMP2A führte zur Translokation von c-Rel und p50 in den Kern. In EREB-LMP1-Zellen konnten im Vergleich zu LMP2A-exprimierenden Zellen erhöhte Mengen von p50, p65 und c-Rel in der nukleären Fraktion detektiert werden. Die Co-Expression von LMP1 und LMP2A führte im Vergleich zu LMP1-exprimierenden Zellen zur weiteren Steigerung der nukleären Translokation von p50, p65 und c-Rel. An Tag 8 nach Östrogenentzug waren im Vergleich zu Tag 4 die p65-Level im Kern von LMP1- und LMP1/2A-co-exprimierenden Zellen wieder deutlich geringer, wobei die c-Rel- und p50-Level

konstant blieben. Diese Daten deuten auf einen kooperativen Effekt von LMP1 und LMP2A auf die nukleäre Translokation von p50/c-Rel-Heterodimeren hin.

Die Aktivierung des nicht-kanonischen NF- κ B-Signalwegs ist durch die Translokation von p52/RelB-Heterodimeren in den Kern charakterisiert. P100 ist der Vorläufer von p52 und wird ebenfalls nach Aktivierung proteasomal degradiert und erlaubt damit die Translokation von p52/RelB in den Kern.

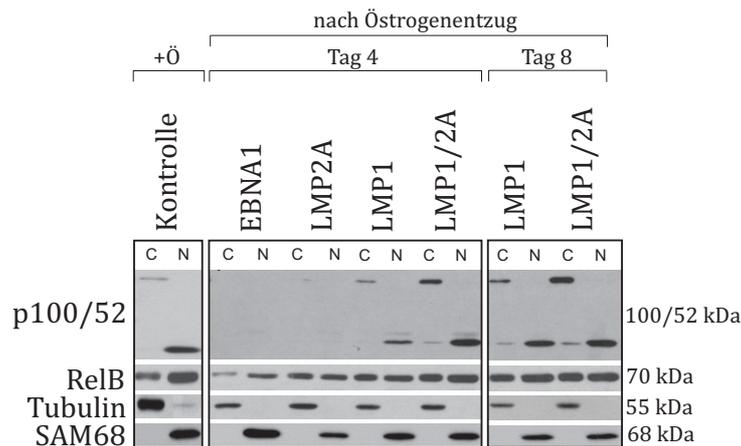


Abbildung 19 Aktivierung des nicht-kanonischen NF- κ B-Signalwegs. Es sind Extrakte von Kern und Zytoplasma von Zellen in Gegenwart von Östrogen gezeigt sowie von den verschiedenen stabil transfizierten EREB2-5-Zelllinien an Tag 4 und 8 nach Östrogenentzug. Die Translokation in den Kern und die damit erhöhten Mengen von p52 und RelB im Kern gibt Aufschluss über die Aktivität des nicht-kanonischen NF- κ B-Signalwegs. (C) Zytoplasma, (N) Kern.

In den proliferierenden Kontrollzellen (+ Ö) konnten p52 und RelB im Kern und somit die Aktivierung des nicht-kanonischen NF- κ B-Signalwegs gezeigt werden (Abbildung 19). Nach Östrogenentzug konnte nur in den LMP1-exprimierenden Zelllinien p52 im Kern detektiert werden, was darauf hinweist, dass der nicht-kanonische NF- κ B-Signalweg nur von LMP1 und nicht von LMP2A aktiviert wird. Die Translokation von RelB in den Kern konnte in Anwesenheit und Abwesenheit von Östrogen beobachtet werden. In den LMP1/2A-co-exprimierenden Zellen konnten sowohl an Tag 4 als auch an Tag 8 nach Östrogenentzug erhöhte p100-Mengen detektiert werden. Es ist damit mehr Substrat p100 vorhanden, welches zu p52 degradiert werden kann. Das Ergebnis weist auf eine Kooperativität von LMP1 und LMP2A auf die Expression von p100 hin.

Um zu untersuchen, ob *NFKB2* (das Gen für p100) auf transkriptioneller Ebene kooperativ von LMP1 und LMP2A induziert wird, wurden die mRNA-Mengen von *NFKB2* durch quantitative RT-PCR analysiert.

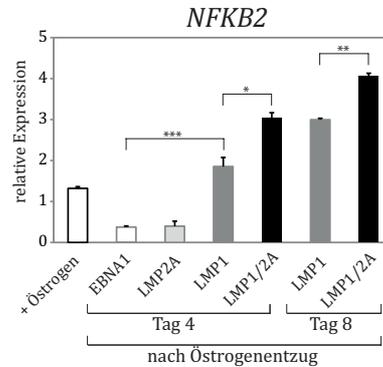


Abbildung 20 Expression von *NFKB2*. Die mRNA Mengen wurden mittels quantitativer RT-PCR bestimmt und auf die Expression der mRNA des ribosomalen Proteins L23a standardisiert. Es ist die relative Expression von *NFKB2* gezeigt. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Die Expressionsanalyse zeigte, dass in Zellen in Gegenwart von Östrogen mehr mRNA von *NFKB2* nachweisbar war als in den EREB-EBNA1- und EREB-LMP2A-Zellen nach Abschalten von EBNA2 (Abbildung 20). Hingegen konnte in den beiden LMP1-exprimierenden Zelllinien nach Östrogenentzug eine vergleichbare oder sogar etwas höhere mRNA-Menge von *NFKB2* als in den Zelllinien mit Östrogen detektiert werden. Die Co-Expression von LMP1 und LMP2A führte zu einer weiteren Steigerung der *NFKB2*-RNA-Mengen. An Tag 8 nach Östrogenentzug wurde mehr *NFKB2* exprimiert als an Tag 4. Diese Analyse zeigte, dass die Expression von p100 auf transkriptioneller Ebene durch LMP1, und verstärkt durch die Co-Expression von LMP1 und LMP2A, reguliert wird.

3.1.3.3 Die von LMP1 und LMP2A vermittelte Aktivierung der Signalwege im Vergleich zu den HL-Zelllinien L428 und KMH2

Um zu untersuchen, inwiefern die Co-Expression von LMP1 und LMP2A die gleichen Signalwege, die auch in HRS-Zellen dereguliert sind, aktiviert, wurde die Aktivierung der Signalwege von EREB-LMP1/2A-Zellen an Tag 8 nach Östrogenentzug mit den beiden EBV-negativen HL-Zelllinien L428 und KMH2 verglichen.

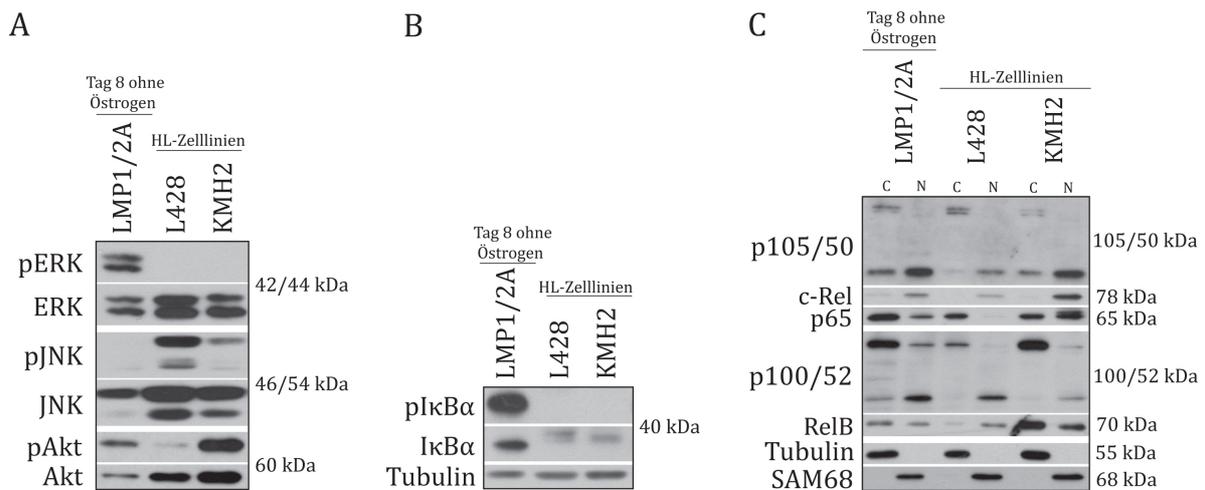


Abbildung 21 Analyse und Vergleich der Aktivierung von ERK, JNK, Akt und NF-κB in den HL-Zelllinien L428 und KMH2 sowie EREB-LMP1/2A-Zellen an Tag 8 nach Östrogenentzug. (A) Es wurde die Aktivität der Kinasen ERK, JNK und Akt in den Zellen L428 und KMH2 untersucht und mit den EREB-LMP1/2A-Zellen verglichen. **(B)** Es wurde die Aktivität des kanonischen NF-κB-Signalwegs durch die Phosphorylierung von IκBα geprüft. **(C)** Durch Kernfraktionierungen wurde die Aktivität von NF-κB in den Zellen L428 und KMH2 analysiert und mit der Aktivität von EREB-LMP1/2A-Zellen verglichen. (C) Zytoplasma, (N) Kern.

Diese Untersuchung zeigte, dass in den beiden HL-Linien L428 und KMH2 im Gegensatz zu der Zelllinie EREB-LMP1/2A der ERK-Signalweg nicht aktiv war, wohingegen JNK in höherem Maße in den HL-Zelllinien aktiviert war. In den L428-Zellen konnten zwar höhere Akt-Level als in den EREB-LMP1/2A-Zellen detektiert werden, jedoch war das Protein nur schwach phosphoryliert. In der Zelllinie KMH2 konnten ebenfalls relativ hohe Akt-Mengen beobachtet werden. Im Gegensatz zu den L428-Zellen war der Akt-Signalweg in KMH2-Zellen stark aktiviert. Die von LMP1- und LMP2A-induzierte Phosphorylierung von Akt war im Vergleich zu den KMH2-Zellen schwächer (Abbildung 21A). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass ERK zumindest in EBV-negativen HRS-Zellen nicht aktiv zu sein scheint, während JNK und Akt eine höhere bzw. vergleichbare Aktivität in EREB-LMP1/2A aufzuweisen scheinen.

In den beiden HL-Zelllinien konnte, wie erwartet, kein IκBα detektiert werden, da das Gen für IκBα in diesen HL-Zelllinien mutiert ist (Abbildung 21B)(Cabannes et al., 1999, Emmerich et al., 1999, Jungnickel et al., 2000). Es wurden Kernfraktionierungen vorgenommen, um die NF-κB-Aktivierung in den HL-Zellen L428 und KMH2 genauer zu charakterisieren und mit den EREB-LMP1/2A-Zellen zu vergleichen. Die Co-Expression

von LMP1 und LMP2A führte zur Aktivierung des kanonischen und nicht-kanonischen NF- κ B-Signalwegs (Abbildung 18, Abbildung 19, Abbildung 21C). In der Zelllinie L428 konnte kein p65 im Kern detektiert werden und im Vergleich zu EREB-LMP1/2A-Zellen erniedrigte c-Rel- und p50-Level. Die Aktivierung des kanonischen NF- κ B-Signalwegs scheint somit in dieser Zelllinie geringer als in EREB-LMP1/2A-Zellen zu sein und hauptsächlich über p50/c-Rel-Komplexe vermittelt zu werden. Dagegen konnte eine relativ starke Aktivierung des nicht-kanonischen NF- κ B-Signalwegs beobachtet werden, die sich in ähnlichen p52- und RelB-Mengen im Kern wie in den EREB-LMP1/2A-Zellen widerspiegelte (Abbildung 21C). In der HL-Zelllinie KMH2 konnte eine starke Aktivierung des kanonischen NF- κ B-Signalwegs beobachtet werden. Es konnte p50, c-Rel und p65 im Kern nachgewiesen werden. Die Aktivierung des nicht-kanonischen NF- κ B-Signalwegs war dagegen in den KMH2-Zellen schwächer als in der Zelllinie L428. P100 akkumulierte im Zytoplasma und im Vergleich zu den EREB-LMP1/2A- und den L428-Zellen wurden nur geringe Mengen von p52 im Kern detektiert. Dies weist auf eine reduzierte Prozessierung von p100 zu p52 hin.

Die Ergebnisse zeigen, dass sich die beiden HL-Zelllinien in der Aktivität ihrer Signalwege unterscheiden. Die HL-Zelllinie KMH2 hatte im Gegensatz zu den L428-Zellen verstärkt den kanonischen NF- κ B-Signalweg aktiviert. Der nicht-kanonische NF- κ B-Signalweg scheint dagegen in den L428-Zellen stärker als in den KMH2-Zellen aktiv zu sein. Außerdem konnten Unterschiede in der Stärke der Aktivierung von Akt und JNK beobachtet werden, wobei ERK in beiden HL-Zelllinien nicht aktiv war. Inwieweit in EBV-positiven HRS-Zellen die Aktivität dieser Signalwege durch die Expression von LMP1 und LMP2A beeinflusst wird, kann aus dieser Analyse nicht abgeleitet werden. Es ist vorstellbar, dass die beiden viralen Proteine zur Aktivierung der Kinasen ERK und Akt sowie zur Aktivierung des kanonischen und des nicht-kanonischen NF- κ B-Signalwegs in HRS-Zellen beitragen und den Zellen gegenüber EBV-negativen Zellen einen Wachstumsvorteil verschaffen.

3.1.4 Die Expressionsstärke des Protoonkogens c-Myc

Der Transkriptionsfaktor c-Myc wird von einem klassischen Protoonkogen kodiert und wird in vielen Tumoren überexprimiert. C-Myc aktiviert den Zellzyklus und kann bei Überexpression zu unkontrollierter Proliferation beitragen. C-Myc wurde als ein

direktes Zielgen von LMP1 beschrieben (Dirmeier et al., 2005). Um zu untersuchen, ob der Überlebensvorteil von LMP1- und LMP1/2A-exprimierenden Zellen neben der Aktivierung der bereits analysierten Signalwege auch auf die Expression von c-Myc zurückzuführen ist, wurden die c-Myc-Level in den verschiedenen EREB2-5-Zelllinien in Gegenwart von Östrogen und nach Östrogenentzug miteinander verglichen.

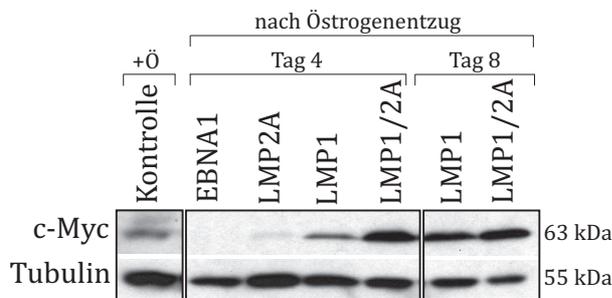


Abbildung 22 Expression von c-Myc. Die EREB2-5-Zellen wurden mit Hilfe eines Western Blots auf die Expression von c-Myc getestet. Es sind Zelllysate von EREB2-5-Zellen in Gegenwart von Östrogen und von den verschiedenen Zelllinien an Tag 4 und 8 nach Östrogenentzug gezeigt.

Der Western Blot zeigt, dass c-Myc in EREB2-5-Zellen in Anwesenheit von Östrogen exprimiert und nach Östrogenentzug herunterreguliert wird (Abbildung 22). In LMP1-exprimierenden Zellen wurden im Vergleich zu den proliferierenden EREB2-5-Zellen nach Abschalten von EBNA2 vergleichbare oder leicht erhöhte c-Myc-Mengen detektiert, die durch Co-Expression von LMP2A noch weiter gesteigert wurden. Diese Analysen zeigen, dass LMP1 und LMP2A in EREB2-5-Zellen in Abwesenheit des Latenz III Programms zur c-Myc Induktion beitragen.

3.1.5 Die Expression der Tumorsuppressoren A20, p53 und Rb

Es stellte sich die Frage, warum trotz der Aktivierung von Akt, ERK und NF- κ B sowie der Expression von c-Myc die EREB-LMP1- und EREB-LMP1/2A-Zellen aufhörten zu proliferieren und nach einiger Zeit starben. Eine Erklärungsmöglichkeit wäre eine verstärkte Expression oder Aktivität von Tumorsuppressor-Genen. Aus diesem Grund wurde die Expression der Tumorsuppressoren A20 und p53 untersucht. A20 ist als negativer Regulator von NF- κ B beschrieben worden und p53 hat einen negativen Einfluss auf die Regulation des Zellzyklus.

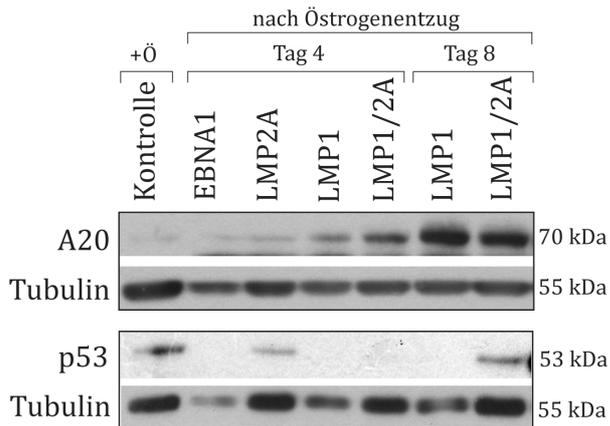


Abbildung 23 Die Expression der Tumorsuppressoren A20 und p53. Die EREB2-5-Zelllinien wurden auf die Expression von A20 und p53 überprüft. Die Expressionsstärke der Faktoren wurde in den verschiedenen Zelllinien nach Östrogenentzug und in Anwesenheit von Östrogen untersucht und miteinander verglichen.

Die Analysen zeigten, dass A20 in Anwesenheit von Östrogen nur schwach exprimiert wird. Nach Östrogenentzug konnte in den beiden LMP1-exprimierenden Zelllinien vermehrt A20 nachgewiesen werden (Abbildung 23). Je länger der Östrogenentzug andauerte, umso höher wurde A20 exprimiert (vgl. Tag 4 mit Tag 8). Die Analysen zeigten somit, dass nach Östrogenentzug die Expression von LMP1 oder die Co-Expression von LMP1 und LMP2A zur Akkumulation des Tumorsuppressors A20 führt. Der Western Blot zeigte, dass der Tumorsuppressor p53 in den Kontrollzellen in Anwesenheit von Östrogen und an Tag 4 nach Östrogenentzug in der Zelllinie EREB-LMP2A exprimiert wurde (Abbildung 23). Es konnte beobachtet werden, dass die Co-Expression von LMP1 und LMP2A an Tag 8 nach Östrogenentzug ebenfalls zur Expression von p53 führt. Diese Daten weisen darauf hin, dass LMP2A zur Induktion des p53-Gens beiträgt. Inwieweit dies das Überleben und die Proliferation der LMP1/2A-co-exprimierenden Zellen beeinflusst, kann aus diesen Analysen nicht abgeleitet werden.

Das Tumorsuppressorprotein Retinoblastom (Rb) reguliert ebenfalls den Zellzyklus und hindert Zellen aus der G1-Phase in die S-Phase einzutreten. Das Rb-Protein kann in verschiedenen Phosphorylierungszuständen vorliegen. In proliferierenden Zellen liegt Rb inaktiv und damit im hyperphosphorylierten Zustand vor und in arretierten Zellen hypophosphoryliert. Mit Hilfe eines Western Blots wurde der Phosphorylierungszustand von Rb in Anwesenheit von Östrogen und 4 Tage nach Abschalten von EBNA2 untersucht.

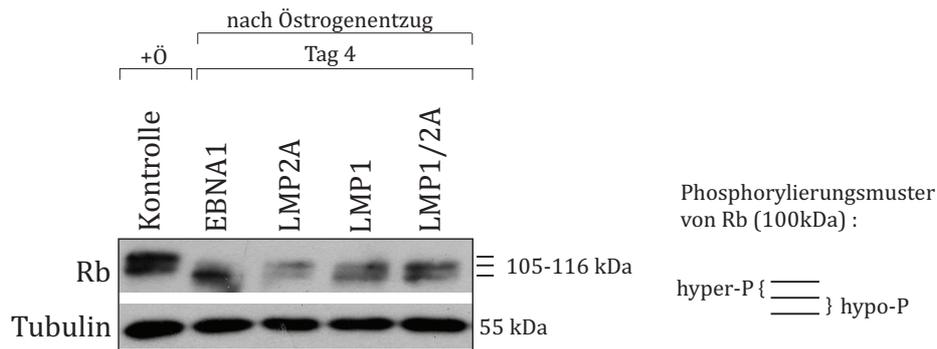


Abbildung 24 Durch die Expression von LMP1 und/oder LMP2A kann Rb nicht hyperphosphoryliert werden. Es wurde der Phosphorylierungszustand der verschiedenen EREB2-5-Zellen in Anwesenheit von Östrogen und an Tag 4 nach Östrogenentzug miteinander verglichen. Es sind Zelllysate von EREB2-5-Zellen in Gegenwart von Östrogen und von den verschiedenen Zelllinien an Tag 4 nach Östrogenentzug gezeigt.

Die hyperphosphorylierte Form von Rb konnte nur in den proliferierenden Zellen in Gegenwart von Östrogen beobachtet werden, in denen EBNA2 aktiv war (Abbildung 24). Weder die Expression von LMP1 noch die Expression von LMP2A oder die Co-Expression beider Proteine war in der Lage Rb zu phosphorylieren. Das Ergebnis zeigt, dass andere virale Proteine der Latenz III nötig sind, um den Tumorsuppressor Rb zu inaktivieren.

Diese Analysen zeigen, dass A20 und p53 in den EREB-LMP1/2A-Zellen exprimiert werden und die Expression von LMP1 und LMP2A nicht ausreicht, um Rb zu inaktivieren. Sowohl die Expression von A20 und p53 sowie die hypophosphorylierte Form von Rb könnten somit eine mögliche Ursache darstellen, warum die Co-Expression von LMP1 und LMP2A nicht ausreicht, um B-Zellen zu immortalisieren.

3.2 Die konditionale Expression von CD30 in B-Zellen zur Analyse physiologischer und pathogener Effekte

CD30 wurde ursprünglich als typischer Marker für Hodgkin-Lymphome (HL) beschrieben, aber ein möglicher Beitrag von CD30 zur Tumorentstehung ist nicht geklärt. Heute gilt CD30 auch als typischer Aktivierungsmarker von B-Zellen, jedoch ist die Rolle von CD30 in B-Zellen umstritten. Um den Einfluss von CD30 in der B-Zellentwicklung und Proliferation von B-Zellen sowie einen möglichen Beitrag von CD30 zur Tumorentstehung aufzuklären, wurden 2 konditionale transgene Mausstämme generiert. Um zu untersuchen, ob die Expression des murinen CD30-Rezeptors einen Einfluss auf die B-Zellentwicklung und -proliferation hat, wurde der Mausstamm CD30^{fSTOP} generiert. In dieser Maus kann CD30 in unterschiedlichen Stadien der B-Zellentwicklung exprimiert werden, jedoch ist die Signalweiterleitung von CD30 von der Interaktion mit einem CD30-Liganden abhängig. Außerdem wurde der Mausstamm LMP1/CD30^{fSTOP} generiert, der es ermöglicht, ein konstitutives CD30-Signal in B-Zellen zu induzieren und zu untersuchen.

3.2.1 Das Fusionsprotein LMP1/CD30

Um ein konstitutives CD30-Signal in B-Zellen zu erreichen, wurde das Fusionsprotein LMP1/CD30 kloniert, welches aus der Transmembrandomäne des Epstein-Barr viralen Proteins LMP1 (AS 1-190) sowie der Signaldomäne des murinen Proteins CD30 (AS 311-498) besteht (siehe Material und Methoden). Die konstitutive Aktivität von CD30 soll über die Transmembrandomäne von LMP1 vermittelt werden, da diese unabhängig von einem Liganden Signale weiterleiten kann (Gires et al., 1997, Hatzivassiliou et al., 1998, Homig-Holzel et al., 2008).

Nach erfolgreicher Klonierung des Fusionsgens *lmp1/cd30* wurde dessen Funktionalität überprüft. Da bekannt ist, dass CD30-Signale zur Aktivierung von NF- κ B führen, wurde die Fähigkeit des Fusionsproteins LMP1/CD30 NF- κ B zu induzieren in HEK293-Zellen getestet. Diese Zellen eignen sich gut für den Test, da sie nur eine sehr geringe NF- κ B-Aktivität aufweisen. Für den Test wurde das Gen *lmp1/cd30* in das Expressionsplasmid pSG5 kloniert und anschließend zusammen mit einem NF- κ B-abhängigen Luziferase-Reporter-Gen in HEK293-Zellen transfiziert. Als Negativkontrolle diente der Leervektor pSG5 und als Positivkontrolle das Expressionsplasmid pSG5_LMP1.

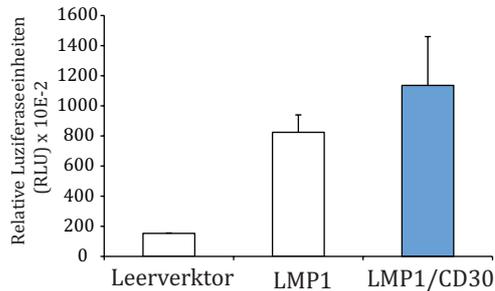


Abbildung 25 Das Fusionsprotein LMP1/CD30 kann in HEK293-Zellen NF- κ B aktivieren. Das Expressionsplasmid pSG_LMP1/CD30 wurde zusammen mit einem Reporter-Plasmid, welches NF- κ B-abhängig das Reporter-gen Luziferase exprimiert, transient in HEK293-Zellen transfiziert. Als Negativkontrolle wurde der Leervektor pSG und als Positivkontrolle das Expressionsplasmid pSG_LMP1 verwendet. 2 Tage nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet, Proteinextrakte angefertigt und anschließend die Aktivität der Luziferase gemessen. ** p < 0,01 im Vergleich zum Leervektor.

Die Expression von LMP1/CD30 führte zu einer starken NF- κ B-abhängigen Expression der Luziferase, die etwas stärker war als nach der Transfektion der Positivkontrolle LMP1 (Abbildung 25). Diese Ergebnisse zeigen, dass das Fusionsprotein in HEK293-Zellen NF- κ B induzieren kann und somit funktionsfähig ist.

3.2.2 Integration der Transgene in das Genom embryonaler muriner Stammzellen

3.2.2.1 CD30

Um den transgenen konditionalen CD30^{flSTOP}-Mausstamm zu etablieren, wurde die murine cDNA von *cd30* (Bowen et al., 1996) in den *rosa26*-Lokus integriert (Abbildung 26). Das *rosa26*-Gen kann ohne phänotypische Auswirkung homozygot inaktiviert werden. Das Transgen wurde in die *Xba*I-Schnittstelle im ersten Intron des *rosa26*-Gens integriert. Die cDNA von *cd30* wurde unter die transkriptionelle Kontrolle des CAGGs-Promotors (CMV early enhancer/chicken β -actin/ rabbit globulin promotor), bekannt als starker und konstitutiv aktiver Promotor, gestellt. Er gewährleistet eine starke Expression in allen Geweben, ausgenommen in Haaren und Erythrozyten (Niwa et al., 1991, Daly et al., 1999a, Daly et al., 1999b)(Niwa et al., 1991; Daly et al., 1999b; Daly et al., 1999a). Die CAGGs-Promotor-Region beinhaltet am 3'-Ende eine kurze Intron-Sequenz, die von einer „Splice“- Donor und „Splice“- Akzeptor Seite flankiert ist, wodurch die Expression der ansonsten „ungesplicten“ cDNA verstärkt wird. 5' von der cDNA-Sequenz von *cd30* befindet sich eine loxP-flankierte transkriptionelle STOP-Kassette. Durch eine zelltypspezifische Expression der Cre-Rekombinase kann nun in

spezifischen Zellen die STOP-Kassette deletiert und damit *cd30* zellspezifisch exprimiert werden. In der Kassette befindet sich auch das *neo*-Resistenzgen, welches nach Transfektion des Zielvektors in embryonale Stammzellen erlaubt, diejenigen ES-Zell-Klone zu identifizieren, welche das Transgen aufgenommen haben. 3' von *cd30* wurde ein um die Signaldomäne verkürzter humaner Rezeptor namens *hCD2* kloniert. Dieses Reporter-gen soll über eine ribosomale Eintrittsstelle (*IRES*) gleichzeitig mit *cd30* exprimiert werden, um die Detektion von den Zellen zu ermöglichen, in welchen die STOP-Kassette deletiert worden ist. Das Reportermodul (*IRES-hCD2*) ist von *frt*-Sequenzen flankiert, wodurch die Deletion des Reporters ermöglicht wird, sofern die Expression von hCD2 einen Effekt auf den Phänotyp haben sollte.

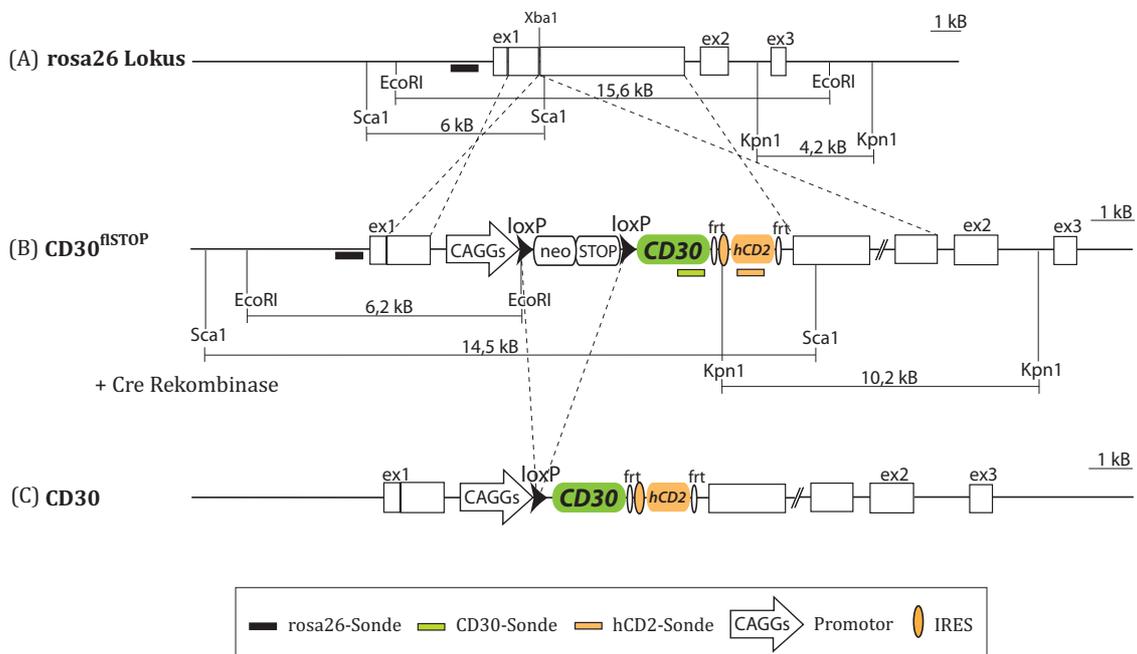


Abbildung 26 Der Mausstamm CD30^{flSTOP}. Diese Abbildung zeigt die Insertion von *cd30* in den *rosa26*-Lokus. Das Transgen wurde durch homologe Rekombination von arm1 und arm2 in den *rosa26*-Lokus inseriert. In (A) ist der Wildtyp *rosa26*-Lokus dargestellt. (B) zeigt den *rosa26*-Lokus nach der richtigen Integration des Transgens. In (C) ist der Locus nach Deletion der STOP-Kassette dargestellt. Das Schema zeigt außerdem die Restriktionsschnittstellen mit denen die genomische DNA der ES-Zellen geschnitten wurde, um im Southern Blot eine korrekte Insertion von *cd30* nachweisen zu können. Zusätzlich ist die Lage der im Southern Blot verwendeten Sonden (*rosa26*-, *CD30*- und *hCD2*-Sonde) und die erwarteten Fragmentgrößen gekennzeichnet.

3.2.2.2 LMP1/CD30

Zur Generierung des konditionalen transgenen Mausstamms LMP1/CD30^{flSTOP} wurde das Fusionsgen *Imp1/cd30* in den *rosa26*-Lokus inseriert (Abbildung 27). Das Transgen

wurde in die *Xba*I-Schnittstelle im ersten Intron des *rosa26*-Gens integriert, durch welches das Fusionsprotein unter die Kontrolle des ubiquitär aktiven *rosa26*-Promotors gestellt wurde (Soriano, 1999). Um eine richtige Prozessierung der *Imp1/cd30*-RNA zu gewährleisten, wurde eine künstliche „Splice-Akzeptor-Stelle“ vor das Transgen inseriert. Die „Splice-Donor-Stelle“ befindet sich 3' vom *rosa26*-Promotor. Vor dem Fusionsgen *Imp1/cd30* wurde eine loxP-flankierte STOP-Kassette inseriert, die eine Cre-abhängige Expression von LMP1/CD30 erlaubt. Zur Selektion der transfizierten ES-Zellen wurde in den loxP-flankierten Bereich das Resistenzgen *neo*, das die Zellen resistent gegen G418 macht, inseriert. Hinter die Gensequenz von *Imp1/cd30* ist ebenfalls der Reporter *hCD2* geschaltet, welcher über eine IRES-Stelle gleichzeitig mit LMP1/CD30 exprimiert wird und damit erlaubt LMP1/CD30-exprimierende Zellen zu detektieren. Auch hier ist das Reportermodul (*IRES-hCD2*) von *frt*-Sequenzen flankiert, was ermöglicht den Reporter zu deletieren.

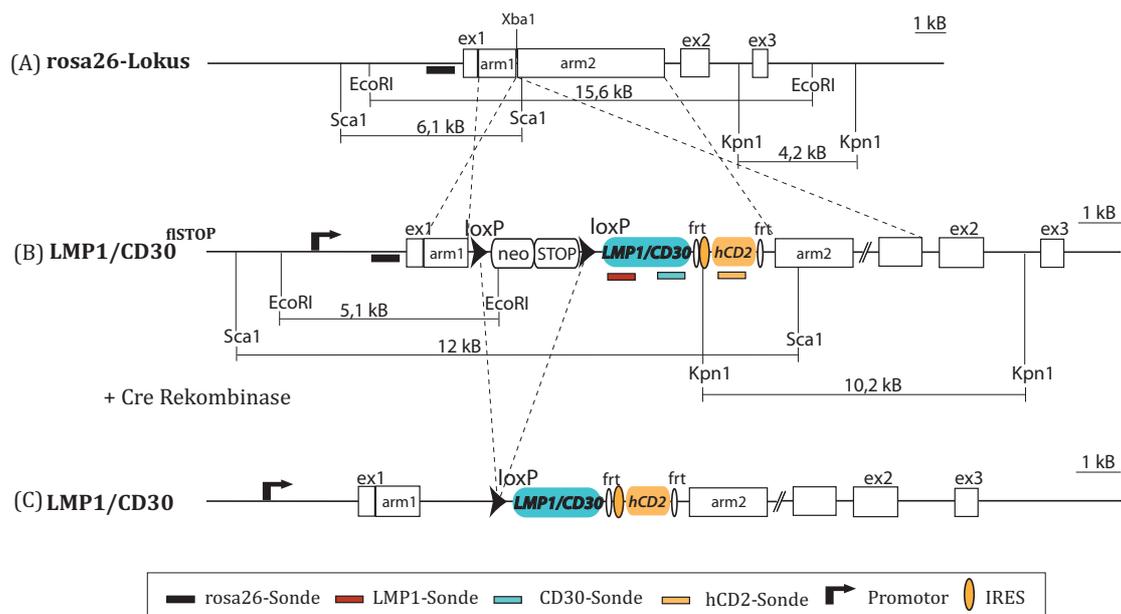


Abbildung 27 Der Mausstamm LMP1/CD30^{flSTOP}. Diese Abbildung zeigt die Insertion des Fusionsgens *Imp1/cd30* in den *rosa-26*-Lokus. Das Transgen wurde durch homologe Rekombination von *arm1* und *arm2* in den *rosa26*-Lokus inseriert. In (A) ist der Wildtyp *rosa26*-Lokus dargestellt. (B) zeigt den *rosa26*-Lokus nach der richtigen Integration des Transgens. In (C) ist der Lokus nach Deletion der STOP-Kassette dargestellt. Das Schema zeigt außerdem die Restriktionsschnittstellen mit denen die genomische DNA der ES-Zellen geschnitten wurde, um im Southern Blot eine korrekte Insertion von *Imp1/cd30* nachweisen zu können. Zusätzlich ist die Lage der im Southern Blot verwendeten Sonden (*rosa26*-, LMP1-, CD30- und *hCD2*-Sonde) und die erwarteten Fragmentgrößen gekennzeichnet.

3.2.3 Identifizierung homolog rekombinierter ES-Zell-Klone

Nachdem die beiden Integrationsvektoren TVCD30_a und TVLMP1/CD30_final kloniert worden sind (siehe Material und Methoden), wurden die linearisierten Vektoren mittels Elektroporation in die murine ES-Zelllinie IDG3.2 transfiziert. Die Zelllinie IDG3.2 ist eine F1-Hybrid-Zelllinie, welche von einer männlichen C57BL/6Jx129/SV (F1) Blastozyste generiert worden ist (Hitz et al., 2007). Für jedes Konstrukt wurden zunächst 300 G418-resistente Zellkolonien auf 96-Loch Platten gepickt und expandiert. Um nun Klone mit einer einfachen und korrekten homologen Rekombination zu identifizieren, wurden Southern Blot Analysen durchgeführt. Die genomische DNA der Klone wurde isoliert und zunächst mit dem Enzym *EcoRI* verdaut. Die DNA wurde zuerst mit der *rosa26*-Sonde hybridisiert. Mit dieser Sonde wurde die homologe Rekombination der Zielvektoren TVCD30_a und TVLMP1/CD30_final am 5'-Ende überprüft. Klone, die homologe Integration am 5'-Ende aufwiesen, wurden mit weiteren Southern-Blot-Analysen genauer untersucht. Die genomische DNA der positiv getesteten Klone wurde mit den Enzymen *ScaI* und *KpnI* verdaut. Es wurden die Sonden *rosa26*, *CD30*, *LMP1* und *hCD2* verwendet. In Tabelle 1 sind die zu erwartenden Größen der Banden für den Wildtyp *rosa26*-Lokus und für den *rosa26*-Lokus nach homologer Rekombination von TVCD30_a und TVLMP1/CD30_final zusammengefasst.

Verdau		<i>ScaI</i>			<i>KpnI</i>
Sonde		rosa26	CD30	LMP1	hCD2
CD30	wt	6 kB	20 kB	-	-
	positive Integration	14,5 kB	14,5 kB	-	10,2 kB
LMP1/CD30	wt	6 kB	20 kB	-	-
	positive Integration	12 kB	12 kB	12 kB	10,2 kB

Tabelle 1 Identifizierung von ES-Klonen, die die Zielvektoren über homologe Rekombination in den *rosa26*-Lokus inseriert haben. In dieser Tabelle sind die im Southern Blot zu erwartenden Größen der Fragmente nach Hybridisierung der verschiedenen Sonden für das wt-Allel und für die Allele nach Integration der Transgene gezeigt.

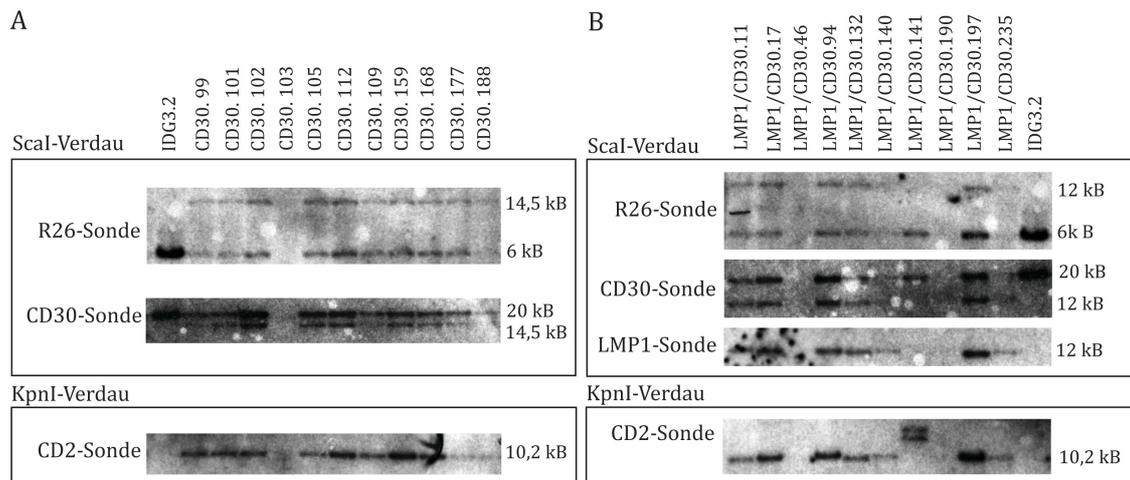


Abbildung 28 Identifizierung von ES-Zellklonen mit positiver Integration der Transgene CD30 und LMP1/CD30. Zur Analyse der homologen Rekombination der Transgene *lmp1/cd30* und *cd30* in den *rosa26*-Lokus in das Genom von IDG3.2-ES-Zellen wurden Southern Blots durchgeführt. Die genomische DNA von Wildtyp IDG3.2-Zellen und von transfizierten CD30- und LMP1/CD30-ES-Klonen wurden mit den Enzymen *Scal* und *KpnI* verdaut. Die Southern Blots wurden mit den radioaktiv markierten Sonden *rosa26*, CD30, LMP1 und hCD2 hybridisiert. In **(A)** ist der Southern Blot von Klonen gezeigt, die auf die korrekte Integration von *cd30* geprüft wurden. In **(B)** wurden Klone auf die Integration des *lmp1/cd30*-Transgens getestet.

Um zu untersuchen, ob die Transgene *lmp1/cd30* und *cd30* korrekt am 5'-Ende in das Genom inseriert wurden, wurde die genomische DNA der ES-Zellen mit *ScaI* verdaut. Als Negativkontrolle wurde die DNA untransfizierter IDG3.2-ES-Zellen verwendet. Im Fall des wt-Allels wird nach Hybridisierung mit der *rosa26*-Sonde eine Bande bei 6 kB sichtbar (Abbildung 28). Nach positiver Integration des Transgens *cd30* detektiert die Sonde eine Bande bei 14,5 kB und nach korrekter Integration von *lmp1/cd30* eine Bande bei 12 kB. Außerdem wurde überprüft, ob die Transgene vollständig und einfach in das Genom inseriert wurden. Mit der CD30-Sonde konnte das Vorhandensein des Fusionsgens *cd30* bzw. der *lmp1/cd30*-cDNA sowie die einfache Integration in das Genom gezeigt werden. Nach einer einfachen Integration in das Genom detektiert die CD30-Sonde zum einen das *cd30* (14,5 kB)- bzw. *lmp1/cd30* (12 kb)-Transgen und zum anderen die Sequenz des endogenen CD30-Lokus (20 kb). Mit der LMP1-Sonde wurde das Vorhandensein der Transmembrandomäne von LMP1 geprüft. Im Falle der positiven Integration von *lmp1/cd30* erkennt die LMP1-Sonde ein Fragment der Größe 12 kB. Um eine korrekte 3'-Integration in das Genom zu überprüfen, wurde die genomische DNA der ES-Zell-Klone mit dem Enzym *KpnI* geschnitten und mit der Sonde

hCD2 hybridisiert. Eine erfolgreiche Integration ist für beide Transgene mit einer Bande von 10,2 kB detektiert worden.

Für die ES-Zellklone LMP1/CD30.11/17/94/132/141/197 konnte die korrekte Integration von *Imp/cd30* durch die Hybridisierung mit allen 4 Sonden gezeigt werden. Es konnte für alle CD30-ES-Zellklone, außer für Klon CD30.103, eine positive und korrekte Integration in das Genom detektiert werden.

Es wurden pro Linie 2 Klone ausgewählt (CD30.99, CD30.102, LMP1/CD30.11, LMP1/CD30.94) um zu testen, ob die STOP-Kassette durch die Expression der Cre-Rekombinase deletiert werden kann. Die 4 ausgewählten ES-Zellklone wurden mit einem Expressionsplasmid für die Cre-Rekombinase transfiziert. Nach der Transfektion des Plasmids wurden Einzelklone gepickt, expandiert und auf die Resistenz gegen G418 getestet. Klone, welche nicht mehr resistent gegen G418 waren, da die STOP-Kassette mit der Neo-Resistenz deletiert wurde, wurden mittels FACS-Analyse auf die Expression des Reporters hCD2 getestet. CD30-ES-Zellklone wurden außerdem auf die Expression von CD30 getestet.

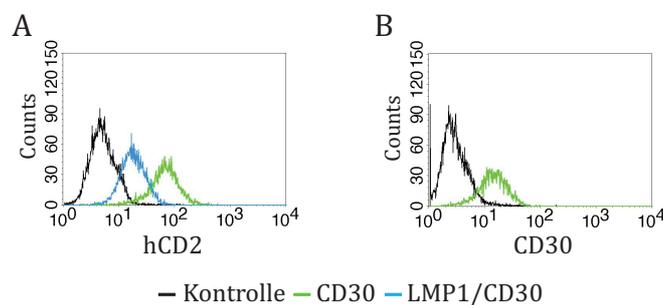


Abbildung 29 Expression des Reporters hCD2 und CD30 in homolog rekombinierten ES-Zellen. Um zu überprüfen, ob die STOP-Kassette durch die Cre-Rekombinase deletiert werden kann, wurden die Klone CD30.99, CD30.102, LMP1/CD30.11 und LMP1/CD30.94 ausgewählt und mit einem Cre-Rekombinase-Expressionsplasmid transfiziert. (A) Transfizierte Einzelklone wurden mit hCD2 gefärbt, um die Expression des Reporters im FACS zu untersuchen. Es ist exemplarisch je ein Subklon der transfizierten Klone CD30.99 und LMP1/CD30.94 gezeigt. (B) Die transfizierten CD30-ES-Zellklone wurden zusätzlich auf die Expression von CD30 geprüft. Es ist die Expression von CD30 von einem Subklon der ES-Zellen CD30.99 dargestellt. Als Kontrolle dienten untransfizierte ES-Zellen.

Sowohl für die CD30- als auch für LMP1/CD30-ES-Zellklone konnte in allen Subklonen die Expression von hCD2 nachgewiesen werden (Abbildung 29A). Außerdem konnten in den Subklonen der CD30-ES-Zellklone CD30 auf der Oberfläche nachgewiesen werden (Abbildung 29B). Es ist exemplarisch je ein Subklon der ES-Zellklone CD30.99 und

LMP1/CD30.94 dargestellt. Die Analyse zeigte damit, dass die STOP-Kassette in den 4 ES-Zellklonen CD30.99, CD30.102, LMP1/CD30.11, LMP1/CD30.94 erfolgreich durch die Cre-Rekombinase deletiert werden kann. In den CD30-Klonen konnte eine stärkere Expression von hCD2 beobachtet werden als in den LMP1/CD30-Klonen. Dies war zu erwarten, da die Expression von CD30 über den starken CAGGs-Promotor erfolgt, während die Expression von LMP1/CD30 über den schwachen endogenen rosa26-Promotor vermittelt wird. Die auf Funktionalität der loxP-Stellen ausgetesteten Klone wurden für die Blastozysten-Injektion verwendet.

3.2.4 Generierung der Mausstämme

In Kooperation mit dem Institut für Entwicklungsgenetik am Helmholtz Zentrum München wurden die 4 positiv getesteten ES-Klone in C57BL/6-Blastozysten injiziert und in C57BL/6-scheinschwangere Mütter implantiert. Nach Injektion der ES-Zellklone CD30.102 und LMP1/CD30.11 wurden keine chimären Tiere geboren. Nach Blastozysten-Injektion des Klons CD30.99 wurde eine Maus mit 40 % Chimärismus geboren, welche 2 Nachkommen hatte, die das CD30-Transgen in der Keimbahn trugen. Mit diesen beiden Mäusen wurde die Mauslinie CD30^{fSTOP} etabliert. Für die LMP1/CD30^{fSTOP}-transgene Maus wurden durch die Injektion der LMP1/CD30.94-Zellen 5 chimäre Mäuse mit einem Chimärismus zwischen 5 % - 40 % geboren. Die zu 5 % chimäre Maus gab Keimbahntransmission und gebar 3 Nachkommen, die das Transgen *Imp1/cd30* in der Keimbahn trugen. Mit diesen Mäusen wurde der Mausstamm LMP1/CD30^{fSTOP} etabliert.

3.3 Die Expression von CD30 während der B-Zellentwicklung und B-Zellproliferation *in vivo*

CD30^{fSTOP}- und LMP1/CD30^{fSTOP}-Mäuse wurden mit CD19Cre^{+/-}-Mäusen verpaart. In CD19Cre^{+/-}-Mäusen ist die Cre-Rekombinase in ein CD19-Allel integriert, was zur Expression der Cre-Rekombinase und damit zur Deletion der STOP-Kassette in CD19-positiven Zellen führt. Da CD19 nur in B-Zellen (ab dem Pro-B-Zellstadium) exprimiert wird, exprimieren die Analysemause CD30/CD19Cre^{+/-} und LMP1/CD30//CD19^{+/-} B-Zell-spezifisch CD30 bzw. LMP1/CD30. Der Einfachheit halber werden CD30/CD19^{+/-}-Mäuse in dieser Arbeit als CD30-Mäuse und LMP1/CD30//CD19Cre^{+/-}-

Mäuse als LMP1/CD30-Mäuse bezeichnet. Mit Hilfe dieser Mäuse wurde der Einfluss der CD30-Expression bzw. eines konstitutiven CD30-Signals auf die B-Zellenentwicklung und -proliferation untersucht.

3.3.1 Die Expression der Transgene LMP1/CD30 und CD30 in murinen B-Zellen

Um die Deletion der STOP-Kassette in murinen CD19-positiven B-Zellen zu verifizieren, wurde die Expression des Reporters hCD2 mit Hilfe einer FACS-Analyse untersucht. Milzzellen wurden mit α -B220-Antikörpern (B-Zellmarker) und α -hCD2 gefärbt und im FACS analysiert.

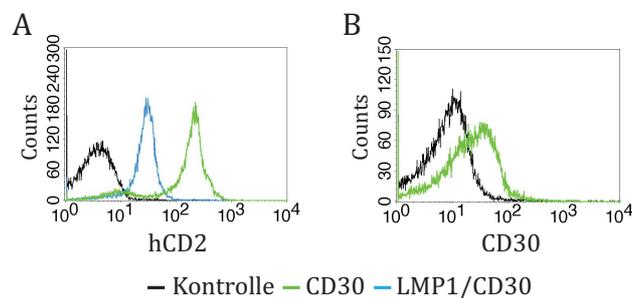


Abbildung 30 Die Expression von hCD2 und CD30 in murinen B-Zellen. (A) In Milzzellen aus CD30- und LMP1/CD30-Mäusen wurden die B-Zellen (B220⁺) auf die Expression des Reporters hCD2 getestet. Als Negativkontrolle wurden B-Zellen von Kontrollmäusen verwendet. **(B)** B-Zellen (B220⁺) aus der Milz von CD30-Mäusen wurden auf die Expression von CD30 geprüft. Die Expression wurde mit B-Zellen von Kontrollmäusen verglichen.

Die FACS-Analyse zeigte, dass in murinen B-Zellen von CD30- und LMP1/CD30-Mäusen das Reporterogen *hCD2* exprimiert wird (Abbildung 30A). In den B-Zellen von CD30-Mäusen konnte eine stärkere Expression von hCD2 beobachtet werden als in den B-Zellen von LMP1/CD30-Mäusen, da die Expression von CD30 über den starken CAGGs-Promotor vermittelt wird, wohingegen die Expression von LMP1/CD30 über den schwächeren endogenen Promotor des *rosa26*-Lokus erfolgt. In Abbildung 30B ist die Expression von CD30 in murinen B-Zellen gezeigt.

Um die Expressionsstärke der Transgene zu untersuchen, wurden aus isolierten B-Zellen von CD30- und LMP1/CD30-Mäusen Proteinextrakte angefertigt.

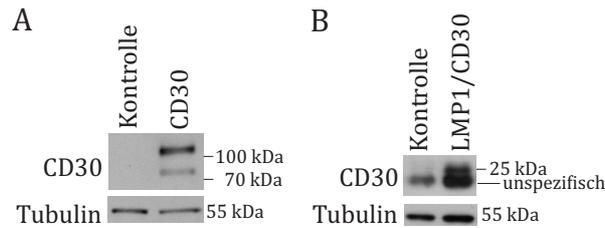


Abbildung 31 Nachweis der Proteine CD30 und LMP1/CD30 in murinen B-Zellen. Um die Expression der Transgene auf Proteinebene nachzuweisen, wurden von gereinigten B-Zellen (CD43⁻) Proteinextrakte angefertigt. Im Western Blot wurde mit einem CD30-Antikörper, der gegen den zytoplasmatischen Teil von CD30 gerichtet ist, CD30 und LMP1/CD30 nachgewiesen. In **(A)** ist die Expression von CD30 in B-Zellen von CD30-Mäusen und Kontrollmäusen dargestellt. In **(B)** ist der Western Blot von LMP1/CD30- und Kontroll-B-Zellen gezeigt.

Im Western Blot konnten in B-Zellen von CD30-Mäusen mit einem CD30-spezifischen Antikörper 2 Banden detektiert werden (Abbildung 31A). Die größere Bande lag bei ca. 110 kDa und entspricht damit der Größe des murinen CD30-Rezeptors (Bowen et al., 1996). Die zweite, kleinere Bande konnte bei 80 kDa beobachtet werden. Dabei handelt es sich vermutlich um die unglykosylierte Vorläuferform von CD30. In der Kontrollmaus war die Detektion von CD30 nicht zu erwarten, da in ruhenden B-Zellen, die den größten prozentualen Anteil der B-Zellen in der Milz ausmachen, CD30 nicht exprimiert wird. In den LMP1/CD30-exprimierenden B-Zellen konnte mit dem CD30-Antikörper eine spezifische Bande bei 25 kDa detektiert werden (Abbildung 31B). Nachdem die Expression von CD30 und LMP1/CD30 erfolgreich in B-Zellen gezeigt werden konnte, wurde untersucht, ob die aberrante Expression von CD30 und LMP1/CD30 einen Einfluss auf die B-Zellexpansion hat.

3.3.2 Das konstitutive Signal von CD30 führt zu einer Zunahme von B-Zellen in der Milz

Um festzustellen, ob die Expression von CD30 oder LMP1/CD30 zu einer Splenomegalie führt, wurden die Milzgrößen und Milzgewichte der beiden CD30-exprimierenden Mausstämmen mit denen von Kontrollmäusen verglichen.

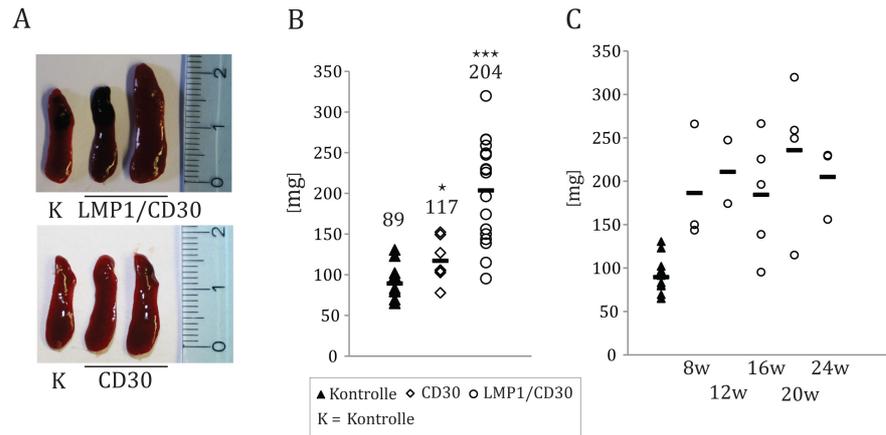


Abbildung 32 Milzgewichte. (A) Die B-Zell-spezifische Expression von LMP1/CD30 kann in den Mäusen zu einer Splenomegalie führen. Oben sind die Milzgrößen von 2 LMP1/CD30-Mäusen (20 Wochen) im Vergleich zu einer altersgleichen Kontrollmaus gezeigt. Unten sind die Milzgrößen von zwei CD30-exprimierenden Mäusen im Vergleich zu einer gleich alten Kontrollmaus (13 Wochen) gezeigt. (B) Es sind die durchschnittlichen Milzgewichte von CD30- und LMP1/CD30-Mäusen im Vergleich zu Kontrollmäusen gezeigt. Es wurden 7 CD30-Mäuse im Alter zwischen 8-14 Wochen untersucht. Außerdem sind die Milzgewichte von 17 LMP1/CD30-Mäusen im Alter zwischen 8-24 Wochen dargestellt. (C) Die Milzgewichte von LMP1/CD30-exprimierenden Mäusen wurden nach Alter aufgetragen, um eine altersbedingte Zunahme der Milzgewichte im Vergleich zur Kontrolle zu prüfen. * P < 0,05 und *** P < 0,001 im Vergleich zur Kontrolle.

Die Analysen zeigten eine signifikante Erhöhung der Milzgewichte von CD30- und LMP1/CD30-Mäusen. Die Splenomegalie war bei den LMP1/CD30-Mäusen stärker als bei den CD30-Mäusen ausgeprägt (Abbildung 32A, B). Außerdem konnte eine hohe Varianz der Milzgewichte in den LMP1/CD30-exprimierenden Mäusen festgestellt werden, die jedoch keine Altersabhängigkeit zeigte (Abbildung 32C).

Um zu untersuchen, ob die Splenomegalie durch erhöhte B- oder T-Zellzahlen vermittelt wird, wurden die Gesamt-, B- und T-Zellzahlen bestimmt. Die Analyse zeigte, dass die Expression von CD30 zu keiner signifikanten Veränderung der Gesamt-, B- und T-Zellzahlen führte (Abbildung 33). Durch die B-Zell-spezifische Expression von LMP1/CD30 konnte eine signifikante Erhöhung der Gesamt- und B-Zellzahlen beobachtet werden (Abbildung 33). Die Expression von LMP1/CD30 führte zu keiner signifikanten Veränderung der T-Zellzahlen. Es konnte aber beobachtet werden, dass in Mäusen, in denen die Splenomegalie stark ausgeprägt war, auch die T-Zellzahlen leicht erhöht waren. Außerdem konnte durch einen Vergleich der Gesamtzellzahlen mit den B-Zellzahlen in LMP1/CD30-exprimierenden Mäusen festgestellt werden, dass die B-Zellen nicht alleine zur Erhöhung der Gesamtzellzahlen beitragen. Diese Daten weisen darauf hin, dass die Expression von LMP1/CD30 in

B-Zellen, neben der Expansion der B-Zellen, auch zu einer Expansion von anderen Milzzellen führt.

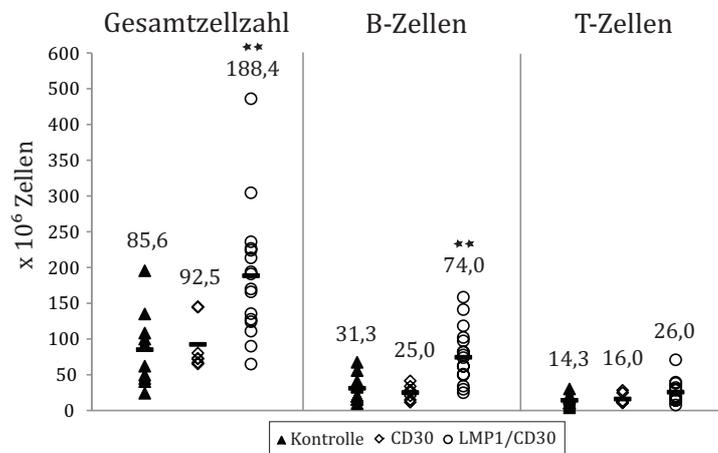


Abbildung 33 Die B-Zell-spezifische Expression von LMP1/CD30 führt zu einer Zunahme der B-Zellen in der Milz. Es sind die Gesamtzellzahlen, die B- und T-Zellzahlen der Milz von CD30-Mäusen, LMP1/CD30-Mäusen und Kontrollmäusen dargestellt. Die Gesamtzellzahlen der Milzen wurden mittels Zählung in der Neubauer-Zählkammer ermittelt. Durch Färbung der Milzzellen mit dem B-Zellmarker B220 und dem T-Zellmarker CD3 wurden die prozentualen Anteile der jeweiligen Population ermittelt und daraus die absoluten Zellzahlen berechnet. Es sind die durchschnittlichen Zellzahlen von mindestens 7 Mäusen pro Genotyp gezeigt. ** P < 0,01 im Vergleich zur Kontrolle.

3.3.3 Die frühe B-Zellentwicklung wird durch die Expression von CD30 oder LMP1/CD30 nicht beeinflusst

Um zu untersuchen, ob die CD30-Expression oder das konstitutive CD30-Signal die frühe B-Zellentwicklung im Knochenmark beeinflussen, wurden die verschiedenen B-Zellpopulationen im Knochenmark genauer untersucht. Knochenmarkszellen wurden mit den Antikörpern gegen die Oberflächenmarker B220, CD43 und IgM gefärbt. Verschiedene Entwicklungsstufen von B-Zellen im Knochenmark lassen sich durch die unterschiedliche Expression der genannten Marker unterscheiden.

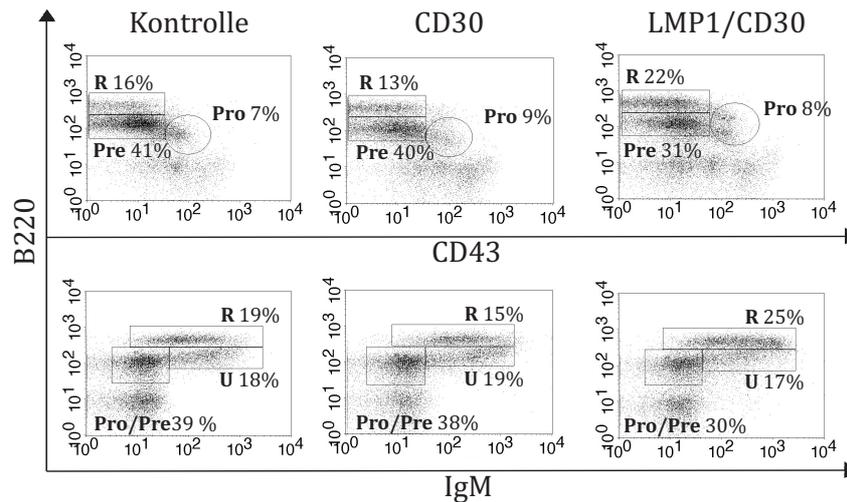


Abbildung 34 Durch die B-Zell-spezifische Expression von CD30 und LMP1/CD30 wird die frühe B-Zellentwicklung nicht gestört. Die FACS-Analyse zeigt die prozentualen Anteile der Pro- und Pre-B-Zellen sowie von unreifen B-Zellen (U) und rezirkulierenden B-Zellen (R) aus Knochenmarkszellen von CD30- und LMP1/CD30-Mäusen im Vergleich zu Kontrollmäusen. Die Zellen wurden mit Antikörpern gegen die Oberflächenmarker B220, CD43 und IgM gefärbt. In der oberen Färbung sind die Prozente rezirkulierender B-Zellen (CD43⁻, IgM⁺), der Pro-B-Zellen (CD43⁺B220^{niedrig}) und der Pre-B-Zellen (CD43⁻B220^{niedrig}) dargestellt. In der unteren Reihe sind die Pro/Pre-B-Zellen (B220^{niedrig}IgM⁻), die unreifen B-Zellen (B220^{niedrig}IgM⁺) und rezirkulierenden B-Zellen (B220^{hoch}IgM⁺) gezeigt. Für die Analyse wurden mindestens 6 Mäuse pro Genotyp herangezogen.

Die Färbung mit den Antikörpern gegen B220 und CD43 zeigte, dass das Verhältnis der Pro-B-Zellen (CD43⁺B220^{niedrig}) und Pre-B-Zellen (CD43⁻B220^{niedrig}) sowie der rezirkulierenden B-Zellen (CD43⁻ B220^{hoch}) durch die Expression von CD30 und LMP1/CD30 nicht beeinflusst wurde (Abbildung 34). Die prozentualen Anteile der B-Zellpopulationen zeigten keine signifikanten Veränderungen. Auch die Färbung gegen die Oberflächenmarker B220 und IgM, welche die Anteile der Pro/Pre-B-Zellen (B220^{niedrig}IgM⁻), der unreifen B-Zellen (B220^{niedrig}IgM⁺) und der rezirkulierenden B-Zellen (B220^{hoch}IgM⁺) darstellt, zeigte keine Unterschiede zwischen den zwei CD30-exprimierenden Mausstämmen im Vergleich zu Kontrollmäusen.

3.3.4 Die Expression von LMP1/CD30 führt zu einer Zunahme von B1-Zellen

Es stellte sich die Frage, ob an der Expansion der B-Zellen in der Milz von LMP1/CD30-Mäusen die verschiedenen Subpopulationen in äquivalenten Maße beteiligt sind oder, ob es sich um die Vermehrung einer bestimmten B-Zellpopulation handelt. Um die in der Milz expandierten B-Zellpopulationen näher zu charakterisieren, wurden die Zellen mittels FACS-Analyse untersucht. Follikuläre B-Zellen (FoB) sind zahlenmäßig mit 75 %

die größte Population in der Milz. Marginalzonen-B-Zellen (MZB) sind mit ca. 5 % in der Milz vertreten und ca. 3 % der Milzzellen sind B1-Zellen. Außerdem findet man in der Milz einen gewissen prozentualen Anteil unreifer B-Zellen, die sogenannten transitionalen B-Zellen. Dies sind frisch aus dem Knochenmark ausgewanderte B-Zellen, die sich zu FoB-Zellen oder MZB-Zellen entwickeln können.

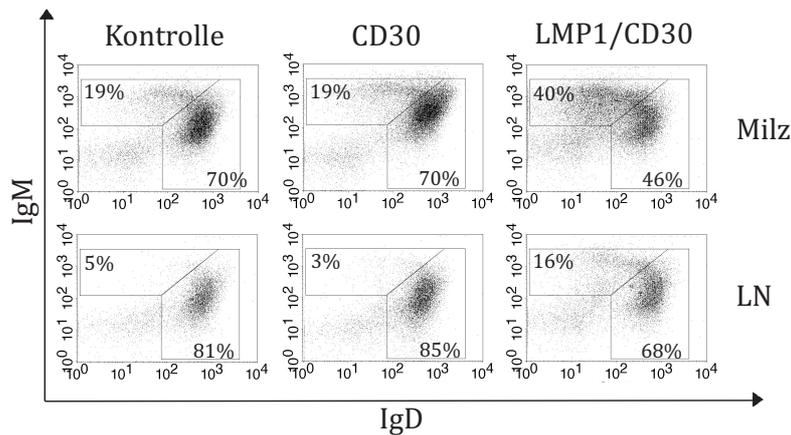


Abbildung 35 Analyse der IgM- und IgD-Expression auf B-Zellen in CD30- und LMP1/CD30-Mäusen. Sowohl Milzzellen als auch die Zellen aus dem Lymphknoten (LN) von CD30-, LMP1/CD30-Mäusen und Kontrollmäusen wurden mittels FACS-Analyse auf die Expression von IgM und IgD untersucht. Es sind die Anteile der B220⁺-Lymphozyten dargestellt. Die durchschnittlichen Prozentzahlen der follikulären B-Zellen (IgM⁺IgD^{hoch}) und IgM^{hoch}IgD^{niedrig}-exprimierender Zellen (Transitionale B-Zellen, MZB und B1-Zellen) von mindestens 6 Mäusen sind dargestellt.

Durch Färbungen mit den Antikörpern IgM und IgD kann man die FoB-Zellen (IgM⁺IgD^{hoch}) von den MZB-Zellen, den transitionalen B-Zellen und den B1-Zellen (IgM^{hoch}IgD^{niedrig}) unterscheiden. Die Expression von CD30 hatte keinen Einfluss auf die Verteilung der FoB (IgM⁺IgD^{hoch})- und IgM^{hoch}IgD^{niedrig}-Zellen (Abbildung 35). In den LMP1/CD30-exprimierenden Mäusen konnten prozentual mehr IgM^{hoch}IgD^{niedrig}-positive Zellen detektiert werden als in den Kontrollmäusen, während die Anteile an IgM⁺IgD^{hoch}-positiver Zellen erniedrigt waren. Dasselbe Ergebnis konnte für die aus den Lymphknoten isolierten Zellen gezeigt werden.

Um zu untersuchen, ob es sich bei der expandierten IgM^{hoch}IgD^{niedrig}-B-Zellpopulation in LMP1/CD30-Mäusen um Transitionelle, MZ- oder B1-Zellen handelt, wurden weitere Färbungen durchgeführt. Zunächst wurde untersucht, ob die Zellzahlen der transitionalen B-Zellen (AA4.1⁺), welche sich in T1 (IgM^{hoch}CD23⁻), T2 (IgM^{hoch}CD23⁺) und T3 (IgM^{niedrig}CD23⁺) gliedern, verändert waren.

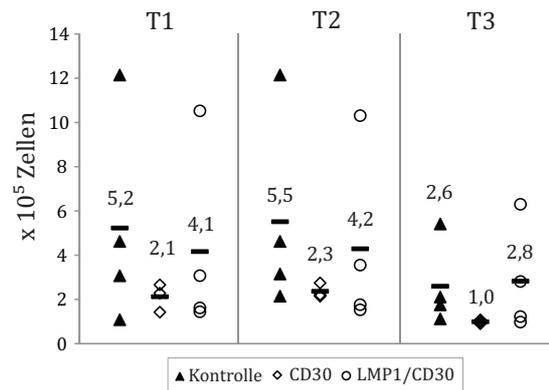


Abbildung 36 Zellzahlen der transitionalen (AA4.1⁺) B-Zellen. Es wurden die absoluten Zellzahlen der transitionalen T1-, T2- und T3-B-Zellen berechnet. Die Berechnung erfolgte mit Hilfe einer FACS Analyse, bei der die AA4.1-positiven B-Zellen nach Expression ihrer Oberflächenmarker IgM und CD23 in T1- (IgM^{hoch}CD23⁻), T2- (IgM^{hoch}CD23⁺) und T3-B-Zellen (IgM^{niedrig}CD23⁺) aufgetrennt wurden. Zur Bestimmung der Zellzahlen wurden die prozentualen Anteile der verschiedenen Populationen auf die Gesamtzellzahl umgerechnet. Die Analyse erfolgte mit mindestens 3 Mäusen pro Genotyp.

Weder die Expression von CD30 noch die Expression von LMP1/CD30 hatte einen signifikanten Einfluss auf die Anzahl oder die prozentuale Verteilung der transitionalen B-Zellen (Abbildung 36).

Um zu untersuchen, ob die Erhöhung der B-Zellzahlen in LMP1/CD30-Mäusen durch eine Expansion von MZB-Zellen verursacht wird, wurde eine CD21- und CD23-Färbung durchgeführt. Die FACS-Analyse zeigte, dass die prozentualen Anteile der MZB-Zellen (B220⁺CD21^{hoch}CD23^{niedrig}) durch die CD30-Expression oder durch ein konstitutives CD30-Signal nicht erhöht waren (Abbildung 37A). Diese Färbung zeigte, dass der Anteil der FoB-Zellen (B220⁺CD21⁺CD23⁺) in LMP1/CD30-Mäusen reduziert war. Zudem konnte beobachtet werden, dass durch die Expression von LMP1/CD30 eine Zellpopulation auftrat, die weder CD21 noch CD23 hoch exprimierte. Die Berechnung der absoluten Zellzahlen der MZB-, FoB- und der CD21^{niedrig}CD23^{niedrig}-Population ergab, dass die FoB-Zellen ca. 1,5-fach, die MZB-Zellen ca. 2,5-fach und die CD21^{niedrig}CD23^{niedrig}-Population ca. 11-fach erhöht war (Abbildung 37B). Die Analyse zeigte somit, dass die Expansion der B-Zellen vor allem durch eine Expansion einer CD21^{niedrig}CD23^{niedrig}-Population zustande kam. Die Expression von CD30 hatte keinen Einfluss auf die Verteilung von FoB- und MZB-Zellen, und es konnte auch keine CD21^{niedrig}CD23^{niedrig}-Population beobachtet werden.

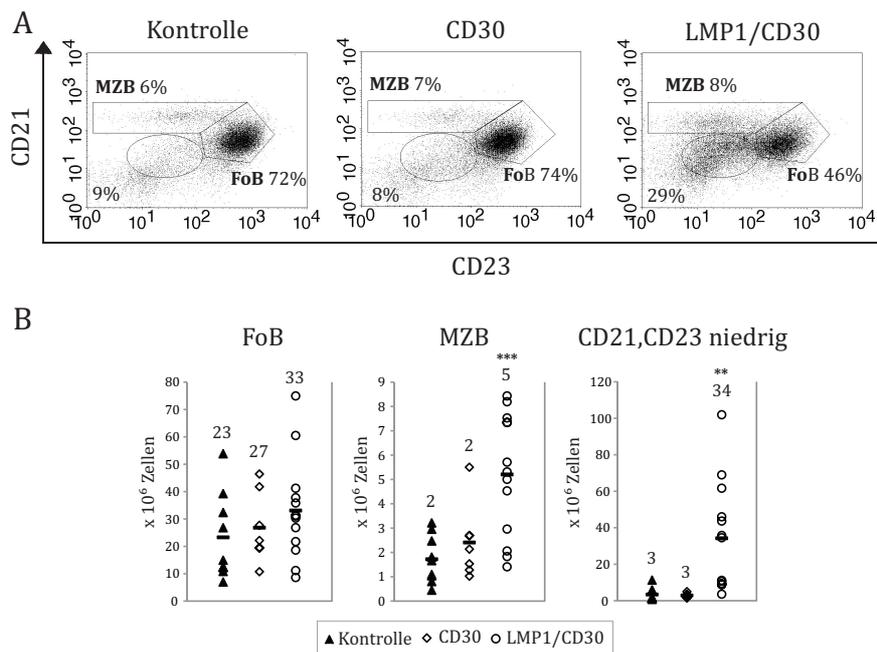


Abbildung 37 Die Expression von LMP1/CD30 führt zu einer stark erhöhten Zellzahl einer CD21^{niedrig}CD23^{niedrig}-B-Zellpopulation. (A) Milzzellen von CD30- und LMP1/CD30-Mäusen sowie von Kontrollmäusen wurden mit α -CD21 und α -CD23 gefärbt und mittels FACS-Färbung analysiert. In den FACS-Blots sind B220⁺-Lymphozyten dargestellt. Es sind die prozentualen Anteile der MZB (CD21^{hoch}CD23^{niedrig})- und FoB (CD21⁺CD23⁺)-Zellen und einer CD21^{niedrig} und CD23^{niedrig}-Population von mindestens 7 Mäusen pro Genotyp dargestellt. **(B)** Zur Bestimmung der Zellzahlen wurden die prozentualen Anteile der verschiedenen Populationen auf die Gesamtzellzahl umgerechnet. Für die Bestimmung der Zellzahlen wurden mindestens 7 Mäuse berücksichtigt. ** P < 0,01 und *** P < 0,001 im Vergleich zur Kontrolle.

Die erhöhte Anzahl von CD21^{niedrig}CD23^{niedrig} -B-Zellen in LMP1/CD30-Mäusen ließ eine Expansion der B1-Zellen vermuten, welche durch das Expressionsmuster B220^{niedrig}CD43⁺IgM^{hoch}IgD^{niedrig}CD23^{niedrig}/-CD21⁻ charakterisiert sind. Aus diesem Grund wurde im Folgenden untersucht, ob es sich bei der expandierten B-Zellpopulation um B1-Zellen handelt. An Hand der Oberflächenmarker CD43 und CD23 wurden die B1-Zellen von den B2-Zellen unterschieden. Die nächste Abbildung zeigt den prozentualen Anteil der B1-Zellen (CD43⁺CD23^{niedrig}/-) und B2-Zellen (CD43⁻CD23⁺) in Milz und Lymphknoten sowie B1- und B2-B-Zellzahlen in der Milz.

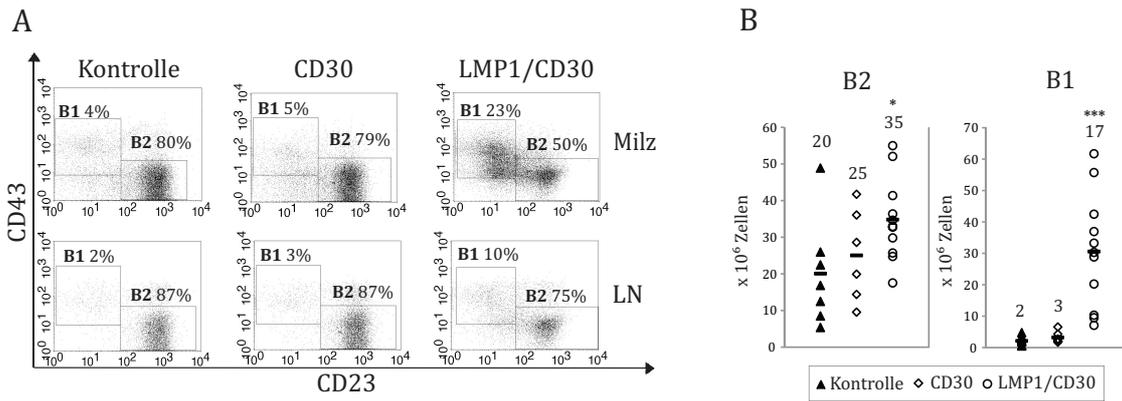


Abbildung 38 Das konstitutive CD30-Signal führt zu einer starken Zunahme der B1-Zellpopulation. **(A)** Diese Abbildung zeigt die Anteile der B1- und B2-Zellen in Milz und Lymphknoten von CD30- und LMP1/CD30-exprimierenden Mäusen im Vergleich zu Kontrollmäusen. Es sind die B220⁺-Lymphozyten dargestellt. B1-Zellen wurden von B2-Zellen an Hand der Oberflächenmarker CD43 und CD23 unterschieden. Es sind die durchschnittlichen Prozente der B1-Zellen (CD43⁺CD23⁻) und B2-Zellen (CD43⁺CD23⁺) in Milz und Lymphknoten dargestellt. Mindestens 6 Mäuse wurden pro Genotyp analysiert. **(B)** Mit dem aus der Färbung A ermittelten Anteil der B1- und B2-Zellen wurden die Gesamtzellzahlen berechnet. * P < 0,05 und *** P < 0,001 im Vergleich zur Kontrolle.

Man konnte sowohl in der Milz als auch in den Lymphknoten eine deutliche Erhöhung CD43⁺CD23⁻-B-Zellen in den LMP1/CD30-exprimierenden Mäusen beobachten (Abbildung 38A). In beiden Organen konnte eine prozentuale Reduktion CD43-negativer B-Zellen gezeigt werden. Außerdem scheint die Expression von LMP1/CD30 zu 2 distinkten CD43⁺-B-Zellpopulationen, die sich hinsichtlich der Expressionsstärke von CD43 unterscheiden, zu führen. Die Bestimmung der Zellzahlen weist auf eine starke Erhöhung der B1-Zellen und eine moderate Erhöhung der B2-Zellen in LMP1/CD30-Mäusen im Vergleich zu den Kontrollmäusen hin, die jedoch einer hohen Varianz unterlagen (Abbildung 38B). Die Analyse der CD30-Mäuse zeigte keine Veränderungen der prozentualen Anteile sowie der Gesamtzellzahlen von B1- und B2-Zellen im Vergleich zu Kontrollmäusen.

Um die Expansion der B1-Zellen näher zu charakterisieren, wurden die Milz- und Lymphknotenzellen mit den Antikörpern gegen die Oberflächenmarker B220 und CD5 gefärbt. Durch diese Färbung kann man B2-Zellen (B220⁺CD5⁻) von den B1a-Zellen (B220^{niedrig}CD5⁺) und den B1b-Zellen (B220^{niedrig}CD5⁻) unterscheiden.

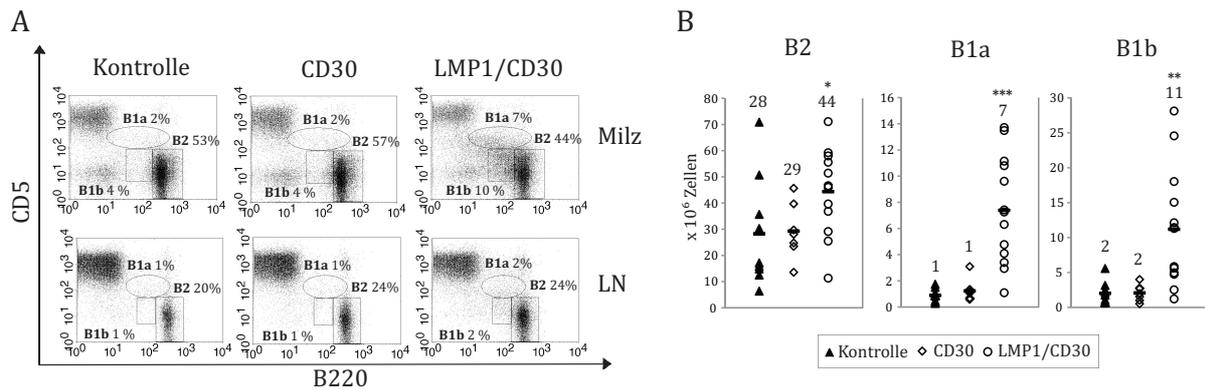


Abbildung 39 LMP1/CD30 führt zu einer starken Zunahme der B1a- und B1b-Zellen. (A) Dargestellt sind die durchschnittlichen prozentualen Anteile der B2 (B220⁺CD5⁻)-, der B1a (B220^{niedrig}CD5⁺)- und der B1b (B220^{niedrig}CD5⁻)-Zellen in der Milz von CD30-, LMP1/CD30- und Kontrollmäusen. Es wurden mindestens 7 Mäuse analysiert. **(B)** Aus den Gesamtzellzahlen und den unter A ermittelten prozentualen B-Zellanteilen wurden die absoluten Zellzahlen in der Milz der untersuchten Populationen berechnet. * P < 0,05, ** P < 0,01 und *** P < 0,001 im Vergleich zur Kontrolle.

Diese FACS-Färbung zeigte eine deutliche Zunahme der B1a- und B1b-Zellpopulation in der Milz und in den Lymphknoten von LMP1/CD30-Mäusen (Abbildung 39A). Die Berechnung der absoluten Zellzahlen in der Milz ergab eine ca. 7-fache Zunahme der B1a-Zellen, eine 5,5-fache Erhöhung der B1b-Zellen und eine 1,5-fache Zunahme der B2-Zellen. Die Analysen zeigten jedoch auch, dass die Anzahl der B1a- und B1b-Zellen stark schwankte (Abbildung 39B). Unabhängig vom Alter gab es Mäuse, bei denen die Expansion der B1-Zellen stark oder nur gering ausfiel. Auch in dieser Färbung konnten keine Veränderungen durch die Expression von CD30 im Vergleich zu Kontrollmäusen festgestellt werden.

3.3.5 Die Expression von LMP1/CD30 führt zu einer starken Zunahme von B-Zellen in der Peritonealhöhle

Da B1-Zellen zum größten Teil in der Bauchhöhle von Mäusen vorkommen, wurde im Folgenden die Peritonealhöhle der Mäuse untersucht. Um die Zellzahlen aus dem Bauchraum zu bestimmen, wurde dieser zunächst ausgespült und anschließend durch Zählen die Gesamtzellzahl bestimmt. Anschließend wurden mit Hilfe einer FACS-Analyse die prozentualen Lymphozytenanteile sowie die Anteile der B-Zellen (α -IgM) des Bauchraums festgestellt, und die absoluten Zellzahlen ermittelt.

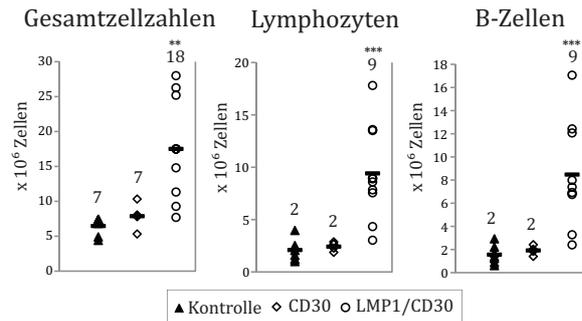


Abbildung 40 Erhöhte Zellzahlen im Bauchraum LMP1/CD30-exprimierender Mäuse. Die Zellen aus dem Peritoneum wurden durch Ausspülen der Bauchhöhle gewonnen und anschließend die Gesamtzellzahl bestimmt. Die Zellen wurden im FACS analysiert und an Hand der Zellgröße und Granularität („Forward und Sideward Scatter“) die prozentualen Anteile der Lymphozyten bestimmt. Die B-Zellen wurden durch eine IgM-Färbung bestimmt. Aus den Gesamtzellzahlen und den prozentualen Anteilen von Lymphozyten und B-Zellen wurden die absoluten Lymphozyten- und B-Zellzahlen ermittelt. ** P < 0,01 und *** P < 0,001 im Vergleich zur Kontrolle. In die Analyse wurden mindestens 4 Mäuse eingeschlossen.

Die Gesamt- und die Lymphozytenzellzahlen im Bauchraum LMP1/CD30-exprimierender Mäuse waren stark erhöht, wobei auch diese einer hohen Varianz unterlagen (Abbildung 40). Die erhöhten Lymphozytenzellzahlen waren hauptsächlich auf eine Expansion von B-Zellen zurückzuführen. In den CD30-Mäusen konnte weder eine Veränderung der Gesamtzellzahl noch eine Zunahme der Lymphozyten-, inklusive der B-Zellzahl in der Bauchhöhle festgestellt werden.

Mit einer FACS-Analyse wurden die B1-B-Zellpopulationen des Bauchraumes genauer untersucht. In der Bauchhöhle sind B2-Zellen (B220⁺CD5⁻) und die beiden B1-Zell-Subpopulationen B1a (B220^{low}CD5⁺) und B1b (B220^{low}CD5⁻) vertreten. Mittels FACS-Analyse wurden zunächst die prozentualen Anteile von B1a-, B1b- und B2-Zellen ermittelt (Abbildung 41A). Dabei wurde eine prozentuale Zunahme der B1b-Zellen durch das konstitutive CD30-Signal beobachtet, wohingegen die Anteile der B2-Zellen und B1a-Zellen unverändert blieben. Durch Ermittlung der absoluten Zellzahlen konnte im Durchschnitt eine 5-fache Erhöhung der B2-Zellen, eine 4-fache Erhöhung der B1a-Zellen und eine 6-fache Erhöhung der B1b-Zellen im Vergleich zu Kontrollmäusen bestimmt werden (Abbildung 41B). Das konstitutive CD30-Signal führt damit zu einer Zunahme von B2-, B1a- und B1b-Zellen in der Bauchhöhle. Die B-Zell-spezifische Expression von CD30 hatte keinen Einfluss auf Verteilung und Anzahl der B-Zellen in der Bauchhöhle.

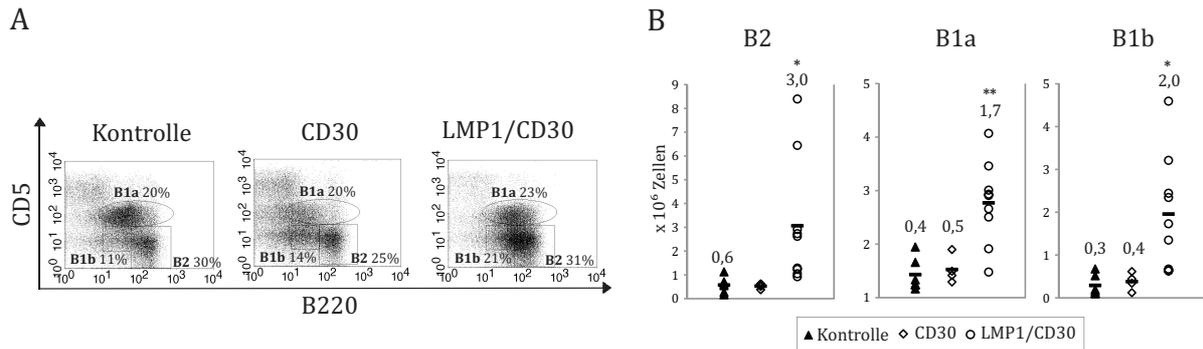


Abbildung 41 Zunahme der B1a-, B1b- und B2-Zellen in der Peritonealhöhle von LMP1/CD30-Mäusen. (A) Mit Hilfe einer CD5- und B220-Färbung wurden die Lymphozyten im FACS auf die prozentuale Verteilung von B1a-(B220^{niedrig}CD5⁺), B1b- (B220^{niedrig}CD5⁻) -Zellen sowie B2-Zellen (B220⁺CD5⁻) untersucht. Es sind die durchschnittlichen Werte von mindestens 6 Mäusen dargestellt. **(B)** Durch die Ermittlung der prozentualen B-Zellanteile in (A) und den Gesamtzellzahlen wurden die absoluten B2-, B1a- und B1b-B-Zellen berechnet. * P < 0,05 und ** P < 0,01 im Vergleich zur Kontrolle.

Die Ergebnisse zeigen, dass das konstitutive CD30-Signal in CD19-positiven B-Zellen zu einer starken Expansion der B1-Zellen in der Milz und den Lymphknoten führt. Außerdem wurde eine starke Expansion der B2- und B1-Zellen in der Bauchhöhle LMP1/CD30-exprimierender Mäuse beobachtet. Allerdings konnte sowohl in der Milz und den Lymphknoten als auch im Bauchraum eine starke Varianz der Effekte beobachtet werden.

3.3.6 Die Follikelstruktur von CD30-exprimierenden Mäusen bleibt erhalten

Um zu untersuchen, ob die aberrante CD30-Expression zu einer Veränderung der mikroskopischen Milzstruktur führt, wurden Gefrierschnitte von Milzen angefertigt. Um die Follikelstruktur sichtbar zu machen, wurden die metallophilen Makrophagen mit α -MOMA-1 (dunkelblau), die B-Zellen mit α -IgM (rot) und die T-Zellen mit α -CD3 (hellblau) gefärbt.

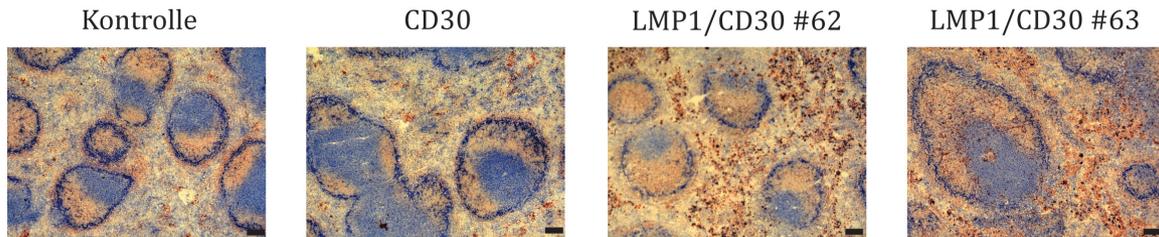


Abbildung 42 Milzstruktur. Milzschnitte wurden mit α -MOMA (metallophile Makrophagen), α -IgM (B-Zellen) und α -CD3(T-Zellen) gefärbt. In Dunkelblau gefärbt sind die metallophilen Makrophagen, die an den Marginalsinus angelagert sind. In Hellrot und Dunkelrot erkennt man B-Zellen, welche entweder niedrig oder stark IgM exprimieren. Die T-Zellen befinden sich in der T-Zell-Zone (hellblau). Balken: 200 μ m.

In den Kontrollen und CD30-exprimierenden Mäusen konnte eine normale Follikelstruktur nachgewiesen werden (Abbildung 42). Die MZB-Zellen (dunkelrot) wurden außerhalb des Marginalsinus detektiert, während die metallophilen Makrophagen (dunkelblau) an der inneren Grenze des Marginalsinus die Follikel abgrenzten. In den Follikeln konnte die B- (rot) und T-Zellzone (hellblau) der Follikel nachgewiesen werden. Auch in den LMP1/CD30-Mäusen konnte die normale Follikelstruktur detektiert werden. Jedoch war in der Milz von LMP1/CD30-exprimierenden Mäusen eine Zunahme von IgM⁺-B-Zellen zwischen den Follikeln zu beobachten. Mit zunehmender B-Zellzahl konnten vermehrt B-Zellen außerhalb der Follikel detektiert werden (Maus #62 mit $2,5 \times 10^7$ B-Zellen im Vergleich zur Maus #63 mit 5×10^7 B-Zellen). Ebenso konnten zwischen den Follikeln, aber auch in den Follikeln, viele dunkelrote, also IgM^{hoch}-exprimierende B-Zellen gefunden werden. Diese Ergebnisse könnten darauf hinweisen, dass sich die stark vermehrten B1-Zellen zumindest teilweise zwischen den Follikeln ansiedeln. Außerdem konnte mit zunehmenden B-Zellzahlen eine Vergrößerung der Follikel beobachtet werden, was man durch die erhöhten B1- und B2-Zellzahlen erklären kann.

3.3.7 Die Expression von LMP1/CD30 führt zu einer B-Zellaktivierung

Um zu untersuchen, ob die Expression von CD30 oder LMP1/CD30 zu einer Aktivierung von B-Zellen führt, wurde die Zellgröße sowie die Expression von B-Zellaktivierungsmarkern analysiert. Da aktivierte B-Zellen größer als ruhende B-Zellen sind, gibt die Zellgröße Hinweise auf den Aktivierungszustand von B-Zellen. Die

B-Zellgröße wurde mittels des „Forward Scatter“ (FSC) im FACS bestimmt. Je höher der Wert des „Forward Scatter“ ist, desto größer sind die Zellen.

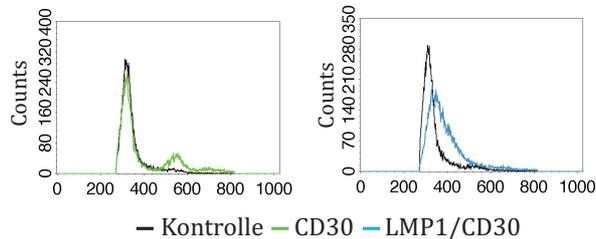


Abbildung 43 Die aberrante Expression des CD30-Rezeptors und das konstitutive CD30-Signal führen zu einer Größenzunahme der B-Zellen. Diese FACS-Analyse zeigt die Zellgröße von Milz-B-Zellen von CD30- und LMP1/CD30-exprimierenden Mäusen im Vergleich zu Kontrollmäusen. Die Zellen wurden mit TOPRO-3 und α -B220 gefärbt. Im Histogramm sind lebende B-Zellen (TOPRO-3-B220⁺) von Kontrollmäusen und lebende CD30- bzw. LMP1/CD30-exprimierenden B-Zellen (TOPRO-3-B220⁺hCD2⁺) nach ihrer Größe im „Forward Scatter“ aufgetragen und miteinander verglichen.

Die Analyse zeigte, dass die Größe der meisten der CD30-exprimierenden B-Zellen unverändert und mit der Größe der B-Zellen von Kontrollmäusen vergleichbar war (Abbildung 43). Es konnte jedoch eine kleine Subpopulation beobachtet werden, deren Zellgröße zugenommen hatte, was darauf hinweist, dass wenige CD30-exprimierende Zellen aktiviert sind. Die Expression von LMP1/CD30 führte zu einer homogenen Verschiebung der Zellgröße. Die Zunahme der Zellgröße kann durch den höheren Anteil der B1-Zellen, die größer als B2-Zellen sind, und/oder durch einen prä-aktivierten Zustand von B-Zellen erklärt werden.

Um den Aktivierungszustand von LMP1/CD30-exprimierenden B-Zellen zu charakterisieren, wurden die B-Zellen auf die Expression der Aktivierungsmarker CD95, CD86 und CD80 sowie des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 untersucht.

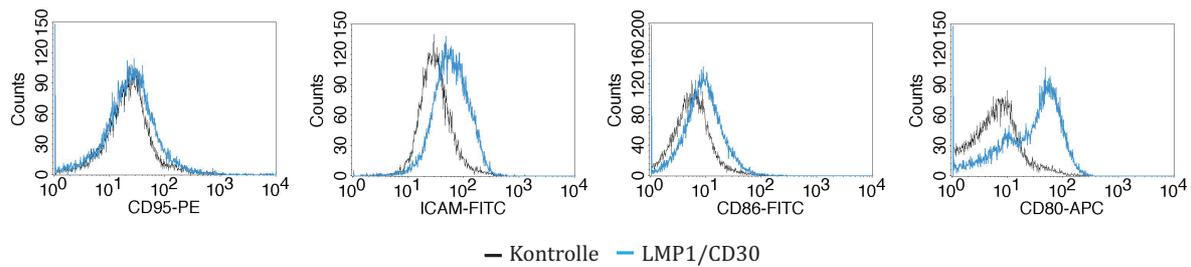


Abbildung 44 Die Expression von LMP1/CD30 führt zu einer Hochregulierung von Aktivierungsmarkern. Lymphozyten der Milz wurden durch FACS-Analysen auf die Expression der angegebenen Aktivierungsmarker untersucht. Die Histogramme zeigen eine Überlagerung der Expressionsstärke der jeweiligen Aktivierungsmarker der im FACS B220-positiven B-Zellen von LMP1/CD30-Mäusen im Vergleich zu Kontrollmäusen.

Die Histogramme zeigen, dass durch die Expression von LMP1/CD30 das Adhäsionsmolekül ICAM1 sowie die Aktivierungsmarker CD86 und CD80 verstärkt exprimiert wurden (Abbildung 44). Die Expression von CD80 wurde durch die Expression von LMP1/CD30 am stärksten hochreguliert, wohingegen der Aktivierungsmarker CD95 nicht hochreguliert wurde. Die erhöhte Expression der Aktivierungsmarker und die Vergrößerung der Zellen weisen darauf hin, dass LMP1/CD30-exprimierende B-Zellen einen prä-aktivierten Phänotyp haben.

3.3.8 Das konstitutive CD30-Signal führt zu einer Zunahme von Plasmazellen

Plasmazellen ($B220^{\text{niedrig}}CD138^+$) entstehen normalerweise während der Immunantwort aus B-Zellen, nachdem diese auf ein Antigen getroffen und dadurch aktiviert worden sind. Da LMP1/CD30-exprimierende B-Zellen einen prä-aktivierten Zustand haben, wurde untersucht, ob die Expression von LMP1/CD30 einen Einfluss auf die Plasmazellzahlen hat. Außerdem führte die Expression von LMP1/CD30 zu einer Expansion der B1-Zellen, die ebenfalls dafür bekannt sind, schnell auf Antigene zu reagieren und in Plasmazellen zu differenzieren.

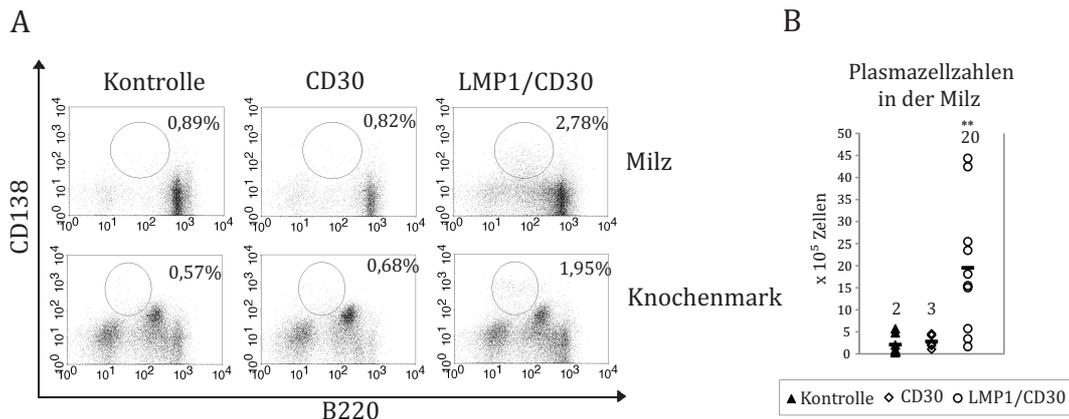


Abbildung 45 Die Expression von LMP1/CD30 führt zu erhöhten Plasmazellzahlen. (A) Milzzellen und Knochenmarkszellen wurden mit α -Mac1 (Makrophagen), α -Gr1 (Granulozyten) und α -CD3 (T-Zellen) gefärbt. Damit konnten Makrophagen, Granulozyten und T-Zellen aus der Färbung ausgeschlossen werden, um mögliche falsch-positive Zellen aus der Plasmazellfärbung zu verhindern. Außerdem wurden die Zellen mit α -B220 und α -CD138 gefärbt, um die Plasmazellen (B220^{niedrig}CD138⁺) zu identifizieren. Es sind die durchschnittlichen prozentualen Anteile der Plasmazellen von mindestens 5 Mäusen in der Milz und im Knochenmark dargestellt. **(B)** Mit Hilfe der Gesamtzellzahlen und den prozentualen Anteilen wurden die absoluten Plasmazellzahlen in der Milz berechnet. ** P < 0,01 im Vergleich zur Kontrolle.

Die FACS-Analyse zeigte, dass die Expression von LMP1/CD30 im Gegensatz zur CD30-Expression zu prozentual erhöhten Plasmazellanteilen in Milz und Knochenmark führt (Abbildung 45A). Die Bestimmung der Plasmazellzahlen in der Milz ergab, dass die Expression von LMP1/CD30 zu einer durchschnittlich 10-fachen Erhöhung der Plasmazellzahlen führte, wobei die Varianz ähnlich hoch wie bei den B1-Zellzahlen war (Abbildung 45B).

3.3.9 Die Expression von LMP1/CD30 führt zu erhöhten Immunglobulintitern

Um zu untersuchen, ob die erhöhten Plasmazellzahlen sich auch in erhöhten Immunglobulin-Titern (Ig-Titer) widerspiegeln wurden die allgemeinen Ig-Titer untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass LMP1/CD30-Mäuse erhöhte IgM-, IgG2a-, IgG3- und IgA- Titer haben (Abbildung 46). Die Titer der Immunglobuline IgG1 und IgG2b waren dagegen nicht erhöht und mit denen von Kontrollmäusen vergleichbar. Im Gegensatz zum konstitutiven CD30-Signal konnte die aberrante Expression von CD30 in B-Zellen keine erhöhten Ig-Titer induzieren. Da bekannt ist, dass B1-Zellen zur Sezernierung des natürlichen IgM beitragen und in Mausmodellen mit erhöhten B1-B-Zellzahlen eine Erhöhung der IgM, IgA-, IgG2a- und IgG3-Titer beschrieben wurde,

spiegeln die erhöhten Immunglobulin-Titer in LMP1/CD30-Mäusen die Expansion der B1-Zellen wider (Sidman et al., 1986, Solvason et al., 1991, Boes et al., 1998).

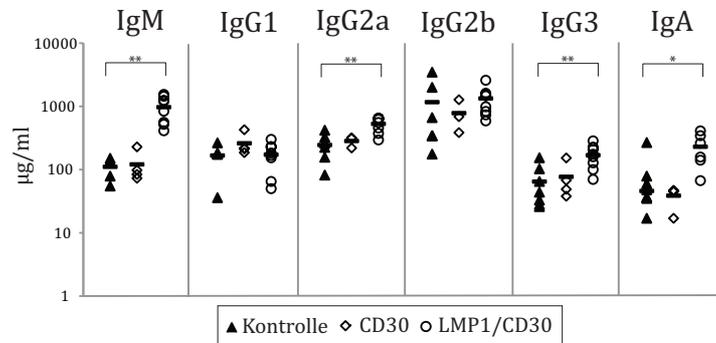


Abbildung 46 Erhöhte Immunglobulintiter. Die Konzentrationen der verschiedenen Isotypen der Immunglobuline im Blut von LMP1/CD30-, CD30- und Kontrollmäusen wurden mittels ELISA bestimmt. Um die Titer von LMP1/CD30-Mäusen und Kontrollmäusen zu bestimmen, wurden mindestens 5 Mäuse analysiert. Die Ig-Titer der CD30-Mäuse basieren auf der Analyse von mindestens 3 Mäusen. * P < 0,05 und ** P < 0,01 im Vergleich zur Kontrolle.

3.4 Der Einfluss von CD30 auf die T-Zell-abhängige Immunantwort

Da in LMP1/CD30-Mäusen erhöhte Plasmazellzahlen detektiert werden konnten, wurde untersucht, ob die Expression von CD30 oder LMP1/CD30 zu einer verstärkten Immunantwort nach T-Zell-abhängiger Immunisierung führt.

3.4.1 LMP1/CD30-exprimierende Mäuse können keine Keimzentren bilden

CD30-, LMP1/CD30-Mäuse und Kontrollmäuse wurden mit dem Hühner-Gammaglobulin konjugierten Hapten Nitrophenylacetyl (NP₁₇-CGG), welches eine T-Zell-abhängige Immunantwort auslöst, immunisiert. Die Mäuse wurden 14 Tage nach der Immunisierung präpariert. Zunächst wurden die Milzzellen mittels FACS-Analyse analysiert, um zu prüfen, ob Keimzentrumszellen (PNA^{hoch}CD95⁺) vorhanden waren.

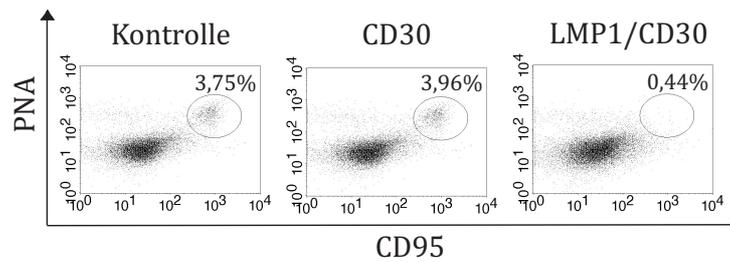


Abbildung 47 Nachweis von Keimzentrumszellen. Die Milzzellen wurden 2 Wochen nach Immunisierung mit einem T-Zell-abhängigen Antigen NP-CCG mit Hilfe einer FACS-Analyse auf Keimzentrums-B-Zellen (B220⁺CD95⁺PNA^{hoch}) untersucht. Es wurden pro Genotyp mindestens 4 Mäuse in die Analyse eingeschlossen.

Im Gegensatz zu den Kontrollmäusen und den CD30-Mäusen konnten in LMP1/CD30-Mäusen keine Keimzentrumszellen detektiert werden (Abbildung 47).

Außerdem wurden Gefrierschnitte von der Milz angefertigt, um die Keimzentrumsbildung mit Hilfe des Keimzentrumsmarkers PNA („peanut agglutinin“) histochemisch nachzuweisen (Rose et al., 1980, Rose et al., 1981). Zusätzlich wurden die Schnitte mit α -IgM gefärbt, um die Struktur der Follikel nach Immunisierung sichtbar zu machen.

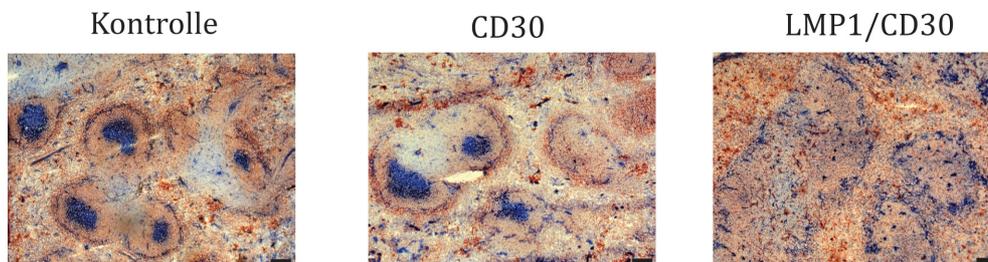


Abbildung 48 Nachweis von Keimzentren. Die Keimzentren wurden histochemisch mit einer PNA(blau)-Färbung nachgewiesen. Um die Follikelstruktur sichtbar zu machen, wurden zusätzlich die B-Zellen mit IgM (rot) gefärbt. Balken: 200 μ m.

In den Kontrollmäusen und den CD30-Mäusen konnten nach der Immunisierung in den Follikeln Keimzentren (blau) nachgewiesen werden, während in den LMP1/CD30-Mäusen weder die Struktur der Follikel noch Keimzentren detektiert werden konnten. Die histochemische Analyse bestätigte, dass LMP1/CD30-exprimierende Mäuse keine Keimzentren bilden konnten (Abbildung 48). Das konstitutive CD30-Signal hat damit im Gegensatz zur Expression von CD30 einen negativen Einfluss auf die Bildung von Keimzentren.

3.4.2 Plasmazellbildung nach Immunisierung

Es wurde untersucht, ob die Expression von CD30 und LMP1/CD30 in B-Zellen nach T-Zell-abhängiger Immunisierung einen Einfluss auf die Plasmazellzahlen hat. Mit Hilfe einer FACS-Analyse wurden die Plasmazellanteile ($B220^{low}CD138^{+}$) in Milz und Knochenmark bestimmt. Zusätzlich wurden die absoluten Plasmazellzahlen in der Milz ermittelt. Zwischen den Kontrollmäusen und den CD30-Mäusen konnten keine signifikanten Unterschiede bezüglich der prozentualen Anteile der Plasmazellen in Milz und Knochenmark sowie der Plasmazellzahlen in der Milz ermittelt werden (Abbildung 49A). Hingegen konnten in LMP1/CD30-Mäusen erhöhte Plasmazellzahlen in der Milz und im Knochenmark beobachtet werden (Abbildung 49A, B).

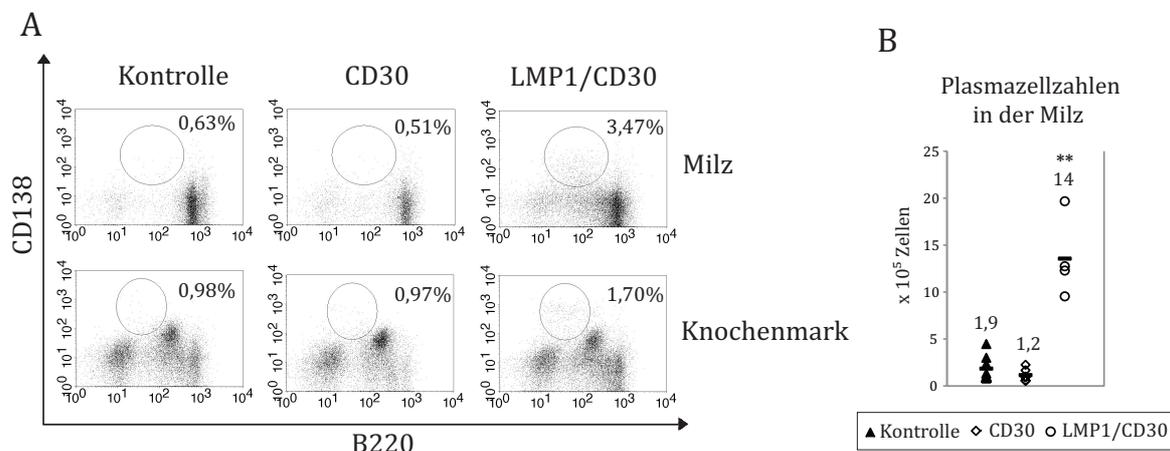


Abbildung 49 In LMP1/CD30-exprimierenden Mäusen konnten nach Immunisierung mehr Plasmazellen in der Milz und im Knochenmark detektiert werden. **(A)** Milz- und Knochenmarkszellen wurden mit α -B220 und α -CD138 gefärbt. Um tatsächlich nur die Plasmazellen zu detektieren, wurden durch Färbung mit den Antikörpern α -CD3, α -Gr1 und α -Mac1 die T-Zellen, Granulozyten und Makrophagen aus der Analyse ausgeschlossen. Es sind die durchschnittlichen prozentualen Anteile der Plasmazellen in Milz und Knochenmark von mindestens 4 Analysemäusen dargestellt. **(B)** Aus den in (A) ermittelten prozentualen Anteilen der Plasmazellen und den Gesamtzellzahlen wurden die absoluten Plasmazellzahlen in der Milz nach Immunisierung berechnet. ** $P < 0,01$ im Vergleich zur Kontrolle.

Da die Expression von LMP1/CD30 auch ohne Immunisierung zu erhöhten Plasmazellzahlen führte, konnte man keine Aussage treffen, ob LMP1/CD30 einen Einfluss auf die Plasmazellbildung nach T-Zell-abhängiger Immunisierung hat. Aus diesem Grund wurde durch eine Elispot-Analyse getestet, ob der Anteil NP-spezifischer Plasmazellzahlen nach der Immunisierung erhöht ist. NP₁₇-spezifische Antikörper weisen eine niedrigere Affinität zu den Antigenen als NP₃-spezifische Antikörper auf.

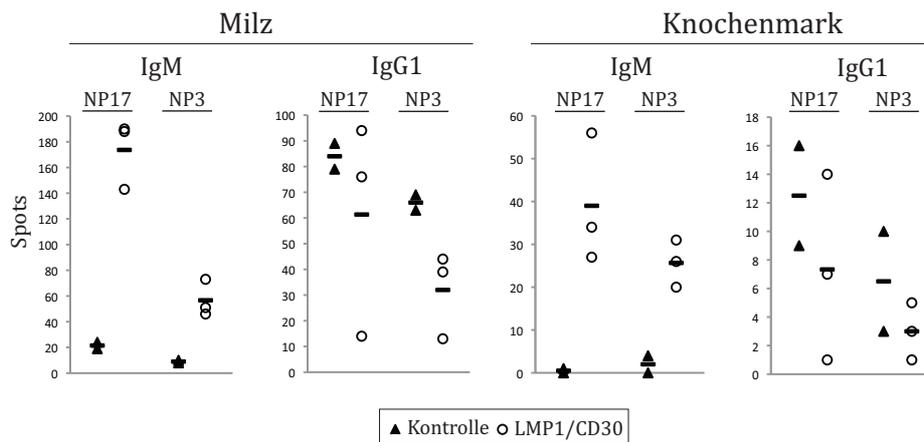


Abbildung 50 Anzahl der NP-spezifischen Plasmazellen nach TD-Immunisierung. Die Anzahl NP-spezifischer Plasmazellen wurde durch Elispot-Analysen nachgewiesen. An Tag 14 nach der Immunisierung wurden Milz- und Knochenmarkszellen auf Elispotplatten ausplattiert, um Zellen zu detektieren, die NP₁₇- oder NP₃-spezifische IgM- oder IgG1-Antikörper sezernieren. Es wurden 2 Kontrollmäuse und 3 LMP1/CD30-Mäuse in die Analyse eingeschlossen.

Die Ergebnisse zeigten, dass in der Milz und im Knochenmark von immunisierten LMP1/CD30-Mäusen wesentlich mehr NP₁₇- und NP₃-spezifische-IgM-Antikörper-sezernierende Plasmazellen detektiert werden konnten als in den Kontrollmäusen (Abbildung 50). Die Anzahl der NP₁₇-spezifischen-IgG1-Antikörper-sezernierenden Plasmazellen scheint in der Milz und im Knochenmark gegenüber den Kontrollmäusen leicht reduziert zu sein. Außerdem konnte beobachtet werden, dass in der Milz und im Knochenmark von Kontrollmäusen mehr NP₃-spezifische-IgG1-Antikörper-sezernierende Plasmazellen vorhanden waren als in den LMP1/CD30-exprimierenden Mäusen. Dies war zu erwarten, da die Expression von LMP1/CD30 die Keimzentrumsreaktion und damit Affinitätsreifung verhinderte. Diese Ergebnisse zeigen, dass in LMP1/CD30-Mäusen nach der T-Zell-abhängigen Immunantwort eine

verstärkte extrafollikuläre Differenzierung zu NP-spezifischen-IgM-Plasmazellen stattgefunden hat.

3.4.3 NP-spezifische Immunglobulintiter

Um zu untersuchen, ob sich die Elispot-Daten in den NP-spezifischen Ig-Titern widerspiegeln, wurden vor der Immunisierung (Tag 0), an Tag 7 und an Tag 14 nach TD-Immunisierung die Mengen NP-spezifischer Antikörper durch ELISA-Analysen gemessen. Es wurden die Mengen der niederaffinen (NP₁₇) und hochaffinen (NP₃) NP-spezifischen IgG1-Antikörper sowie der NP₁₇-spezifischen IgM-Antikörper bestimmt.

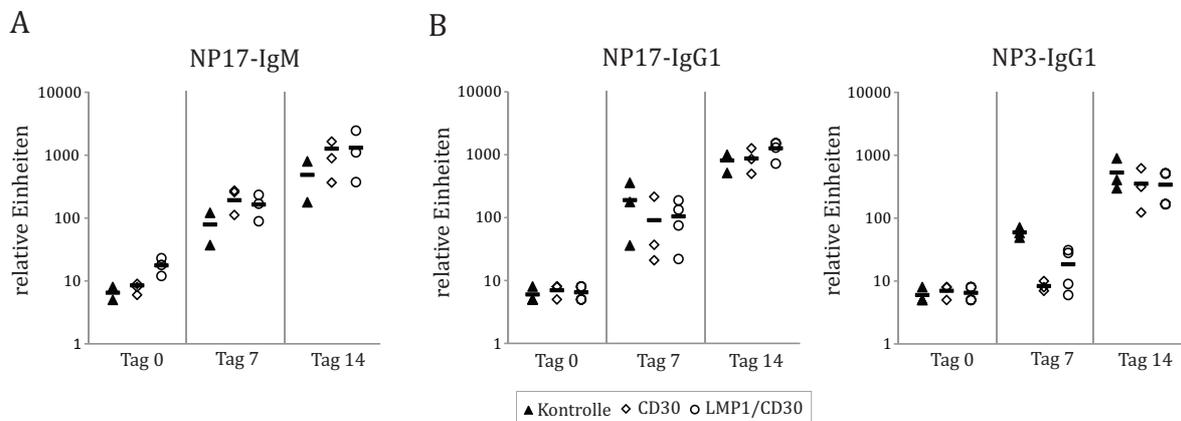


Abbildung 51 Nachweis NP-spezifischer IgM- und IgG1-Immunglobulintiter. Diese Abbildung zeigt die NP-spezifischen Immunglobulintiter von CD30-, LMP1/CD30- und Kontrollmäusen. **(A)** Von je 3 Mäusen jeden Genotyps sind die Titer NP₁₇-spezifischer IgM-Antikörper vor der Immunisierung (Tag 0) und an Tag 7 und Tag 14 nach der Immunisierung dargestellt. **(B)** Es sind die Titer NP₁₇- und NP₃-spezifischer IgG1-Antikörper vor der Immunisierung (Tag 0) und an Tag 7 und Tag 14 nach der Immunisierung dargestellt. Es wurden mindestens 3 Mäuse je Genotyp berücksichtigt.

Die Ergebnisse zeigten, dass sowohl die Expression von CD30 als auch die Expression von LMP1/CD30 zu leicht erhöhten NP₁₇-spezifischen IgM-Antikörper-Mengen im Vergleich zu den Kontrollen führten (Abbildung 51A). Die Analyse der NP₁₇-spezifischen IgG1-Antikörper ergab, dass die CD30- und LMP1/CD30-Mäuse vergleichbare Titer wie die Kontrollmäuse nach der Immunisierung hatten (Abbildung 51B).

3.5 Hinweise auf Tumorentstehung

Es ist bekannt, dass CD30 auf vielen Lymphomen exprimiert wird, jedoch ist eine mögliche Rolle von CD30 bei der Tumorentstehung bisher nicht geklärt. Innerhalb der bisherigen Haltedauer LMP1/CD30-exprimierender Mäuse von 24 Wochen konnten 2 LMP1/CD30-exprimierende Mäuse beobachtet werden, die eventuell bereits ein B-Zell-Lymphom entwickelt haben.

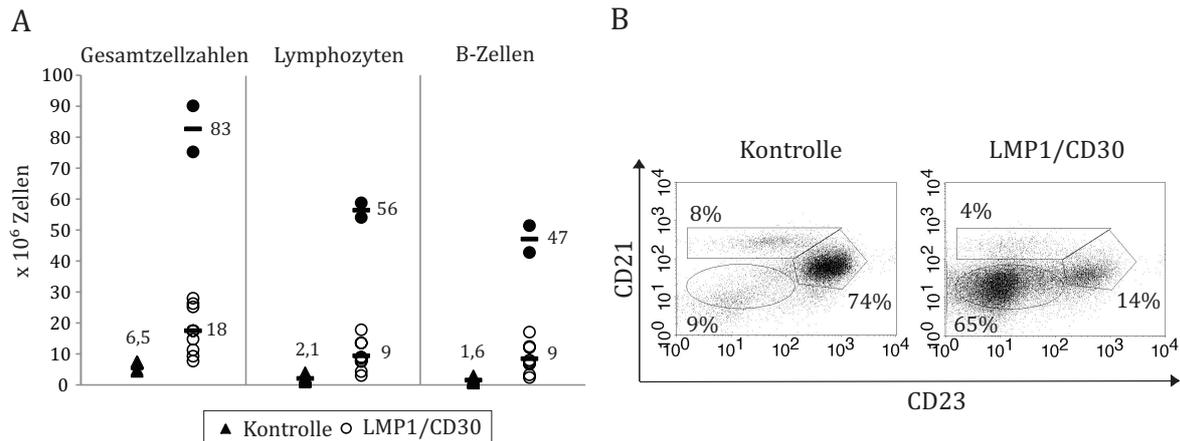


Abbildung 52 Hinweise auf Tumorenstehung in LMP1/CD30-exprimierenden Mäusen. (A) Die Zellen aus dem Peritoneum wurden durch Ausspülen der Bauchhöhle gewonnen und anschließend die Gesamtzellzahl bestimmt. Die Zellen wurden im FACS analysiert und an Hand der Zellgröße und Granularität („Forward und Sideward Scatter“) die prozentualen Anteile der Lymphozyten bestimmt. Die B-Zellen wurden durch eine IgM-Färbung bestimmt. Aus den Gesamtzellzahlen und den prozentualen Anteilen von Lymphozyten und B-Zellen wurden die absoluten Lymphozyten- und B-Zellzahlen ermittelt. Es sind die durchschnittlichen Werte von 8 LMP1/CD30-Mäusen und ein separater Durchschnitt für die beiden tumorverdächtigen Mäuse (volle Kreise) angeben. Es wurden 6 Kontrollmäuse in die Analyse einbezogen. **(B)** Im FACS-Blot sind B220⁺-Lymphozyten dargestellt. Es sind die prozentualen Anteile der MZB (CD21^{hoch}CD23^{niedrig}) und FoB (CD21⁺CD23⁺) und einer CD21^{niedrig} und CD23^{niedrig}-Population der tumorverdächtigen LMP1/CD30-Maus #40 und einer Kontrollmaus dargestellt.

Von 12 Mäusen, deren Bauchhöhle untersucht wurde, konnte in 2 Mäusen, im Alter von 20 Wochen eine sehr starke Expansion der B-Zellen beobachtet werden (Abbildung 52A). Im Vergleich zu den anderen LMP1/CD30-Mäusen wurde in diesen beiden Mäusen eine 5-fache Erhöhung der B-Zellzahlen in der Bauchhöhle festgestellt. Vergleicht man die B-Zellzahlen dieser Mäuse mit Kontrollmäusen, so konnte eine über 20-fache Erhöhung der B-Zellen beobachtet werden. Außerdem ergab die Analyse, dass in der Milz dieser beiden Mäuse die aberrante CD21^{niedrig}CD23^{niedrig}-Population sehr stark expandiert war. Der Anteil der CD21^{niedrig}CD23^{niedrig}-Population lag bei 32 % und 65 %. Die Analyse aller LMP1/CD30-exprimierender Mäuse ergab, dass von 17 untersuchten Mäusen 3 Mäuse beobachtet werden konnten, deren prozentuale Anteile

der CD21^{niedrig}CD23^{niedrig}-Population höher als die der FoB-Zellen war. Dies zeigt also, dass in diesen 3 Mäusen die Haupt-B-Zell-Population nicht mehr die FoB-Zellen waren, sondern die CD21^{niedrig}CD23^{niedrig}-Population. Der FACS-Blot einer tumorverdächtigen LMP1/CD30-Maus ist exemplarisch dargestellt (Abbildung 52B). Diese starke Expansion der aberranten CD21^{niedrig}CD23^{niedrig}-Population in der Milz und Bauchhöhle könnte auf die Entstehung eines B-Zell-Lymphoms hindeuten.

4 Diskussion

4.1 Der Einfluss von LMP1 und LMP2A auf B-Zellen

50 % der Hodgkin Lymphome (HL) sind Epstein-Barr-Virus (EBV)-positiv. In den EBV-positiven Tumorzellen werden die viralen Proteine LMP1 und LMP2A exprimiert, die funktionelle, konstitutiv aktive Homologe von CD40 und dem BCR darstellen. Man geht davon aus, dass die beiden viralen Proteine zur Pathogenese des HL beitragen.

Durch die stabile Transfektion von Expressionsvektoren für EBNA1, LMP1 und LMP2A in die konditional transformierte Zelllinie EREB2-5 (Kempkes) ist es gelungen, ein Zellsystem zu etablieren, das das Latenz II-Stadium von EBV widerspiegelt (Rastelli, 2007). Dies ermöglichte zu untersuchen, welchen Einfluss die in der Latenz II-exprimierten viralen Proteine auf den Phänotyp von B-Zellen haben. Das ist insofern interessant, da das Virus in vielen Tumoren, wie z.B. im HL, in dieser Latenzform vorliegt. Julia Rastelli konnte in ihrer Doktorarbeit bereits zeigen, dass die Co-Expression von LMP1 und LMP2A das Überleben von B-Zellen deutlich verlängert und eine begrenzte Proliferation induziert, jedoch konnte die Proliferation der B-Zellen nicht unbegrenzt aufrechterhalten werden. Das weist darauf hin, dass die in der Latenz III zusätzlich exprimierten viralen Proteine EBNA2, EBNA 3A, 3B, und 3C weitere wichtige Funktionen zur B-Zell-Immortalisierung beisteuern.

4.1.1 LMP1 und LMP2A induzieren typische HL-Merkmale

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Expression von LMP1 und LMP2A in B-Zellen einen HRS-ähnlichen Phänotyp induziert. So führte die Expression von LMP1 oder die Co-Expression von LMP1 und LMP2A zu einer Zunahme der Zellgröße und zu einer Polykaria-Formation, wie sie auch in HRS-Zellen zu beobachten ist. Eine ähnliche Beobachtung wurde bereits vor mehreren Jahren von Knecht und Kollegen gemacht, die zeigten, dass LMP1 in Lymphomzellen eine Mehrkernigkeit induziert (Knecht et al., 1996). LMP1 und LMP2A trugen außerdem kooperativ zur Expression des HL-Markers CD30 bei. CD30 wird normalerweise auf aktivierten B-Zellen exprimiert (Schneider and Hubinger, 2002), jedoch ist der Mechanismus der CD30-Aktivierung noch unbekannt. HRS-Zellen sind auch durch eine hohe Expression der Rezeptoren

Notch1 und Notch2 gekennzeichnet (Jundt et al., 2002a). In LMP1/LMP2A-exprimierenden EREB-Zellen konnte die Expression des Rezeptors Notch2 sowie die Expression des Notch-Liganden Jagged1 nachgewiesen werden. Außerdem wird Notch1 in den verschiedenen EREB-2-5-Zelllinien transkribiert, was darauf hinweist, dass auch Notch1 auf den EREB-LMP1/2A-Zellen exprimiert wird. Notch2 wurde von LMP1 und LMP2A kooperativ induziert, während die Expression von Jagged1 hauptsächlich durch LMP1 aktiviert wurde. Da in Endothelzellen gezeigt wurde, dass die Expression von Jagged1 über die Aktivität des kanonischen NF- κ B-Signalwegs induziert wird (Johnston et al., 2009), ist vorstellbar, dass in EREB2-5-Zellen die Expression von Jagged1 über die LMP1 induzierte NF- κ B-Aktivität vermittelt wird. Allerdings wurde trotz der starken Aktivität des kanonischen NF- κ B-Signalwegs in der HL-Zelllinie KMH2 Jagged1 nur schwach exprimiert, was darauf hindeutet, dass die Expression von Jagged1 nicht nur über NF- κ B induziert wird. Die Expression der Rezeptoren Notch1 und Notch2 und des Notch-Liganden Jagged1 könnte theoretisch zur kontinuierlichen Aktivierung des Notch-Signalwegs in den EREB-LMP1/2A-Zellen führen. Für HRS-Zellen wurde beschrieben, dass die Aktivierung des Notch-Signalwegs einen positiven Einfluss auf das Proliferationsverhalten hat (Jundt et al., 2002a). Es ist also vorstellbar, dass konstitutive Notch-Signale einen positiven Effekt auf das Überleben und die Proliferation der Zellen haben. Allerdings ist zu beachten, dass Notch2 in LMP1/2A-exprimierenden EREB2-5-Zellen nur sehr schwach im Vergleich zu HL-Zelllinien exprimiert wird. Dies könnte zu einer sehr viel schwächeren Notch-Signalstärke in EREB2-5-Zellen führen, die zu gering ist, um die Proliferation und das Überleben der Zellen positiv zu beeinflussen. Versuche mit gamma-Sekretase-Inhibitoren könnten die Frage beantworten, ob Notch-Signale einen Einfluss auf den Phänotyp von LMP1/2A-exprimierenden EREB2-5-Zellen haben. Ein weiteres Merkmal von HRS-Zellen ist die Herunterregulierung des BCR (IgM) und der BCR-Komponenten Ig α und Ig β . Frühere Arbeiten zeigten, dass sowohl LMP1 als auch LMP2A zur negativen Regulation B-Zell-spezifischer Gene beitragen (Vockerodt et al., 2008, Portis et al., 2003). In EREB2-5-Zellen konnte durch die Expression von LMP2A eine gewisse Herunterregulierung von Ig μ , Ig α und Ig β beobachtet werden. Es ist bekannt, dass die Expression von LMP2A in murinen B-Zellen zur Expression von ID2 führt, welche den für die B-Zellentwicklung essentiellen Transkriptionsfaktor E2A inhibiert (Portis and Longnecker, 2003). Auch in Hodgkin-Lymphomen wurde eine hohe ID2-Expression gefunden und die Hypothese aufgestellt,

dass diese zur negativen Regulation von BCR-Komponenten beiträgt (Mathas et al., 2006). LMP2A könnte somit in EREB2-5 Zellen über die Induktion von ID2-Expression zur Herunterregulierung von B-Zell-spezifischen Genen beitragen. Im Gegensatz zu den von der Gruppe Murray veröffentlichten Daten, die eine Herunterregulierung von Ig α und Ig β durch LMP1 in Keimzentrums-B-Zellen zeigten (Vockerodt et al., 2008), hatte LMP1 in EREB2-5-Zellen keinen Effekt auf die Expression der BCR-Komponenten. Ein möglicher Grund für die unterschiedlichen Ergebnisse könnten die unterschiedlichen B-Zellpopulationen sein, in denen der Einfluss von LMP1 untersucht wurde. Bei den EREB2-5-Zellen handelt es sich um naive durch EBV immortalisierte B-Zellen (Kempkes et al., 1995), während die andere Studie mit EBV-negativen Keimzentrums-B-Zellen durchgeführt wurde. Dies könnte darauf hinweisen, dass die Expression von LMP1 in naiven und Keimzentrums-B-Zellen unterschiedliche phänotypische Auswirkungen hat. Die Expression von Ig μ , Ig α und Ig β war in EREB-LMP1/2A-Zellen noch deutlich höher als in den HL-Zelllinien. Dies zeigt, dass das virale Protein LMP2A nur zu einem gewissen Anteil zur verminderten Expression der BCR-Komponenten beiträgt und weitere Faktoren für die vollständige Herunterregulierung der B-Zell-spezifischen Gene, wie sie typischerweise in den HRS-Zellen zu finden ist, notwendig sind.

4.1.2 LMP1- und LMP2A-induzierte Signalwege

Um zu untersuchen, welche MAP-Kinasen durch LMP1 und/oder LMP2A aktiviert werden und zu klären inwiefern die viralen Proteine zur Aktivierung deregulierter Signalwege in HRS-Zellen beitragen, wurden die EREB2-5-Zelllinien hinsichtlich der Phosphorylierung von ERK, JNK und Akt getestet. Sowohl die Expression von LMP1 als auch LMP2A führte in EREB2-5-Zellen zur Aktivierung des ERK- und Akt-Signalwegs. Es war bereits bekannt, dass LMP2A in murinen B-Zellen zur Aktivierung des ERK-Signalwegs führt (Anderson and Longnecker, 2008). Die LMP1-vermittelte Aktivierung von ERK wurde bislang nur in Epithelzellen und Rattenfibroblasten gezeigt (Chen et al., 2002, Mainou et al., 2005, Dawson et al., 2003). Erste Hinweise, dass LMP1 auch in B-Zellen zur Aktivierung von ERK führt, wurden durch die Stimulierung muriner B-Zellen, die das Fusionsprotein CD40/LMP1 exprimierten, erbracht (Rastelli et al., 2008). In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass nicht nur

das Fusionsprotein CD40/LMP1, sondern auch LMP1 in B-Zellen zur Aktivierung von ERK führt. Außerdem konnte erstmals gezeigt werden, dass LMP1 und LMP2A kooperativ Akt aktivieren. Die dadurch ausgelöste relativ starke Aktivierung von Akt könnte zumindest teilweise für das verbesserte Überleben und die verstärkte Proliferation von LMP1 und LMP2A co-exprimierenden Zellen im Vergleich zu den EREB2-5-Zellen, die entweder nur LMP1 oder LMP2A exprimieren, verantwortlich sein. Erstaunlicherweise führte die Expression von LMP2A zu einer wesentlich stärkeren Phosphorylierung von JNK als LMP1. Untersuchungen, in denen die Expression von LMP1 und LMP2A durch Doxycyclin verstärkt wurde, zeigten, dass nur durch die verstärkte Expression von LMP2A eine verstärkte Phosphorylierung von JNK beobachtet werden konnte, wohingegen die verstärkte Expression von LMP1 keinen Einfluss auf die Aktivierung von JNK hatte. Diese Daten waren zunächst nicht zu erwarten, da in der Literatur beschrieben wurde, dass LMP1 die Aktivierung von JNK1 induziert (Kieser et al., 1997). Außerdem konnte gezeigt werden, dass aktiviertes JNK essentiell für die Transformierung EBV-positiver B-Zellen ist (Kutz et al., 2008). Die hier erhobenen Daten lassen vermuten, dass der positive Einfluss auf die Proliferation eher durch eine schwache als durch eine extrem starke JNK-Aktivierung vermittelt wird. Es ist möglich, dass die extrem starke Phosphorylierung von JNK in EREB-LMP2A-Zellen nicht direkt durch LMP2A, sondern durch sekundäre Effekte verursacht wird. Durch die transiente Transfektion von LMP2A in EREB2-5-Zellen nach EBNA2-Inaktivierung wurde gezeigt, dass LMP2A den lytischen Zyklus induziert (Schaadt et al., 2005). Von mir durchgeführte Experimente bestätigten dies und zeigten, dass auch in der Zelllinie EREB-LMP2A der lytische Zyklus induziert wird. Es ist daher nicht auszuschließen, dass die starke Phosphorylierung von JNK in Zusammenhang mit der Induktion des lytischen Zyklus steht. Es ist möglich, dass die JNK-Phosphorylierung durch eine Stressantwort der Zellen auf den lytischen Zyklus verursacht wird. Diese Vermutung wird von der Tatsache unterstützt, dass in den co-exprimierenden Zellen, in denen die Induktion des lytischen Zykluses durch die Expression von LMP1 inhibiert wird (Adler et al., 2002), JNK nur schwach aktiviert ist. Eine direkte Aktivierung des JNK-Signalwegs durch LMP2A ist jedoch auch ohne weiteres vorstellbar, da in EBV-negativen Epithelzellen die Expression von LMP2A ebenfalls zur Aktivierung von JNK führte (Chen et al., 2002). Die Frage, ob die Expression von LMP2A zur direkten Aktivierung von JNK führt oder, ob

diese durch sekundäre Effekte wie den lytischen Zyklus induziert wird, muss durch weitere Versuche geklärt werden.

Die Expression von LMP1 in B-Zellen führt zur Aktivierung des kanonischen und nicht-kanonischen NF- κ B-Signalwegs (Kieser, 2007). Da sowohl BCR- als auch CD40-Signale zur Aktivierung von NF- κ B führen, wurde in dieser Arbeit untersucht, ob die viralen Homologe LMP1 und LMP2A kooperativ den NF- κ B-Weg aktivieren. Um ein genaueres Bild über die von LMP1- und LMP2A-induzierte NF- κ B-Aktivierung zu bekommen, wurde in dieser Arbeit erstmals durch nukleäre Fraktionierungen untersucht, welche NF- κ B-Komponenten durch die Expression der beiden viralen Proteine in den Kern transloziert werden. Die Analysen zeigten, dass in den LMP1 und LMP2A co-exprimierenden EREB2-5-Zellen NF- κ B im Vergleich zu den EREB-LMP1-Zellen verstärkt aktiv war. Es konnte in den Kernen der co-exprimierenden Zellen mehr c-Rel, p50, p65 und p52 detektiert werden. Außerdem waren die p100-Mengen in den co-exprimierenden Zellen erhöht und damit mehr Substrat vorhanden, welches zu p52 prozessiert werden kann. Durch die nukleären Fraktionierungen konnte außerdem gezeigt werden, dass es sich bei der Aktivierung des kanonischen Signalwegs durch LMP1 hauptsächlich um die Translokation von c-Rel/p50 Dimeren handelt, da nur relativ wenig p65 im Kern detektiert werden konnte. Bisher gibt es widersprüchliche Daten, ob die Expression von LMP2A, das als funktionelles Homolog des BCR angesehen wird, zur Aktivierung von NF- κ B führt. Es gibt Studien, die zeigen, dass LMP2A in Epithelzellen die Aktivierung von NF- κ B inhibieren kann (Stewart et al., 2004). Die Gruppe von Longnecker publizierte, dass in LMP2A-exprimierenden B-Zellen NF- κ B konstitutiv aktiv ist (Swanson-Mungerson et al., 2005). Im Gegensatz zu diesen Daten führte die Expression von LMP2A in EREB2-5-Zellen zu keiner sichtbaren Aktivierung des kanonischen NF- κ B-Wegs. Allerdings konnte in den LMP1/2A-co-exprimierenden Zellen im Vergleich zu LMP1-exprimierenden Zellen eine verstärkte Expression von *NFKB2* und eine verstärkte Translokation von c-Rel in den Kern beobachtet werden. Da auch in LMP2A-exprimierenden Zellen eine schwache Translokation von c-Rel in den Kern beobachtet wurde, ist vorstellbar, dass LMP1 und LMP2A synergistisch oder kooperativ auf die nukleäre Translokation von p50/c-Rel-Dimeren einwirken. Dagegen konnte in LMP2A-exprimierenden Zellen im Vergleich zu den EREB-EBNA1-Zellen keine erhöhte *NFKB2*-Expression detektiert werden. Dies könnte darauf hinweisen, dass die stärkere Aktivierung des nicht-kanonischen NF- κ B Signalwegs in EREB-LMP1/2A-Zellen

im Vergleich zu EREB-LMP1-Zellen eher durch die erhöhte LMP1-Mengen in den co-exprimierenden Zellen als durch LMP2A vermittelt wird. Es gibt Hinweise, dass die Expression von LMP2A die Halbwertszeit von LMP1 in Epithelzellen verlängern kann, was die erhöhten LMP1-Mengen und somit die verstärkte NF- κ B-Aktivität in den co-exprimierenden Zellen im Vergleich zu den LMP1-exprimierenden Zellen erklären könnte (Dawson et al., 2001).

Um zu analysieren, inwiefern die viralen Proteine LMP1 und LMP2A zur Deregulierung von Signalwegen in HRS-Zellen beitragen, wurden die EREB-LMP1/2A-Zellen mit den L428- und KMH2-Zellen verglichen. Ein Vergleich der Aktivierung von Signalwegen in HRS-Zellen mit EREB-LMP1/2A-Zellen ist jedoch schwierig, da in HRS-Zellen eine heterogene Aktivierung beobachtet wurde. Die Experimente zeigten, dass sich die HRS-Zellen in der Aktivierung der Signalwege voneinander unterscheiden. Die HL-Zelllinie L428 wies im Gegensatz zu den KMH2-Zellen eine starke Aktivierung des nicht-kanonischen NF- κ B- und des JNK-Signalwegs auf. In den KMH2-Zellen konnte dagegen eine starke Aktivierung des kanonischen NF- κ B- und des Akt-Signalwegs beobachtet werden, während diese beiden Signalwege in den L428-Zellen nur schwach aktiviert waren. Eine mögliche Ursache für die schwache Aktivierung des kanonischen NF- κ B-Signalwegs in den L428-Zellen könnte A20 sein. Kürzlich wurde beschrieben, dass A20, der als negativer Regulator von NF- κ B beschrieben wurde, in L428, aber nicht in KMH2-Zellen exprimiert wird (Schmitz et al., 2009). Die beiden HL-Linien unterschieden sich nicht nur hinsichtlich der Aktivität der untersuchten Signalwege sondern auch in ihrer CD30-Expression. So wurde in L428-Zellen der CD30-Rezeptor stärker exprimiert als in den KMH2-Zellen. Eine mögliche Ursache könnte die starke JNK-Aktivierung in den L428-Zellen sein. Die Gruppe von Horie zeigte, dass die Bindestelle AP-1 im Promotor von CD30 der repressiven Aktivität der Mikrosatelliten-Sequenzen im Promotor entgegenwirkt und damit zur verstärkten Expression von CD30 führt (Watanabe et al., 2003). Die starke JNK-Aktivität könnte somit zur verstärkten Aktivität der Transkriptionsfaktoren JunB und c-Jun führen, die wiederum an die AP-1 Bindestelle im CD30-Promotor binden und damit die verstärkte Expression von CD30 induzieren.

4.1.3 Die Expression der Tumorsuppressoren

Es war erstaunlich, dass trotz der starken Aktivierung der MAP-Kinasen ERK und Akt sowie des kanonischen und nicht-kanonischen NF- κ B-Signalwegs, was zur hohen c-Myc Expression führte, die Co-Expression von LMP1 und LMP2A nicht für die B-Zell-Immortalisierung ausreichte. Ein Grund dafür könnte sein, dass die Tumorsuppressoren A20 und p53 in den EREB-LMP1/2A-Zellen nach Östrogenentzug exprimiert werden und die Expression von LMP1 und/oder LMP2A nicht ausreicht, um das Retinoblastom Protein (Rb) zu inaktivieren.

P53 scheint nicht essentiell am Wachstumsarrest von LMP1/2A-co-exprimierenden Zellen beteiligt zu sein, da in EREB-LMP1/2A-Zellen nach Östrogenentzug vergleichbare Mengen p53 detektiert wurden wie in proliferierenden EREB2-5-Zellen in Anwesenheit von Östrogen. Außerdem konnte in EREB-LMP1-Zellen, die ebenfalls einige Tage nach Östrogen-Entzug ihre Proliferation einstellten, kein p53 nachgewiesen werden. A20, ein negativer Regulator von NF- κ B, wurde kürzlich als typischer Tumorsuppressor in HRS-Zellen beschrieben. Die Re-Expression von A20 führte in A20-negativen HL-Zellen zu einem verminderten Überleben und zeigte damit, dass A20 einen negativen Effekt auf das Überleben von Tumorzellen hat (Schmitz et al., 2009). Im EREB2-5-System war auffallend, dass in den proliferierenden LCLs, also in der Latenz III, nur geringe A20-Level detektiert werden konnten, während in den EREB-LMP1- und EREB-LMP1/2A-Zellen A20 akkumulierte. Geht man davon aus, dass die hohen A20-Level in LMP1 und LMP2A co-exprimierenden EREB2-5-Zellen einen ähnlich negativen Effekt auf die Proliferation der B-Zellen haben wie die Re-Expression von A20 in den A20-negativen HL-Zellen, könnte die im Verlauf des Östrogenentzugs zunehmende Expression von A20 zu dem Wachstumsarrest von LMP1- und LMP1/2A-exprimierenden EREB2-5-Zellen führen. Um zu klären, ob A20 tatsächlich einen negativen Einfluss auf die Proliferation hat, müsste man A20 inaktivieren und das Überleben der Zellen untersuchen. Die Expression von LMP1 und/oder LMP2A führte nach Östrogenentzug nicht zur Hyperphosphorylierung von Rb. Dies war nicht zu erwarten, da sowohl in den EREB-LMP1- und EREB-LMP1/2A-Zellen die Expression von c-Myc nachgewiesen werden konnte (Dirmeier et al., 2005) und in der humanen B-Zelllinie P493-6, welche durch das Einbringen von Tetracyclin-regulierbaren c-Myc in EREB2-5-Zellen generiert wurde, gezeigt wurde, dass c-Myc zur Hyperphosphorylierung von Rb und damit zur Proliferation der Zellen führt (Pajic et al., 2000, Schuhmacher et al., 1999). Es ist

möglich, dass die c-Myc Proteinmengen in den EREB-LMP1 und EREB-LMP1/2A-Zellen geringer als in den P493-6-Zellen sind und damit nicht ausreichen, um Rb zu hyperphosphorylieren. Um diesen Aspekt zu klären, müsste man die c-Myc-Level der verschiedenen Zelllinien miteinander vergleichen. Eine andere Möglichkeit könnte sein, dass durch die hohe Expression von c-Myc die von LMP1-vermittelte NF- κ B-Aktivierung nicht zur Proliferation sondern zur Apoptose führt (Klapproth et al., 2009).

4.2 Generierung der Mausstämme CD30^{fSTOP} und LMP1/CD30^{fSTOP}

Um den Einfluss aberranter CD30-Signale auf die B-Zellentwicklung und -proliferation *in vivo* zu untersuchen, wurden die Mausstämme CD30^{fSTOP} und LMP1/CD30^{fSTOP} generiert. Die Verpaarung der Mäuse mit CD19Cre-Mäusen (Rickert et al., 1997) führte zur B-Zell-spezifischen Expression von CD30 und LMP1/CD30. Nach der Deletion der STOP-Kassette konnte die Expression des hCD2-Reporters in den CD30- und LMP1/CD30-Mäusen beobachtet werden. Im Western Blot wurden in den CD30-exprimierenden B-Zellen 2 CD30-spezifische Banden beobachtet. Die größere Bande von ca. 110 kDa entspricht der in der Literatur beschriebenen Größe von CD30 (Froese et al., 1987). Die kleinere Bande hat eine Größe von ca. 90 kDa, was die unglykosylierte Vorläuferform von CD30 darstellen könnte (Nawrocki et al., 1988). In den LMP1/CD30-exprimierenden B-Zellen wurde eine CD30-spezifische Bande bei ca. 25 kDa detektiert.

4.3 Die aberrante Expression von CD30

CD30 wird normalerweise nur auf aktivierten B-Zellen exprimiert. Um die Expression von CD30 auch in nicht aktivierten B-Zellen zu untersuchen, wurde in CD30^{fSTOP}-Mäusen die CD30-Expression durch Verpaarung mit CD19Cre-Mäusen ab dem Pro-B-Zellstadium aktiviert. Die Expression von CD30 hatte keinen Einfluss auf die frühe B-Zellentwicklung im Knochenmark. In der Peripherie konnte eine geringe, jedoch statistisch signifikante Erhöhung der Milzgewichte beobachtet werden, obwohl keine Abweichungen hinsichtlich der Gesamtzellzahlen inklusive der B-Zellzahlen im Vergleich zu Kontrollmäusen beobachtet werden konnte. Auch war die Zellgröße CD30-exprimierender B-Zellen zum größten Teil vergleichbar mit den Kontrollen. Es konnte jedoch in der Milz eine kleine Population deutlich größerer B-Zellen, die in den

Kontrollmäusen nicht vorhanden war, beobachtet werden, die eventuell zu dem leicht erhöhten Milzgewicht in CD30-Mäusen führt. Diese großen CD30-exprimierenden B-Zellen könnten nach Aktivierung des CD30-Rezeptors durch den CD30-Liganden entstehen. Die Expression des CD30-Liganden wurde in Mäusen vor allem auf aktivierten T-Zellen, aber auch auf manchen dendritischen Zellen sowie einer CD4⁺CD3-Zellpopulation, die sich nahe der aktivierten T-Zellen in den B-Zell-Follikeln befindet, detektiert (Kennedy et al., 2006). Das Expressionsprofil des CD30-Liganden deutet darauf hin, dass B-Zellen normalerweise bei Immunreaktionen, bei denen B-Zellen in Kontakt mit aktivierten T-Zellen kommen, ein CD30-Signal erhalten. Dies lässt vermuten, dass Veränderungen in CD30-Mäusen nur nach Immunreaktionen zu beobachten sind. Da der Tierstall sauber, aber nicht frei von Pathogenen ist, könnten die wenigen großen CD30-exprimierenden B-Zellen, B-Zellen darstellen, die durch eine Entzündungsreaktion aberrante CD30-Signale erhalten haben. Da die Population mit extrem großen Zellen nur in CD30-Mäusen aber nicht in Kontrollmäusen entsteht, nehmen wir an, dass diese aberrante B-Zell-Population durch ein fehlgeleitetes CD30-Signal verursacht wird, was dadurch entsteht, dass CD30 auf allen und nicht nur auf aktivierten B-Zellen exprimiert wird. Alternativ könnte diese extrem große Zellpopulation aber auch eine Ansammlung von Pre-Plasmablasten darstellen, die nicht mehr zu Plasmazellen differenzieren können, weil sie CD30 nicht herunterregulieren können. Für diese Hypothese spricht, dass Pre-Plasmablasten CD30 positiv sind, während CD30 in Plasmazellen nicht mehr exprimiert wird (Jourdan et al., 2009). Gezielte Immunisierungen mit TD- und TI-Antigenen können eventuell die Herkunft dieser aberrant großen CD30-exprimierenden B-Zellen klären.

Es wird interessant sein, zu untersuchen, ob diese aberrante B-Zell-Population *in vivo* und *in vitro* verstärkt proliferiert. Dies ist im Hinblick auf die Pathogenese des HL interessant. Man nimmt an, dass die CD30-positiven HRS-Zellen ebenfalls von B-Zellen abstammen, die eine Immunreaktion durchlaufen haben. Im HL sind die Tumorzellen von vielen CD30L-exprimierenden Zellen umgeben und werden dadurch wahrscheinlich stetig mit CD30-Signalen versorgt. Bis jetzt ist noch unbekannt, welchen Einfluss CD30-Signale auf das Proliferationsverhalten dieser B-Zellen haben.

4.4 Das konstitutiv aktive CD30-Signal in B-Zellen führt zu einer Expansion von B1-Zellen

Um ein konstitutives CD30-Signal in B-Zellen zu untersuchen, wurden LMP1/CD30^{flSTOP}-Mäuse mit CD19Cre-Mäusen verpaart. Im Gegensatz zu den CD30-Mäusen ist die Signalweiterleitung in diesen Mäusen nicht von dem CD30-Liganden abhängig, sondern wird durch die Transmembrandomäne von LMP1 konstitutiv vermittelt. Die Expression von LMP1/CD30 in B-Zellen führte zu einer normalen B-Zellentwicklung im Knochenmark, aber zu einer Splenomegalie in der Peripherie, die in unterschiedlichen Mäusen unterschiedlich stark ausgeprägt war. Eine altersabhängige Korrelation der Splenomegalie konnte jedoch nicht festgestellt werden. Die Gesamtzellzahlen in der Milz waren stark erhöht. Die Splenomegalie konnte teilweise durch eine B-Zell-Expansion erklärt werden. Auf LMP1/CD30-exprimierenden Milz-B-Zellen waren die Aktivierungsmarker CD80 und CD86 sowie das Adhäsionsmolekül ICAM1 hochreguliert, was auf einen prä-aktivierten Zustand hinweist. Es ist vorstellbar, dass LMP1/CD30-exprimierende B-Zellen durch ihren prä-aktivierten Zustand verstärkt Zytokine ausschütten, die dann zur Rekrutierung oder zur Aktivierung von anderen Zellen des Immunsystems führen. Dies könnte die Zunahme der Gesamtzellzahl erklären, die sich nicht alleine durch die erhöhten B-Zellzahlen erklären lässt. Weitere Analysen werden klären, ob das konstitutive CD30-Signal Einfluss auf die Expansion anderer Zellen in der Milz wie beispielsweise von NK-Zellen, Granulozyten oder Makrophagen hat.

Die Expansion der B-Zellen war vor allem auf die Zunahme von B1a- und B1b-Zellen zurückzuführen, während die FoB- und MZB-Zellen nur leicht erhöht waren. Warum gerade B1-Zellen in LMP1/CD30-exprimierenden Mäusen expandiert waren, ist noch unklar. Es ist möglich, dass das konstitutive CD30-Signal speziell B1-Zellen zur verstärkten Proliferation anregt und dadurch einen positiven Einfluss auf die Selbsterneuerung von B1-Zellen hat (Kantor et al., 1995). Die Entstehung und Aufrechterhaltung der B1a-Zell-Population ist von der Milz abhängig (Wardemann et al., 2002). Dies lässt vermuten, dass B1-Zellen von Zeit zu Zeit in die Milz wandern, wo sie Überlebenssignale bekommen und zum Zwecke der Selbsterneuerung begrenzt proliferieren. In LMP1/CD30-Mäusen könnte diese Proliferation durch das konstitutive CD30-Signal erhöht sein, was zur Akkumulation der B1-Zellen in Milz und Peritoneum führen könnte. Gegen diese Hypothese spricht jedoch, dass die B1-Zellen in der Milz und in der Bauchhöhle nicht altersabhängig akkumulieren,

sondern eher eine starke Variation in der Anzahl der B1-Zellen zwischen unterschiedlichen Mäusen zu beobachten ist. Eine andere Studie schlägt vor, dass aktivierte B1-Zellen aus dem Bauchraum auswandern, um in der Milz zu IgM-Antikörper-sezernierenden Plasmazellen zu differenzieren (Kawahara et al., 2003). Die Voraktivierung der LMP1/CD30-exprimierenden B1-Zellen könnte den Schwellenwert dieser Aktivierung senken und dadurch zu einer verstärkten Auswanderung der B1-Zellen in die Milz führen. In der Milz differenzieren die B1-Zellen zuerst zu Pre-Plasmablasten, deren Phänotyp nur schwer von B1-Zellen zu unterscheiden ist. Das konstitutive CD30 Signal könnte zu einer verstärkten Auswanderung der B1-Zellen in die Milz und dort zu einer starken Proliferation von Pre-Plasmablasten führen, die dann zu Plasmazellen differenzieren, was die Akkumulation der Plasmablasten („B1-like“) und Plasmazellen in der Milz von LMP1/CD30-exprimierenden Mäusen erklären könnte. Es ist jedoch dann immer noch schwer zu verstehen, warum in der Bauchhöhle von LMP1/CD30-Mäusen sowohl B1- als auch B2-Zellen stark vermehrt sind. Dies kann unserer Meinung nach nur mit der Antigen-induzierten Bildung von B1-Zellen erklärt werden. Die Antigen-induzierte Differenzierungshypothese schlägt vor, dass die B1-Zellen aus B2-B-Zell-Vorläufern entstehen, die durch ein T-Zell-unabhängiges Typ-II- Antigen stimuliert worden sind (Cong et al., 1991). Die Antigenspezifität bei einer Immunreaktion könnte darüber entscheiden, ob aus B-Zellen aktivierte B2-Zellen oder B1-Zellen entstehen. CD30-Signale könnten einerseits den B1-B-Zell-Differenzierungsprozess positiv regulieren und andererseits die Wanderung der B1-Zellen in den Bauchraum induzieren. Für diese Hypothese spricht, dass B1-Zellen in der Bauchhöhle CD30 exprimieren (<http://www.immgen.org>). Ein konstitutives CD30-Signal könnte im Falle eines Antigenkontakts die B1-B-Zelldifferenzierung und -auswanderung in den Bauchraum verstärken. Außerdem könnten durch das konstitutive CD30 Signal aktivierte B2-Zellen ebenfalls fälschlicherweise in die Bauchhöhle geleitet werden.

Wie B1-Zellen tatsächlich entstehen und welche Rolle CD30-Signale bei diesem Differenzierungsprozess spielen, muss durch weitere Versuche geklärt werden. LMP1/CD30-Mäuse könnten ein gutes Modell darstellen, um genauere Einblicke in die Mechanismen der Expansion von B1-Zellen in der Milz und im Bauchraum zu erhalten.

4.5 Das konstitutiv aktive CD30-Signal in B-Zellen führt zu einer Zunahme von Plasmazellen

Neben der B1-B-Zell-Zunahme wurde eine erhöhte Anzahl von Plasmazellen in der Milz und im Knochenmark LMP1/CD30-exprimierender Mäuse beobachtet. Plasmazellen sind normalerweise mit weniger als 1 % in den lymphoiden Organen vertreten und sind für eine effektive Immunantwort wichtig (Fairfax et al., 2008). B1-Zellen spielen in der ersten Phase der Immunantwort eine große Rolle, indem sie durch eine schnelle Differenzierung zu Plasmablasten und Plasmazellen für eine schnelle Immunantwort sorgen (Martin et al., 2001, Fairfax et al., 2007). Das Expressionsprofil von B1-Zellen entspricht dem von aktivierten B-Zellen mit erhöhten Blimp1-mRNA-Mengen und niedrigen Bcl6-mRNA-Mengen (Fairfax et al., 2007). Der Transkriptionsfaktor Blimp1 ist für die Differenzierung zu Plasmazellen und die Immunglobulin-Sekretion essentiell (Shapiro-Shelef et al., 2003). Es ist daher vorstellbar, dass die erhöhten Plasmazellzahlen im Zusammenhang mit den erhöhten B1-Zellen stehen, welche durch Antigenstimulation zu Plasmazellen differenzieren. Aber auch der prä-aktivierte Zustand der LMP1/CD30-exprimierenden B2-Zellen kann dazu führen, dass die B-Zellen responsiver auf Antigene werden und damit schneller zu Plasmazellen differenzieren können. Wie die B1-Zellen unterlag auch die Expansion der Plasmazellen einer hohen Varianz. Dabei scheint die Expansion der B1-Zellen mit der Expansion der Plasmazellen korreliert zu sein, da nur in Mäusen mit erhöhten B1-B-Zellzahlen erhöhte Plasmazellzahlen detektiert werden konnten. Die erhöhten Plasmazellzahlen könnten somit in Zusammenhang mit einer Immunreaktion stehen, die eine Differenzierung zu Plasmazellen induziert. Gezielte Immunisierungen mit TI- und TD-Antigenen werden weitere Aufschlüsse über die Ursache der erhöhten Plasmazellzahlen in der Milz und im Knochenmark geben.

4.6 LMP1/CD30- und CD30-Mäuse haben eine normale Follikelstruktur in der Milz

Die histologischen Schnitte zeigten, dass die Follikelstruktur in der Milz durch die Expression von CD30 und LMP1/CD30 nicht beeinflusst wird. So war der strukturelle Aufbau mit abgegrenzter B- und T-Zellzone sowohl in der Milz von CD30- als auch LMP1/CD30-Milzen gut sichtbar. In LMP1/CD30-Mäusen mit einer starken Expansion

von B-Zellen konnten jedoch deutlich größere Follikel beobachtet werden. Die B-Zellen akkumulierten teilweise in den Follikeln, jedoch waren auch außerhalb der Follikel, in der roten Pulpa, IgM-positive Zellen nachweisbar, die mit steigenden B-Zellzahlen zunahmen. Außerdem konnten in LMP1/CD30-Mäusen innerhalb und außerhalb der Follikel B-Zellen detektiert werden, die stark IgM exprimierten. Bei diesen Zellen könnte es sich um B1-Zellen oder Plasmazellen handeln. Spezifischere Färbungen werden Aufschlüsse darüber geben, ob es sich bei diesen Zellen um die B1-Zellen oder Plasmazellen handelt.

4.7 Das konstitutive CD30-Signal blockiert die Keimzentrumsreaktion

Die Expression von CD30 konnte bisher nur auf wenigen aktivierten B-Zellen, die sich am Rand von Keimzentrum sowie in der parafollikulären Region befanden, nachgewiesen werden (Stein et al., 1985, Durkop et al., 1997). Ebenso konnte auf HRS-Zellen, welche ursprünglich von Keimzentrums-B-Zellen abstammen, CD30 detektiert werden. Die Inaktivierung von CD30 in Mäusen führte zu einem Defekt in der Aufrechterhaltung von Keimzentren und einer Störung der sekundären Immunantwort (Gaspal et al., 2005). Diese Befunde legen eine mögliche Rolle von CD30 während der Keimzentrumsreaktion nahe. Aus diesem Grund wurde untersucht, ob das konstitutive CD30-Signal oder die Expression von CD30 einen Einfluss auf die Entwicklung von Keimzentren nach T-Zell-abhängiger Immunisierung hat. Die Ergebnisse zeigten, dass das konstitutive CD30-Signal die Keimzentrumsreaktion verhindert, während die Expression des CD30-Rezeptors keinen Einfluss auf die Bildung von Keimzentren hatte.

Die Anzahl der NP-spezifischen-IgM-sezernierenden Plasmazellen in der Milz und im Knochenmark war nach Immunisierung von LMP1/CD30-Mäusen deutlich höher als in Kontrollmäusen, während die Anzahl der NP-spezifischen IgG1-sezernierenden Plasmazellen erniedrigt zu sein scheint. Diese Daten deuten darauf hin, dass LMP1/CD30-Mäuse nach TD-Immunisierung eine verstärkte extrafollikuläre Differenzierung zu IgM-spezifischen Plasmazellen durchführen, aber keine Keimzentren ausbilden. Erstaunlicherweise waren die NP-spezifischen IgG1-Titer in LMP1/CD30-Mäusen mit den Kontrollmäusen vergleichbar, obwohl weniger NP-spezifische IgG1-sekretierende Plasmazellen nach der TD-Immunisierung von LMP1/CD30

detektiert wurden. Eine mögliche Ursache könnte eine erhöhte Antikörper-Produktion und -Sekretion durch das konstitutive CD30-Signal sein. CD30-Signale in murinen B-Zellen wurden bereits in Zusammenhang mit erhöhter Antikörper-Sekretion gebracht (Shanebeck et al., 1995).

4.8 LMP1/CD30 und Tumorentstehung

Ob LMP1/CD30-exprimierende Mäuse Tumore entwickeln, konnte bisher nicht geklärt werden. Es konnten jedoch 2 LMP1/CD30-exprimierende Mäuse beobachtet werden, die extrem erhöhte B-Zellzahlen in der Bauchhöhle hatten. In diesen Mäusen waren nicht mehr die FoB-Zellen die Haupt-B-Zellpopulation in der Milz, sondern die aberrante CD21^{niedrig}CD23^{niedrig}CD43⁺-B-Zellpopulation. Das Auswachsen einer aberranten B-Zellpopulation könnte auf die Entstehung eines B-Zell-Lymphoms hindeuten. Um letztendlich die Aussage zu treffen, dass es sich tatsächlich um ein B-Zell-Lymphom handelt, muss über eine Southern-Blot Analyse die Mono- oder Oligoklonalität dieser Population nachgewiesen werden. Da diese Mäuse erst 20 Wochen alt waren, deutet dies auf eine relativ frühe Lymphomentstehung in LMP1/CD30-Mäusen hin. Die aberranten B-Zellen akkumulierten nicht nur in der Milz sondern auch im Peritoneum. Die starke Akkumulation der B-Zellen in der Bauchhöhle erinnert zunächst an das primäre Effusionslymphom (PEL), das dadurch charakterisiert ist, dass die Tumorzellen im Bauchraum akkumulieren, jedoch keine soliden Gewebetumoren ausbilden. Die Tumorzellen des PEL sind durch das Expressionsprofil CD30⁺CD138⁺CD23⁻ und den Verlust der Ig-Oberflächenexpression charakterisiert (Matolcsy et al., 1998). Das PEL ist immer mit dem Karposi Sarkoma Virus (KSHV) und manchmal mit EBV assoziiert (Gaidano and Carbone, 2001). Da die aberranten B-Zellen in den LMP1/CD30-Mäusen jedoch nicht nur im Peritoneum, sondern auch in der Milz akkumulieren und KSHV-negativ sind, könnte es sein, dass die Mäuse eher ein sogenanntes sekundäres Effusionslymphom entwickeln, bei dem die Akkumulation der Tumorzellen im Bauchraum oft als sekundäres Ereignis erschwerend zu Gewebe-Lymphomen entsteht. Das sekundäre Effusionslymphom wird von dem PEL dadurch unterschieden, dass die Tumorzellen KSHV-negativ sind und IgM exprimieren (Carbone et al., 2009). Da CD30 in Preblasten exprimiert wird (Jourdan et al., 2009), ist es vorstellbar, dass die aberrante B-Zell-Population in der

Milz von LMP1/CD30-Mäusen von Pre-Plasmablasten abstammen, die einen Differenzierungsblock zu Plasmazellen aufweisen. Einige dieser Zellen könnten in den Bauchraum abwandern, wo sie ein sekundäres Effusionslymphom entwickeln. Da Genexpressionsstudien zeigen, dass Tumorzellen des PEL CD30-positiv sind und von sogenannten Plasmablasten abstammen (Klein et al., 2003), ist vorstellbar, dass CD30-Signale bei der Pathogenese des primären und sekundären Effusionslymphoms eine Rolle spielen könnten. Die CD30- und LMP1/CD30-Mäuse könnten ein geeignetes Modell sein, um die Rolle von CD30 bei der Entstehung von Effusionslymphomen zu untersuchen.

5 Zusammenfassung

Das Hodgkin Lymphom (HL) ist eines der häufigsten Lymphome der westlichen Welt. Die Hodgkin-Reed-Sternberg-Zellen (HRS-Zellen) sind durch die Expression zellulärer Rezeptoren wie CD30, CD40, Notch1 und Notch2, einer konstitutiv hohen NF- κ B-Aktivität und den Verlust typischer B-Zelleigenschaften charakterisiert. In Epstein-Barr-Virus-positiven HRS-Zellen werden außerdem die beiden latenten Membranproteine LMP1 und LMP2A exprimiert. Man geht davon aus, dass sowohl die zellulären Rezeptoren als auch die beiden viralen Proteine LMP1 und LMP2A zur Tumorentstehung beitragen.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde mit Hilfe eines Zellsystems untersucht, inwiefern die Proteine LMP1 und LMP2A zum Phänotyp einer HRS-Zelle beitragen. Die Expression von LMP1 und LMP2A führte zu einer für HRS-Zellen typische Zunahme der Zellgröße und Polykaria-Formation sowie zur Expression des HL-Markers CD30. Außerdem hatte die Expression von LMP2A einen negativen Einfluss auf die Expression typischer B-Zell-spezifischer Gene. Die Analyse der Signalwege zeigte, dass LMP1 zur starken Aktivierung von NF- κ B beiträgt, während LMP2A eine starke Aktivierung der MAP-Kinasen JNK und ERK auslöst. Die Co-Expression beider Proteine führte zu einer verstärkten Aktivierung von Akt, ERK und NF- κ B. Obwohl diese Signalwege einen positiven Einfluss auf das Überleben und die Proliferation haben, reichte die Co-Expression von LMP1 und LMP2A nicht aus, um B-Zellen zu immortalisieren. Eine mögliche Ursache könnte die hohe Expression des Tumorsuppressors A20 sein, der oft in HL mutiert vorliegt. Außerdem reichte die Expression von LMP1 und/oder LMP2A nicht aus, um das Retinoblastom-Protein zu hyperphosphorylieren und damit den Zellzyklus zu induzieren. Die Ergebnisse zeigen, dass die Co-Expression von LMP1 und LMP2A teilweise zum Phänotyp von HL beitragen, letztendlich jedoch für die B-Zell-Transformation nicht ausreichen.

CD30, ein Rezeptor der TNF-R-Familie, wird physiologischerweise auf aktivierten B- und T-Zellen exprimiert und wurde bereits vor mehr als 25 Jahren als Marker für HL beschrieben. Der zweite Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit der Frage, welchen Einfluss CD30 bei der normalen B-Zellentwicklung und B-Zell-Lymphomentstehung spielt. Um diese Frage zu beantworten, wurden die beiden konditionalen Mausstämme

CD30^{flSTOP} und LMP1/CD30^{flSTOP} generiert, die sich hinsichtlich der CD30-Signalweiterleitung unterscheiden. In CD30^{flSTOP}-Mäusen kann CD30 in Zellen, die physiologischerweise CD30 negativ sind, zwar exprimiert werden, jedoch ist die Aktivierung des Signals von der Interaktion mit CD30-Liganden präsentierenden Zellen abhängig. Hingegen ist in LMP1/CD30^{flSTOP}-Mäusen das CD30-Signal durch die LMP1-Transmembrandomäne konstitutiv aktiv. Die B-Zell-spezifische Expression von CD30 führte zu einer normalen B-Zellentwicklung und -aktivierung. Es konnten jedoch wenige CD30-exprimierende B-Zellen beobachtet werden, deren Zellgröße stark zugenommen hatte. Wir vermuten, dass dies aktivierte B-Zellen sind, die während einer Immunreaktion durch aktivierte T-Zellen ein CD30-Signal bekommen haben. Die B-Zell-spezifische Expression von LMP1/CD30 führte zu einer Expansion von B1-Zellen in Bauchraum, Milz und Lymphknoten sowie zu einer Zunahme von Plasmazellen in Milz und Knochenmark. Sowohl die Expansion der B1-Zellen, als auch der Plasmazellen war in den einzelnen Mäusen unterschiedlich stark ausgeprägt, was darauf hindeutet, dass sekundäre Effekte, z.B. Immunreaktionen, die Expansion dieser Zellen auslösen. Bis jetzt konnten 2 Mäuse beobachtet werden, die im Alter von 20 Wochen eine extrem starke Expansion von B-Zellen in Milz und Bauchraum aufwiesen, die alle einen B1-B-Zell-ähnlichen Phänotyp hatten. Weitere Untersuchungen werden klären, ob diese Mäuse bereits B-Zell-Lymphome entwickelt haben. Diese Ergebnisse zeigen erstmals, dass ein konstitutives CD30-Signal zur Expansion von B1-B- und Plasmazellen führt. Dies könnte auf eine physiologische Rolle von CD30 bei der B1-B-Zell- und Plasmazellentwicklung hindeuten und lässt vermuten, dass deregulierte CD30-Signale zu der Entstehung von B-Zell-Lymphomen führen.

6 Material

6.1 Plasmide

- pBmgNeomCD30 5.2 full length clone #2 (Podack ER., Seattle)

Das Plasmid enthält die murine cDNA von CD30 und wurde dazu verwendet, um die cDNA von CD30 und den zytoplasmatischen Teil von CD30 zu amplifizieren und in die entsprechenden Vektoren zu klonieren.

- pBSLMP1Asc1 (Cornelia Hömig-Hözl)

LMP1 wurde über die Schnittstelle *BamHI* in den Vektor pBluescriptIIKS+ kloniert.

- pBSLMP1Asc1_a (Petra Fiedler)

Die Orientierung von LMP1 wurde durch die Schnittstelle *BamHI* geändert.

- pBSLMP1/CD30

Mit Hilfe des Vektors pBSLMP1Asc1_a wurde über die Schnittstellen *NcoI* und *KpnI* der zytoplasmatische Teil von LMP1 mit dem zytoplasmatischen Teil von CD30 (PCR-Produkt) ausgetauscht. Dieses Plasmid enthält die cDNA für das Fusionsprotein LMP1/CD30.

- pUC18_Oligo1 (Franziska Hampel)

Die „Multiple Cloning Site“ (MCS) des Vektors pUC18 wurde dahingehend verändert, dass nun eine Insertion von Genen über die Schnittstelle *SbfI* möglich ist. Dieser Vektor wurde verwendet, um die cDNA von CD30 zu subklonieren.

- pCD30-1 / pCD30-7

Das Plasmid trägt die cDNA für das murine CD30 Protein. Über die Schnittstelle *SbfI* wurde die cDNA (PCR-Produkt) von CD30 in den Vektor pUC18_Oligo1 kloniert.

- DC-R26CAGp-IRES-CD2 (TVR26) (Marc Schmitt-Supprian)

Der Vektor ermöglicht die Insertion von Transgenen spezifisch in den *rosa26*-Lokus. Durch die beiden 1 kb und ein 4 kb langen Arme sollen *Imp1/cd30* und *cd30* über homologe Rekombination in den *rosa26*-Lokus integriert werden. Zwischen den Armen ist der CAGGs-Promotor kodiert, gefolgt von einer loxP-flankierten STOP-Kassette in der das *Neomycin-Geneticin* Resistenzgen kodiert ist. Anschließend kann über die Schnittstelle *AscI* das gewünschte Transgen eingebaut werden. Dahinter ist das Reportergen *hCD2* (*IRES-hC2*) kodiert, welches von *frt*-Seiten flankiert ist.

- TVLMP1/CD30_final

Über die Schnittstelle *AscI* wurde das Fusionsgen *Imp1/cd30* in den Vektor DC-R26CAGp-IRES-CD2 kloniert. Anschließend wurde der CAGGs-Promotor über die Schnittstelle *PacI* deletiert, um die Transkription von LMP1/CD30 über den endogenen Rosa26-Promotor zu ermöglichen. Dieser Vektor wurde für Transfektion in die ES-Zellen verwendet, um den transgenen Mausstamm LMP1/CD30^{f^{STOP}} herzustellen.

- TVCD30_a

Über die Schnittstelle *AscI* wurde die cDNA von CD30 in den Vektor DC-R26CAGp-IRES-CD2 kloniert (Richtung a). Dieser Vektor wurde für Transfektion in die ES-Zellen verwendet, um den transgenen Mausstamm CD30^{f^{STOP}} herzustellen.

- pSG5_Oligo

Das Expressionsplasmid enthält den SV40-Promotor sowie eine Polyadenylierungssignalsequenz (bpA), die für die richtige Expression des Gens notwendig ist. Die MCS wurde modifiziert, damit eine Insertion von Genen über die Schnittstelle *AscI* möglich ist.

- pSG5_LMP1/CD30

Über die Schnittstelle *AscI* wurde das Fusionsgen *Imp1/cd30* in den Vektor pSG5_Oligo kloniert. Mit Hilfe dieses Expressionsplasmids wurde die Funktionalität des Fusionsproteins im LUC-Assay geprüft. Außerdem wurde aus diesem Plasmid die CD30-Sonde über die Restriktionsschnittstelle *BsgI* gewonnen.

- pRosa26-5-pBSKS (Phillipe Soriano, Seattle)

Der Vektor pRosa26-5-pBSKS enthält ein 550bp langes Fragment aus dem ersten Intron des *rosa26*-Lokus, welches von einer *EcoRI*- und einer *PacI*-Schnittstelle flankiert ist. Das Fragment wurde als Southern-Blot-Sonde verwendet.

- pGK-Cre-bpA (Kurt Fellenberg, Institut für Genetik, Köln)

Dieses Plasmid trägt das Gen für die Cre-Rekombinase, welches unter der Kontrolle des PGK-Promotors steht. Das Plasmid wurde verwendet, um die Deletion der STOP-Kassette in den ES-Zellen zu überprüfen.

- pBS_hCD2 (Franziska Hampel)

Mit Hilfe dieses Plasmids, das *hCD2* kodiert, kann durch die Restriktionsschnittstellen *BmgBI* und *BsaI* die CD2-Sonde gewonnen werden.

-p581_SVLMP1

Dieser Vektor kodiert für LMP1. Mit diesem Plasmid wurde über die Restriktionsschnittstellen *BamHI* und *MscI* die LMP1-Sonde gewonnen.

6.2 Sonden für Southern Blot Analyse

- R26-Sonde

Die 550 bp lange Sonde wurde aus dem Plasmid pRosa26-5-pBSKS mit den Enzymen *EcoRI* und *PacI* isoliert. Waschbedingungen: 3 x 10 min bei 58°C in 0,2 x SSC 0,5 % SDS.

- hCD2 Sonde

Die 424 bp lange Sonde wurde aus dem Plasmid pBS_hCD2 mit den Enzymen *BmgBI* und *BsaI* isoliert. Waschbedingungen: 2 x 10 min bei 58°C in 0,2 x SSC 0,5 % SDS.

- CD30 Sonde

Die 407 bp lange Sonde wurde aus dem Plasmid pSG_LMP17CD30 mit dem Enzym *BsgI* isoliert. Waschbedingungen: 2 x 10 min bei 58°C in 0,2 x SSC 0,5 % SDS.

- LMP1 Sonde

Die 644 bp lange Sonde wurde aus dem Plasmid p581_SVLMP1 mit den Restriktionsenzymen *BamHI* und *MscI* isoliert. Waschbedingungen: 30 min in 1 x SSC 0,1 % SDS bei 65°C und anschließend 15 min bei 65°C in 1 x SSC 0,5 % SDS.

6.3 Bakterien

DH5 α (E.coli)

Genotyp: *F-endA1 glnV44 thi-1 recA1 gyrA96 deoR nupG ϕ 80d lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169 hsdR17 (*r_k*, *m_k*), λ*

6.4 Zelllinien

-Embryonale Stammzellen IDG3.2 (Dr. Ralf Kühn, Helmholtz Zentrum Neuherberg; Hitz et al., 2007)

Die murine ES-Zelllinie, aus einer männlichen C57BL/6Jx129/SV (F1) Blastozyste, wurde für die Generierung der Mausstämme LMP1/CD30^{fSTOP} und CD30^{fSTOP} verwendet.

-Embryonale Fibroblasten (EF-Zellen) (Dr. Ralf Kühn, Helmholtz Zentrum Neuherberg)

Die EF-Zellen wurden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Ralf Kühn aus Embryonen des Neomycin-resistenten Stamms pSVneo, PEP-II4 C57BL/6 an Tag 13,5 präpariert.

- HEK293-Zellen (AG Kempkes, Helmholtz Zentrum München)

Die transformierte Fibroblasten-ähnliche Zelllinie wurde aus embryonalen Nierenzellen gewonnen. In dieser Arbeit wurde sie zur Überprüfung der Funktionalität des Fusionsproteins LMP1/CD30 genutzt.

- EREB2-5 Zellen (Bettina Kempkes)

EREB2-5 ist eine humane konditional immortalisierte lymphoblastoide Zelllinie, die durch Infektion von primären B-Zellen aus Nabelschnurblut mit einer nicht-transformierenden, EBNA2-defizienten P3HR1-Linie des EBV etabliert wurde, wobei der EBNA2-Defekt durch die Transfektion mit einem Mini EBV-Plasmid, das für ein Östrogen-regulierbares EBNA2 (ER/EBNA2) kodiert, komplementiert wurde (Kempkes et al., 1995). EBNA2 ist ein wichtiger viraler Transkriptionsfaktor, der die Transkription fast aller EBV-Proteine transaktiviert. ER/EBNA2 wird konstitutiv exprimiert, jedoch wird es in Abwesenheit von Östrogen über die Östrogen-Bindedomäne an das Heat-shock Protein 90 (Hsp 90) gebunden und mit einer inkorrekten Faltung an der Membran inaktiv gehalten (Francis et al., 1995, Briegel et al., 1996). In Abwesenheit von EBNA2 weisen EREB2-5 Zellen einen ruhenden Phänotyp auf, der am ehesten reifen, naiven B-Zellen ähnelt, die noch keinen Antigen-Kontakt hatten. In Anwesenheit von Östrogen ist EBNA2 funktionell und kann neben den viralen Genen auch die Expression vieler zellulärer Gene regulieren. Dies führt zur Aktivierung und Proliferation der B-Zelle, die dann einen Phänotyp aufweist, der einer reifen Antigen-aktivierten B-Zelle ähnelt.

- EREB-EBNA1 (Julia Rastelli)

Diese Zelllinie (Ursprung EREB2-5) diente als Negativkontrolle. Nach Abschalten von EBNA2 werden weder LMP1 noch LMP2A exprimiert.

- EREB-LMP2A (Julia Rastelli)

In der Zelllinie (Ursprung EREB2-5) findet nach Östrogenentzug die EBNA2-unabhängige Expression von LMP2A unter dem Doxyzyklin-abhängigen bidirektionalen Promotor P_{tet}bi-1 statt.

- EREB-LMP1 (Julia Rastelli)

In der Zelllinie (Ursprung EREB2-5) findet nach Östrogenentzug die EBNA2-unabhängige Expression von LMP1 unter dem Doxyzyklin-abhängigen bidirektionalen Promotor P_{tet}bi-1 statt.

- EREB-LMP1/2A (Julia Rastelli)

In der Zelllinie (Ursprung EREB2-5) findet nach Östrogenentzug die EBNA2-unabhängige Co-Expression von LMP1 und LMP2A unter dem Doxyzyklin-abhängigen bidirektionalen Promotor P_{tet}bi-1 statt.

6.5 Mäusstämme

- C57BL/6

Der Mausstamm wurde für die Blastozysten-Injektion und für Verpaarungen verwendet, um Keimbahntransmission zu überprüfen.

- Balb/CJ

Die Mäuse wurden verwendet um einen stabilen Stamm aufzubauen.

- CD19Cre (Rickert et al.,1997)

Ursprünglicher C57BL/6 Stamm, der in den CD19-Lokus das Gen für die Cre-Rekombinase integriert hat, zurückgekreuzt auf Balb/C Hintergrund.

6.6 Oligonukleotide

Tabelle 2 Verwendete Primer zur Etablierung der Mäusstämme

CD30-F	GAGCCTGCAGGCGGGAAGCCAAGATGAGCG
CD30-R	CGTCCTGCAGGGTCACTTCTCAGAGACAGTCGTGGGCCCCATGGTCC
LMP1/CD30-F	GAGCCATGGACAACGAAAGGCCTGTAGGAGGCGGTTCCAGCAG
LMP1/CD30-R	TTCCGGTACCGGCGCGCCGTCACTTCTCAGAGACAGTCGTGGGCCCCGTGGTCC
Primer 5a	GCTAACCATGTTCATGCCTTC forward
Primer 6	ATGCGATGTTTCGCTTGGT
Primer 7	TAAAGTCGACTCGGGGACAC
Primer 8	TGCCATCTAGTGATGATGAGG
Primer 11	GGACGTGGTTTTCTTTGAA
Primer 12	GAGGAGTCGGAGAAATGATGA
TV CD30 - a	TGTCTGGATCTGACATGGTAAGT
TV CD30 - b	ACCTTGTGCAGGAAGATGCT
TV CD30 - c	CAGTGATCGTGGGCTCTGTA
TV CD30 - d	GCCGAATATCATGGTGGAAA
TV CD30 - e	CCCCCTGAACCTGAAACATA
TV CD30 - f	GAGTGTCCCTGGAGATGGAA
TV CD30 - g	GTATAGTGAGCGGCCTCAGC

Material

TV LMP1/CD30 - a	GTCCAGGGTTTCCTTGATGA
TV LMP1/CD30 - b	TGTCTGGATCTGACATGGTAAGT
TV LMP1/CD30 - c	ACAACGAAAGGCCTGTAGGA
TV LMP1/CD30 - d	GCAGGAGACAGAACCACCTC
TV LMP1/CD30 - e	GCACTTGCTCTCCCAAAGTC
TV LMP1/CD30 f rev	GCTGGAAGGTCTGCACTAGG
TV LMP1/CD30 g rev	GTATAGTGAGCGGCCTCAGC
hCD2 rev	GGAGACTGCACCTTTGGAAG
ExFw1LMP1	AGGAGCCCTCCTTGTCTCTA

Tabelle 3 Verwendete Primer für die Genotypisierung

Primer	Sequenz 5' - 3'
Cre7	TCA GCT ACA CCA GAG ACG G
CD19d	CCA GAC TAG ATA CAG ACC AG
CD19c	AAC CAG TCA ACA CCC TTC C
TVCD30c	CAGTGATCGTGGGCTCTGTA
hCD2rev	GGAGACTGCACCTTTGGAAG
ExFW1LMP1	AGGAGCCCTCCTTGTCTCTA
TVLMP1/CD30g rev	GTATAGTGAGCGGCCTCAGC

Tabelle 4 Verwendete Primer für die quantitative PCR

Primer	Sequenz 5' - 3'	Anlagerungs-Temperatur
hNotch1 seq	AGC CAC AGA CCT GGA TGC	58 °
hNotch1 rev	CGG TCC ATA TGA TCC GTG A	58 °
hNotch2 seq	ATG CCA GGA TGA ATG ATG GT	58 °
hNotch2 rev	TGA TGT CTC GAT TGG CAA AA	58 °
VH3se	GAG GAC ACA GCC GTG TAT TAC TG	57 °C
Cμ-as	CCG AAT TCA GAC GAG GGG GAA AAG GGT T	57 °C
hIgα seq	CAG GAG TCC TCC AAG CTC T	57 °C
hIgα rev	ACG TGT AGT TGC CAT GGA G	57 °C
hIgβ seq	GGA AGC AGG AGA TGG ACG AGA AT	61 °C
hIgβ rev	TTG TCC AGC AGG AAG ATA GG	61 °
hc-Rel seq	CAG AAA CTG TGC CAG GAT CA	62 °
hc-Rel rev	TCC AAT TGA ACC GAG GAG AC	62 °
hp100 seq	GAA CAG CCT TGC ATC TAG CC	63 °
hp100 rev	TCC GAG TCG CTA TCA GAG GT	63 °
hribProt123a seq	CTC CTA AAG CTG AAG CCA AA	57 °C
hribProt123a rev	GCC TGT TTA ATC TGG TGC TT	57 °C

6.7 Antikörper für Western Blot

Tabelle 5 Antikörper Western Blot

α-pERK	# 9101 S, Fa. Cell Signaling
α-ERK	# 9102, Fa. Cell Signaling
α-pJNK	# 4671 S, Fa. Cell Signaling
α-JNK	# 9258, Fa. Cell Signaling
α-pAkt	# 9271 S, Fa. Cell Signaling
α-Akt	# 9272, Fa. Cell Signaling

α -pI κ B α	# 9246 S, Fa. Cell Signaling
α -I κ B α	sc- 371, Fa. Santa Cruz
α -p105/50	sc- 1190, Fa. Santa Cruz
α -c-Rel	sc- 6955, Fa. Santa Cruz
α -p65	# 3034, Fa. Cell Signaling
α -p100/52	# 4882, Fa. Cell Signaling
α -RelB	# 4954, Fa. Cell Signaling
α -EBNA1 (1H4)	Elisabeth Kremmer
α -LMP1 (clone CS1-4)	Fa. Dako Cytomation
α -LMP2A-14B6	Elisabeth Kremmer
α -tubulin	# 2148, Fa. Cell Signaling
α -CD30	sc-466833, Fa. Santa Cruz
α -Notch2 C651	Elisabeth Kremmer
α -Jagged1	sc-6011, Fa. Santa Cruz
c-myc	Überstand 9E10, E. Kremmer
A20	Klon 5C3, Fa. eBioscience
p53	sc-126, Fa. Santa Cruz
Rb	554162, Fa. BD Pharmingen
α -Kaninchen HRP	# 7074, Fa. Cell Signaling
α -Maus HRP	# 7076, Fa. Cell Signaling
α -Ratte HRP	sc- 2006, Fa. Santa Cruz
α -Ziege/Schaf HRP	Fa. Sigma

6.8 Antikörper für Immunhistochemie

Tabelle 6 Antikörper für Immunhistochemie

Antigen	Quelle	gekoppelt an	Verdünnung	Firma
murines CD3	Hund		1:2	E. Kremmer
murines IgM	Ziege	Peroxidase	1:100	Fa. Sigma
murines MOMA-1	Ratte		1:100	Fa. Biomedicals
PNA	Ratte	Biotin	1:2000	Fa. Vector Laboratories
Rat IgG2	Maus	Biotin	1:250	Fa. Jackson Laboratories

6.9 Antikörper für ELISA und ELISPOT

- IgM, II/41; IgG1, A85-3; IgG2a, R11-8; IgG2b, R9-91; IgG3, R2-38; IgA, C11-3 (Fa. BD Bioscience)
- für NP-spezifische ELISAs: NP₁₇-BSA und NP₃- BSA (Fa. Biosearch Technologies)
- biotinylierte sekundäre Antikörper: IgM-Bio, R6-60.2; IgG1-Bio, A85-1; IgG2a-Bio, R19-15; IgG2b-Bio, R12-3; IgG3-Bio, R40-82; IgA-Bio, C10-1 (Fa. BD Bioscience)
- Streptavidin-gekoppelte Alkaline Phosphatase (Fa. Vector)

6.10 Chemikalien, Plastikware, Geräte, Reagenzien

Tabelle 7 Chemikalien, Plastikware, Geräte, Reagenzien

Firma	Produkt
ABgene	PCR reaction tube
AID Diagnostika GmbH	EliSpot-Reader
Berthold Detection Systems	Luminometer
Becton Dickinson (BD) GmbH	Antikörper für FACS, FACS Calibur, Falcon-Röhrchen
Biochrom KG	Fetal Calf Serum (FCS, für EREB-Zellen)
BioRad	Transblot System; Electrophorese Kammer; Gene Pulser Küvette, 0,4 cm Elektrode; Elektroporator, Elektroporator
Chemicon	LIF (Leukämie inhibierender Faktor)
Diagnostic chemicals limited PEI	Dithiothreitol (DTT)
Eppendorf	Tischzentrifuge 5415, BioPhotometer
Ernst & Christiansen	CEA RP new, Cawomat 2000 IR Prozessor
Fermentas	Restriktionsenzyme
GE Healthcare	Hyperfilm-ECL, ECL-Western Blotting, Random Prime Labeling Kit Reagent, G50 Sephadex Säule
Genomed	Maxi-Preparations-Kit für Plasmid Isolation
Gibco BRL, Life Technologies	L-Glutamine, Natrium-Pyruvate, Penicillin/Streptomycin, Trysin-EDTA (1x), Trypan Blue, DMEM (Dulbeccos Mod Eagle Medium), RPMI 1640, nicht-essentielle Aminosäuren, β -Mercaptoethanol, G418 (Geneticin), OptiMEM, Hühnerserum
Hartmann Analytic	50 μ Ci 32P-a32-dCTP
Heraeus Christ Instruments	Umluft-Sterilbank, Zentrifuge, Inkubator
Invitrogen Life Technologies	1 kB Ladder, Pre-Stained Protein Ladder, Agarose, Hygromycin, TRIZOL
Kodak	M35 X-OMAT Entwicklmaschine, Biomax MS PE Applied Biosystems 35x43 cm
Leica Microsystems	Kryotom
Metabion	Oligonukleotide
Merck	Bovine Serum Albumin (BSA), Wrights Eosin-Methylenblau
Milipore	Immobilon TM membrane, 96-Loch-Filterplatten
Milteny-Biotec	LS-Säulen, MACS-Seperator, MACS-Puffer
Nikon	Stereomikroskop
Nunc GmbH	Cryo Vials, Zellkultur-Flaschen und -Platten, 96-Lochplatten, Maxisorb 96-Lochplatten
PAA Laboratories	Fetal Calf Serum (FCS), für EREB-Zellen und Feeder-Zellen), RPMI w/o Phenolrot, PBS (Dulbecco)
PAN Biotech	Fetal Calf Serum (FCS) für ES-Zellen
Pierce	Halt Phosphatase Inhibitor
Qiagen	QIAquick Gel extraction Kit, MaxiPrep Kit
Roche Diagnostic	Ampicillin; Protease Inhibitor; 1st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR [AMV];

Material

	LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green 1; LightCycler capillaries; LightCycler Gerät, Glaskapillaren, Complete Mini Tabletten
Roth	Phenol, Acrylamid
RS Photometrics	Digitalkamera
Sakura	O.C.T. Tissue Tek
Sigma	Ethidiumbromid, PonceauS, Streptavidin-gekoppelter Phosphatase, Östrogen, Gelatine, DMSO, Mitomycin C, Polyethylenimin, Mineralöl, O-Phenyldimine, DAB-Peroxidase-Substrat, UREA H ₂ O ₂
Schubert & Weiss	Neubauer Zählkammer
Tecan	Mikrotiterplatten-Leser
Vector Laboratories	„Alkaline Phosphate Substrate Kit“, „Peroxidase Substrate Kit“, Avidin/Biotin Blocking Kit
Zeiss	Lichtmikroskop

6.11 EDV

Adobe Illustrator CS3	Bildbearbeitung
Adobe Photoshop CS3	Bildbearbeitung
Clone Manager 8	Sequenzverarbeitung und -analyse
CELL Quest Becton Dickinson	FACS Aufnahmen und Auswertung
EndNote 2	Referenzen
Epson Scanner Programm	Einscannen der Western-Blot-Analysen
Microsoft Excel 2008	Tabellen und Kalkulationen
Microsoft Word 2008	Textverarbeitung
Primer3	Design von Primern

7 Methoden

7.1 DNA-präparative Techniken

7.1.1 DNA-Isolation, Aufreinigung und Isolation von Plasmiden aus Bakterien

Um Plasmide in geringer Menge zu isolieren, wurde ein MiniPrep angewendet. Die Bakterien einer 4 ml Übernachtskultur wurden bei 10000 rpm 5 min abzentrifugiert und das Pellet in 100 µl Puffer P1 resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen durch Zugabe von 200 µl Puffer P2 5 min bei RT lysiert. Die Zell-Lyse wurde durch 150 µl Puffer P3 gestoppt. Die Lösung wurde sofort durch Vortexen vermischt. Nach 10-minütiger Inkubation auf Eis erfolgte ein erneuter Zentrifugationsschritt bei 15000 rpm für 10 min bei 4 °C. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt, mit 700 µl Isopropanol versetzt und mehrmals invertiert. Nach 2-minütiger Inkubation bei RT wurden die DNA bei 15000 rpm für 10 min bei 4 °C abzentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde einmal in 400 µl 70 % Ethanol gewaschen und anschließend getrocknet. Zum Schluss wurde die DNA in 50 µl TE aufgenommen. Die Puffer P1, P2 und P3 wurden aus dem Jetstar-Isolations-Kit verwendet. Um Plasmide in größerer Menge zu erhalten, wurden die Plasmide mit dem Quiagen Plasmid Maxi Kit nach Angaben des Herstellers gereinigt.

7.1.2 Plasmidisolierung und Aufreinigung der Zielvektoren für die Transfektion in die ES-Zellen

Die Vektoren TVLMP1/CD30_final und TVCD30_a wurden mit dem Quiagen Plasmid Maxi Kit aus den Bakterien isoliert. Für die Transfektion der ES-Zellen wurde der linearisierte Vektor (Linearisierung erfolgte durch die Restriktion mit *AsiSI*) mittels Phenol-Chloroform-Extraktion aufgereinigt. Nach der Ethanol-Präzipitation wurde die DNA in 1,5 ml 70 % Ethanol zur Sterilisation bei -20°C aufbewahrt. Am Tag der Transfektion wurde der Ansatz 20 min bei 15000 rpm bei 4°C zentrifugiert. Anschließend wurde der Ethanol unter sterilen Bedingungen verworfen und die DNA unter der Sterilbank getrocknet und dann im Transfektionsmedium (RPMI w/o Phenolrot) gelöst. Nach Konzentrationsmessung der DNA am Photometer wurde die DNA auf 0,5 µg/µl eingestellt.

7.1.3 DNA-Präparation von ES-Zellen-Klonen aus 96-Loch-Platten

Die ES-Zell-Klone wurden in 96-Loch-Platten bis zur Konfluenz kultiviert. Nach 2-maligen Waschen der Zellen mit PBS wurden je Loch 50 µl ES-Zell-Lysepuffer (10 mM Tris pH 7,5; 10 mM EDTA; 10 mM NaCl; 0,5 % Sarcosyl; 1 mg/ml Proteinase K) zugegeben. Die 96-Loch-Platten wurden in wasserdampfgesättigter Atmosphäre bei 56 °C über Nacht inkubiert und am nächsten Tag bei Raumtemperatur 30 min abgekühlt. Anschließend wurden 100 µl 100 %-iger Ethanol je Loch zugegeben, um die DNA zu präzipitieren. Nach 1 h Inkubation bei RT wurde die DNA durch Zentrifugation sedimentiert und der Überstand vorsichtig abgossen. Die DNA wurde zweimal mit 100 µl 75 % Ethanol gewaschen, anschließend getrocknet und direkt die vorbereitete Lösung für den darauffolgenden Restriktionsverdau (35 µl/Loch) zugegeben.

7.1.4 DNA-Präparation von ES-Zellen aus 6 cm Platten

Zur Präparation der genomischen DNA von ES-Zell-Klonen in größeren Mengen wurden die Klone auf 6 cm Platten bis zur Konfluenz kultiviert. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und in 1 ml ES-Zell-Lysepuffer aufgenommen. Nach 5 min Inkubation bei 37°C wurden die sich von der Unterlage lösenden Zellen mit einer Pipette in Falcon-Röhrchen überführt und bei 56°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die DNA mit 2,5-fachem Volumen 100 %-igem Ethanol gefällt. Die DNA wurde mit einem Glashaken aus der Lösung geholt, in ein neues Gefäß überführt und anschließend mit 75 % Ethanol gewaschen. Anschließend wurde die DNA in 300 µl TE aufgenommen und 4 h bei 37°C unter Schütteln gelöst.

7.1.5 DNA-Isolation aus Mausschwanzspitzen

Bei dieser Methode handelt sich um ein leicht abgewandeltes Verfahren von Laird (Laird et al., 1991). Den Mäusen wurde ein etwa 0,3 cm langes Stück des Schwanzes abgeschnitten und dieser über Nacht in 500 µl Lysepuffer (100 mM Tris/HCl pH 8; 5 mM EDTA; 0,2 % SDS; 200mM NaCl; 100 µg/ml Proteinase K) bei 56°C inkubiert. Zur Fällung der Proteine wurde 1/3 gesättigte (> 5M) NaCl-Lösung zugegeben und der Ansatz 10 min bei 15000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt. Diesem Ansatz wurde 600 µl Isopropanol zur Präzipitation der DNA zugegeben und

anschließend bei 15000 rpm 15 min zentrifugiert. Danach wurde die DNA mit 70 % Ethanol gewaschen und bei 15000 rpm 5 min zentrifugiert. Nach Trocknen der DNA wurde diese in 100 µl TE-Puffer aufgenommen.

7.1.6 Phenol-Chloroform-Extraktion von DNA

Mit dieser Methode können Proteinkontaminationen der DNA-Lösung beseitigt werden. Die DNA-Lösung wurde auf ein Volumen von 400 µl gebracht und anschließend mit 400 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt und zum Vermischen der Lösungen mehrmals invertiert. Nach Mischen der Lösungen wurde die Phasentrennung durch Zentrifugation bei 15000 rpm 10 min bei 4°C erzielt. Die obere Phase wurde in ein neues Gefäß überführt, mit einem Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) versetzt und die Lösung durch Invertieren gemischt. Erneut erfolgte eine Zentrifugation bei 15000 rpm für 10 min bei 4°C. Die DNA in der oberen wässrigen Phase wurde anschließend in ein neues Gefäß überführt und durch Ethanol gefällt.

7.1.7 Enzymatische Spaltung von Plasmid-DNA

Die Spaltung von Plasmid-DNA mit Restriktionsenzymen wurde unter den vom Hersteller vorgeschlagenen Bedingungen und den entsprechenden Puffern durchgeführt.

7.1.8 Enzymatische Spaltung genomischer DNA aus ES-Zellen

Bei der Spaltung genomischer DNA aus Zellen, die direkt in 96-Loch-Platten präpariert wurden, wurde die DNA direkt nach der Fällung in 35 µl Restriktionslösung (Spermidin 1 mM, DTT 1 mM, BSA 100 µg/ml, RNase 50 µg/ml, Puffer (10 x) 1/10 Volumen, Enzym 50U/Loch) aufgenommen und die Platten nach Versiegelung mit Parafilm in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre über Nacht bei 37°C inkubiert. Für die Spaltung genomischer DNA, die bereits gelöst war, wurden 5-10 µg DNA mit 50-60 µl Restriktionslösung bei 37°C über Nacht inkubiert.

7.1.9 Southern Blot nach Southern, E.M.

Durch die von Southern entwickelte Methode ist es möglich, die in einem Agarosegel elektrophoretisch der Größe nach aufgetrennte DNA auf eine Membran zu transferieren. Durch das anschließende Hybridisieren der fixierten DNA auf der Membran mit einer radioaktiv markierten Sonde ist es möglich, spezifische DNA-Fragmente als Banden auf der Membran zu detektieren. Dabei ist die Spezifität des Nachweises von der Spezifität der Sonde abhängig, die einem Teil der nachzuweisenden Region komplementär ist.

Die mit Restriktionsenzymen verdaute DNA wurde nach Zugabe von 1/10 Ladepuffer auf ein 0,8 % Agarosegel (Ethidiumbromid 5 µg/ml) aufgetragen. Um später die Größe der detektierten Fragmente zu bestimmen, wurde zusätzlich ein Größenstandard auf das Gel aufgetragen. Nach der Auftrennung der DNA im Gel durch Gelelektrophorese wurde dieses zusammen mit einem Lineal unter UV-Licht fotografiert. Anschließend wurde das Gel 20 min in 0,25 M HCl auf dem Schüttler geschwenkt. Danach wurde es kurz mit Wasser gewaschen und 40 Minuten in einem alkalischen Transferpuffer (0,4 M NaOH; 0,6 M NaCl) inkubiert. Anschließend wurde der Blot (Abbildung 53) aufgebaut. Nach 12 h wurde der Blot abgebaut, die Position der Geltaschen markiert und die Membran kurz in 2 x SSC (0,3 M NaCl; 0,03 M Na-Citrat) geschwenkt. Danach wurde die Membran 1 h bei 80°C gebacken und die DNA so auf der Membran fixiert. Danach konnte der Blot für die Hybridisierung mit einer radioaktiven Sonde vorbereitet werden.

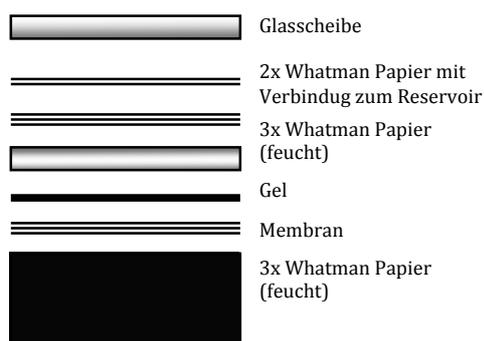


Abbildung 53 Aufbau Southern Blot. Auf einen Stapel mit Papiertüchern wurden zwei trockene 3 MM-Papiere gelegt, danach ein weiteres in Transferpuffer getränktes und anschließend die ebenfalls in Puffer angefeuchtete Nylon-Membran Hybond-N (Fa. Amersham Bioscience, Freiburg). Anschließend wurde das Gel auf die Membran gelegt und mit 3 weiteren angefeuchteten 3MM-Papieren zugedeckt. Zum Schluss wurde die Verbindung zum Transferpuffer-Reservoir über zwei lange angefeuchtete 3MM-Papiere hergestellt und der ganze Aufbau mit einer Glasscheibe abgedeckt (Hömig, 2005).

7.1.9.1 Hybridisierung der Southern-Blot Membran

Zum Blocken unspezifischer Bindungen wurden die Membranen prähybridisiert. Der Blot wurde dazu in 2 x SSC angefeuchtet und in einem Glaszylinder in vorgewärmter

Hybridisierungslösung (1 M NaCl; 50 mM Tris pH 7,5; 10 % Dextransulfat; 1 % SDS; 250 µg/ml sonifizierte Lachssperma DNA) über Nacht bei 65°C im Hybridisierungssofen inkubiert.

7.1.9.2 Markierung der Sonde

Es wurden jeweils 50 ng Sonden-DNA mit 50 µCi ³²P-a32-dCTP mit Hilfe des „Random Prime Labeling Kit“ nach Firmenprotokoll markiert. Anschließend wurde die markierte Sonde mit Hilfe einer G50-Sephadex-Säule nach Firmenprotokoll gereinigt. Danach wurde die Probe durch 5-minütige Inkubation bei 100°C denaturiert und der Hybridisierungslösung beigemischt. Die Membran wurde anschließend 16 h bei 65°C im Hybridisierungssofen inkubiert und dann mit vorgewärmtem Waschpuffer bei 56°C - 60°C gewaschen. Die Waschbedingungen variierten je nach Sonde und sind daher bei der Beschreibung der Sonden einzeln vermerkt. Die markierten Banden auf der Membran ließen sich im Anschluss mit einem fotosensitiven Film (Biomax MS PE Applied Biosystems 35x43 cm) nachweisen. Die radioaktive Sonde konnte bis zu zwei Wochen aufgehoben und nach zehnminütigem Aufkochen erneut verwendet werden.

7.1.10 Polymerase- Kettenreaktion (PCR)

Die PCR-Technik wurde verwendet, um die cDNA von CD30 sowie die Sequenz des zytoplasmatischen Teils von CD30 zu amplifizieren, um diese in die vorhergesehenen Plasmide klonieren zu können. Hierbei wurden entsprechende Primer hergestellt, an die zusätzlich die Sequenz für spezifische Restriktionsenzyme angehängt wurde, die die Klonierung in die entsprechenden Vektoren ermöglichte.

Außerdem wurde die Technik zur Amplifikation von DNA-Fragmenten aus ES-Zellen verwendet, um die Sequenz der integrierten DNA vor der Generierung der transgenen Mäuse durch Sequenzierung zu überprüfen. Die PCR wurde ebenfalls zur Genotypisierung der transgenen Mäuse verwendet. Hierzu wurde die genomische DNA verwendet, die aus den Schwanzzellen der zu untersuchenden Mäuse isoliert wurde. Die Magnesium-Konzentration der Reaktionsansätze sowie das PCR-Programm wurden je nach Primerpaar gewählt.

7.1.10.1 Amplifizierung der murinen *CD30* cDNA und des zytoplasmatischen Teil von *CD30*

Primer für CD30: CD30-F und CD30-R

Primer für zytoplasmatischen Teil: LMP1/CD30-F und LMP1/CD30-R

Reaktion		PCR Programm	
DNA	1 µl	Denaturierung	94°C 1 min
dNTPs (10 mM)	0,5 µl	Hybridisierung	45°C 1 min 30 s
Puffer	2 µl	Verlängerung	72°C 1 min 30 s
MgSO ₄	2 µl		Zyklen: 3
Primer 1	0,5 µl	Denaturierung	94°C 1 min
Primer 2	0,5 µl	Hybridisierung	55°C 1 min
H ₂ O	12,75 µl	Verlängerung	72°C 1 min
Pwo-Polymerase	0,5 µl		Zyklen: 40
		Verlängerung	72°C 5 min
			4°C ∞

7.1.10.2 Amplifizierung der DNA-Segmente aus den ES-Zellen für die Sequenzierung

Primer für die 5'-loxP-Stelle1 (loxP1):

CD30: Primer 5a + TVCD30drev – 60°C – Produkt: 370 bp

LMP1/CD30: TVLMP1/CD30a + TVCD30drev – 60°C – Produkt: 414 bp

Primer für die 3'-loxP-Stelle1 und Teile des Transgene (loxP2):

CD30: TVCD30e + TVCD30frev – 60°C – Produkt: 1007 bp

LMP1/CD30: TVCD30e + TVCD30frev – 59°C – Produkt: 870 bp

Teile des Transgene bis zum hCD2 Reportergen (hCD2):

CD30: TVCD30b + TVCD30grev – 63°C – Produkt: 1010 bp

LMP1/CD30: TVLMP1/CD30c + TVCD30grev – 63°C – Produkt: 678 bp

loxP1 und hCD2-Teil		loxP2	
DNA	1 µl	DNA	1 µl
dNTPs (10mM)	0,4 µl	dNTPs (10mM)	0,4 µl
Puffer	4 µl	Puffer	4 µl
Primer 1	1 µl	Primer 1	1 µl
Primer 2	1 µl	Primer 2	1 µl
H ₂ O	12,4 µl	H ₂ O	11,4 µl
Phusion-Polymerase	0,2 µl	Phusion-Polymerase	0,2 µl
		MgCl ₂	1 µl

Methoden

PCR Programm:

Denaturierung	98°C	30 s
Hybridisierung	x °C	10 s
Verlängerung	72°C	15 s
Verlängerung	72°C	10 min

Zyklen: 30

7.1.10.3 Genotypisierung der LMP1/CD30^{fSTOP} und CD30^{fSTOP} transgenen Mäuse:

Tabelle 8 PCR zur Genotypisierung

LMP1/CD30 ^{fSTOP}	CD30 ^{fSTOP}
<u>Reaktion</u>	<u>Reaktion</u>
DNA 1 µl	DNA 1 µl
dNTPs (10mM) 0,5 µl	dNTPs (10mM) 0,5 µl
Puffer 2 µl	Puffer 2,5 µl
MgCl ₂ 0,5 µl	MgCl ₂ 0,5 µl
ExFw1LMP1 0,1 µl	TVCD30c 0,1 µl
TVLMP1/CD30g rev 0,1 µl	hCD2 rev 0,1 µl
H ₂ O 20,15 µl	H ₂ O 19,65 µl
Taq-Polymerase 0,15 µl	Taq-Polymerase 0,15 µl
	DMSO 0,5 µl
<u>PCR Programm:</u>	<u>PCR Programm:</u>
Starttemperatur 95°C 5 min	Starttemperatur 95°C 5 min
Zyklische Denaturierung 95°C 45 s	Zyklische Denaturierung 95°C 45 s
Hybridisierung 57°C 45 s	Hybridisierung 56°C 45 s
Verlängerung 72°C 1.15 min	Verlängerung 72°C 1 min
Finale Verlängerung 72°C 10 min	Finale Verlängerung 72°C 10 min
Zyklusanzahl: 31	Zyklusanzahl: 33

7.2 Klonierung der Zielvektoren

Um den Zielvektor TVLMP1/CD30_{final} zu klonieren, wurde zunächst der zytoplasmatische Teil von CD30 mit einer PCR unter Verwendung der Pwo-Polymerase (mit Korrekturlesefunktion) von dem Vektor pBmgNeomCD30 5.2 full length clone #2 amplifiziert. Zur Amplifizierung wurden Primer gewählt, an deren Enden Restriktionsschnittstellen angehängt waren, um die Klonierung in die entsprechenden Vektoren zu ermöglichen. Um das Fusionsprotein LMP1/CD30 zu generieren, wurde der zytoplasmatische Teil von CD30 über die Schnittstellen *KpnI* und *NcoI* in den Vektor pBSLMP1Asc1_a kloniert (=pBSLMP1/CD30). Das Fusionsprotein wurde über *AscI* in das Expressionsplasmid pSG5 kloniert, um die Funktionalität von LMP1/CD30 in HEK293-Zellen zu untersuchen (=pSG_LMP1/CD30). Außerdem wurde *Imp1/cd30* über

AscI in den Vektor DC-R26CAGp-IRES-CD2 kloniert, um die Integration von *Imp1/cd30* in den *rosa26*-Lokus zu ermöglichen (=TVLMP1/CD30_a). Anschließend wurde der CAGGs-Promotor über die Schnittstellen *PacI* aus dem Zielvektor entfernt, damit die Expression von LMP1/CD30 von dem endogenen Rosa26-Promotor erfolgt (=TVLMP1/CD30_final). Um den Zielvektor TVCD30_a zu klonieren, wurde die cDNA von CD30 mit einer PCR unter Verwendung der Pwo-Polymerase (mit Korrekturlesefunktion) aus dem Vektor pBmgNeomCD30 5.2 full length clone #2 amplifiziert. Zur Amplifizierung wurden Primer gewählt, an deren Enden Restriktionsschnittstellen angehängt waren, um die Klonierung in die entsprechenden Vektoren zu ermöglichen. Die cDNA von *CD30* wurde zunächst über *SbfI* in den Vektor pUC18_Oligo1 subkloniert. Anschließend wurde die *CD30* cDNA in den Vektor DC-R26CAGp-IRES-CD2 kloniert (=TVCD30_a).

7.3 RNA-präparative Techniken

7.3.1 Isolierung von Gesamt RNA aus Zellen

Zur Gesamt-RNA Isolierung wurden die Zellen bei 2100 rpm und 4°C 5 min abzentrifugiert und ohne vorheriges Waschen in 1 ml Trizol pro 5-10 x 10⁶ Zellen resuspendiert. So behandelte Zellen konnten vor der weiteren Phenol-Chloroform-Extraktion, die nach Protokoll durchgeführt wurde, bis zu 8 Wochen bei -80°C gelagert werden. Die Qualität der RNA wurde mittels Gelelektrophorese in einem 1 % Agarosegel (1 x MOPS, 5 % Formaldehyd) bestimmt.

7.3.2 Herstellen von cDNA

Mit Hilfe der Reversen Transkriptase kann RNA in einzelsträngige cDNA transkribiert werden. Für die cDNA-Synthese wurde 1 µg Gesamt-RNA eingesetzt. Mit dem 1st Strand cDNA Synthesis Kit wurden aus der Gesamt-RNA spezifisch die mRNA-Moleküle umgeschrieben, indem die im Kit enthaltenen Oligo(dT)₁₅ Primer verwendet wurden. Der Reaktionsansatz wurde zur Anlagerung der Primer für 10 min bei 25 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die reverse Transkription bei 42°C für 1 h. Durch Erhitzen auf 99°C für 5 min wurde die Reverse Transkriptase denaturiert. Die erhaltenen cDNA-Moleküle wurden bei -20°C gelagert und in die quantitativen RT-PCR-Reaktionen eingesetzt.

7.3.3 Quantitative RT-PCR

Die quantitative Real Time PCR (qRT-PCR) mit der LightCycler Methode nach Roche ist eine PCR-Reaktion, die mit einer Faststart Taq DNA-Polymerase und dem dsDNA-spezifischem Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green1 arbeitet. Die Taq Polymerase ist mit hitzelabilen Blockgruppen modifiziert und so bei Raumtemperatur inaktiv. Erst durch Erhitzen auf 95°C wird die Reaktion gestartet. SYBR Green 1 ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der spezifisch in die kleine Furche der dsDNA interkaliert und dessen Fluoreszenz durch diese Bindung um das 100-fache gesteigert wird. So können die bei der Amplifikation entstehenden Produkte mittels ihrer Fluoreszenz detektiert werden. Die Fluoreszenz wird am Ende jeder Elongationsphase gemessen, was die Kontrolle der Zunahme der DNA-Mengen in „Echt-Zeit“ erlaubt. Die Menge an amplifizierter DNA gibt einen Hinweis darauf, wieviel cDNA zu Beginn in der untersuchten Probe war, die mit den gewählten Primern erkannt werden konnte. Zur Überprüfung der Spezifität wird das amplifizierte Produkt aufgeschmolzen und es ergibt sich eine spezifische Schmelztemperatur. Zusätzlich kann das Produkt mittels Gelelektrophorese aufgetrennt werden und seine Spezifität anhand der Größe ermittelt werden.

Für die LightCycler Reaktion wurde abweichend vom Protokoll (FastStart DNA Master SYBR Green) nur 1 µl der 1:10 verdünnten cDNA auf ein Reaktionsvolumen von 10 µl eingesetzt. Die Primer waren exonübergreifend um zu vermeiden, dass eventuelle Verunreinigungen mit genomischer DNA Amplifikationsprodukte bilden. Die PCR-Reaktionen wurden in Glaskapillaren in einem LightCycler mit folgender Temperaturabfolge in 55 Zyklen durchgeführt:

Denaturierung der DNA und Aktivierung der Polymerase	95°C	für 10 min
Zyklische Denaturierung	95°C	für 1 s
Zyklische Anlagerung	54-68°C	für 10 s
Zyklische Verlängerung	72°C	für 4 s pro 100 bp
Aufschmelzen	70°C bis 97°C	in 10 s
Abkühlen	40°C	für 15 s

Die cDNA-Mengen wurden auf das ribosomale Protein L23a standardisiert.

7.4 Proteintransfer und immunologischer Nachweis von Proteinen

7.4.1 Präparation von Proteinen aus Zellen

Für die Isolierung der Zellproteine wurden ca. 5×10^6 Zellen verwendet. Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und anschließend entweder die Zellpellets bei -80°C aufbewahrt oder direkt in 20 μl – 40 μl NP-40 Puffer (150 mM NaCl; 50 mM Tris/HCl pH 8; 1 % Igepal) aufgenommen. Der NP-40 Puffer wurde, kurz bevor er auf die Zellen gegeben wurde, mit Protease- (Complete Mini Tabletten) und Phosphatase-Inhibitoren (Halt Phosphatase Inhibitor) versetzt. Die Proben wurden für 15 min auf einem Vortexer bei 4°C geschüttelt und anschließend bei 15000 rpm für 15 min bei 4°C zentrifugiert und der Überstand mit den Proteinen bei -80°C aufbewahrt. Für die Kernfraktionierungen wurden 2×10^7 Zellen für 15 min in 200 μl Puffer A (10 mM HEPES pH 7,9; 10 mM KCl; 0,1 mM EDTA; 0,1 mM EGTA; 1 mM DTT; 1x Protease-Inhibitor) auf Eis inkubiert. Anschließend wurden je Probe 12,5 μl 10 % IgePal hinzugefügt und die Proben für 5 min bei 4°C auf dem Vortexer geschüttelt. Um die Kerne zu sedimentieren, wurden die Proben bei 15000 rpm für 5 min zentrifugiert. Der Überstand, der die zytoplasmatische Fraktion enthält, wurde bei -80°C aufbewahrt. Die Kerne wurden in 1,5 ml Puffer A gewaschen und anschließend mit 40 μl Puffer C (20 mM HEPES pH 7,9; 0,4 M NaCl; 1 mM EDTA; 1 mM EGTA; 1 mM DTT; 1x Protease-Inhibitor) für die Lyse der Kerne versetzt. Die Proben wurden 30 min bei 4°C geschüttelt und anschließend 15 min bei 4°C und 15000 rpm Geschwindigkeit abzentrifugiert. Der Überstand mit der nukleären Fraktion wurde bei -80°C aufbewahrt.

7.4.2 Proteinquantifizierung

Die Quantifizierung der Proteine erfolgte mit dem DC Protein Assay von Bio-Rad und wurde nach Firmenprotokoll durchgeführt. Zur Ermittlung der Konzentration wurde parallel zu den Proben eine Eichgerade mit Rindergammaglobulin angefertigt.

7.4.3 SDS-PAA-Gelelektrophorese

Bei dieser Methode wurden die Proteine in einem Polyacrylamidgel (PAA-Gel) aufgetrennt, das 0,1 % SDS enthält. Zur Vorbereitung der Zelllysate wurde die entsprechende Proteinmenge mit 5 x Lämmli (300 mM Tris pH 6,8, 7,5 % SDS, 50 %

Glycerin) versetzt, der mit Bromphenolblau-Lösung (1/10) sowie 1% Mercaptoethanol versetzt war. Die Proben wurden für 10 min bei 70°C aufgeköcht. Durch das Aufkochen wurden die enthaltenen Proteine denaturiert und die erneute Faltung durch das Detergenz SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) verhindert, welches die Eigenladung der Proteine überlagert, so dass alle Proteine negativ geladen sind. Die Disulfidbrücken zwischen den Polypeptidketten wurden durch Mercaptoethanol reduziert.

Das Acrylamidgel bestand aus einem Sammelgel, das der Fokussierung der geladenen Proteine dient, und einem Trenngel, das die Auftrennung der Proteine nach ihrer molekularen Masse ermöglicht. Die verwendeten 10 % und 12 % -igen Trenngele ermöglichten eine Auftrennung von Proteinen im Bereich zwischen 20 und 80 kDa.

Die vorbereiteten Proben wurden auf das mit Lämmli-Laufpuffer (30,03 g Tris Base, 144,2 g Glycin, 100 ml 10 % SDS, auf 1 l mit H₂O auffüllen) überschichtete Gel aufgetragen. Für den Größenvergleich wurde ein Proteinstandard (Page Ruler, Prestained Protein Ladder) mitgeführt. Die Elektrophorese wurde in einer Bio-Rad Vorrichtung erst für 20 min bei 20 mA und dann 40 mA durchgeführt.

<u>Trenngel 10 % (10 ml)</u>		<u>Trenngel 12 % (10 ml)</u>	
H ₂ O	2,75 ml	H ₂ O	3,30 ml
30 % Acrylamid-Mix	3,30 ml	30 % Acrylamid-Mix	4,00 ml
1.5 M Tris (pH 8,8)	3,75 ml	1.5M Tris (pH 8,8)	2,50 ml
10 % SDS	100 µl	10 % SDS	100 µl
10 % APS	100 µl	10 % APS	100 µl
Temed	4 µl	Temed	4 µl

<u>Sammelgel (5 ml)</u>	
H ₂ O	3,70 ml
30 % Acrylamid-Mix	840 µl
2 M Tris/HCl (pH6,8)	312 µl
10 % SDS	50 µl
10 % APS	50 µl
Temed	3 µl

7.4.4 Western-Blot

Bei der Western-Blot-Analyse können die im SDS-PAA-Gel aufgetrennten Proteine durch elektrischen Transfer auf eine proteinbindende Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran (ImmobilonTM membrane) transferiert werden. Da das elektrische Feld dabei senkrecht zur vorherigen Trennrichtung angelegt wird, bleibt das Muster der getrennten Proteine auf der Membran erhalten. Es wurde ein sogenannter „Nass-Blot“ in

einem Bio-Rad-Tank durchgeführt, bei dem die gesamte Blotvorrichtung mit Blotpuffer überdeckt ist. Vor dem Blotvorgang wurde die PVDF-Membran zur Aktivierung für 2 min in Methanol gelegt, dann kurz in Wasser gewaschen und anschließend im Blotpuffer äquilibriert. Das Acrylamidgel wurde ebenfalls im Blotpuffer äquilibriert und dann auf drei mit Blotpuffer getränkte Filterpapiere gelegt. Auf das Gel wurde die PVDF-Membran gelegt und darauf drei weitere in Blotpuffer getränkte Filterpapiere. Anschließend wurde der Blot zwischen Anode und Kathode der Kammer so angeordnet, dass die negativ geladenen Proteine in Richtung Membran wanderten. Die Transferkammer wurde mit 100 ml 10 x Blotpuffer (30,03 g Tris Base, 14,42 g Glycin in 1 l H₂O), 200 ml Methanol auf 1 l mit H₂O aufgefüllt, ein Kühlelement hineingestellt und für 2 h ein elektrisches Feld von 250 mA angelegt. Anschließend wurde die Membran mit PonceauS (2 % PonceauS, 30 % Trichloressigsäure, 30 % Sulfosalicylsäure) gefärbt, um den Transfer der Proteine zu überprüfen. Für weitere Analysen wurde die Membran in Wasser gewaschen, bis die PonceauS Färbung entfernt war und feucht bei 4°C aufbewahrt.

7.4.5 Spezifischer Proteinnachweis mittels Antikörpern

Proteine von Interesse können mit spezifischen Antikörpern auf der Western-Blot-Membran nachgewiesen werden. Der Proteinnachweis erfolgt über zwei Antikörper. Der Erstantikörper bindet spezifisch das gesuchte Protein und mit Hilfe des Zweitantikörpers, der den Erstantikörper spezifisch bindet, wird das Protein mittels einer Chemolumineszenzreaktion sichtbar gemacht. Der Zweitantikörper ist an die Meerrettich (horseradish)-Peroxidase (HRP) gekoppelt, die die Oxidation des zyklischen Diacylhydrazides Luminol katalysiert. Das oxidierte Luminol emittiert Licht und wird durch die Exposition eines lichtsensitiven Filmes nachgewiesen. Die Chemolumineszenz wird verstärkt, indem die Oxidation von Luminol durch HRP in Anwesenheit eines chemischen Verstärkers wie Phenol durchgeführt wird.

Um unspezifische Bindungen der Antikörper zu vermeiden, wurden die Western-Blot Membranen zunächst in einer 10 % Milchpulver-TBS-Tween 0,02 % -Lösung 10 min bei RT auf dem Schüttler inkubiert. Die Membran wurde mit dem Erstantikörper, der in einer 5 %-Milchpulver-TBS-Tween 0,02 % -Lösung verdünnt wurde, über Nacht inkubiert. Die Membran wurde anschließend dreimal 5 min mit TBS-Tween 0,02 % gewaschen und dann mit dem Zweitantikörper, der in einer 5 % Milchpulver-TBS-

Tween 0,02 % -Lösung verdünnt wurde, für 1 bis 3 h bei RT inkubiert. Danach wurde die Membran wieder dreimal 5 min in TBS-Tween 0,02 % gewaschen. Anschließend wurde mit dem ECL-Detektionsreagenz die Chemolumineszenz-Reaktion angeregt. Die Membran wurde auf einen Film (CEA RP new) aufgelegt und der Film anschließend der Entwicklungsmaschine (Cawomat 2000 IR Prozessor) entwickelt.

7.5 Kernfärbung

Um die Kerne der EREB2-5-Zellen sichtbar zu machen, wurden $0,5 - 1,0 \times 10^6$ Zellen einmal in PBS gewaschen und anschließend in 100 μ l PBS aufgenommen, gevortext und 10 μ l -50 μ l der Zellen auf die Objektträger pipettiert und bei RT getrocknet. Anschließend wurden die Zellen mit einer vorgekühlten Methanol/Aceton (1:1)-Lösung 15 min bei -20°C fixiert. Danach wurden die Objektträger entweder bei -20°C gelagert oder die Zellen direkt im Anschluss gefärbt. Um die Kerne sichtbar zu machen, wurden die Kerne mit Wrights Eosin-Methylenblau 5 min gefärbt und anschließend die Lösung mit H_2O abgewaschen und getrocknet. Die Färbelösung besteht aus dem basischen Farbstoff Methylenblau und dem anionischen Farbstoff Eosin sowie aus Azur B, eine basische Thiazinfarbe, welche eine Oxidationsreaktion mit Methylenblau bewirkt. Das Methylenblau verbindet sich mit den negativ geladenen Bestandteilen der Zellen wie DNA und RNA und erscheint dunkelviolet. Die Intensität der Färbung hängt vom Azur B Gehalt und dem Verhältnis Azur B und Eosin G ab. Das Zytoplasma erscheint blau bis graublau. Die Kerne wurden mit einem Lichtmikroskop untersucht und mit einer Digitalkamera aufgenommen.

7.6 Zellkultur

7.6.1 Allgemeine Zellkulturtechniken

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter einer Umluft-Sterilbank und unter Verwendung steriler Pipetten und Lösungen durchgeführt. Falls nicht anders beschrieben, wurden die Zellen bei Zentrifugationsschritten bei 1200 rpm (ca. $300 \times g$) für 10 min zentrifugiert. Für die Waschschrte wurde steriles PBS (Dulbecco) verwendet. Die Zellen wurden im Brutschrank bei 37°C mit 5 % CO_2 und 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Die verschiedenen Zelltypen wurden in auf diese Zellen angepassten Medien kultiviert.

ES-Zellmedium:

DMEM, 15 % FCS, 2 % HEPES, 1,5 % L-Glutamin, 1 % Pyruvat, 1 % nicht-essentielle Aminosäuren, 50 mM Mercapthoethanol, 0,1 % LIF (Leukämie inhibierender Faktor)

EF-Medium:

DMEM, 10 % hitzeinaktiviertes FKS, 1 % L-Glutamin, 1 % nicht-essentielle Aminosäuren

HEK293-Medium und EREB2-5-Zellen nach Auswaschung

RPMI 1640, 10 % hitzeinaktiviertes FKS, 1 % Penicillin/Streptomycin, 1 % L-Glutamin, 1 % Pyruvat

EREB2-5-Medium

RPMI 1640, 10 % hitzeinaktiviertes FKS, 1 % Penicillin/Streptomycin, 1 % L-Glutamin, 1 % Pyruvat, 75 µl/ml Hygromycin, 1 µM Östrogen

1 % oder 10 % B-Zellmedium (für murine primäre B-Zellen)

RPMI 1640, 1 % oder 10 % hitzeinaktiviertes FKS, 1 % Penicillin/Streptomycin, 1 % L-Glutamin, 1 % Pyruvat, 1 % nicht-essentielle Aminosäuren, 50 mM Mercapthoethanol

Das Medium wurde bei embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) jeden Tag und bei embryonalen Fibroblastenzellen (EF-Zellen) und 293-Zellen jeden zweiten Tag gewechselt. Um bei den adhärenen EF-Zellen eine gute Festsetzung zu gewährleisten, wurden die Zellkulturplatten mit Gelatine beschichtet. Dazu wurden die Platten 15 min mit einer 0,1 % Gelatinelösung inkubiert (2 % Gelatine in PBS). Die verschiedenen EREB2-5-Zelllinien wurden alle 2 bis 3 Tage gesplittet. Die Zelldichte von Zellen wurde mit Neubauer-Zählkammern lichtmikroskopisch bestimmt. Adhärenente Zellen (HEK293 und EF-Zellen) wurden zum Passagieren oder Ernten durch kurzzeitige Behandlung (5-10 min) mit Trypsin in Suspension gebracht. ES-Zellen wurden durch Trypsin, welches mit 1 % Hühnerserum versetzt war, in Suspension gebracht. Dazu wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mit 37°C warmem Trypsin 10 min inkubiert. Die Reaktion wurde danach mit Zellkulturmedium gestoppt. Die Zellen wurden zentrifugiert und je nach Verwendungszweck in Medium aufgenommen.

7.6.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Adhärente Zellen und Suspensionszellen wurden einen Tag vor dem Einfrieren mit frischem Medium gefüttert. Zum Einfrieren wurden sie in Einzelzellsuspension gebracht, zentrifugiert und in kaltem Einfriermedium (50 % FKS; 10 % DMSO; 40 % entsprechendes Medium) resuspendiert. Die Zellen wurden anschließend in Einfrier-Röhrchen (Cryo Vials) zunächst bei -80°C eingefroren und nach zwei Tagen in flüssigen Stickstoff (-196°C) überführt. Um ein zu schnelles Einfrieren zu verhindern, wurden die Röhrchen dick in Zellstoff eingewickelt. Beim Auftauen wurden die Zellen auf 37°C erwärmt und in 10-fachem Volumen Medium aufgenommen. Um das DMSO zu entfernen, wurden die Zellen zentrifugiert und in neuem Medium aufgenommen.

7.6.3 Kultivieren der EREB2-5-Zelllinien und die Inaktivierung von EBNA2

EREB-EBNA1, EREB-LMP2A, EREB-LMP1 und EREB-LMP1/2A-Zellen (Rastelli, 2007) wurden im EREB2-5-Medium kultiviert. Um die EBNA2-unabhängige Expression von LMP1 und LMP2A zu untersuchen, wurden die Zellen 3 x im RPMI, welches mit 10 % hitzeinaktivierten FKS versetzt war, gewaschen. Die Waschschrirte erfolgten durch Zentrifugation bei 1200 rpm. Nach der zweiten Auswaschung wurden die Zellen 20 min bei RT inkubiert. Nach der dritten Auswaschung wurden die Zellen im EREB2-5-Medium ohne Östrogen und Hygromycin aufgenommen, gezählt und anschließend in einer Dichte von $0,4 \times 10^5/\text{ml}$ ausgesät.

7.6.4 Kultivieren von embryonalen Fibroblastenzellen (EF-Zellen)

EF-Zellen wurden alle 3 bis 4 Tage gesplittet, wobei eine dicht gewachsene 10 cm Platte EF-Zellen auf 4 bis 5 neue 10 cm Platten ausplattiert wurde. Nur EF-Zellen, die maximal dreimal gesplittet wurden (Passage 3), wurden für die Kultivierung von ES Zellen verwendet. EF-Zellen müssen, bevor man sie zur Kultivierung von ES-Zellen verwenden kann, mitotisch inaktiviert werden. Diese Inaktivierung erfolgt mit Hilfe des aus dem Pilz *Streptomyces caespitosus* stammenden Zellgiftes Mitomycin C. Da es die beiden DNA-Stränge durch alkylierende Reaktionen kovalent quervernetzt, verhindert es weitere Zellteilungen. Die Zellen wurden zunächst 1x mit PBS gewaschen und anschließend mit Mitomycin C-haltigem ($10 \mu\text{g}/\text{ml}$) EF-Medium 2-4 h im Brutschrank inkubiert. Um die Zellen in geeigneter Dichte ($1,5\text{-}2 \times 10^6$ pro 10 cm Platte) ausplattieren zu können,

wurden die Zellen nach 3-maligem Waschen mit PBS mit Trypsin behandelt und anschließend ihre Zellzahl bestimmt und in entsprechender Zellzahl auf Gelatinebeschichtete 10 cm Platten überführt. Nach ca. 12 h hatten sich die EF-Zellen auf dem Boden der Zellkulturplatten abgesetzt und es konnten die ES-Zellen darauf kultiviert werden.

7.6.5 Kultivierung von embryonalen Stammzellen (ES-Zellen)

Um zu verhindern, dass die ES-Zellen während der Kultivierung ihre Pluripotenz durch Differenzierung verlieren, wurden sie unter Zugabe von LIF (Leukämie-inhibierender Faktor) auf inaktivierten EF-Zellen (Feeder-Layer) gehalten. Das Medium der ES-Zellen wurde jeden Tag erneuert. Außerdem wurde vermieden, dass die Zellen zu dicht wuchsen, indem sie alle 2 Tage erneut in einer Dichte von $7,5 \times 10^5$ bis 1×10^6 Zellen pro 10 cm Platte ausplattiert wurden. Da ES-Zellen ebenfalls adhärent sind, mussten die Zellen vor dem Passagieren mit Trypsin behandelt werden. Da die ES-Zellen sehr empfindlich sind, wurde dem Trypsin zum Schutz 1 % Hühner-Serum zugefügt. Die Trypsinierung einer 10 cm Platte erfolgte mit 1 ml Trypsin für 10 min bei 37°C und wurde anschließend mit 9 ml Medium gestoppt. Um Einzelzellen zu erhalten, wurden die Zellen 10-mal vorsichtig auf- und abpipettiert. Anschließend wurden die ES-Zellen bei 900 rpm abzentrifugiert, gezählt und in der entsprechenden Dichte auf einen neuen Feeder-Layer ausgesät.

7.6.6 Transfektionen

7.6.6.1 Transiente Transfektion von HEK293-Zellen für den LUC-Assay

Am Tag vor der Transfektion wurden 3×10^5 HEK293-Zellen auf einer 6 cm Platte ausplattiert. 30 min bis 1 h vor der Transfektion wurde das Medium gewechselt und durch serumfreies Medium (DMEM, 1 % FCS) ersetzt. Pro Ansatz wurden die entsprechenden Plasmide in 100 µl OptiMEM durch 2 s Vortexen gelöst. Außerdem wurden 4 µl PEI (Polyethylenimin 1 mg/ml) in 100 µl durch 2 s Vortexen gelöst. Die beiden Lösungen wurden schnell durch 2 s Vortexen gemischt und 15 – 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die PEI/DNA/OptiMEM-Lösung tröpfchenweise vorsichtig auf die Zellen pipettiert und 4 h im Brutschrank inkubiert. Die Lösung wurde vorsichtig abgenommen und durch normales Medium ersetzt. Die Zellen wurden 2 Tage

nach der Transfektion geerntet. Von den Vektoren pSG-Leervektor, pSG-LMP1, pSG-LMP1/CD30 wurden je 1 µg, von dem β-Gal-Reporter-Plasmid (CMVβ-Gal) je 50 ng und dem Luciferase-Reporterplasmid (NFκBConALUC (689) oder Negativkontrolle NFκBConAmtLUC (690) von Gerhard Laux) pro Ansatz 0,5 µg eingesetzt.

7.6.6.2 Transiente Transfektion von ES-Zellen

Um zu testen, ob die ES-Zell-Klone die STOP-Kassette deletieren können, wurden die ES-Zellklone transient (ohne Linearisierung) mit dem Vektor pGK-Cre-bpA, der für die Cre-Rekombinase kodiert, transfiziert. Die Transfektion erfolgte wie die stabile Transfektion von ES-Zellen.

7.6.6.3 Stabile Transfektion von ES-Zellen

Um ES-Zell-Klone zu generieren, welche die Transgene CD30 oder LMP1/CD30 tragen, wurden die ES-Zellen stabil transfiziert. Die ES-Zellen wurden bis zu einer Dichte von 5×10^6 - 1×10^7 auf einer 10 cm Platte kultiviert. 4 h vor der Transfektion wurde das Medium erneuert um zu gewährleisten, dass sich die Zellen während der Transfektion in einer starken Proliferationsphase befinden. Die ES-Zellen wurden trypsiniert, gezählt, einmal mit PBS gewaschen und anschließend im Transfektionsmedium (RPMI ohne Phenolrot) aufgenommen. Pro Transfektionsansatz wurden 7×10^6 Zellen in 700 µl Transfektionsmedium aufgenommen und mit 20 µg linearisiertem Vektor (*AsiSI*) transfiziert. Die DNA wurde in 100 µl Transfektionsmedium gelöst und in eine Transfektionsküvette (Gene Pulser Küvette, 0,4 cm Elektrode) überführt. Anschließend wurden die Zellen in die Küvette überführt und in einem Elektroporator (Gene Pulser) bei 230 V, 500 µF transfiziert. Die frisch transfizierten Zellen wurden 10 min bei RT inkubiert, in 40 ml ES-Zellmedium verdünnt und auf vier 10 cm Platten mit inaktivierten EF-Zellen ausplattiert. Als Negativkontrolle wurden untransfizierte ES-Zellen ausplattiert.

7.6.7 Selektion stabiler ES-Klone

Nach der Transfektion wurden die ES-Zellen zunächst für 24 h in normalem ES-Zellmedium kultiviert. Anschließend wurde mit der Selektion Neomycin-resistenter Klone begonnen, welche das Transgen aufgenommen hatten. Ab Tag 1 oder 2 nach der

Transfektion wurden die ES-Zellen mit Medium gefüttert, welches mit aktivem G418 (Geneticin) versetzt war. Das Amino-Glycosid-Antibiotikum G418 ist normalerweise für eukaryotische Zellen toxisch, jedoch macht das *Neomycin(neo)*-Gen (in der STOP-Kassette auf den Zielvektoren kodiert) die Zellen gegenüber G418 resistent. Die Konzentration von G418 wurde die ersten 4 Tage täglich um 10 µg/ml von 140 µg/ml auf 180 µg/ml erhöht. 7-10 Tage nach der Transfektion konnten positiv selektionierte Klone gepickt werden. Um festzustellen, dass die Zellen fertig durchselektioniert waren, wurde die untransfizierte Negativkontrolle herangezogen, auf welcher nun keine lebenden ES-Zell-Kolonien mehr detektiert werden durften. Das Medium wurde durch PBS ausgetauscht, um die Kolonien mit einer 200 µl Pipettenspitze unter einem Stereomikroskop unter einer Sterilbank picken zu können. Die Einzelkolonien wurden zunächst in eine 96-Loch-Rundbodenplatte überführt (eine Kolonie pro Loch), in welcher pro Loch 25 µl PBS vorgelegt waren. Pro Loch wurden nun 50 µl Trypsin zugefügt, um Einzelzellen zu erhalten. Die 10-minütige Trypsinierung bei 37°C wurde durch Zugabe von 50 µl Selektionsmedium gestoppt. Anschließend wurden die Zellen auf 96-Loch-Platten (Flachboden), auf denen einen Tag zuvor inaktive EF-Zellen ausplattiert worden sind, überführt. Die ES-Zellen wurden nach 2-3 Tagen auf drei Platten gesplittet. Auf 2 der 3 Platten waren einen Tag zuvor EF-Zellen ausplattiert worden. ES-Zellen, welche auf den Platten mit EF-Zellen überführt worden waren, wurden nach 2-3 Tagen weggefroren. Die Zellen wurden trypsinisiert, mit 50 µl ES-Zell-Einfriermedium (20 % DMSO und 80 % FKS) versetzt und anschließend mit 50 µl Mineralöl beschichtet und bei -80°C weggefroren. Die Platten können mit Zellstoff umwickelt für bis zu 2 Monate bei -80°C aufbewahrt werden. Die Zellen wurden an 2 verschiedenen Tagen weggefroren, um für jeden einzelnen Zellklon eine gute Zelldichte zu gewährleisten, um die Zellen später für die Blastozysten-Injektion verwenden zu können. Die dritte Platte, auf der ES-Zellen überführt wurden, war mit Gelatine beschichtet und sollte für erste Southern Blot-Analysen verwendet werden. Nach 2 Tagen wurde die ES-Zellen auf zwei weitere mit Gelatine beschichtete Platten gesplittet. Um genug DNA für Southern Blot Analysen zu bekommen, wurden die Zellen für mindestens 4 Tage bis zu einer hohen Dichte kultiviert.

7.7 Funktionale Tests

7.7.1 LUC-Assay

Die Zellen wurden 2 Tage nach der Transfektion durch Abschaben von der Zellkulturplatte geerntet. Anschließend wurden die Zellen in PBS gewaschen und bei 300 g bei 4°C abzentrifugiert. Der Extraktionspuffer (5 x-Puffer: 50 % Glycerin; 5 % Triton X-100; 10 mM EDTA; 125 mM Tris/HCl pH 7,8; 2 mM DTT) wurde 1:5 verdünnt und frisch mit DTT versetzt. Zum Lysieren wurde das Zellpellet in 100 µl Extraktionspuffer resuspendiert. Die Proben wurden 15 min bei 13500 rpm und 4°C zentrifugiert und anschließend der Überstand in ein kaltes Eppendorf Gefäß überführt. Die Proben können bei -80°C gelagert werden. Die Messung der Proben erfolgte in Duplikaten. Zur Messung der Luziferase wurden je 10 µl auf eine Mikrotiterplatte vorgelegt, anschließend erfolgte die Messung der Biolumineszenz in „relativen Lichteinheiten“ (RLE), durch Zugabe von 50 µl Luziferase-Assay-Puffer (20 mM Tricin; 1,07 mM MgCO₃·Mg(OH)₂·5(H₂O); 2,67 mM Mg₂SO₄; 0,1 mM EDTA; 270 µM Coenzym A; 470 µM Luciferin) am Luminometer (Orion Microplate Luminometer). Zur Messung der β-Galaktosidase wurden ebenfalls je 10 µl einer Probe in Duplikaten auf eine Mikrotiterplatte vorgelegt. Dann wurden 100 µl β-Galaktosidase Assaypuffer (100 mM Na-P pH 8; 1% Galacton-Plus/Serva; 1 mM MgCl₂) zugegeben und 10-20 min inkubiert. Anschließend erfolgte die Messung durch Zugabe von 50 µl β-Galaktosidase Verstärkungspuffer (0,2 M NaOH; 10% Emerald Enhancer). Die Aktivität der Luziferase wurde durch Standardisierung auf die β-Galaktosidase berechnet.

7.7.2 Deletion der STOP-Kassette in ES-Zellen

Um die Deletion der STOP-Kassette in den ES-Zellen zu überprüfen, wurden die ES-Zellen transient mit dem Plasmid pGK-Cre-bpA, welches für die Cre-Rekombinase kodiert, transfiziert. Nach der Transfektion wurden die Zellen auf 10 cm Platten mit normalem ES-Zellmedium ausplattiert, um nach einigen Tagen Einzelkolonien picken zu können. Es wurden pro transfiziertem Klon 100 Einzelkolonien gepickt und auf 96-Loch-Platten überführt. Nach 2 Tagen wurden die Zellen auf zwei 96-Loch-Platten gesplittet, wobei die Zellen auf einer Platte in Anwesenheit von G418 gehalten wurden, und auf der anderen Platte mit normalem ES-Zellmedium ohne Selektionsmarker. Auf der Platte, auf denen die Zellen mit Selektionsmarker gehalten wurden, konnten Klone identifiziert

werden, welche die STOP-Kassette deletiert hatten, da diese Zellen nun in Gegenwart von G418 starben. Die Zellen, die nicht mehr G418 resistent waren, wurden nun mit einer FACS-Analyse auf die Expression von hCD2 und CD30 getestet.

7.8 Blastozysten-Injektion

Es wurden je 2 ES-Zellklone pro Konstrukt, die positiv im Southern Blot und im funktionalen Test getestet wurden, für die Blastozysten-Injektion verwendet. Die Zellen wurden vor der Injektion im normalen ES-Zellmedium ohne G418 kultiviert. Ca. 36 h vor der Injektion wurden die ES-Zellen gesplittet, damit sich die Zellen zum Zeitpunkt der Injektion in einer proliferierenden Phase befinden. Die Zellen wurde am Tag der Injektion trypsiniert, im ES-Zellmedium resuspendiert und für 20 min auf eine gelatinisierte Platte ausgesät, damit sich die Feeder-Zellen absetzen konnten. Die ES-Zellen wurden vorsichtig abgenommen und ins Helmholtz-Zentrum nach Neuherberg zur Blastozysten-Injektion gebracht (in Kooperation mit dem Institut für Entwicklungsgenetik, Fa. Helmholtz Zentrum München). Die Blastozysten stammen von einer schwangeren C57BL/6 Maus ab. Dies macht es möglich, den Chimärismus der Nachkommen zu bestimmen, da die IDG3.2 ES-Zellen aus der F1-Generation von einer schwarzen C57BL/6 und einer braunen 129/SV-Maus abstammen. Der Chimärismus wurde durch den Anteil von braunem Fell bestimmt.

7.9 Mausversuche

7.9.1 Mäuse

Mäuse, die das *cd30^{fSTOP}* oder *Imp1/cd30^{fSTOP}* Allel tragen, wurden mit dem CD19-Cre Mausstamm (Balb/C Hintergrund) gekreuzt, um die Transgene ab dem Pro-B-Zellstadium zu exprimieren (Rickert et al., 1997). Die Analysen der Mäuse wurden im Alter von 8-24 Wochen vorgenommen.

7.9.2 Isolierung von Lymphozyten

Die Mäuse wurden durch CO₂-Begasung eingeschläfert und anschließend direkt präpariert. Die Zellen aus dem Bauchraum wurden durch Ausspülen gewonnen. Dabei wurde 1 % B-Zell-Medium in die Bauchhöhle gespritzt und anschließend die Maus

vorsichtig geschüttelt, um die Zellen zu lösen. Danach wurde das Medium vorsichtig aus der Bauchhöhle rausgesaugt. Das Blut zur Bestimmung der Immunglobulin-Titer wurde aus dem Herzen genommen. Milz und inguinale Lymphknoten wurden als ganze Organe entnommen. Um das Knochenmark zu präparieren, wurde der Schienbeinknochen präpariert. Die Knochen wurden zur Isolierung angeschnitten und mit Medium ausgespült. Um die lymphatischen Zellen von Milz und Lymphknoten aus dem Gewebeverband zu lösen, wurden die Gewebe durch ein feines Sieb gedrückt. Bei blutreichen Geweben (Milz und Knochenmark) wurde eine Lyse der Erythrozyten vorgenommen. Dazu wurden die Zellen zunächst 10 min bei 1200 rpm abzentrifugiert und anschließend die Zellen in 1 ml Lyse-Puffer (1 x RBC Lysis Buffer, Fa. eBioscience) resuspendiert. Nach 3 min wurde die Lyse durch Zugabe von 9 ml Medium gestoppt. Die Zellen wurden erneut zentrifugiert und anschließend in 1 ml Medium aufgenommen. Außer bei der 3-minütigen Erythrozyten-Lyse wurden die Zellen immer auf Eis gehalten. Um die B-Zellen aus der Milz zu isolieren, wurden die Milzzellen mit magnetisch gekoppelten CD43-Antikörpern inkubiert und die B-Zellen (CD43-negativ) anschließend magnetisch über eine Separationssäule von den anderen Milzzellen getrennt. Dies wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt (Milteny Biotec).

7.9.3 Durchflusszytometrie (FACS)

Einzellensuspensionen wurden zuerst mit MACS-Puffer (PBS; 1 % BSA) gewaschen, um mögliche unspezifische Bindungen der Antikörper zu vermeiden. Anschließend wurden die Zellen mit einer Kombination von FITC-, PE-, PerCP- und APC-konjugierten monoklonalen Antikörpern gefärbt, die in MACS-Puffer verdünnt waren. Es wurden jeweils 1×10^6 Zellen für 20 min mit dem entsprechenden Färbemix gefärbt und anschließend nochmals in MACS-Puffer gewaschen. Dann wurden die Zellen in MACS-Puffer für die Analyse aufgenommen. Alle Analysen wurden mit einem FACSCalibur™ durchgeführt und die Resultate mit der CELLQuest™ Software ausgewertet. Es wurden je Färbung 3×10^4 lebende Zellen aufgenommen, die sich innerhalb des „Lymphozyten-Fensters“, welches durch eine bestimmte Größe der Zellen und die lichtbrechenden Eigenschaften der Zelle definiert ist, befanden. Die Antikörper AA4.1, B220, hCD2 (human), CD3, CD5, CD21, CD23, CD30, CD43, CD80, CD86, CD95, CD138, Gr-1, ICAM-1, IgD, IgM, Mac-1 wurden von BD-Biosciences bezogen. PNA wurde von Vector Linearis (Wertheim) bezogen und TOPRO-3 von Molecular Probes.

7.9.4 Immunisierung der Mäuse

Je Maus wurden 100 µg des Antigens NP-chicken-gamma-globulin (CGG) (4-Hydroxy-3-Nitrophenylacetyl-hapten, Fa. Bioresearch Technologies) intraperitoneal injiziert. Das Antigen wurde durch $KAl(SO_4)_2$ gefällt, da das Immunsystem der Mäuse mit dem Antigen in der präzipitierten größeren Form besser reagiert. Für die Präzipitation wurde ein Volumen des Antigens mit einem Volumen 10 %-igem $KAl(SO_4)_2$ gemischt und mit 1 N NaOH auf pH 6,5 eingestellt. Dann wurde die Probe für 30 min auf Eis inkubiert und anschließend 10 min bei 4200 rpm zentrifugiert. Danach wurde das Antigen dreimal mit sterilem PBS gewaschen und jeweils für 10 min bei 4200 rpm zentrifugiert. Zum Schluss wurde das Antigen in 200 µl sterilem PBS aufgenommen und den Mäusen intraperitoneal gespritzt. Es wurden nur Mäuse im Alter von 8-16 Wochen immunisiert. An Tag 0 und 7 nach Immunisierung wurde den Mäusen Blut abgenommen, um die NP-spezifischen Immunglobulin-Titer zu verfolgen. Die Mäuse wurden an Tag 14 nach Immunisierung präpariert.

7.9.5 Immunhistochemie von Gefrierschnitten

Um gute Gefrierschnitte der Organe zu erhalten, wurden diese möglichst innerhalb kurzer Zeit nach der Präparation in O.C.T. Tissue Tek eingelegt und zum Gefrieren auf Trockeneis gestellt. Anschließend wurden sie bei $-80^{\circ}C$ gelagert. Für die Färbungen wurden 8 µm dicke Schnitte mit einem Kryotom angefertigt und diese danach getrocknet. Anschließend wurde die Schnitte 5 min in 100 % Aceton fixiert und für 20 min getrocknet und dann entweder bei $-20^{\circ}C$ gelagert oder gleich in PBS gewaschen und dann für 20 min mit einem Blockierungspuffer (10 % Ziegenserum; 0,1 % H_2O_2 ; 1 % BSA in PBS) in einer mit Wasser gesättigten Atmosphäre bei RT inkubiert. Danach wurden die Schnitte zur Blockierung unspezifischer Biotin- oder Avidin-Bindestellen mit zwei verschiedenen Blocklösungen (Avidin/Biotin Blocking Kit) je 15 min inkubiert, was jeweils von einem 5-minütigen PBS-Waschschritt unterbrochen wurde. Im Anschluss daran wurden die verschiedenen Antikörper je 1 h bei RT inkubiert. Zwischen den verschiedenen Antikörper-Schritten wurde jeweils drei Mal 5 min mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Schnitte mit Streptavidin-gekoppelter Phosphatase 30 min inkubiert und nochmals gewaschen. Streptavidin gekoppelte Antikörper wurden mit

Hilfe des „Alkaline Phosphate Substrate Kit“ in Blau und Peroxidase gekoppelte Antikörper durch eine Reaktion mit 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) „Peroxidase Substrate Kit“ in Rot nachgewiesen. Die Farbreaktionen wurden durch Waschen der Schnitte mit PBS gestoppt, die gefärbten Schnitte getrocknet. Die Aufnahmen der Schnitte wurden mit einem Lichtmikroskop untersucht, mit einer Digitalkamera aufgenommen und im Programm Openlab von Improvision und der Adobe Photoshop Software gesichert.

7.9.6 Präparation von Blutserum aus Mäuseblut

Für die Gewinnung von Seren wurde den Mäusen vor und nach der Immunisierung Blut von der Schwanzvene abgenommen. Bei der Präparation der Mäuse wurde das Blut direkt dem Herzen entnommen. Danach wurde das Blut für mindestens 1 h auf Eis inkubiert und anschließend bei 13000 rpm in einer auf 4°C gekühlten Minizentrifuge zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgenommen. Dieser Schritt wurde, um ein möglichst sauberes Serum zu gewährleisten, noch einmal wiederholt.

7.9.7 ELISA

Mit dieser Methode kann die Serum-Konzentration von sezernierten Antikörpern mit einer bestimmten Antigenspezifität und/oder einem bestimmten Immunglobulin-Isotyp bestimmt werden. Dazu werden die entsprechenden Antigene bzw. isotypspezifischen Antikörper an eine 96-Lochplatte gekoppelt. Anschließend inkubiert man die Platten mit den zu untersuchenden Seren in verschiedenen Verdünnungen. Die spezifisch gebundenen Antikörper können mit Hilfe von biotinylierten Immunglobulin-isotypspezifischen Antikörpern und einer Streptavidin-gekoppelten alkalischen Phosphatase in einer enzymatischen Farbreaktion quantifiziert werden.

7.9.7.1 Bestimmung der allgemeinen Immunglobulin-Titer

Maxisorb 96-Lochplatten wurden mit 5 µg/ml der Ig-Isotyp-spezifischen Ratte- anti-Maus Antikörper (je nach Isotyp: IgM, II/41; IgG1, A85-3; IgG2a, R11-8; IgG2b, R9-91; IgG3, R2-38; IgA, C11-3 von BD Bioscience) in 0,1 M NaHCO₃-Puffer (pH 9,2; 1:2000) beschichtet. Am nächsten Tag wurden die Platten dreimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden unspezifische Bindungsstellen mit dem

Blockpuffer (1 % Milchpulver in Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS-M)) durch eine 30-minütige Inkubation bei RT abgesättigt. Im Anschluss wurden die Seren in Verdünnungen von 1:50 bis 1:10 in PBS-M verdünnt aufgetragen. Nach einer Inkubationszeit von 60 min bei RT wurde dreimal mit PBS gewaschen und je nach Isotyp der biotinylierte sekundäre Antikörper (IgM-Bio, R6-60.2; IgG1-Bio, A85-1; IgG2a-Bio, R19-15; IgG2b-Bio, R12-3; IgG3-Bio, R40-82; IgA-Bio, C10-1) zugegeben. Nach 1 h Inkubation bei RT und dreimaligem Waschen der Platten mit PBS wurde die Streptavidin-gekoppelte Alkaline Phosphatase, verdünnt 1:2000 in 0,1 M NaHCO₃, zugegeben. Nach weiteren 30 min Inkubation, ebenfalls bei RT, wurde erneut dreimal mit PBS gewaschen und anschließend die Anwesenheit der Phosphatase durch die Zugabe von O-Phenyldimine in 0,1 M Zitronensäure-Puffer mit 0,015 % H₂O₂ als Substrat nachgewiesen. Die auftretende Farbreaktion wurde bei 405 nm mit einem Mikrotiterplatten-Leser (Photometer Sunrise RC) gemessen. Um die Immunglobulin-Mengen zu quantifizieren, wurden je Platte Ig-spezifische Standards mit bekannter Menge ebenfalls in den verschiedenen Verdünnungen aufgetragen (IgM, G155-228; IgG1, MOPC-31-C; IgG2a, G155-178; IgG2b, MPC-11; IgG3, A112-3; IgA, M18-254).

7.9.7.2 Bestimmung der NP-spezifischen Immunglobulintiter

Die 96-Lochplatten wurden für den Nachweis NP-spezifischer Antikörper mit 5 µg/ml NP₁₇-BSA und für den Nachweis hoch affiner Antikörper mit 5 µg/ml NP₃-BSA beschichtet. Die Zugabe der Seren sowie die weiteren Schritte erfolgten genau wie beim Nachweis der allgemeinen Immunglobulintiter. Es wurden nur NP-spezifische Antikörper mit den Isotypen IgM und IgG1 bestimmt. Die Quantifizierung der NP-spezifischen IgM- und IgG1-Antikörper-Titer erfolgte durch die Standardisierung auf das Serum einer immunisierten Kontrollmaus. Die Titer wurden in relativen Einheiten angegeben.

7.9.8 Elispot

Einen Tag vor den Mausexperimenten wurden die Filterplatten (HA, Clear Plates, 0,45 µM Surfactant-Free, Mixed Cellulose, Ester Membrane) mit den entsprechenden NP₃- und NP₁₇-BSA (1:400) in 0,1 M NaHCO₃-Puffer (pH 9,2) unter sterilen Bedingungen beschichtet. Am nächsten Tag wurden die Platten dreimal mit sterilem PBS

(100 µl/Loch) gewaschen und anschließend mit 10 % B-Zellmedium geblockt (150 µl/Loch) und für mindestens 2 h im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Das Blockmedium wurde verworfen und 5 x 10⁵ Zellen (exakt gezählt!) pro Loch (in 100 µl) auf die Platten pipettiert und 1 bis 2 Tage im Brutschrank kultiviert.

Am Tag der Entwicklung wurden die Zellen verworfen und die Platten 6 x mit PBS/0,01 % Tween20 gewaschen. Anschließend wurde in jedes Loch (100 µl/Loch) der entsprechende biotinylierte Antikörper (IgM-Bio, R6-60.2; IgG1-Bio, A85-1) 1:500 in PBS/BSA 1 % verdünnt gegeben und für 2 h bei 37°C, 5 % CO₂ und 95 % Feuchtigkeit inkubiert. Es erfolgte ein erneuter Waschschrift durch 6-maliges Waschen mit PBS/0,01 % Tween20. Nun gab man die 1:2000 in PBS/BSA 1 % verdünnte Streptavidin-gekoppelte Alkaline Phosphatase auf die Platte (50 µl/Loch) und inkubierte 45 min bei RT. Anschließend wurde die Platte 3 x mit PBS/0,01 % Tween20 und dann 3 x mit PBS gewaschen. Es wurden pro Platte 1 Tablette DAB-Peroxidase-Substrat und 1 Tablette UREA H₂O₂ in 5 ml H₂O gelöst und filtriert (0,45 µm). Zum Entwickeln wurden von der Lösung 50 µl/Loch auf die Platte pipettiert. Nach ca. 5 min sind die Spots zu erkennen und die Reaktion wurde unter fließendem H₂O gestoppt. Die Anzahl der Spots wurde mit dem EliSpot-Reader gelesen.

8 Literatur

- ADLER, B., SCHAADT, E., KEMPKE, B., ZIMMER-STROBL, U., BAIER, B. & BORNKAMM, G. W. (2002) Control of Epstein-Barr virus reactivation by activated CD40 and viral latent membrane protein 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 437-42.
- AHEARN, J. M., FISCHER, M. B., CROIX, D., GOERG, S., MA, M., XIA, J., ZHOU, X., HOWARD, R. G., ROTHSTEIN, T. L. & CARROLL, M. C. (1996) Disruption of the Cr2 locus results in a reduction in B-1a cells and in an impaired B cell response to T-dependent antigen. *Immunity*, 4, 251-62.
- AIZAWA, S., NAKANO, H., ISHIDA, T., HORIE, R., NAGAI, M., ITO, K., YAGITA, H., OKUMURA, K., INOUE, J. & WATANABE, T. (1997) Tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) 5 and TRAF2 are involved in CD30-mediated NFkappaB activation. *J Biol Chem*, 272, 2042-5.
- ALT, F. W., YANCOPOULOS, G. D., BLACKWELL, T. K., WOOD, C., THOMAS, E., BOSS, M., COFFMAN, R., ROSENBERG, N., TONEGAWA, S. & BALTIMORE, D. (1984) Ordered rearrangement of immunoglobulin heavy chain variable region segments. *EMBO J*, 3, 1209-19.
- AMAKAWA, R., HAKEM, A., KUNDIG, T. M., MATSUYAMA, T., SIMARD, J. J., TIMMS, E., WAKEHAM, A., MITTRUECKER, H. W., GRIESSER, H., TAKIMOTO, H., SCHMITS, R., SHAHINI, A., OHASHI, P., PENNINGER, J. M. & MAK, T. W. (1996) Impaired negative selection of T cells in Hodgkin's disease antigen CD30-deficient mice. *Cell*, 84, 551-62.
- ANDERSON, L. J. & LONGNECKER, R. (2008) EBV LMP2A provides a surrogate pre-B cell receptor signal through constitutive activation of the ERK/MAPK pathway. *J Gen Virol*, 89, 1563-8.
- ARNOLD, L. W., PENNELL, C. A., MCCRAY, S. K. & CLARKE, S. H. (1994) Development of B-1 cells: segregation of phosphatidyl choline-specific B cells to the B-1 population occurs after immunoglobulin gene expression. *J Exp Med*, 179, 1585-95.
- ATKINSON, P. G., COOPE, H. J., ROWE, M. & LEY, S. C. (2003) Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus stimulates processing of NF-kappa B2 p100 to p52. *J Biol Chem*, 278, 51134-42.
- BABCOCK, G. J., DECKER, L. L., VOLK, M. & THORLEY-LAWSON, D. A. (1998) EBV persistence in memory B cells in vivo. *Immunity*, 9, 395-404.
- BARTH, T. F., MARTIN-SUBERO, J. I., JOOS, S., MENZ, C. K., HASEL, C., MECHTERSHEIMER, G., PARWARESCH, R. M., LICHTER, P., SIEBERT, R. & MOOLLER, P. (2003) Gains of 2p involving the REL locus correlate with nuclear c-Rel protein accumulation in neoplastic cells of classical Hodgkin lymphoma. *Blood*, 101, 3681-6.
- BECHTEL, D., KURTH, J., UNKEL, C. & KUPPERS, R. (2005) Transformation of BCR-deficient germinal-center B cells by EBV supports a major role of the virus in the pathogenesis of Hodgkin and posttransplantation lymphomas. *Blood*, 106, 4345-50.
- BERLAND, R. & WORTIS, H. H. (2002) Origins and functions of B-1 cells with notes on the role of CD5. *Annu Rev Immunol*, 20, 253-300.
- BOES, M., ESAU, C., FISCHER, M. B., SCHMIDT, T., CARROLL, M. & CHEN, J. (1998) Enhanced B-1 cell development, but impaired IgG antibody responses in mice deficient in secreted IgM. *J Immunol*, 160, 4776-87.
- BORNKAMM, G. W., BERENS, C., KUKLIK-ROOS, C., BECHET, J. M., LAUX, G., BACHL, J., KORNDORFER, M., SCHLEE, M., HOLZEL, M., MALAMOSSI, A., CHAPMAN, R. D., NIMMERJAHN, F., MAUTNER, J., HILLEN, W., BUJARD, H. & FEUILLARD, J. (2005) Stringent doxycycline-dependent control of gene activities using an episomal one-vector system. *Nucleic Acids Res*, 33, e137.
- BOSSY, D., MILILI, M., ZUCMAN, J., THOMAS, G., FOUGEREAU, M. & SCHIFF, C. (1991) Organization and expression of the lambda-like genes that contribute to the mu-psi light chain complex in human pre-B cells. *Int Immunol*, 3, 1081-90.
- BOUCHER, L. M., MARENGERE, L. E., LU, Y., THUKRAL, S. & MAK, T. W. (1997) Binding sites of cytoplasmic effectors TRAF1, 2, and 3 on CD30 and other members of the TNF receptor superfamily. *Biochem Biophys Res Commun*, 233, 592-600.
- BOWEN, M. A., LEE, R. K., MIRAGLIOTTA, G., NAM, S. Y. & PODACK, E. R. (1996) Structure and expression of murine CD30 and its role in cytokine production. *J Immunol*, 156, 442-9.
- BRAUNINGER, A., SCHMITZ, R., BECHTEL, D., RENNE, C., HANSMANN, M. L. & KUPPERS, R. (2006) Molecular biology of Hodgkin's and Reed/Sternberg cells in Hodgkin's lymphoma. *Int J Cancer*, 118, 1853-61.

- BRIEGEL, K., BARTUNEK, P., STENGL, G., LIM, K. C., BEUG, H., ENGEL, J. D. & ZENKE, M. (1996) Regulation and function of transcription factor GATA-1 during red blood cell differentiation. *Development*, 122, 3839-50.
- BRIELMEIER, M., MAUTNER, J., LAUX, G. & HAMMERSCHMIDT, W. (1996) The latent membrane protein 2 gene of Epstein-Barr virus is important for efficient B cell immortalization. *J Gen Virol*, 77 (Pt 11), 2807-18.
- CABANNES, E., KHAN, G., AILLET, F., JARRETT, R. F. & HAY, R. T. (1999) Mutations in the I κ B α gene in Hodgkin's disease suggest a tumour suppressor role for I κ B α . *Oncogene*, 18, 3063-70.
- CALDWELL, R. G., WILSON, J. B., ANDERSON, S. J. & LONGNECKER, R. (1998) Epstein-Barr virus LMP2A drives B cell development and survival in the absence of normal B cell receptor signals. *Immunity*, 9, 405-11.
- CARBONE, A., CESARMAN, E., SPINA, M., GLOGHINI, A. & SCHULZ, T. F. (2009) HIV-associated lymphomas and gamma-herpesviruses. *Blood*, 113, 1213-24.
- CARBONE, A., GLOGHINI, A., GATTEI, V., ALDINUCCI, D., DEGAN, M., DE PAOLI, P., ZAGONEL, V. & PINTO, A. (1995) Expression of functional CD40 antigen on Reed-Sternberg cells and Hodgkin's disease cell lines. *Blood*, 85, 780-9.
- CASOLA, S., OTIPOBY, K. L., ALIMZHANOV, M., HUMME, S., UYTTERSROT, N., KUTOK, J. L., CARROLL, M. C. & RAJEWSKY, K. (2004) B cell receptor signal strength determines B cell fate. *Nat Immunol*, 5, 317-27.
- CERUTTI, A., SCHAFFER, A., SHAH, S., ZAN, H., LIOU, H. C., GOODWIN, R. G. & CASALI, P. (1998) CD30 is a CD40-inducible molecule that negatively regulates CD40-mediated immunoglobulin class switching in non-antigen-selected human B cells. *Immunity*, 9, 247-56.
- CHAGANTI, S., BELL, A. I., PASTOR, N. B., MILNER, A. E., DRAYSON, M., GORDON, J. & RICKINSON, A. B. (2005) Epstein-Barr virus infection in vitro can rescue germinal center B cells with inactivated immunoglobulin genes. *Blood*, 106, 4249-52.
- CHAN, V. W., MENG, F., SORIANO, P., DEFranCO, A. L. & LOWELL, C. A. (1997) Characterization of the B lymphocyte populations in Lyn-deficient mice and the role of Lyn in signal initiation and down-regulation. *Immunity*, 7, 69-81.
- CHEN, S. Y., LU, J., SHIH, Y. C. & TSAI, C. H. (2002) Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A regulates c-Jun protein through extracellular signal-regulated kinase. *J Virol*, 76, 9556-61.
- CHUMLEY, M. J., DAL PORTO, J. M., KAWAGUCHI, S., CAMBIER, J. C., NEMAZEE, D. & HARDY, R. R. (2000) A VH11V kappa 9 B cell antigen receptor drives generation of CD5+ B cells both in vivo and in vitro. *J Immunol*, 164, 4586-93.
- CONG, Y. Z., RABIN, E. & WORTIS, H. H. (1991) Treatment of murine CD5- B cells with anti-Ig, but not LPS, induces surface CD5: two B-cell activation pathways. *Int Immunol*, 3, 467-76.
- DALY, T. M., OKUYAMA, T., VOGLER, C., HASKINS, M. E., MUZYCZKA, N. & SANDS, M. S. (1999a) Neonatal intramuscular injection with recombinant adeno-associated virus results in prolonged beta-glucuronidase expression in situ and correction of liver pathology in mucopolysaccharidosis type VII mice. *Hum Gene Ther*, 10, 85-94.
- DALY, T. M., VOGLER, C., LEVY, B., HASKINS, M. E. & SANDS, M. S. (1999b) Neonatal gene transfer leads to widespread correction of pathology in a murine model of lysosomal storage disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 2296-300.
- DAWSON, C. W., GEORGE, J. H., BLAKE, S. M., LONGNECKER, R. & YOUNG, L. S. (2001) The Epstein-Barr virus encoded latent membrane protein 2A augments signaling from latent membrane protein 1. *Virology*, 289, 192-207.
- DAWSON, C. W., TRAMOUNTANIS, G., ELIOPOULOS, A. G. & YOUNG, L. S. (2003) Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 (LMP1) activates the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway to promote cell survival and induce actin filament remodeling. *J Biol Chem*, 278, 3694-704.
- DEVERGNE, O., HATZIVASSILIOU, E., IZUMI, K. M., KAYE, K. M., KLEIJNEN, M. F., KIEFF, E. & MOSIALOS, G. (1996) Association of TRAF1, TRAF2, and TRAF3 with an Epstein-Barr virus LMP1 domain important for B-lymphocyte transformation: role in NF-kappaB activation. *Mol Cell Biol*, 16, 7098-108.
- DIRMEIER, U., HOFFMANN, R., KILGER, E., SCHULTHEISS, U., BRISENO, C., GIRES, O., KIESER, A., EICK, D., SUGDEN, B. & HAMMERSCHMIDT, W. (2005) Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus coordinately regulates proliferation with control of apoptosis. *Oncogene*, 24, 1711-7.
- DUCKETT, C. S., GEDRICH, R. W., GILFILLAN, M. C. & THOMPSON, C. B. (1997) Induction of nuclear factor kappaB by the CD30 receptor is mediated by TRAF1 and TRAF2. *Mol Cell Biol*, 17, 1535-42.

- DURKOP, H., ANAGNOSTOPOULOS, I., BULFONE-PAUS, S. & STEIN, H. (1997) Expression of several members of the TNF-ligand and receptor family on tonsillar lymphoid B cells. *Br J Haematol*, 98, 863-8.
- DUTTON, A., REYNOLDS, G. M., DAWSON, C. W., YOUNG, L. S. & MURRAY, P. G. (2005) Constitutive activation of phosphatidylinositol 3 kinase contributes to the survival of Hodgkin's lymphoma cells through a mechanism involving Akt kinase and mTOR. *J Pathol*, 205, 498-506.
- EDRY, E. & MELAMED, D. (2004) Receptor editing in positive and negative selection of B lymphopoiesis. *J Immunol*, 173, 4265-71.
- ELIOPOULOS, A. G., CAAMANO, J. H., FLAVELL, J., REYNOLDS, G. M., MURRAY, P. G., POYET, J. L. & YOUNG, L. S. (2003) Epstein-Barr virus-encoded latent infection membrane protein 1 regulates the processing of p100 NF-kappaB2 to p52 via an IKKgamma/NEMO-independent signalling pathway. *Oncogene*, 22, 7557-69.
- ELIOPOULOS, A. G. & YOUNG, L. S. (1998) Activation of the cJun N-terminal kinase (JNK) pathway by the Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1 (LMP1). *Oncogene*, 16, 1731-42.
- EMMERICH, F., MEISER, M., HUMMEL, M., DEMEL, G., FOSS, H. D., JUNDT, F., MATHAS, S., KRAPPMANN, D., SCHEIDEREIT, C., STEIN, H. & DORKEN, B. (1999) Overexpression of I kappa B alpha without inhibition of NF-kappaB activity and mutations in the I kappa B alpha gene in Reed-Sternberg cells. *Blood*, 94, 3129-34.
- EPSTEIN, M. A., ACHONG, B. G. & BARR, Y. M. (1964) Virus Particles in Cultured Lymphoblasts from Burkitt's Lymphoma. *Lancet*, 1, 702-3.
- FAGARASAN, S., WATANABE, N. & HONJO, T. (2000) Generation, expansion, migration and activation of mouse B1 cells. *Immunol Rev*, 176, 205-15.
- FAIRFAX, K. A., CORCORAN, L. M., PRIDANS, C., HUNTINGTON, N. D., KALLIES, A., NUTT, S. L. & TARLINTON, D. M. (2007) Different kinetics of blimp-1 induction in B cell subsets revealed by reporter gene. *J Immunol*, 178, 4104-11.
- FAIRFAX, K. A., KALLIES, A., NUTT, S. L. & TARLINTON, D. M. (2008) Plasma cell development: from B-cell subsets to long-term survival niches. *Semin Immunol*, 20, 49-58.
- FIUMARA, P., SNELL, V., LI, Y., MUKHOPADHYAY, A., YOUNES, M., GILLENWATER, A. M., CABANILLAS, F., AGGARWAL, B. B. & YOUNES, A. (2001) Functional expression of receptor activator of nuclear factor kappaB in Hodgkin disease cell lines. *Blood*, 98, 2784-90.
- FLOETTMANN, J. E. & ROWE, M. (1997) Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 (LMP1) C-terminus activation region 2 (CTAR2) maps to the far C-terminus and requires oligomerisation for NF-kappaB activation. *Oncogene*, 15, 1851-8.
- FRANCIS, M. K., PHINNEY, D. G. & RYDER, K. (1995) Analysis of the hormone-dependent regulation of a JunD-estrogen receptor chimera. *J Biol Chem*, 270, 11502-13.
- FROESE, P., LEMKE, H., GERDES, J., HAVSTEEN, B., SCHWARTING, R., HANSEN, H. & STEIN, H. (1987) Biochemical characterization and biosynthesis of the Ki-1 antigen in Hodgkin-derived and virus-transformed human B and T lymphoid cell lines. *J Immunol*, 139, 2081-7.
- FRUEHLING, S., SWART, R., DOLWICK, K. M., KREMMER, E. & LONGNECKER, R. (1998) Tyrosine 112 of latent membrane protein 2A is essential for protein tyrosine kinase loading and regulation of Epstein-Barr virus latency. *J Virol*, 72, 7796-806.
- GAIDANO, G. & CARBONE, A. (2001) Primary effusion lymphoma: a liquid phase lymphoma of fluid-filled body cavities. *Adv Cancer Res*, 80, 115-46.
- GASPAL, F. M., KIM, M. Y., MCCONNELL, F. M., RAYKUNDALIA, C., BEKIARIS, V. & LANE, P. J. (2005) Mice deficient in OX40 and CD30 signals lack memory antibody responses because of deficient CD4 T cell memory. *J Immunol*, 174, 3891-6.
- GAY, D., SAUNDERS, T., CAMPER, S. & WEIGERT, M. (1993) Receptor editing: an approach by autoreactive B cells to escape tolerance. *J Exp Med*, 177, 999-1008.
- GERDES, J., SCHWARTING, R. & STEIN, H. (1986) High proliferative activity of Reed Sternberg associated antigen Ki-1 positive cells in normal lymphoid tissue. *J Clin Pathol*, 39, 993-7.
- GILFILLAN, S., DIERICH, A., LEMEURE, M., BENOIST, C. & MATHIS, D. (1993) Mice lacking TdT: mature animals with an immature lymphocyte repertoire. *Science*, 261, 1175-8.
- GIRES, O., ZIMMER-STROBL, U., GONNELLA, R., UEFFING, M., MARSCHALL, G., ZEIDLER, R., PICH, D. & HAMMERSCHMIDT, W. (1997) Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus mimics a constitutively active receptor molecule. *EMBO J*, 16, 6131-40.
- GRAY, D., SIEPMANN, K., VAN ESSEN, D., POUQUIER, J., WYKES, M., JAINANDUNSING, S., BERGTHORSDDOTTIR, S. & DULLFORCE, P. (1996) B-T lymphocyte interactions in the generation and survival of memory cells. *Immunol Rev*, 150, 45-61.

- HATZIVASSILIOU, E., MILLER, W. E., RAAB-TRAUB, N., KIEFF, E. & MOSIALOS, G. (1998) A fusion of the EBV latent membrane protein-1 (LMP1) transmembrane domains to the CD40 cytoplasmic domain is similar to LMP1 in constitutive activation of epidermal growth factor receptor expression, nuclear factor-kappa B, and stress-activated protein kinase. *J Immunol*, 160, 1116-21.
- HITZ, C., WURST, W. & KUHN, R. (2007) Conditional brain-specific knockdown of MAPK using Cre/loxP regulated RNA interference. *Nucleic Acids Res*, 35, e90.
- HOCHBERG, D., MIDDELDORP, J. M., CATALINA, M., SULLIVAN, J. L., LUZURIAGA, K. & THORLEY-LAWSON, D. A. (2004) Demonstration of the Burkitt's lymphoma Epstein-Barr virus phenotype in dividing latently infected memory cells in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 239-44.
- HÖMIG, C. (2005) Einfluss der Epstein-Barr-Virus Proteine LMP1 und EBNA2 auf die B-Zellentwicklung in vivo. LMU München.
- HOMIG-HOLZEL, C., HOJER, C., RASTELLI, J., CASOLA, S., STROBL, L. J., MULLER, W., QUINTANILLA-MARTINEZ, L., GEWIES, A., RULAND, J., RAJEWSKY, K. & ZIMBER-STROBL, U. (2008) Constitutive CD40 signaling in B cells selectively activates the noncanonical NF-kappaB pathway and promotes lymphomagenesis. *J Exp Med*, 205, 1317-29.
- HORIE, R., AIZAWA, S., NAGAI, M., ITO, K., HIGASHIHARA, M., ISHIDA, T., INOUE, J. & WATANABE, T. (1998) A novel domain in the CD30 cytoplasmic tail mediates NFkappaB activation. *Int Immunol*, 10, 203-10.
- HSU, B. L., HARLESS, S. M., LINDSLEY, R. C., HILBERT, D. M. & CANCRO, M. P. (2002) Cutting edge: BlyS enables survival of transitional and mature B cells through distinct mediators. *J Immunol*, 168, 5993-6.
- HUEN, D. S., HENDERSON, S. A., CROOM-CARTER, D. & ROWE, M. (1995) The Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 (LMP1) mediates activation of NF-kappa B and cell surface phenotype via two effector regions in its carboxy-terminal cytoplasmic domain. *Oncogene*, 10, 549-60.
- INAOKI, M., SATO, S., WEINTRAUB, B. C., GOODNOW, C. C. & TEDDER, T. F. (1997) CD19-regulated signaling thresholds control peripheral tolerance and autoantibody production in B lymphocytes. *J Exp Med*, 186, 1923-31.
- IZUMI, K. M., CAHIR MCFARLAND, E. D., TING, A. T., RILEY, E. A., SEED, B. & KIEFF, E. D. (1999) The Epstein-Barr virus oncoprotein latent membrane protein 1 engages the tumor necrosis factor receptor-associated proteins TRADD and receptor-interacting protein (RIP) but does not induce apoptosis or require RIP for NF-kappaB activation. *Mol Cell Biol*, 19, 5759-67.
- JANEWAY, C., MURPHY, K., TRAVERS, P., WALPORT, M. (2007) Janeway's immunobiology. *Garland Science, Tayler & Francies Group*, 7th edition.
- JOCHNER, N., EICK, D., ZIMBER-STROBL, U., PAWLITA, M., BORNKAMM, G. W. & KEMPKES, B. (1996) Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 is a transcriptional suppressor of the immunoglobulin mu gene: implications for the expression of the translocated c-myc gene in Burkitt's lymphoma cells. *EMBO J*, 15, 375-82.
- JOHNSTON, D. A., DONG, B. & HUGHES, C. C. (2009) TNF induction of jagged-1 in endothelial cells is NFkappaB-dependent. *Gene*, 435, 36-44.
- JOURDAN, M., CARAUX, A., DE VOS, J., FIOL, G., LARROQUE, M., COGNOT, C., BRET, C., DUPERRAY, C., HOSE, D. & KLEIN, B. (2009) An in vitro model of differentiation of memory B cells into plasmablasts and plasma cells including detailed phenotypic and molecular characterization. *Blood*, 114, 5173-81.
- JUNDT, F., ANAGNOSTOPOULOS, I., FORSTER, R., MATHAS, S., STEIN, H. & DORKEN, B. (2002a) Activated Notch1 signaling promotes tumor cell proliferation and survival in Hodgkin and anaplastic large cell lymphoma. *Blood*, 99, 3398-403.
- JUNDT, F., KLEY, K., ANAGNOSTOPOULOS, I., SCHULZE PROBSTING, K., GREINER, A., MATHAS, S., SCHEIDEREIT, C., WIRTH, T., STEIN, H. & DORKEN, B. (2002b) Loss of PU.1 expression is associated with defective immunoglobulin transcription in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of classical Hodgkin disease. *Blood*, 99, 3060-2.
- JUNGNICKEL, B., STARATSCHEK-JOX, A., BRAUNINGER, A., SPIEKER, T., WOLF, J., DIEHL, V., HANSMANN, M. L., RAJEWSKY, K. & KUPPERS, R. (2000) Clonal deleterious mutations in the I kappa B alpha gene in the malignant cells in Hodgkin's lymphoma. *J Exp Med*, 191, 395-402.
- KANTOR, A. B., STALL, A. M., ADAMS, S., WATANABE, K. & HERZENBERG, L. A. (1995) De novo development and self-replenishment of B cells. *Int Immunol*, 7, 55-68.
- KANZLER, H., KUPPERS, R., HANSMANN, M. L. & RAJEWSKY, K. (1996) Hodgkin and Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease represent the outgrowth of a dominant tumor clone derived from (crippled) germinal center B cells. *J Exp Med*, 184, 1495-505.
- KAWAHARA, T., OH DAN, H., ZHAO, G., YANG, Y. G. & SYKES, M. (2003) Peritoneal cavity B cells are precursors of splenic IgM natural antibody-producing cells. *J Immunol*, 171, 5406-14.

- KAYE, K. M., IZUMI, K. M. & KIEFF, E. (1993) Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 is essential for B-lymphocyte growth transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90, 9150-4.
- KEMPKES, B., PAWLITA, M., ZIMBER-STROBL, U., EISSNER, G., LAUX, G. & BORNKAMM, G. W. (1995) Epstein-Barr virus nuclear antigen 2-estrogen receptor fusion proteins transactivate viral and cellular genes and interact with RBP-J kappa in a conditional fashion. *Virology*, 214, 675-9.
- KENNEDY, M. K., WILLIS, C. R. & ARMITAGE, R. J. (2006) Deciphering CD30 ligand biology and its role in humoral immunity. *Immunology*, 118, 143-52.
- KHAN, W. N., ALT, F. W., GERSTEIN, R. M., MALYNN, B. A., LARSSON, I., RATHBUN, G., DAVIDSON, L., MULLER, S., KANTOR, A. B., HERZENBERG, L. A. & ET AL. (1995) Defective B cell development and function in Btk-deficient mice. *Immunity*, 3, 283-99.
- KIESER, A. (2007) Signal transduction by the Epstein-Barr virus oncogene latent membrane protein 1 (LMP1). *Signal Transduction*, 7, 20-33.
- KIESER, A., KILGER, E., GIRES, O., UEFFING, M., KOLCH, W. & HAMMERSCHMIDT, W. (1997) Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 triggers AP-1 activity via the c-Jun N-terminal kinase cascade. *EMBO J*, 16, 6478-85.
- KILGER, E., KIESER, A., BAUMANN, M. & HAMMERSCHMIDT, W. (1998) Epstein-Barr virus-mediated B-cell proliferation is dependent upon latent membrane protein 1, which simulates an activated CD40 receptor. *EMBO J*, 17, 1700-9.
- KLAPPROTH, K., SANDER, S., MARINKOVIC, D., BAUMANN, B. & WIRTH, T. (2009) The IKK2/NF- κ B pathway suppresses MYC-induced lymphomagenesis. *Blood*, 114, 2448-58.
- KLEIN, U., GLOGHINI, A., GAIDANO, G., CHADBURN, A., CESARMAN, E., DALLA-FAVERA, R. & CARBONE, A. (2003) Gene expression profile analysis of AIDS-related primary effusion lymphoma (PEL) suggests a plasmablastic derivation and identifies PEL-specific transcripts. *Blood*, 101, 4115-21.
- KNECHT, H., MCQUAIN, C., MARTIN, J., ROTHENBERGER, S., DREXLER, H. G., BERGER, C., BACHMANN, E., KITTLER, E. L., ODERMATT, B. F. & QUESENBERRY, P. J. (1996) Expression of the LMP1 oncoprotein in the EBV negative Hodgkin's disease cell line L-428 is associated with Reed-Sternberg cell morphology. *Oncogene*, 13, 947-53.
- KOCHERT, K., ULLRICH, K., KREHER, S., ASTER, J. C., KITAGAWA, M., JOHRENS, K., ANAGNOSTOPOULOS, I., JUNDT, F., LAMPRECHT, B., ZIMBER-STROBL, U., STEIN, H., JANZ, M., DORKEN, B. & MATHAS, S. High-level expression of Mastermind-like 2 contributes to aberrant activation of the NOTCH signaling pathway in human lymphomas. *Oncogene*.
- KOSCO, M. H. & GRAY, D. (1992) Signals involved in germinal center reactions. *Immunol Rev*, 126, 63-76.
- KRAUS, M., ALIMZHANOV, M. B., RAJEWSKY, N. & RAJEWSKY, K. (2004) Survival of resting mature B lymphocytes depends on BCR signaling via the Igalpha/beta heterodimer. *Cell*, 117, 787-800.
- KULWICHIT, W., EDWARDS, R. H., DAVENPORT, E. M., BASKAR, J. F., GODFREY, V. & RAAB-TRAUB, N. (1998) Expression of the Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 induces B cell lymphoma in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 11963-8.
- KUPPERS, R. (2005) Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis. *Nat Rev Cancer*, 5, 251-62.
- KUPPERS, R. (2009) The biology of Hodgkin's lymphoma. *Nat Rev Cancer*, 9, 15-27.
- KUPPERS, R., KANZLER, H., HANSMANN, M. L. & RAJEWSKY, K. (1996) Immunoglobulin V genes in Reed-Sternberg cells. *N Engl J Med*, 334, 404; author reply 405-6.
- KUTZ, H., REISBACH, G., SCHULTHEISS, U. & KIESER, A. (2008) The c-Jun N-terminal kinase pathway is critical for cell transformation by the latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus. *Virology*, 371, 246-56.
- LAIRD, P. W., ZIJDERVELD, A., LINDERS, K., RUDNICKI, M. A., JAENISCH, R. & BERNS, A. (1991) Simplified mammalian DNA isolation procedure. *Nucleic Acids Res*, 19, 4293.
- LAM, K. P., KUHN, R. & RAJEWSKY, K. (1997) In vivo ablation of surface immunoglobulin on mature B cells by inducible gene targeting results in rapid cell death. *Cell*, 90, 1073-83.
- LAM, N. & SUGDEN, B. (2003) CD40 and its viral mimic, LMP1: similar means to different ends. *Cell Signal*, 15, 9-16.
- LEE, S. Y., KANDALA, G., LIOU, M. L., LIOU, H. C. & CHOI, Y. (1996) CD30/TNF receptor-associated factor interaction: NF- κ B activation and binding specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 9699-703.
- LIU, Y. J., DE BOUPELLER, O. & FUGIER-VIVIER, I. (1997) Mechanisms of selection and differentiation in germinal centers. *Curr Opin Immunol*, 9, 256-62.
- LONGNECKER, R., MILLER, C. L., MIAO, X. Q., MARCHINI, A. & KIEFF, E. (1992) The only domain which distinguishes Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A (LMP2A) from LMP2B is dispensable for lymphocyte infection and growth transformation in vitro; LMP2A is therefore nonessential. *J Virol*, 66, 6461-9.

- LUFTIG, M., YASUI, T., SONI, V., KANG, M. S., JACOBSON, N., CAHIR-MCFARLAND, E., SEED, B. & KIEFF, E. (2004) Epstein-Barr virus latent infection membrane protein 1 TRAF-binding site induces NIK/IKK alpha-dependent noncanonical NF-kappaB activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 141-6.
- MACLENNAN, I. C., TOELLNER, K. M., CUNNINGHAM, A. F., SERRE, K., SZE, D. M., ZUNIGA, E., COOK, M. C. & VINUESA, C. G. (2003) Extrafollicular antibody responses. *Immunol Rev*, 194, 8-18.
- MAINO, B. A., EVERLY, D. N., JR. & RAAB-TRAUB, N. (2005) Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 CTAR1 mediates rodent and human fibroblast transformation through activation of PI3K. *Oncogene*, 24, 6917-24.
- MANCAO, C., ALTMANN, M., JUNGNICHEL, B. & HAMMERSCHMIDT, W. (2005) Rescue of "crippled" germinal center B cells from apoptosis by Epstein-Barr virus. *Blood*, 106, 4339-44.
- MARTIN, F. & KEARNEY, J. F. (2002) Marginal-zone B cells. *Nat Rev Immunol*, 2, 323-35.
- MARTIN, F., OLIVER, A. M. & KEARNEY, J. F. (2001) Marginal zone and B1 B cells unite in the early response against T-independent blood-borne particulate antigens. *Immunity*, 14, 617-29.
- MATHAS, S., HINZ, M., ANAGNOSTOPOULOS, I., KRAPPMANN, D., LIETZ, A., JUNDT, F., BOMMERT, K., MECHTA-GRIGORIOU, F., STEIN, H., DORKEN, B. & SCHEIDEREIT, C. (2002) Aberrantly expressed c-Jun and JunB are a hallmark of Hodgkin lymphoma cells, stimulate proliferation and synergize with NF-kappa B. *EMBO J*, 21, 4104-13.
- MATHAS, S., JANZ, M., HUMMEL, F., HUMMEL, M., WOLLERT-WULF, B., LUSATIS, S., ANAGNOSTOPOULOS, I., LIETZ, A., SIGVARDSSON, M., JUNDT, F., JOHRENS, K., BOMMERT, K., STEIN, H. & DORKEN, B. (2006) Intrinsic inhibition of transcription factor E2A by HLH proteins ABF-1 and Id2 mediates reprogramming of neoplastic B cells in Hodgkin lymphoma. *Nat Immunol*, 7, 207-15.
- MATOLCSY, A., NADOR, R. G., CESARMAN, E. & KNOWLES, D. M. (1998) Immunoglobulin VH gene mutational analysis suggests that primary effusion lymphomas derive from different stages of B cell maturation. *Am J Pathol*, 153, 1609-14.
- MCHEYZER-WILLIAMS, L. J. & MCHEYZER-WILLIAMS, M. G. (2005) Antigen-specific memory B cell development. *Annu Rev Immunol*, 23, 487-513.
- MOLIN, D., FISCHER, M., XIANG, Z., LARSSON, U., HARVIMA, I., VENGE, P., NILSSON, K., SUNDSTROM, C., ENBLAD, G. & NILSSON, G. (2001) Mast cells express functional CD30 ligand and are the predominant CD30L-positive cells in Hodgkin's disease. *Br J Haematol*, 114, 616-23.
- MONTECINO-RODRIGUEZ, E., LEATHERS, H. & DORSHKIND, K. (2006) Identification of a B-1 B cell-specified progenitor. *Nat Immunol*, 7, 293-301.
- MOORE, P. A., BELVEDERE, O., ORR, A., PIERI, K., LAFLEUR, D. W., FENG, P., SOPPET, D., CHARTERS, M., GENTZ, R., PARMELEE, D., LI, Y., GALPERINA, O., GIRI, J., ROSCHKE, V., NARDELLI, B., CARRELL, J., SOSNOVTSEVA, S., GREENFIELD, W., RUBEN, S. M., OLSEN, H. S., FIKES, J. & HILBERT, D. M. (1999) BLyS: member of the tumor necrosis factor family and B lymphocyte stimulator. *Science*, 285, 260-3.
- MURAMATSU, M., KINOSHITA, K., FAGARASAN, S., YAMADA, S., SHINKAI, Y. & HONJO, T. (2000) Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell*, 102, 553-63.
- NAWROCKI, J. F., KIRSTEN, E. S. & FISHER, R. I. (1988) Biochemical and structural properties of a Hodgkin's disease-related membrane protein. *J Immunol*, 141, 672-80.
- NIWA, H., YAMAMURA, K. & MIYAZAKI, J. (1991) Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene*, 108, 193-9.
- OETTINGER, M. A., SCHATZ, D. G., GORKA, C. & BALTIMORE, D. (1990) RAG-1 and RAG-2, adjacent genes that synergistically activate V(D)J recombination. *Science*, 248, 1517-23.
- PAJIC, A., SPITKOVSKY, D., CHRISTOPH, B., KEMPKES, B., SCHUHMACHER, M., STAEGE, M. S., BRIELMEIER, M., ELLWART, J., KOHLHUBER, F., BORNKAMM, G. W., POLACK, A. & EICK, D. (2000) Cell cycle activation by c-myc in a burkitt lymphoma model cell line. *Int J Cancer*, 87, 787-93.
- PAO, L. I., LAM, K. P., HENDERSON, J. M., KUTOK, J. L., ALIMZHANOV, M., NITSCHKE, L., THOMAS, M. L., NEEL, B. G. & RAJEWSKY, K. (2007) B cell-specific deletion of protein-tyrosine phosphatase Shp1 promotes B-1a cell development and causes systemic autoimmunity. *Immunity*, 27, 35-48.
- PARKER, D. C. (1993) T cell-dependent B cell activation. *Annu Rev Immunol*, 11, 331-60.
- PINTO, A., ALDINUCCI, D., GLOGHINI, A., ZAGONEL, V., DEGAN, M., IMPROTA, S., JUZBASIC, S., TODESCO, M., PERIN, V., GATTEI, V., HERRMANN, F., GRUSS, H. J. & CARBONE, A. (1996) Human eosinophils express functional CD30 ligand and stimulate proliferation of a Hodgkin's disease cell line. *Blood*, 88, 3299-305.
- POMERANTZ, J. L. & BALTIMORE, D. (2002) Two pathways to NF-kappaB. *Mol Cell*, 10, 693-5.

- PORTIS, T., DYCK, P. & LONGNECKER, R. (2003) Epstein-Barr Virus (EBV) LMP2A induces alterations in gene transcription similar to those observed in Reed-Sternberg cells of Hodgkin lymphoma. *Blood*, 102, 4166-78.
- PORTIS, T. & LONGNECKER, R. (2003) Epstein-Barr virus LMP2A interferes with global transcription factor regulation when expressed during B-lymphocyte development. *J Virol*, 77, 105-14.
- PORTIS, T. & LONGNECKER, R. (2004) Epstein-Barr virus (EBV) LMP2A mediates B-lymphocyte survival through constitutive activation of the Ras/PI3K/Akt pathway. *Oncogene*, 23, 8619-28.
- POYET, J. L., SRINIVASULA, S. M., LIN, J. H., FERNANDES-ALNEMRI, T., YAMAOKA, S., TSICHLIS, P. N. & ALNEMRI, E. S. (2000) Activation of the I κ B kinases by RIP via IKK γ /NEMO-mediated oligomerization. *J Biol Chem*, 275, 37966-77.
- RADIC, M. Z., ERIKSON, J., LITWIN, S. & WEIGERT, M. (1993) B lymphocytes may escape tolerance by revising their antigen receptors. *J Exp Med*, 177, 1165-73.
- RAJEWSKY, K. (1996) Clonal selection and learning in the antibody system. *Nature*, 381, 751-8.
- RASTELLI, J. (2007) Latent Epstein-Barr virus infection and the germinal center reaction. LMU München
- RASTELLI, J., HOMIG-HOLZEL, C., SEAGAL, J., MULLER, W., HERMANN, A. C., RAJEWSKY, K. & ZIMBER-STROBL, U. (2008) LMP1 signaling can replace CD40 signaling in B cells in vivo and has unique features of inducing class-switch recombination to IgG1. *Blood*, 111, 1448-55.
- RE, D., MUSCHEN, M., AHMADI, T., WICKENHAUSER, C., STARATSCHEK-JOX, A., HOLTICK, U., DIEHL, V. & WOLF, J. (2001) Oct-2 and Bob-1 deficiency in Hodgkin and Reed Sternberg cells. *Cancer Res*, 61, 2080-4.
- REVVY, P., MUTO, T., LEVY, Y., GEISSMANN, F., PLEBANI, A., SANAL, O., CATALAN, N., FORVEILLE, M., DUFOURCQ-LABELOUSE, R., GENNERY, A., TEZCAN, I., ERSOY, F., KAYSERILI, H., UGAZIO, A. G., BROUSSE, N., MURAMATSU, M., NOTARANGELO, L. D., KINOSHITA, K., HONJO, T., FISCHER, A. & DURANDY, A. (2000) Activation-induced cytidine deaminase (AID) deficiency causes the autosomal recessive form of the Hyper-IgM syndrome (HIGM2). *Cell*, 102, 565-75.
- RICKERT, R. C., ROES, J. & RAJEWSKY, K. (1997) B lymphocyte-specific, Cre-mediated mutagenesis in mice. *Nucleic Acids Res*, 25, 1317-8.
- ROSE, M. L., BIRBECK, M. S., WALLIS, V. J., FORRESTER, J. A. & DAVIES, A. J. (1980) Peanut lectin binding properties of germinal centres of mouse lymphoid tissue. *Nature*, 284, 364-6.
- ROSE, M. L., HABESHAW, J. A., KENNEDY, R., SLOANE, J., WILTSHAW, E. & DAVIES, A. J. (1981) Binding of peanut lectin to germinal-centre cells: a marker for B-cell subsets of follicular lymphoma? *Br J Cancer*, 44, 68-74.
- SAITO, N., COURTOIS, G., CHIBA, A., YAMAMOTO, N., NITTA, T., HIRONAKA, N., ROWE, M. & YAMAOKA, S. (2003) Two carboxyl-terminal activation regions of Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 activate NF- κ B through distinct signaling pathways in fibroblast cell lines. *J Biol Chem*, 278, 46565-75.
- SCHAADT, E., BAIER, B., MAUTNER, J., BORNKAMM, G. W. & ADLER, B. (2005) Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A mimics B-cell receptor-dependent virus reactivation. *J Gen Virol*, 86, 551-9.
- SCHMITZ, R., HANSMANN, M. L., BOHLE, V., MARTIN-SUBERO, J. I., HARTMANN, S., MECHTERSHEIMER, G., KLAPPER, W., VATER, I., GIEFING, M., GESK, S., STANELLE, J., SIEBERT, R. & KUPPERS, R. (2009) TNFAIP3 (A20) is a tumor suppressor gene in Hodgkin lymphoma and primary mediastinal B cell lymphoma. *J Exp Med*, 206, 981-9.
- SCHNEIDER, C. & HUBINGER, G. (2002) Pleiotropic signal transduction mediated by human CD30: a member of the tumor necrosis factor receptor (TNFR) family. *Leuk Lymphoma*, 43, 1355-66.
- SCHNEIDER, P., MACKAY, F., STEINER, V., HOFMANN, K., BODMER, J. L., HOLLER, N., AMBROSE, C., LAWTON, P., BIXLER, S., ACHA-ORBEA, H., VALMORI, D., ROMERO, P., WERNER-FAVRE, C., ZUBLER, R. H., BROWNING, J. L. & TSCHOPP, J. (1999) BAFF, a novel ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates B cell growth. *J Exp Med*, 189, 1747-56.
- SCHOLLE, F., BENDT, K. M. & RAAB-TRAUB, N. (2000) Epstein-Barr virus LMP2A transforms epithelial cells, inhibits cell differentiation, and activates Akt. *J Virol*, 74, 10681-9.
- SCHUHMACHER, M., STAEGE, M. S., PAJIC, A., POLACK, A., WEIDLE, U. H., BORNKAMM, G. W., EICK, D. & KOHLHUBER, F. (1999) Control of cell growth by c-Myc in the absence of cell division. *Curr Biol*, 9, 1255-8.
- SCHWAB, U., STEIN, H., GERDES, J., LEMKE, H., KIRCHNER, H., SCHAADT, M. & DIEHL, V. (1982) Production of a monoclonal antibody specific for Hodgkin and Sternberg-Reed cells of Hodgkin's disease and a subset of normal lymphoid cells. *Nature*, 299, 65-7.
- SHANEBECK, K. D., MALISZEWSKI, C. R., KENNEDY, M. K., PICHA, K. S., SMITH, C. A., GOODWIN, R. G. & GRABSTEIN, K. H. (1995) Regulation of murine B cell growth and differentiation by CD30 ligand. *Eur J Immunol*, 25, 2147-53.

- SHAPIRO-SHELEF, M., LIN, K. I., MCHEYZER-WILLIAMS, L. J., LIAO, J., MCHEYZER-WILLIAMS, M. G. & CALAME, K. (2003) Blimp-1 is required for the formation of immunoglobulin secreting plasma cells and pre-plasma memory B cells. *Immunity*, 19, 607-20.
- SIDMAN, C. L., SHULTZ, L. D., HARDY, R. R., HAYAKAWA, K. & HERZENBERG, L. A. (1986) Production of immunoglobulin isotypes by Ly-1+ B cells in viable motheaten and normal mice. *Science*, 232, 1423-5.
- SLIFKA, M. K., ANTIA, R., WHITMIRE, J. K. & AHMED, R. (1998) Humoral immunity due to long-lived plasma cells. *Immunity*, 8, 363-72.
- SOLVASON, N., LEHUEN, A. & KEARNEY, J. F. (1991) An embryonic source of Ly1 but not conventional B cells. *Int Immunol*, 3, 543-50.
- STEIN, H., GERDES, J., SCHWAB, U., LEMKE, H. & DIEHL, V. (1983) Evidence for the origin of Hodgkin and Sternberg-Reed cells from a newly detected small cell population. *Haematol Blood Transfus*, 28, 407-10.
- STEIN, H., MARAFIOTI, T., FOSS, H. D., LAUMEN, H., HUMMEL, M., ANAGNOSTOPOULOS, I., WIRTH, T., DEMEL, G. & FALINI, B. (2001) Down-regulation of BOB.1/OBF.1 and Oct2 in classical Hodgkin disease but not in lymphocyte predominant Hodgkin disease correlates with immunoglobulin transcription. *Blood*, 97, 496-501.
- STEIN, H., MASON, D. Y., GERDES, J., O'CONNOR, N., WAINSCOAT, J., PALLESEN, G., GATTER, K., FALINI, B., DELSOL, G., LEMKE, H. & ET AL. (1985) The expression of the Hodgkin's disease associated antigen Ki-1 in reactive and neoplastic lymphoid tissue: evidence that Reed-Sternberg cells and histiocytic malignancies are derived from activated lymphoid cells. *Blood*, 66, 848-58.
- STEWART, S., DAWSON, C. W., TAKADA, K., CURNOW, J., MOODY, C. A., SIXBEY, J. W. & YOUNG, L. S. (2004) Epstein-Barr virus-encoded LMP2A regulates viral and cellular gene expression by modulation of the NF-kappaB transcription factor pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 15730-5.
- SWANSON-MUNGERSON, M. A., CALDWELL, R. G., BULTEMA, R. & LONGNECKER, R. (2005) Epstein-Barr virus LMP2A alters in vivo and in vitro models of B-cell anergy, but not deletion, in response to autoantigen. *J Virol*, 79, 7355-62.
- THORLEY-LAWSON, D. A. (2001) Epstein-Barr virus: exploiting the immune system. *Nat Rev Immunol*, 1, 75-82.
- TIEGS, S. L., RUSSELL, D. M. & NEMAZEE, D. (1993) Receptor editing in self-reactive bone marrow B cells. *J Exp Med*, 177, 1009-20.
- TUNG, J. W., MRAZEK, M. D., YANG, Y. & HERZENBERG, L. A. (2006) Phenotypically distinct B cell development pathways map to the three B cell lineages in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 6293-8.
- UCHIDA, J., YASUI, T., TAKAOKA-SHICHIJO, Y., MURAOKA, M., KULWICHIT, W., RAAB-TRAUB, N. & KIKUTANI, H. (1999) Mimicry of CD40 signals by Epstein-Barr virus LMP1 in B lymphocyte responses. *Science*, 286, 300-3.
- VOCKERODT, M., MORGAN, S. L., KUO, M., WEI, W., CHUKWUMA, M. B., ARRAND, J. R., KUBE, D., GORDON, J., YOUNG, L. S., WOODMAN, C. B. & MURRAY, P. G. (2008) The Epstein-Barr virus oncoprotein, latent membrane protein-1, reprograms germinal centre B cells towards a Hodgkin's Reed-Sternberg-like phenotype. *J Pathol*, 216, 83-92.
- WANG, D., LIEBOWITZ, D. & KIEFF, E. (1985) An EBV membrane protein expressed in immortalized lymphocytes transforms established rodent cells. *Cell*, 43, 831-40.
- WARDEMANN, H., BOEHM, T., DEAR, N. & CARSETTI, R. (2002) B-1a B cells that link the innate and adaptive immune responses are lacking in the absence of the spleen. *J Exp Med*, 195, 771-80.
- WATANABE, M., OGAWA, Y., ITO, K., HIGASHIHARA, M., KADIN, M. E., ABRAHAM, L. J., WATANABE, T. & HORIE, R. (2003) AP-1 mediated relief of repressive activity of the CD30 promoter microsatellite in Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *Am J Pathol*, 163, 633-41.
- WERTZ, I. E., O'ROURKE, K. M., ZHOU, H., EBY, M., ARAVIND, L., SESHAGIRI, S., WU, P., WIESMANN, C., BAKER, R., BOONE, D. L., MA, A., KOONIN, E. V. & DIXIT, V. M. (2004) De-ubiquitination and ubiquitin ligase domains of A20 downregulate NF-kappaB signalling. *Nature*, 430, 694-9.
- WOLNIAK, K. L., SHINALL, S. M. & WALDSCHMIDT, T. J. (2004) The germinal center response. *Crit Rev Immunol*, 24, 39-65.
- YOUNG, L. S. & RICKINSON, A. B. (2004) Epstein-Barr virus: 40 years on. *Nat Rev Cancer*, 4, 757-68.
- ZHANG, S. Q., KOVALENKO, A., CANTARELLA, G. & WALLACH, D. (2000) Recruitment of the IKK signalosome to the p55 TNF receptor: RIP and A20 bind to NEMO (IKKgamma) upon receptor stimulation. *Immunity*, 12, 301-11.
- ZHENG, B., FIUMARA, P., LI, Y. V., GEORGAKIS, G., SNELL, V., YOUNES, M., VAUTHEY, J. N., CARBONE, A. & YOUNES, A. (2003) MEK/ERK pathway is aberrantly active in Hodgkin disease: a signaling

pathway shared by CD30, CD40, and RANK that regulates cell proliferation and survival. *Blood*, 102, 1019-27.

ZIMBER-STROBL, U., KEMPKES, B., MARSCHALL, G., ZEIDLER, R., VAN KOOTEN, C., BANCHEREAU, J., BORNKAMM, G. W. & HAMMERSCHMIDT, W. (1996) Epstein-Barr virus latent membrane protein (LMP1) is not sufficient to maintain proliferation of B cells but both it and activated CD40 can prolong their survival. *EMBO J*, 15, 7070-8.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die es ermöglicht haben, diese Doktorarbeit zu erstellen:

Ein ganz besonderes Dankeschön geht an meine Betreuerin PD Dr. Ursula Zimmer-Strobl für die Möglichkeit meine Dissertation in ihrem Labor anzufertigen, für die Bereitstellung dieses interessanten Themas und die konstruktiven und enthusiastischen Diskussionen. Außerdem danke ich ihr dafür, dass sie mir ein wenig die Angst vor Vorträgen genommen hat.

Ein besonderer Dank gebührt meinem Doktorvater Prof. Dr. Dirk Eick für die Betreuung meiner Doktorarbeit.

Außerdem möchte ich mich bei Prof. Dr. Elisabeth Weiß für das Erstellen des Zweitgutachtens bedanken.

Prof. Wolfgang Hammerschmidt und Prof. Georg Bornkamm danke ich für die Möglichkeit an ihren Instituten forschen zu dürfen.

Vielen Dank an meine gesamte Arbeitsgruppe! Vielen Dank an Julia Rastelli, die mich so gut eingelernt hat. Ein ganz besonderer Dank geht an Gabrielle Marschall, die mir gerade im letzten Jahr so unglaublich viel geholfen hat. Außerdem möchte ich Lothar Strobl für die vielen konstruktiven Ideen und für seine unermüdliche Literaturrecherche danken. Vielen Dank an alle Mädels der AG Strobl für die angenehme und oft lustige Zeit im Labor: Franziska Hampel, Sabine Schmidl, Samantha Feicht, Anne Dreaseke, Kristina Djermanovic und Stefanie Ehrenberg.

Ein großer Dank geht an den Mitglieder des Tierstalls, vor allem an Silke, für die gute Betreuung meiner Mausstämme.

Vielen Dank an unsere Kooperationspartner, die mir geholfen haben, meine beiden transgenen Mausstämme zu generieren: Marc Schmidt-Supprian für den Zielvektor, Ralf

Danksagung

Kühn für die ES-Zelllinie IDG3.2 und Susanne Weidemann sowie Adrianne Tasdemir für die Blastozysten Injektion.

Ich möchte mich auch bei Barbara Scholz und Inga Ludenberg bedanken, die immer ein offenes Ohr für mich hatten.

Außerdem möchte ich mich bei meinen Stammtischmädeln bedanken: Silvia, für die gute Idee sich doch bei Ulla für die Promotion zu bewerben; Kerstin, die mich gerade in der ersten Zeit immer mit Essen versorgt hat und natürlich Olivia und Judith. Ich hoffe wir, behalten unseren Stammtisch bei!

Ein ganz, ganz großes Dankeschön geht an meine Familie, ohne die ich diese Arbeit nicht geschafft hätte. Ich möchte meinen Eltern für Ihre Geduld und Unterstützung in allen Lebenslagen danken. Meinem Bruder möchte ich vor allem für die große Hilfe in allen Computerfragen danken!

Zuletzt möchte ich mich bei meinem Schatz für die Unterstützung und Geduld bedanken. Danke, dass Du immer für mich da warst!

Veröffentlichungen

Publikationen

CALDWELL, R. B., **FIEDLER, P.**, SCHOETZ, U. & BUERSTEDDE, J. M. (2007) Gene function analysis using the chicken B-cell line DT40. *Methods Mol Biol*, 408, 193-210.

SCHOETZ, U., CERVELLI, M., WANG, Y. D., **FIEDLER, P.** & BUERSTEDDE, J. M. (2006) E2A expression stimulates Ig hypermutation. *J Immunol*, 177, 395-400

CALDWELL, R. B., KIERZEK, A. M., ARAKAWA, H., BEZZUBOV, Y., ZAIM, J., **FIEDLER, P.**, KUTTER, S., BLAGODATSKI, A., KOSTOVSKA, D., KOTER, M., PLACHY, J., CARNINCI, P., HAYASHIZAKI, Y. & BUERSTEDDE, J. M. (2005) Full-length cDNAs from chicken bursal lymphocytes to facilitate gene function analysis. *Genome Biol*, 6, R6.

Manuskript in Vorbereitung

Julia Rastelli*, **Petra Fiedler***, Martin Janz, Stefan Mathas, Georg W. Bornkamm, Lothar J. Strobl, Ursula Zimmer-Strobl

The Epstein-Barr viral latent membrane proteins LMP1 and LMP2A are not sufficient to maintain B cell immortalization.* equal contribution

Vorträge

- 6th B Cell Forum of the German Society of Immunology of the Study Group „Biology of B Lymphocytes“, Eibsee, Deutschland, 2008

Titel: Co-expression of the Epstein-Barr viral proteins LMP1 and LMP2A, mimicking constitutively active forms of CD40 and BCR, does not lead to B cell transformation

- European EBV Conference, Brighton 2009

Titel: Dissection of LMP1 and LMP2A signaling in LCLs

- Transregio 54, Berlin, 2009

Titel: Influence of deregulated CD30 and the viral proteins LMP1 and LMP2A on B cells

- 9th B Cell Forum of the German Society of Immunology of the Study Group „Biology of B Lymphocytes“, Bad Sooden-Allendorf, Deutschland, 2011

Titel: Constitutive CD30 signaling in B cells leads to an expansion of B1 like B cells

Poster

- Gene Expression & Signaling in the Immune System Meeting of the Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, USA, 2010

Petra Fiedler, Julia Rastelli, Ursula Zimmer-Strobl

Titel: Co-expression of the Epstein-Barr viral proteins LMP1 and LMP2A, mimicking constitutively active forms of CD40 and BCR, does not lead to B cell transformation

- 6th B Cell Forum of the German Society of Immunology of the Study Group „Biology of B Lymphocytes“, Eibsee, Deutschland, 2008

Petra Fiedler, Julia Rastelli, Ursula Zimmer-Strobl

Titel: Co-expression of the Epstein-Barr viral proteins LMP1 and LMP2A, mimicking constitutively active forms of CD40 and BCR, does not lead to B cell transformation

Erklärung

Ich versichere hiermit, dass ich mich nicht anderweitig einer Doktorprüfung ohne Erfolg unterzogen habe.

München, im April 2011

Petra Fiedler

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Petra Fiedler, geboren am 3. August 1981 in München, ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Quellen angefertigt habe.

München, im April 2011

Petra Fiedler