

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

# **Rolle des Epstein-Barr Virus Proteins LMP2A in transformierten B-Zellen**

Von

**Christoph Mancao**

München, 21. November 2006

Erstgutachter: Prof. Dirk Eick

Zweitgutachter: PD Dr. Christine Falk

Tag der mündlichen Prüfung: 16.02.2007

Diese Arbeit wurde veröffentlicht in

**Rescue of „crippled“ germinal center B cells from apoptosis by  
Epstein-Barr virus**

Blood. 2005 Dec 15; 106(13): 4339-44

**Epstein-Barr virus's LMP2A is a mimic of the BCR and essential for  
B-cell survival**

Eingereicht

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung .....</b>	<b>7</b>
1.1. Das Hodgkin-Lymphom .....	8
1.1.1. Geschichte des Hodgkin-Lymphom .....	8
1.1.2. Histopathologie und Diagnose des Hodgkin-Lymphoms.....	10
1.1.3. Therapie des Hodgkin-Lymphoms .....	12
1.2. Das Epstein-Barr Virus .....	13
1.2.1. Diagnose und Pathologie von EBV .....	14
1.3. Das virale Protein LMP2A.....	16
1.3.1. Die Struktur von LMP2A.....	16
1.3.2. Signaltransduktion durch den B-Zell-Rezeptor.....	18
1.3.3. Signaltransduktion durch LMP2A.....	20
1.4. Der Zusammenhang zwischen EBV und HL.....	22
1.4.1. Epidemiologie .....	22
1.4.2. Molekularbiologische Nachweise .....	23
1.4.3. Somatische Hypermutation in den Keimzentren .....	24
1.4.4. Verkrüppelte pro-apoptotische B-Zellen.....	25
1.5. Zielsetzung .....	26
<b>2. Material .....</b>	<b>27</b>
2.1. Antikörper .....	28
2.2. Oligonukleotide.....	29
2.3. Plasmide.....	30
2.4. Bakterien .....	30
2.5. Zelllinien .....	31
2.6. Chemikalien, Enzyme, Geräte und sonstiges .....	31
<b>3. Methoden .....</b>	<b>34</b>
3.1. Bakterienkultur.....	35
3.1.1. Amplifikation und Lagerung von Bakterien.....	35
3.1.2. Transformation und Elektroporation von Bakterien .....	35
3.2. Zellkultur und Analyse von Zellen.....	36
3.2.1. Zellkulturbedingungen.....	36
3.2.2. Aufbewahrung von Zellen .....	37
3.2.3. Präparation primärer B-Zellen.....	37
3.2.4. Separation B-Zell-Rezeptor-negativer Keimzentrums-B-Zellen.....	37
3.2.5. Messung der Zellproliferation: BrdU-Einbau .....	38
3.2.6. Messung der Apoptose: AnnexinV-Färbung .....	39
3.2.7. Bestimmung der Zellzahl .....	39
3.2.8. PEI-Transfektion .....	39
3.2.9. Produktion infektiöser Viruspartikel und Titerquantifizierung.....	40
3.2.10. Konzentration von Virusüberständen .....	40
3.2.11. FACS-Analysen .....	40

---

3.3.	DNA-Arbeitstechniken .....	41
3.3.1.	Extraktion zellulärer DNA/RNA aus eukaryotischen Zellen .....	41
3.3.2.	Präparative Plasmidreinigung .....	42
3.3.3.	PCR-Analysen der Immunglobulingene .....	43
3.3.4.	Reverse Transkriptase (RT)-PCR der LMP2A Transkripte .....	44
3.3.5.	„real-time“-PCR.....	44
3.4.	Proteinarbeitstechniken .....	45
3.4.1.	Immunoblot Analyse .....	45
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>47</b>
4.1.	Isolation BZR-negativer Keimzentrums-B-Zellen.....	49
4.2.	Infektion BZR-negativer Keimzentrums-Zellen .....	53
4.3.	BrdU-Einbau infizierter Zellen.....	54
4.3.1.	Infizierte BZR <sup>+/-</sup> Zellen.....	55
4.3.2.	Infizierte BZR <sup>-</sup> Zellen .....	56
4.4.	Immunglobulin-Phänotyp der transformierten Zellen .....	58
4.5.	BZR <sup>-</sup> Einzel-Zellklone: Auswahlverfahren .....	58
4.5.1.	Expression der leichten Kette .....	59
4.5.2.	Expression der schweren Kette .....	59
4.6.	Sequenzierung der Immunglobulingene .....	61
4.7.	CRE vermittelte Deletion von LMP2A.....	68
4.8.	HTNC Protein Transduktion.....	77
4.8.1.	Quantitative PCR zur Bestimmung der viralen Kopienzahl .....	79
<b>5.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>80</b>
5.1.	Die Rolle von LMP2A bei der Transformation BZR <sup>-</sup> B-Zellen .....	83
5.2.	Die Rolle von LMP2A in transformierten Zellen .....	87
5.3.	LMP2A und der B-Zell-Rezeptor: Synergie oder Konkurrenz? .....	92
5.4.	Offene Fragen und Ausblick .....	95
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>96</b>
<b>7.</b>	<b>Abkürzungen .....</b>	<b>99</b>
<b>8.</b>	<b>Literatur .....</b>	<b>102</b>



# 1. Einleitung

**Titelbild: Erste Zeichnung eines Hodgkin-Lymphoms aus dem Jahre 1832.** Der britische Pathologe Sir Robert Carswell war der bedeutendste Pathologe und Zeichner postmortaler Untersuchungen seiner Zeit. Hier ist der siebte Patient von Thomas Hodgkin dargestellt. Die Erkrankung ist geprägt durch eine Lymphadenopathie.

## 1.1. Das Hodgkin-Lymphom

### 1.1.1. Geschichte des Hodgkin-Lymphom

„This enlargement of the glands appeared to be a primitive affection of those bodies, rather than the result of an irritation propagated to them from some ulcerated surface or other inflamed texture ...“ Mit diesen Worten beschrieb Thomas Hodgkin (Abb. 1) die postmortalen Befunde von sieben Patienten des Guy's Hospital in London (Hodgkin, 1832). Die massiven Lymphknoten- und Milzvergrößerungen des siebten Patienten wurden von seinem Freund Sir Robert Carswell in einer Zeichnung festgehalten (Deckblatt). Aus historischer Sicht ist dies jedoch nicht die erste Schilderung dieser Erkrankung, wie Thomas Hodgkin in seiner Veröffentlichung im Jahre 1832 mit dem Titel „On some Morbid Appearances of the Absorbent Glands and Spleen“ anmerkt. Die erste Referenz zu diesem oder einem sehr ähnlichen Siechtum stammt aus 1666 von Marcellus Malpighi (Malpighi, 1666). Gegen Ende des 19.

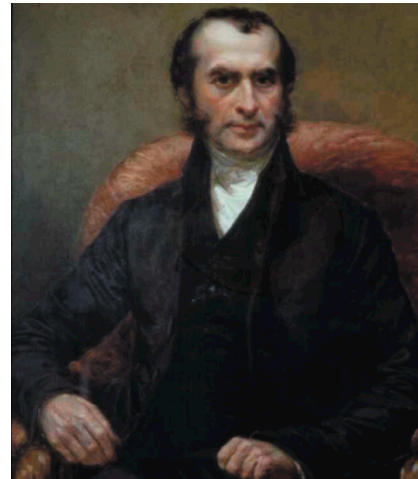


Abb. 1: Porträt des englischen Arztes Thomas Hodgkin (\*17.08.1798; †15.04.1866).

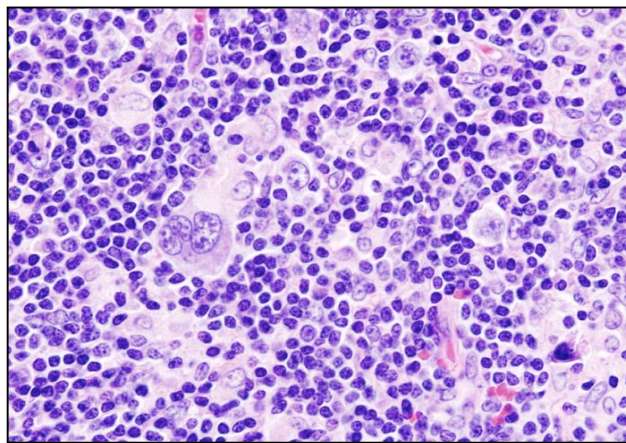
Jahrhunderts folgten immer mehr Veröffentlichungen über „große Zellen mit einem oder zwei Kernen ... riesige Milz und vergrößerte abdominale Knoten“ bis Carl Sternberg und Dorothy Reed als erste eine eindeutige Histopathologie des Hodgkin-Lymphoms (HL) beschrieben (Reed, 1902; Sternberg, 1898). Sind die Zellen mononukleär, so spricht man von Hodgkin Zellen und im Fall der Multinuklearität von Reed/Sternberg Zellen. Die Ätiologie und Pathogenese dieser Hodgkin- und Reed/Sternberg-Zellen (HRS-Zellen) blieb lange Zeit im Dunkeln; die Symptome (anhaltendes Fieber, Nachtschweiß, Gewichtsverlust und Lymphadenopathie) weisen auf eine Infektion hin. Als mögliche Erreger wurde *Mycobacterium tuberculosis*, *Corynebacterium diphtheria* oder *Brucella spp.* diskutiert (Bonadonna, 2000).



Erst 1960 konnten zytogenetische Analysen zeigen, dass es sich hierbei nicht um eine infektiöse Krankheit, sondern um eine maligne Neoplasie handelt, da die Riesenzellen zwei wesentliche Merkmale neoplastischer Zellen erfüllen: Aneuploidie und klonale Abstammung (Bonadonna, 2000). Im Wesentlichen gibt es drei Hauptgründe, warum die Natur der HRS-Zellen bis in die Neunziger Jahre nicht aufgeklärt wurde. Zum einen exprimieren diese Zellen kein einheitliches Muster an Oberflächenmarkern, mit deren Hilfe eine Klassenzugehörigkeit definiert werden konnte (Drexler, 1992). Eine Gen-Expressionsanalyse zeigte nur, dass HRS-Zellen aktivierten hämatopoetischen Zellen gleichen (Trumper et al., 1993). Eine weitere Einschränkung war unmöglich, da diese Zellen sowohl lymphozyten- als auch monozyten-charakteristische Oberflächenmerkmale ko-exprimieren. Zum zweiten führt der äußerst geringe Anteil von nur circa 1 % an HRS-Zellen in einem Hodgkin-Tumor zu einer schwierigen pathohistologischen Situation. Das umgebende Gewebe besteht aus scheinbar benignen T- und B-Zellen, Histiozyten, neutrophilen und eosinophilen Granulozyten und Plasmazellen. Frühere molekularbiologische Techniken, die DNA aus dem gesamten Tumorgewebe untersuchten und dadurch wesentlich zur Phänotypisierung anderer Lymphome beigetragen haben, versagen hier, weil die Frequenz der HRS-Zellen zu gering ist, um sie direkt zu analysieren. Darüber hinaus ist es bislang nur gelungen, 15 verschiedene Zelllinien aus HRS-Zellen zu generieren (Kuppers and Rajewsky, 1998). Extrem sensitive PCR Techniken ermöglichten schließlich den eindeutigen Nachweis, dass es sich beim Hodgkin-Lymphom um eine maligne Neoplasie der B-Lymphozyten handelt: die HRS-Zellen weisen klonale Immunglobulin-V-Gen Rearrangements und somatische Hypermutationen auf; ein wesentliches Kennzeichen der B-Zell-Entwicklung (Kuppers et al., 1994). Jedoch weichen HRS-Zellen stark von normalen B-Zellen ab, weil spezifische Oberflächenmarker (CD19, CD21, CD45, CD79a/b), Signalmoleküle (LYN, SYK, BLK PLC- $\gamma$ , MAPK) und Transkriptionsfaktoren (PU.1) nicht oder nur in geringerem Maße exprimiert werden (Schwering et al., 2003).

### 1.1.2. Histopathologie und Diagnose des Hodgkin-Lymphoms

Das primäre Symptom, das die meisten Patienten veranlasst einen Arzt aufzusuchen, ist ein oder mehrere schmerzlos geschwollene (zervikale, axilläre, inguinale, mediastinale oder abdominale) Lymphknoten. Begleitend kommt es zu unspezifischen Allgemeinsymptomen, der so genannten B-Symptomatik. Dazu gehören Fieber, Nachtschweiß, eine Gewichtsabnahme von mehr als 10 % innerhalb von sechs Monaten, Leistungsminderung und Juckreiz. Beschrieben wurde auch ein Schmerzempfinden der Lymphknoten nach Alkoholgenuss (Alkoholschmerz) und in manchen Fällen eine Hepatomegalie oder Splenomegalie. Infolge der Immunschwäche kann eine Infektion (Tuberkulose, Pilze oder Viren) auftreten. Bei diesen Verdachts-Symptomen werden in erster Linie Entzündungsmarker getestet. Dazu gehören folgende Laborparameter: Erhöhung der Blutsenkungsgeschwindigkeit und des C-reaktiven Proteins (CRP), Eosinophilie, Thrombozytopenie, Laktat-Dehydrogenase-Erhöhung und Anämie. Lymphknoten- und in manchen Fällen auch Knochenmarksbiopsien dienen der histologischen Untersuchung. Dabei sind die 15 – 45  $\mu\text{m}$  großen HRS-Zellen (Abb. 2) das definitive diagnostische Kriterium (Diehl et al., 2004; Naumann et al., 2004).



**Abb. 2: Histopathologisches Bild eines Hodgkin-Lymphoms.** Die Probe stammt aus einer Lymphknotenbiopsie. Nach der Hämatoxylin/Eosin Färbung erkennt man die charakteristischen mehrkernigen Hodgkin und Reed/Sternbergzellen.

Generell können Lymphome in zwei Klassen aufgeteilt werden: Non-Hodgkin-Lymphome (NHL) und Hodgkin-Lymphome (HL). Erstere zeichnen sich durch das Fehlen von HRS-Zellen im Tumorgewebe aus und schließen folgende Lymphome ein: den B-Zelltyp der chronischen lymphatischen Leukämie (B-CLL), das Mantelzell-Lymphom, das folliculäre Lymphom, das Marginalzonen B-Zell-Lymphom vom MALT-Typ („mucosa-associated lymphoid tissue“), das Burkitt-Lymphom, sowie verschiedene T-Zell-Lymphome. Das HL wird in Abhängigkeit von Histologie und zellulärer Komposition des umgebenden Gewebes durch die World Health Organization (WHO) in zwei Formen eingeteilt: das nodulär-lymphozytenprädominante HL (NLPHL) und das klassische HL (cHL, classical HL), welches weiter in vier Subtypen unterteilt wird (Harris, 1999).

**Nodulär-sklerosierende (NS) Form.** Sie ist mit 60% aller HL Fälle die häufigste Form und ist charakterisiert durch knotige Verhärtungen (Sklerose) hauptsächlich im Mediastinum und im supraklavikulären Bereich.

**Gemischtzellige Form (mixed-cellularity, MC).** In der MC als auch in der NS Form sind T-Zellen die vorherrschende Lymphozyten-Population. Ein zervikales und abdominales Vorkommen ist hierfür typisch.

**Lymphozytenreiche Form (lymphocyte predominant, LP).** Hier dominieren histologisch B-Lymphozyten in betroffenen axillären und zervikalen Lymphknoten.

**Lymphozytenarme Form (lymphocyte depleted, LD).** Diese seltene Form betrifft hauptsächlich Patienten in fortgeschrittenem Alter und manifestiert sich hauptsächlich im Abdomen.

Wie bereits erwähnt, zeigen HRS-Zellen einen heterogenen Immunphänotyp in der Histologie. Jedoch sind die NS, MC und die LD Form meist positiv für die Aktivierungsmarker CD30 (clusters of differentiation) und CD15 und negativ für die B-Zellmarker CD20. Bei der LP Form ist die Situation umgekehrt.

Unabhängig von der histologischen Einteilung wird das HL nach der Ann Arbor Klassifikation anhand der Anzahl und Lage befallener Lymphknoten und Organe in vier klinische Stadien (I-IV) eingeteilt (Greene, 2002; Lister et al., 1989).

Derzeit erkranken in Nordamerika und Europa jährlich 20.000 Menschen an HL. Dies entspricht einer Inzidenz von zwei bis vier pro 100.000 Einwohnern / Jahr, wobei eine zweigipflige Altersverteilung auffällig ist. Die meisten Patienten sind zum Zeitpunkt der Diagnose entweder zwischen 15 und 34 Jahre oder über 60 Jahre alt (Cartwright and Watkins, 2004). Diese Verteilung spiegelt einen wichtigen Hinweis auf die Rolle des Immunsystems wider. Im Kindes- bzw. Jugendalter und dann später im Seniorenalter ist das Immunsystem besonders belastet. Dies trifft auch auf die „Erkältungsmonate“ Februar und März zu, in denen ein signifikanter Anstieg an positiven Diagnosen zu verzeichnen ist (Cartwright and Watkins, 2004).

### **1.1.3. Therapie des Hodgkin-Lymphoms**

Die klinische Stadieneinteilung bestimmt die Therapie, die sich aus Strahlen- und Chemotherapie zusammensetzt. Entweder wird die Polychemotherapie ABVD (Adriamycin (Doxorubicin), Bleomycin, Vinblastin, Dacarbazin) oder BEACOPP (Bleomycin, Etoposid, Adriamycin (Doxorubicin), Cyclophosphamid, Oncovin (Vincitrin), Prednison, Procarbazin) eingesetzt. In jedem Fall erfolgt die Chemo- in Verbindung mit einer „involved field“ Strahlentherapie (d.h. kleinflächige, auf den Lymphknotenbefall orientierte Bestrahlung) mit 20 – 30 Gray (Gy). In drei Studien führte diese Therapie zu einem Langzeitüberleben von 93 - 98 % (Connors, 2005).

## 1.2. Das Epstein-Barr Virus

Dieses humane  $\gamma$ -Herpesvirus konnte 1964 von Anthony Epstein und Yvonne Barr in Zelllinien eines Burkitt-Lymphoms elektronenmikroskopisch detektiert werden (Epstein et al., 1964). Es wird durch Speichel übertragen (Tröpfcheninfektion; daher auch sein volkstümlicher englischer Name „kissing disease“) und infiziert dort Epithel- oder direkt B-Zellen (in seltenen Fällen können auch T-Zellen infiziert werden). Das Epstein-Barr Virus (EBV) bindet über das virale Glykoprotein gp220/350 an das zelluläre Oberflächenprotein CD21 (Nemerow et al., 1987) und alternativ über gp42 an das humane Leukozyten-Antigen (HLA) der Klasse II (Borza and Hutt-Fletcher, 2002). Nach der Adsorption liegt das EBV-Genom im Zellkern als zirkuläres, kovalent geschlossenes, doppelsträngiges DNA-Molekül mit einer Größe von 172 kb in bis zu 100 Kopien pro Zelle vor. Der Lebenszyklus weist, wie der anderer Herpesviren, eine lytische und eine latente Phase auf. Die Infektion beginnt mit der akuten lytischen Phase, in der nahezu alle viralen Gene exprimiert werden. Sie dient dem Virus zur Replikation und Produktion neuer Viruspartikel. In dieser lytischen Phase können 10 bis 50 % aller B-Zellen infiziert sein (Andersson, 2006; Thompson and Kurzrock, 2004). Das Immunsystem reagiert mit der Bildung von drei Antikörperklassen (IgG, IgM und IgA) gegen das virale Kapsidantigen und gegen die frühen Antigene D und R (Thompson and Kurzrock, 2004). Diese humorale Immunantwort, zusammen mit einer zellulären zytotoxischen T-Zell-Reaktion führt zu einer Abnahme der Viruslast, der Ausbildung des EBV-spezifischen immunologischen Gedächtnisses und stellt den Übergang in die latente Phase dar. Während der Latenz werden nur noch elf der ca. 90 viralen Gene exprimiert (Latenz III; Tab. 1). In infizierten naiven B-Zellen, welche die Keimzentrumsreaktion durchlaufen, ändert EBV das Muster seiner Genexpression zur so genannten Latenz II. Nach der klonalen Expansion differenzieren diese infizierten Zellen zu Gedächtnis-B-Zellen und das Virus ändert das Expressionsmuster auf die Latenz 0 (Young and Rickinson, 2004). Außer LMP2A werden jetzt keine viralen Proteine mehr exprimiert. Auf diese Weise erreicht das Virus sein Reservoir der lebenslangen Persistenz, in dem es nicht mehr vom Immunsystem erkannt und eliminiert werden kann (Kuppers, 2003).

Latenz	Exprimierte Gene	Gewebe
0	LMP2A, -2B; EBER	periphere Gedächtnis-B-Zellen
I	EBNA1; EBER	Burkitt-Lymphom
II	EBNA1; LMP1, -2A, -2B; EBER	Hodgkin-Lymphom, Keimzentrum-B-Zellen
III	EBNA1, -2, -3A, -3B, -3C, -LP; LMP1, -2A, -2B; EBER	naive und Keimzentrum-B- Zellen; LCLs; PTLD

**Tabelle 1: Expressionsmuster viraler Gene in den verschiedenen Latenzstadien.** EBNA (EBV nukleäre Antigene); LMP (Latente Membranproteine); EBER (EBV kodierte RNAs); LCLs (Lymphoblastoide Zelllinien); PTLD (Post-transplantationale lymphoproliferative Erkrankung).

### 1.2.1. Diagnose und Pathologie von EBV

Die Infektion erfolgt in der Regel im Kindesalter. Immunkompetente Personen zeigen entweder keine oder nur leichte, von normalen Kinderkrankheiten kaum unterscheidbare Symptome. Infektionen im Erwachsenenalter führen jedoch in 35 – 50 % der Fälle zu einer Infektiösen Mononukleose (IM, Pfeiffersches Drüsenfieber), die sich durch Fieber, Pharyngitis und einer Lymphadenopathie von bis zu vier Monaten Dauer manifestiert.

Bereits kurz nach seiner Identifizierung wurde klar, dass dieses Virus B-Zellen *in vitro* mit einer hohen Effizienz transformieren kann. Es wurde somit als erstes humanes Tumovirus eingestuft und gilt heute in der WHO-Einteilung als Karzinogen der höchsten Gefahrenklasse. Ätiologisch ist EBV jedoch nicht nur mit dem Burkitt Lymphom, aus dem es isoliert wurde, eng assoziiert, sondern mit einer ganzen Reihe von Krebserkrankungen (Kieff and and Rickinson, 2001; Thompson and Kurzrock, 2004). Besonders in Fällen von geschwächter Immunabwehr, wie z.B. bei einer HIV-Infektion oder nach Immunsuppression im Verlauf von allogenen Transplantationen, kann EBV an der Entstehung solcher B-Zell-Tumore eine wesentliche Rolle spielen. Dies zeigt den wichtigen Einfluss des Immunsystems bei der Kontrolle einer EBV-Infektion auf.

**Burkitt-Lymphome** zeichnen sich durch spezifische chromosomale Translokationen zwischen dem Chromosom 8 und den Chromosomen 14, 2 oder 22 aus. Dadurch gelangt das Gen *c-myc* unter die Kontrolle der Immunglobulinenhancer, was zu einer konstitutiven Aktivierung dieses Protoonkogens führt. Über 90% aller endemischen Burkitt-Lymphome sind mit EBV assoziiert. Deren hauptsächliches Auftreten in Äquatorial-Afrika wird mit Malaria-Infektionen in Verbindung gebracht. Die aus dieser Infektion resultierende Stimulation des Immunsystems hat wahrscheinlich eine Reaktivierung der latenten EBV-Infektion zur Folge. Die nicht-endemischen Burkitt-Lymphome der westlichen Welt stellen ein zunehmendes Problem bei HIV-positiven Patienten dar.

**Nasopharynxkarziome** sind epitheliale Tumore des Nasen-Rachenraumes. Sie treten besonders gehäuft in China, Hong Kong und Taiwan auf, was eine zusätzliche genetische (HLA-Typ) oder umweltbedingte Komponente (Ernährung durch gesalzenen Fisch und Rauchexposition) vermuten lässt.

**Post-Transplantations-Lymphome** sind EBV-getriebene opportunistische Lymphoproliferationen, die direkt mit dem immunkomprimierten Status des Patienten korrelieren. Die Inzidenzen reichen von 1 % nach Stammzell-Transplantationen bis hin zu 33 % nach Herz-Lungentransplantationen (Burns and Crawford, 2004).

**Non-Hodgkin-Lymphome** weisen auf die Fähigkeit von EBV hin, nicht nur B-Zellen sondern auch T-Zellen infizieren und transformieren zu können (Young and Rickinson, 2004).

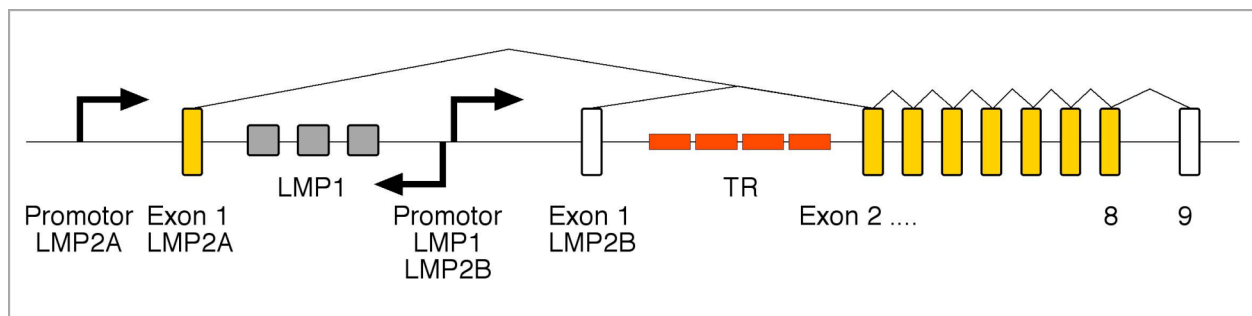
**Leiomyosarkome** sind Tumore der weichen Muskulatur und korrelieren stark mit EBV in HIV- und anderen immunsupprimierten Patienten (Thompson and Kurzrock, 2004).

**Hodgkin-Lymphome** (siehe 1.1) zeichnen sich durch eine veränderte Struktur des betroffenen Lymphknotens und die Anwesenheit mononukleärer Hodgkin- und/oder Reed-Sternberg-Zellen aus.

## 1.3. Das virale Protein LMP2A

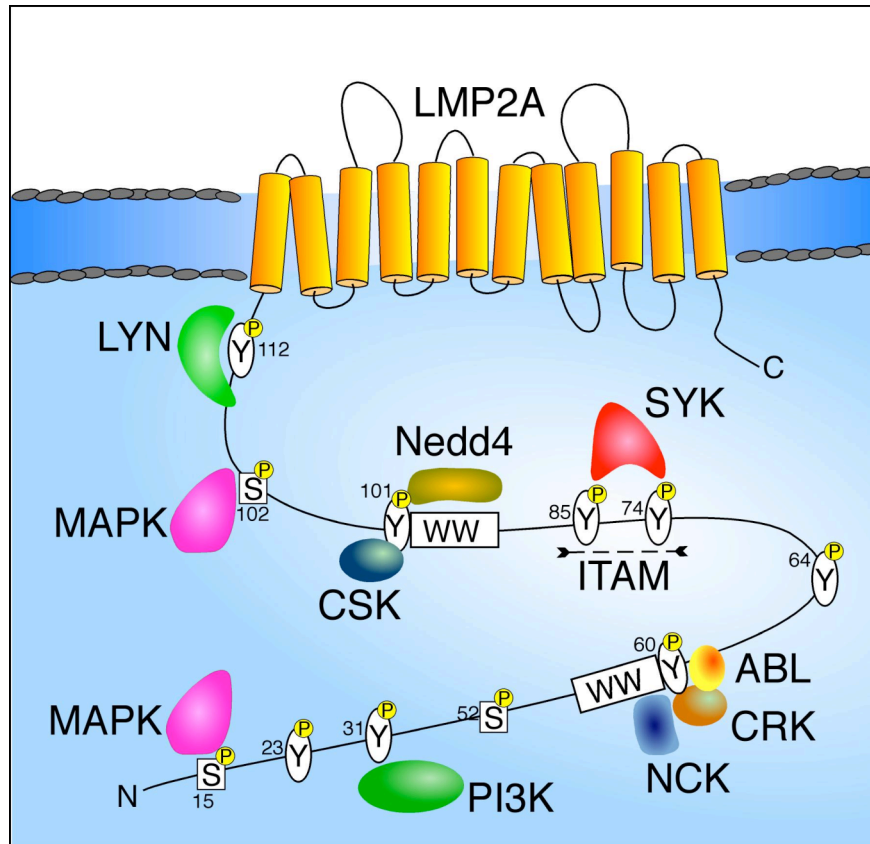
### 1.3.1. Die Struktur von LMP2A

Die Genabschnitte, die für die Latenten Membranproteine (LMP) 2A und 2B kodieren, liegen beiderseits der Enden („terminal repeats“) des EBV-Genoms und können nur transkribiert werden, wenn das Genom in zirkulärer Form vorliegt (Laux et al., 1988). Acht Exons werden in einen aminoterminalen Abschnitt, zwölf Transmembrandomänen und den 27 Aminosäure langen zytoplasmatischen Carboxyterminus translatiert (Abb. 3 und 4). Letzterer dient zusammen mit den Transmembrandomänen der Oligomerisierung in Cholesterin- und Sphingolipid-reichen Mikrodomänen („lipid rafts“) (Dykstra et al., 2001; Matskova et al., 2001). Die Proteine LMP2A und LMP2B unterscheiden sich lediglich im 119 Aminosäure langen, zytoplasmatischen N-Terminus. Er ist im Falle von LMP2A durch das erste Exon kodiert, während das erste Exon von LMP2B nicht-kodierend ist. Die Translation von LMP2B beginnt damit an der Transmembrandomäne. Die N-terminale Domäne von LMP2A weist strukturelle und funktionelle Homologie zur Signaldomäne des B-Zell-Rezeptors auf (Abb. 4) (Ingham et al., 2005). Sie vermittelt die Signalkapazität von LMP2A, auf die im folgenden Abschnitt näher eingegangen wird.



**Abb. 3: Genetische Komposition des LMP2A Lokus.** Die kodierenden (gelb) und nicht-kodierenden (weiss) Exons 1-9 von LMP2A und LMP2B befinden sich auf beiden Seiten der Enden (TR; rot) des viralen Genoms. LMP2A kodiert im Gegensatz zu LMP2B für eine N-terminale Signaldomäne und wird von einem eigenen Promotor transkribiert. LMP2B teilt sich ein bidirektionales Promotorelement mit LMP1.





**Abb. 4: Signaldomänen von LMP2A.** Signalmediatoren des B-Zell-Rezeptor Signalweges können an LMP2A binden. An phosphorylierten Tyrosinresten im N-Terminus binden LYN und PI3K, an Serinresten MAPK. SYK bindet innerhalb eines ITAM-Motifs. An den WW Domänen können Nedd4-ähnliche Ubiquitin-Ligasen binden und den Abbau des ganzen Komplexes initiieren.

**Tyrosin-Motive.** Der N-Terminus von LMP2A beinhaltet acht Tyrosinreste (Abb. 4), die phosphoryliert werden können: Y23, Y31, Y60, Y64, Y74, Y85, Y101 und Y112. Diese Reste binden Familienmitglieder der Protein-Tyrosin-Kinasen (PTK). Dazu gehören Proteine, die eine Src-Homologie-2-Domäne (SH2) enthalten. Y31 bindet die SH2 Proteine SHC, Phosphoinositol-3-Kinase (PI3K) und Phospholipase- $\gamma$ -2 (PLC $\gamma$ -2), während Y60 ABL, CRK und NCK bindet (Longnecker, 2000). Die Tyrosinreste Y74 und Y85 befinden sich in einem Motiv, das dem Immuorezeptor-Tyrosin-basierten-Aktivierungs-Motive (ITAM) homolog ist. Es findet sich auch in den Ko-Rezeptoren CD79a (Ig $\alpha$ ) und CD79b (Ig $\beta$ ) des B-Zell-Rezeptor-Komplexes und im CD3-Molekül des T-Zell-Rezeptor-Komplexes wieder, in denen es die wesentliche Signalweiterleitung ermöglicht (Merchant et al., 2001). An dieses Motiv kann vor allem ZAP70/SYK (spleen

tyrosine kinase) binden. Y101 kann mit der Kinase CSK („cytoplasmatic tyrosine kinase“) interagieren und das Y112 Motiv assoziiert mit FYN und LYN, den Initiator der B-Zell-Rezeptor-Signalwege (Fruehling et al., 1998).

**Serin-Motive.** Die Aminosäuren S15 und S102 können in *in vitro* Versuchen durch die Mitogen-aktivierte Protein Kinase (MAPK) ERK1 „(extracellular-signal regulated kinase“) (Panousis and Rowe, 1997) und S52 durch die Kasein-Kinase-II phosphoryliert werden (Merchant et al., 2001).

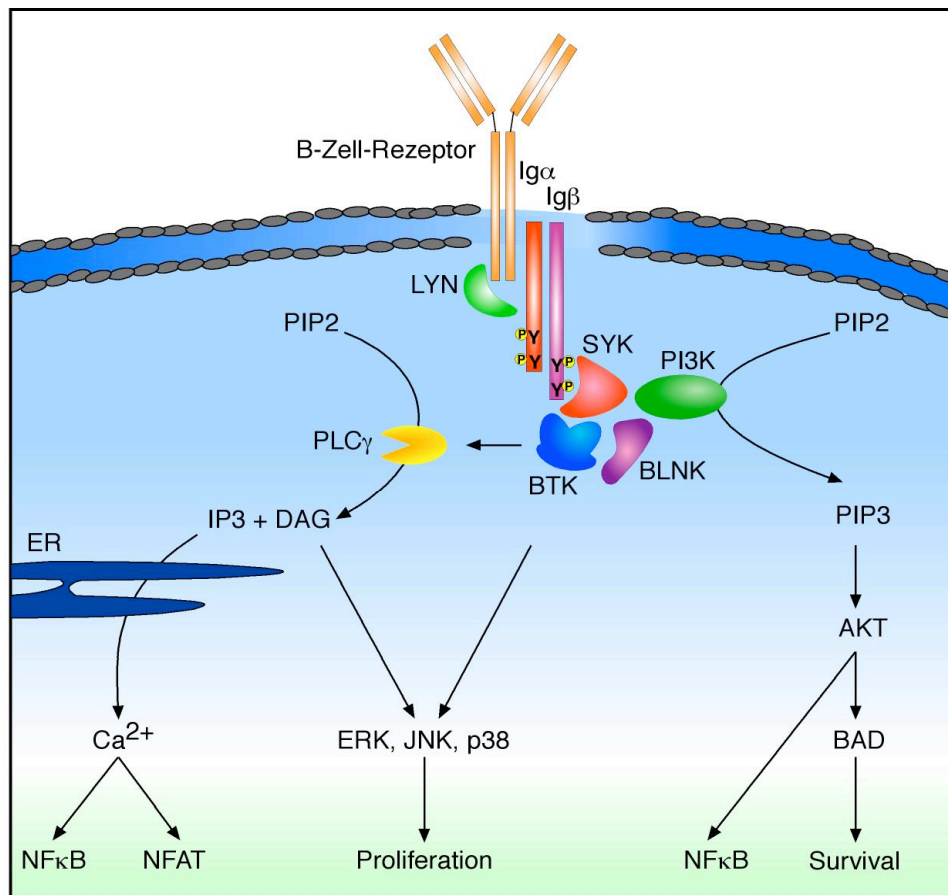
**Prolin-Motive.** Die Aminosäuren 56 - 60 und 97 – 101 können mit Proteinen interagieren, die WW Domänen enthalten. Dazu gehören Proteine der Nedd4-ähnlichen Ubiquitin-Ligase Familie, die LMP2A und assoziierte Proteine ubiquitinieren und damit deren Abbau induzieren (Portis et al., 2004).

Die oben beschriebenen Interaktionen von LMP2A mit Proteinen, die wesentlich in die Signalweiterleitung des B-Zell-Rezeptors involviert sind, legen eine funktionelle Bedeutung von LMP2A für diesen Signalweg nahe. Durch die Struktur scheint LMP2A den B-Zell-Rezeptor zu imitieren. Im Folgenden wird deshalb auf die Signaltransduktion des B-Zell-Rezeptors eingegangen und es wird verdeutlicht, wie LMP2A diese Signaltransduktion antagonistisch und synergistisch modifizieren kann.

### 1.3.2. Signaltransduktion durch den B-Zell-Rezeptor

Der B-Zell-Rezeptor besteht aus schweren und leichten Immunglobulin-(Ig)-Ketten, die mit den Ko-Rezeptoren  $Ig\alpha$  und  $Ig\beta$  (CD79a/b) verbunden sind (Abb. 5). Nach der Quervernetzung der Membran-Immunglobuline durch Antigene kommt es zur Translokation des gesamten Komplexes in Mikrodomänen („lipid rafts“) (Simons and Ikonen, 1997) und zur Phosphorylierung des ITAM-Motifs von  $Ig\alpha$  und  $Ig\beta$  durch LYN. Phosphorylierte Tyrosinreste stellen eine Plattform für Proteine dar, die eine SH2 Domäne beinhalten: SYK bindet an  $Ig\alpha$  und rekrutiert das so genannte Signalosom (Merchant et al., 2001), ein Multiproteinkomplex bestehend aus BLNK („B-cell linker protein“ oder SLP65), Bruton’s Tyrosin-Kinase (BTK) und PI3K. Aktiviertes PI3K inhibiert durch AKT-Kinase-Aktivierung apoptotische Signale oder phosphoryliert Phosphatidol-

Inositol-4,5-Bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) zu Phosphatidol-Inositol-3,4,5-Triphosphat (PIP<sub>3</sub>). Dies wiederum rekrutiert die BTK und infolge dessen wird PLC $\gamma$  aktiviert, welches PIP<sub>2</sub> in Inositol 1,4,5-Trisphosphat (IP<sub>3</sub>) und Diazylglyzerol (DAG) spaltet. IP<sub>3</sub> führt zur Kalzium-Freisetzung, die letzten Endes zur Aktivierung NF $\kappa$ B- und NFAT-abhängiger Promotoren führt. DAG hingegen aktiviert ERK-Kaskaden. Das Signalosom kann auch direkt JNK („c-Jun N-terminal kinase“) abhängige Signale induzieren. All diese Signale stimulieren die B-Zell-Proliferation und weitere Differenzierung. Für die Aktivierung einer B-Zell-Antwort ist zusätzlich noch eine Internalisierung des Antigens notwendig, was zusammen mit dem B-Zell-Rezeptor erfolgt. Das Antigen wird in intrazellulären Kompartimenten als Peptid-MHC-Klasse-II-Komplex formiert, um es T-Helferzellen zu präsentieren und eine Immunantwort zu initiieren. Dies ist die zweite wesentliche Aufgabe des B-Zell-Rezeptors (Pierce, 2002; Watts, 1997).



**Abb. 5: Signaltransduktion des B-Zell-Rezeptors.** Nach Quervernetzung der Membran-Immunglobuline durch Antikörper werden die Ko-Rezeptoren Ig $\alpha$ / $\beta$  phosphoryliert und binden Proteine des Signalosoms. Diese initiieren verschiedene Signalkaskaden, die in der Aktivierung von NF $\kappa$ B-, NFAT-, MAPK-abhängige Promotoren münden.

### 1.3.3. Signaltransduktion durch LMP2A

Im Gegensatz zum B-Zell-Rezeptor benötigt LMP2A keine Ligandenbindung zur Quervernetzung, da es durch die Transmembrandomänen bereits in Homooligomeren vorliegt und damit konstitutiv aktiv ist. In der Literatur wird es vornehmlich als Protein beschrieben, das den B-Zell-Rezeptor-Signalweg blockieren kann. In LCLs können nach einer B-Zell-Rezeptor-Quervernetzung die charakteristischen zellulären Aktivitäten wie Kalzium-Ausstrom, Kinase-Aktivierungen und Tyrosin-Phosphorylierungen nicht mehr beobachtet werden (Miller et al., 1995; Miller et al., 1993). Dieser Effekt bleibt in einer LCL-Population aus, die mit einem rekombinanten EBV infiziert wurde, das kein LMP2A mehr exprimieren kann. Mehrere Beobachtungen versuchen eine mechanistische Erklärung für diese Inhibierung zu liefern: LMP2A verhindert die für die Signalweiterleitung essentielle Translokation des B-Zell-Rezeptors in spezielle Mikrodomänen („lipid rafts“) (Dykstra et al., 2001) und damit die Internalisierung des Antigens. Zudem binden LYN und SYK an LMP2A und werden zusammen mit LMP2A durch Nedd4-ähnliche Protein-Ubiquitin-Ligasen zum proteolytischen Abbau freigegeben (Ikeda et al., 2000). Somit stehen diese Protein-Tyrosin-Kinasen für die Induktion der B-Zell-Rezeptor-Signalwege nicht mehr zur Verfügung. Die Signaltransduktionsaktivität des B-Zell-Rezeptors kann jedoch durch Mutation des Tyrosins 112 in der aminoterminalen Domäne von LMP2A wieder hergestellt werden (Fruehling et al., 1998). In dieser Mutante kann die Protein-Kinase LYN als initialer Schritt nicht an LMP2A binden und Tyrosine innerhalb des ITAM-Motivs trans-phosphorylieren. Die Internalisierung des an den B-Zell-Rezeptor gebundenen Antigens bleibt aber trotz dieser Mutation in LMP2A weiterhin unterbunden (Dykstra et al., 2001). In DNA Microarray-Analysen konnte ein globaler Einfluss von LMP2A auf die zelluläre Genexpression gezeigt werden, von denen auch Gene betroffen sind, die den Zellzyklus und die Apoptose steuern (Portis and Longnecker, 2003). Interessanterweise unterdrückt LMP2A auch die Expression B-Zell-spezifischer Marker (Portis et al., 2003), ein Phänomen, das für HRS-Zellen in Hodgkin-Lymphomen beschrieben wurde (Schwering et al., 2003).

Neben diesen inhibitorischen Funktionen werden LMP2A auch aktivierende Eigenschaften zugeschrieben. Die Entwicklung früher B-Zellen im Knochenmark zu reifen naiven B-Zellen und deren Migration in das periphere Blut ist strikt abhängig von der Expression eines funktionellen B-Zell-Rezeptors. Die Expression von LMP2A in transgenen Mäusen ermöglicht jedoch die Reifung von B-Zell-Rezeptor defizienten B-Zellen im Knochenmark und deren Persistenz im peripheren Blut und in lymphoiden Organen (Caldwell et al., 1998). Dieser Befund stützt die Hypothese, dass LMP2A nicht nur die Funktion eines vorhandenen B-Zell-Rezeptors unterdrückt, sondern sogar die für die Reifung früher B-Lymphozyten nötigen Entwicklungssignale des B-Zell-Rezeptors nachahmt und ein Ausdifferenzieren von frühen B-Lymphozyten auch ohne funktionsfähigen B-Zell-Rezeptor ermöglicht.

Diese molekulare Mimikry von LMP2A, die einer Stimulation des B-Zell-Rezeptors entspricht, entsteht im Wesentlichen durch die konstitutive Aktivierung der PI3K/AKT-Kaskade, die sowohl anti-apoptotisch als auch proliferativ wirkt (Portis and Longnecker, 2004; Scholle et al., 2000; Swart et al., 2000). Durch diese Aktivierung wird zum einen die Konformationsänderung des pro-apoptotisch wirkenden Proteins BAX unterbunden. Somit kann BAX infolge eines apoptotischen Stimulus nicht in die mitochondriale Membran translozieren und die Freisetzung von Cytochrom-C bewirken. Zum anderen wird durch AKT-Kinase die proteolytische Spaltung von BID („BH3 interacting domain“), einem dadurch erst pro-apoptotisch wirkendem Protein, verhindert (Yamaguchi and Wang, 2001). Des Weiteren verstärkt LMP2A signifikant die durch LMP1 induzierten Signalwege, in dem es die Halbwertszeit der Lebensdauer von LMP1 mehr als verdoppelt und damit indirekt anti-apoptotisch wirkt (Dawson et al., 2001).

Die Funktion von LMP2A wurde auch in Epithelzellen untersucht. In der humanen Keratinozyten-Zelllinie HaCaT und in humanen Vorhaut-Fibroblasten (HEF) hat LMP2A transformierende Eigenschaften, inhibiert die Zelldifferenzierung und aktiviert AKT konstitutiv (Scholle et al., 2000). In der HEK-293-Zelllinie wird MAPK, ERK2 und JNK durch die stabile Transfektion mit LMP2A aktiviert (Chen et al., 2002). Die Ausbreitung und Beweglichkeit von Schuppen-Epithelzellen wird durch LMP2A signifikant erhöht

(Allen et al., 2005). In Nasopharynx-Karzinomzellen aktiviert LMP2A mTOR („mammalian target of rapamycin“), einen Proliferations-Mediator (Moody et al., 2005).

Diese weit reichenden Veränderungen in verschiedenen Zelltypen und die Tatsache, dass LMP2A in peripheren Gedächtnis-B-Zellen als einziges, und in verschiedenen EBV-assoziierten Tumoren als konstitutives virales Protein exprimiert wird, lässt ihm eine besondere Bedeutung zukommen. Jedoch konnte bisher nicht eindeutig geklärt werden, welche Rolle LMP2A in der Entstehung und der Aufrechthaltung von EBV-transformierten B-Zellen spielt.

## **1.4. Der Zusammenhang zwischen EBV und HL**

### **1.4.1. Epidemiologie**

Wie bereits erwähnt ist die Ätiologie des Hodgkin-Lymphoms (HL) nicht eindeutig geklärt. Aus verschiedenen Beobachtungen wird ein direkter Zusammenhang mit einer EBV-Infektion vermutet. Eine Erkrankung an der Infektiösen-Mononukleose (IM) birgt ein bis zu fünffach höheres Risiko, HL zu entwickeln (Alexander et al., 2000; Haluska et al., 1994; Hjalgrim et al., 2003). Die durchschnittliche Dauer zwischen der IM-Diagnose bis zum HL beträgt dabei vier Jahre. Hodgkin-Lymphom Patienten weisen erhöhte Antikörper-Titer gegen virale Kapsidantigene auf (Alexander et al., 1995). Die biphasische Risikokurve für Hodgkin-Lymphom im Jugend- und späten Erwachsenenalter (siehe 1.1.2) korreliert mit dem Kontakt zu EBV; akute EBV-Infektionen im Kindes- und Jungendalter bergen das Risiko einer IM und damit von HL. Bei älteren Erwachsenen kann eine verminderte Immunkompetenz – eine natürliche Folge des Alterns – eine erhöhte virale Replikation begünstigen. Dies stellt einen Erklärungsansatz für den hohen Anteil an EBV-assoziierten HL in dieser Gruppe dar (Andersson, 2006). Neben diesen empirischen Hinweisen gibt es jedoch auch eine Reihe direkter Zusammenhänge zwischen EBV und HL, auf die im nächsten Abschnitt eingegangen wird.

### 1.4.2. Molekularbiologische Nachweise

In Europa und Nord-Amerika konnte EBV durch *in situ* Hybridisierungs-Techniken in ungefähr 40% der Fälle in HRS-Zellen nachgewiesen werden (Weiss et al., 1989) (Anagnostopoulos et al., 1989). Diese Prävalenzen unterliegen jedoch geographischen Schwankungen und können in Lateinamerika (Peru und Honduras) zwischen 94 % und 100 % betragen (Ambinder et al., 1993; Chang et al., 1993; Herbst, 1996). Neben den nicht-kodierenden EBERS exprimieren HRS-Zellen nur drei virale Proteine: EBNA1, LMP1 und LMP2A (Deacon et al., 1993; Herbst et al., 1991; Jarrett and MacKenzie, 1999; Rickinson and Kieff, 2001). EBNA1 ist für die Replikation und die Aufrechterhaltung des viralen Genoms zwingend notwendig (Humme et al., 2003; Rickinson and Kieff, 2001). Das einzige EBV-Protein, dem bisher ein direktes onkogenes Potential zugeordnet werden konnte, ist LMP1, das die Zelle mit einem konstitutiven CD40-ähnlichen Signal versorgt (Wang et al., 1985). Dieses vermittelt die Aktivierung der NF $\kappa$ B, MAPK und JAK/STAT Signalwege (Gires et al., 1999; Gires et al., 1997; Kieser et al., 1999; Kieser et al., 1997). Auf die Funktion von LMP2A wurde bereits in Abschnitt 1.3.3 näher eingegangen.

Da in Tumorzellen gewöhnlich ein monoklonaler EBV-Stamm über den gesamten Krankheitsverlauf detektiert wird, ist von einer Infektion bereits vor der malignen Transformation auszugehen (Brousset et al., 1994; Gulley et al., 1994). Tatsächlich konnten retrospektive Studien in HL Patienten vor der Diagnose erhöhte Antikörpertiter gegen EBV (Mueller et al., 1989) sowie eine erhöhte Anzahl infizierter peripherer B-Lymphozyten (Khan et al., 2005) zeigen. EBV-negative und EBV-positive HRS-Zellen in einem Patienten zeigen ein übereinstimmendes Muster an Ig-Rearrangements und somatischen Hypermutationen. Darüber hinaus zeigen EBV-positive HRS-Zellen zusätzliche Mutationen, die sie von ihren EBV-negativen Verwandten oder Vorläufer unterscheiden. Dies beweist, dass die EBV-Infektion vor oder während der Keimzentrumsreaktion erfolgte und dass der Tumor aus infizierten sowie aus nicht-infizierten Keimzentrumzellen hervor geht (Kuppers et al., 2005). Im alternativen Szenario würde EBV in Teilen des Tumors verloren gehen („hit and run“) und nur EBV-

positive Klone könnten weitere Mutationen erlangen. Anderenfalls lässt sich nicht erklären, warum EBV-negative Klone weniger Mutationen anhäufen als EBV-positive Klone (Tinguely et al., 2003).

### **1.4.3. Somatische Hypermutation in den Keimzentren**

Die so genannte Keimzentrumsreaktion in den sekundären lymphatischen Organen spielt bei der Entstehung des HL eine wesentliche Rolle. Die kodierenden Abschnitte der B-Zell-Rezeptorgene naiver B-Zellen werden in den Keimzentren somatisch hypermutiert, um eine höhere Affinität gegenüber dem Antigen zu erlangen (Liu et al., 1989). Dieser Prozess verläuft weitgehend zufällig, so dass die überwiegende Mehrzahl der B-Zellen Immunglobuline tragen, die eine geringere Affinität zu antigenen Epitopen aufweisen. Desweiteren können auch Mutationen eingeführt werden, die eine Verschiebung des Leserasters zur Folge haben. Deletionen oder Insertionen, sowie Unterbrechungen des Leserasters durch ein Stopp-Kodon können ebenfalls dazu führen, dass die B-Zellen nicht mehr in der Lage sind, einen funktionsfähigen B-Zell-Rezeptor an der Oberfläche zu exprimieren. Man spricht in diesem Fall von verkrüppelten („crippling“) B-Zellen. B-Zellen, die einen B-Zell-Rezeptor mit einer geringen Affinität oder überhaupt keinen B-Zell-Rezeptor mehr exprimieren, werden innerhalb weniger Stunden durch apoptotische Abläufe eliminiert (Kraus et al., 2004; Mangeney et al., 1991). Diese negative Selektion geschieht jedoch passiv, da alle Zellen, die in die Keimzentren eintreten, per se pro-apoptotisch werden (Liu et al., 1996). B-Zellen benötigen zum Überleben also einen positiven Stimulus, der durch folliculäre dendritische Zellen über die Antigenpräsentation und durch T-Zellen über CD40-Ligation erfolgt. Erst dann können diese Zellen weiter reifen, den Klassenwechsel durchführen und die Keimzentren verlassen. Ihre Lebensdauer im peripheren Blut kann entweder ein paar Wochen (Antikörper-produzierende Plasmazellen) oder Jahre (Gedächtnis-B-Zellen) betragen.



#### **1.4.4. Verkrüppelte pro-apoptotische B-Zellen**

Erstaunlicherweise werden in ca. 25 % der HRS-Zellen Mutationen in den Immunglobulingenen gefunden, die eine Expression des B-Zell-Rezeptors unmöglich machen (Kanzler et al., 1996; Kuppers, 2002; Kuppers et al., 1994). Diese verkrüppelten pro-apoptotischen Zellen sind der negativen Selektion in den Keimzentren entkommen und stellen damit potentielle Vorläuferzellen für das HL dar. Tatsächlich ist unter physiologischen Bedingungen die Frequenz von B-Zellen mit einem nicht-funktionalen B-Zell-Rezeptor aber wesentlich höher. Zum einen konnte in den Analysen der Küppers Gruppe nur ein Teil der Immunglobulingene sequenziert werden – weitere Mutationen außerhalb der sequenzierten Bereiche sind wahrscheinlich (persönliche Kommunikation Ralf Küppers) – zum anderen können durch diese Methode keine B-Zellen detektiert werden, die einen niedrig-affinen B-Zell-Rezeptor exprimieren. Diese B-Zellen sollten dennoch negativ selektioniert werden (Kanzler et al., 1996). Unter dieser Annahme ist es wahrscheinlich, dass fast alle HRS-Vorläuferzellen der Apoptose in den Keimzentren entgangen sind (Brauninger et al., 2006). Jedoch ist bisher unklar, warum HRS-Zellen diesen wichtigen Kontrollpunkt überlaufen können. Die Infektion mit EBV könnte an dieser Stelle eine entscheidende Rolle spielen.

Eine Zusammenfassung von Fallstudien belegt eine klare Korrelation zwischen diesen verkrüppelten B-Zellen und einer EBV-Infektion: in elf von zwölf klassischen HL-Fällen mit nicht funktionalen Mutationen in den Immunglobulingenen waren die HRS-Zellen EBV-positiv, während in nur 19 von 43 Fälle mit korrekten Immunglobulingenen das Virus nachgewiesen werden konnte (Brauninger et al., 2006). Dieser Befund ist für die Arbeitshypothese dieser Promotion ein zentraler Hinweis. In der folgenden Zielsetzung wird aufbauend auf den Zusammenhang zwischen HL und EBV genauer auf eine nahe liegende Rolle des viralen Proteins LMP2A eingegangen.

## 1.5. Zielsetzung

Ein beträchtlicher Teil der charakteristischen Zellen eines Hodgkin-Lymphoms (HL), die so genannten Hodgkin- und Reed-Sternberg-Zellen (HRS), weisen somatische Hypermutationen auf, die eine Expression des B-Zell-Rezeptors unterbinden. Da solche Zellen normalerweise in den Keimzentren keine positiven Überlebenssignale erhalten, werden sie durch Apoptose negativ selektioniert. Eine Infektion mit EBV und der damit einhergehenden Expression des viralen Proteins LMP2A könnten die Existenz dieser Zellen außerhalb der Keimzentren erklären und zur Entstehung von HL beitragen.

Die fehlenden positiven Überlebenssignale in den Keimzentrumzellen können durch EBV-Proteine, die in HRS-Zellen exprimiert werden, ersetzt werden: während LMP1 in weiten Teilen einem konstitutiven CD40 Rezeptor ähnelt, kommt besonders LMP2A in der Keimzentrumreaktion eine entscheidende Rolle zu. LMP2A ist dem B-Zell-Rezeptor strukturell und funktionell auf mehreren Ebenen homolog. Initiale Proteine des B-Zell-Rezeptor-Signalweges binden das ITAM-Motif von LMP2A und induzieren gleiche Signalwege wie die membrangebundenen Immunglobuline nach Quervernetzung mit einem Antigen. In transgenen Mäusen kann LMP2A die B-Zell-Rezeptor-Expression simulieren. Es ist deshalb wahrscheinlich, dass LMP2A auch in Keimzentrumzellen Rezeptor-proximale Signalkomponenten aktivieren kann, die normalerweise dem B-Zell Rezeptor-Signalweg angehören. Diese molekulare Mimikry könnte demnach die fehlenden B-Zell-Rezeptor-Signale ersetzen und wesentlich zum Überleben der pro-apoptotischen Keimzentrumzellen beisteuern, die keinen oder einen niedrig-affinen B-Zell-Rezeptor exprimieren.

Die Hypothese, ob EBV solche pro-apoptotischen Keimzentrumzellen infizieren und damit ihr Überleben ermöglicht, sollte in meiner Promotionsarbeit beantwortet werden. Darüber hinaus sollte die Frage beantwortet werden, ob LMP2A-Signale in latent infizierten Zellen und damit wahrscheinlich auch in HRS-Zellen, zur Aufrechterhaltung des transformierten Status zwingend nötig sind.

## **2. Material**

## 2.1. Antikörper

anti CD3, APC gekoppelt, Maus IgG2a $\kappa$ (HIT3a)	BD Pharmingen
anti CD19, PE gekoppelt, Maus IgG1 $\kappa$ (HIB19)	BD Pharmingen
anti CD21, APC gekoppelt, Maus IgG1 $\kappa$ (B-ly4)	BD Pharmingen
anti CD77, FITC gekoppelt, Maus IgM $\kappa$ (5B5)	BD Pharmingen
anti Ratte IgG (H+L), Peroxidase gekoppelt, Ziege (polyklonal)	Promega
anti IgA/G/M (H+L), Peroxidase gekoppelt, Ziege (polyklonal)	Dianova
anti lambda, PE gekoppelt, Maus IgG1 $\kappa$ (JDC-12)	BD Pharmingen
anti lambda, Maus IgG1 $\kappa$ (JDC-12)	BD
anti kappa, APC gekoppelt, Maus IgG3 (HP6062)	Caltag Laboratories
anti kappa, Maus IgG1 $\kappa$ (G20-193)	BD Pharmingen
anti IgM, PE gekoppelt, Maus IgG1 (MCA1622)	Serotec
anti IgG (H+L), PE gekoppelt, Ziege F(ab') <sub>2</sub> (IM1626)	Beckman Coulter
anti NGF, PE gekoppelt, Maus IgG1 $\kappa$ (C40-1457)	BD Pharmingen
anti Maus IgG1, Ratte, gekoppelt mit „magnetic Beads“	Miltenyi Biotech
anti FITC Isomer-1, Maus IgG1, gekoppelt mit „magnetic Beads“	Miltenyi Biotech
anti CD3, Maus IgG2a, gekoppelt mit „magnetic Beads“	Miltenyi Biotech
anti IgG + IgM (H+L); Ziege (polyklonal)	Dianova
anti IgG (H+L); Ziege (polyklonal)	Dianova
anti FKBP12, Hase (polyklonal)	Affinity BioReagents
Beriglobin: humanes Immunglobulin (IgG+IgA)	Aventis Behring
Maus IgG3, APC gekoppelt	Caltag Laboratories
Maus IgG1, PE gekoppelt	BD Pharmingen
Maus IgM, FITC gekoppelt	BD Pharmingen
anti LMP2A, Ratte (14B7)	E. Kremmer, GSF
anti EBNA2A/B, Ratte (R3/1E6)	E. Kremmer, GSF

## 2.2. Oligonukleotide

Die Synthesen der verwendeten Oligonukleotide wurden bei der Firma Metabion (München) in Auftrag gegeben. Die Sequenzen der Oligonukleotide sind in 5'-3'-Orientierung angegeben.

R = A oder G

K = G oder T

- Primer für die Amplifikation/Sequenzierung der schweren Immunglobulinketten:

VH1:	CAG TCT GGG GCT GAG GTG AAG A
VH1L:	CTC ACC ATG GAC TGG ACC TGG AG
VH2:	GTC CTR CGC TGG TGA AAC CCA CAC A
VH3:	GGG GTC CCT GAG ACT CTC CTG TGC AG
VH3L:	GAC CCT GTC CCT CAC CTG CRC TGT C
VH3.2L:	ACC ATG GAA CTG GGG CTC CGC TG
VH3-48 in:	CCA ACC CAA CCC TGA CCC TGC AGC
VH3-Leader (GSF):	GTT TGG GCT GAG CTG GGT TTT CCT CG
VH4:	GAC CCT GTC CCT CAC CTG CRC TGT C
VH4L:	CTC CTG GTG GCA GCT CCC AGA T
VH5:	AAA AAG CCC GGG GAG TCT CTG ARG A
VH6:	ACC TGT GCC ATC TCC GGG GAC AGT G
3'JH1.2.4.5:	ACC TGA GGA GAC GGT GAC CAG GGT
3'JH3:	ACC TGA AGA GAC GGT GAC CAT TGT
3'JH6:	ACC TGA GGA GAC GGT GAC CGT GGT
5'JH1.4.5:	GAC GGT GAC CAG GGT KCC CTG GCC
5'JH2:	GAC AGT GAC CAG GGT GCC ACG GCC
5'JH3:	GAC GGT GAC CAT TGT CCC TTG GCC
5'JH6:	GAC GGT GAC CGT GGT CCC TTK GCC
GL front:	AGA GCA GAC TCC AGG GAC G
GL back:	CCA CAC CAA GGT CAT CAT TGT AG
DQ52:	AGA GTG ACT GGC AGG GTT GAG G
DH1:	GTG TGC AGG CCT CRG TCT CTG TG

- Primer für die Amplifikation des LMP2A- und der Aktin-cDNA (RT-PCR)

LMP2A for:	ATG ACT CAT CTC AAC ACA TA
LMP2A back:	CAT GTT AGG CAA ATT GCA AA
Aktin 1:	CAC CCT GTG CTG CTC ACC GAG GCC
Aktin 2:	ACC GCT CGT TGC CAA TAG TGA TGA

## 2.3. Plasmide

Ein Teil der folgenden Plasmide waren bereits in der Arbeitsgruppe vorhanden oder wurden freundlicherweise von anderen Arbeitsgruppen zur Verfügung gestellt. Die mit einem Stern (\*) gekennzeichneten Plasmide wurden im Rahmen dieser Arbeit hergestellt. Die folgende Auflistung gibt alle verwendeten Plasmide als Auszug aus der Datenbank der Abteilung Genvektoren wieder.

p509	pCMV:BZLF1, (Hammerschmidt and Sugden, 1988)
p2670	pCMV:BALF4
p2089	Wildtyp Maxi-EBV: F-Plasmid (pMBO131) mit <i>eGFP</i> Gen und Hygromycin-Resistenzgen in B95.8 DNA (Delecluse et al., 1998)
p2190	wie p2089, Promotor und erstes Exon von LMP2A loxP flankiert
p2525	$\Delta$ LMP2A, Cre Rekombination von p2190new in <i>E. coli</i>
p3233*	pCMV:NGF-R:EMCV-IRES:Cre-Rekombinase
p3232*	pCMV:NGF-R in pCR2.1, NGF-R über PCR aus p92.A amplifiziert

## 2.4. Bakterien

<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	F-, <i>lac</i> -, <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> , $\Delta$ ( <i>lacZYA-argF</i> ), U169, F80d <i>lacZ</i> $\Delta$ M15, <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> (Hanahan, 1985)
<i>E. coli</i> DH10B	F-, <i>mcrA</i> , $\Delta$ ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ), $\Phi$ 80d <i>lacZ</i> $\Delta$ M15, $\Delta$ <i>lacX74</i> , <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>araD139</i> , $\Delta$ ( <i>ara, leu</i> )7697, <i>galJ</i> , <i>galK</i> , $\lambda$ -, <i>rpsL</i> , <i>nupG</i> (GibcoBRL)
<i>E. coli</i> BJ5183	F-, <i>endA</i> , <i>sbcB</i> -, <i>recBC</i> -, <i>galK</i> , <i>met</i> -, <i>str</i> <sup>R</sup> , <i>thi-1</i> , <i>bioT</i> , <i>hsdR</i> ( <i>r<sub>K</sub></i> -, <i>m<sub>K</sub></i> +), $\lambda$ - (Hanahan, 1983)
GM2163	F-, <i>ara-14</i> , <i>leuB6</i> , <i>tonA31</i> , <i>lacY1</i> , <i>tsx-78</i> , <i>supE44</i> , <i>galK2</i> , <i>galT22</i> , <i>hisG4</i> , <i>rpsL136</i> , <i>xyl-5</i> , <i>mt1-1</i> , <i>thi-1</i> , <i>dam-13</i> , Tn9 (Crr), <i>dcm-6</i> , <i>hsdR2</i> , <i>mcrA</i> -, <i>mcrB</i> - (NEB)

## 2.5. Zelllinien

Die verwendeten Zelllinien stammen, wenn nicht anders vermerkt, aus der Sammlung der Abteilung Genvektoren oder wurden im Rahmen dieser Arbeit etabliert (\*).

HEK293	Humane embryonale Nierenepithel-Zelllinie, die durch die Gene E1a und E1b von Adenovirus Typ 5 transformiert wurde (Graham et al., 1977)
Raji	Humane EBV-positive Burkitt-Lymphom-Zelllinie (Pulvertaft, 1964)
KM-H2	Humane Hodgkin-Lymphom Zelllinie aus Pleuralerguss eines 37-Jahre alten Hodgkin-Lymphom Patienten, EBV negativ (Kamesaki et al., 1986)

### 293-Zelllinien, stabil transfiziert mit Maxi-EBV Plasmiden

HEK293/2089	p2089, Wildtyp-LMP2A
HEK293/2190new	p2190new, Promotor/Exon1 von LMP2A loxP flankiert
HEK293/2525	p2525, $\Delta$ LMP2A

## 2.6. Chemikalien, Enzyme, Geräte und sonstiges

Alle hier nicht aufgeführten Chemikalien wurden von der Firma Merck, Darmstadt, in reinsten Form pro analysis bezogen.

### Amixa, Köln

Nucleofector Elektroporationsgerät und Reagenzien

### Beckmann, Heidelberg

Avanti J25 Zentrifuge, L7-55 Ultrazentrifuge, FACS-Calibur

### Becton Dickinson GmbH, Heidelberg

Plastik-Reagenzgefäße, Zellkulturflaschen, FACS Calibur, Antikörper, BrdU Flow Kit

### BioCat, Heidelberg

AnnexinV-Kit

Bio-Rad Lab., Richmond, Calif., USA

Gene Pulser Elektroporationsgerät

Calbiochem GmbH, Frankfurt/Main

Dithiothreitol (DTT), Hygromycin B

Coulter Electronics GmbH, Krefeld

"Particle Counter", Z Serie

Dako Cytomation, Hamburg

MoFlo Zellsortierungsgerät

Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA

Bacto-Agar, Hefeextrakt, Trypton

Eastman Kodak Company, Rochester, N.Y., USA

Röntgenfilme XAR5

Eppendorf Gerätebau, Hamburg

Tischzentrifuge 5415, Reaktionsgefäße verschiedener Größe, BioPhotometer

Eurogentec, Seraing

Goldstar-Polymerase

Genomed, Bad Oeynhausen

Maxi-Präparations-Kit für Plasmidpräparationen (Jetstar)

General Electric Healthcare, München

Hybond™-ECL-Zellulosemembran, ECL-Western Blotting Analysis System

Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, USA

Mighty Small II Gel Elektrophorese Einheit, SemiPhor, Semidry Blottingsystem

Invitrogen GmbH, Karlsruhe

Amphotericin B (Fungizone), fötales Kälberserum, HEPES, 1 Kb DNA-Leiter, L-Glutamin, Lipofectamin Transfektionsreagenz, Natrium-Pyruvat, Optimem I, Penicillin, Streptomycin, Trypsin-EDTA (1x), Trypton, Zellkulturmedium RPMI 1640, Superscript™ III-Reverse Transkriptase Kit, BenchMark Prestained Protein Ladder

Macherey-Nagel, Düren

Nucleobond AX500 Säulen, NucleoSpin Extract II Kit

MBI Fermentas, St. Leon-Rot

Restriktionsenzyme

Merck-Eurolab GmbH

Glyzerin, Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), Ammoniumperoxodisulfat (APS), Essigsäure, Ethidiumbromid, Ethanol, Glucose, Glyzin, Glyzylglyzin, Isopropanol, Kaliumacetat, Kaliumchlorid, Kaliumdihydrogenphosphat, Lithiumchlorid, Magnesiumchlorid, Magnesiumsulfat, Natriumacetat, Natriumchlorid, Natriumdihydrogenphosphat, Natriumdodecylsulfat (SDS), Natrium-Orthovanadat, Salzsäure, Saccharose, Tetramethyldiamin (TEMED), Triton-X-100



Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach

MACS Antikörper, MACS Separationseinheiten

Nunc GmbH, Wiesbaden

Cryotubes 3 ml, Impfösen, Plastikpetrischalen, Zellkulturflaschen, Zellkulturschalen, 96, 48, 24 und 6 Loch Platten

New England Biolabs, Schwalbach

Restriktionsenzyme, DNA modifizierende Enzyme

Pall Gelman Sciences, Dreieich

Acrodisc Syringe Filter, 0,8µm

PE Biosystems, Weiterstadt

PCR-Reaktionsgefäße

Peqlab, Erlangen

Reaktionsgefäße, Elektroporationsküvetten (2 mm Plattenabstand), Elektrophorese-Kammern, dNTPs

Pierce, Rockford

BCA Protein Assay

Promega, Mannheim

Taq-Polymerase, Taq-Puffer, dNTP's

Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

dNTPs, Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS), alkalische Phosphatase, DNase I, RNase I, Klenow-Fragment, Restriktionsenzyme, Random primed DNA labeling kit, cDNA-Synthese-System, Light Cycler, Light Cycler – Fast Start DNA Master SYBR green I

Roth, Karlsruhe

Natriumdodecylsulfat, Phenol, Roti-Block, Acrylamid

Qiagen, Hilden

Polyfect Zelltransfectionsreagenz, RNAeasy Kit, QiaAmp DNA Kit

Sigma Chemie, München

Ampicillin, Bromphenolblau,  $\beta$ -Glyzerophosphat, DMSO, Dithiothreitol (DTT), Glyzin, HEPES, Harnstoff, Kälberthymus-DNA, Lysozym, Natriumfluorid, Natriummolybdat, Natriumorthovanadat, Natriumpyrophosphat, Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), Triton X-100, Monolaurat (Tween-20), Prestained SDS Molecular Weight Marker, Rinderserumalbumin (BSA)

Stratagene, Heidelberg

Robocycler

Schleicher & Schuell, Dassel

Filtereinheit 1,2 µm

Zeiss, Göttingen

Axiovert 10 Fluoreszenzmikroskop, Axiovert 40C

## **3. Methoden**

## 3.1. Bakterienkultur

### 3.1.1. Amplifikation und Lagerung von Bakterien

Bakterien wurden als flüssige Suspensionskultur in LB-Medium oder zur Vereinzelnung von Kolonien auf LB-Agar-Platten kultiviert. Bei Selektion auf Resistenz gegen ein oder mehrere Antibiotika wurde dem LB-Medium Ampicillin (100 $\mu$ g/ml), Chloramphenicol (30 $\mu$ g/ml) oder Kanamycin (30 $\mu$ g/ml) zugegeben. Zur Lagerung von Bakterien über längere Zeiträume wurde eine über Nacht gewachsene Suspensionskultur mit 16% Glycerin versetzt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

LB-Medium: 1 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 0,5 % NaCl

LB-Agar-Platten: 4 % w/v Bacto-Agar

### 3.1.2. Transformation und Elektroporation von Bakterien

#### Transformation

Transformations-kompetente Bakterien-Stämme wurden nach dem Protokoll von Hanahan hergestellt (Hanahan, 1983). Diese kompetenten Bakterien konnten bei -80°C aufbewahrt werden. Für eine Transformation wurden 200  $\mu$ l dieser Bakterien mit der DNA des Ligationsansatzes und 7  $\mu$ l DMSO vermischt und für 90 Sekunden bei 42°C im Wasserbad inkubiert. Die Zellen wurden kurz auf Eis abgekühlt, mit 4 ml SOC-Medium versetzt und einer 60-minütigen phänotypischen Expression bei 37°C ausgesetzt. Die Zellsuspension wurde dann auf LB-Agarplatten unter entsprechender Selektion ausplattiert und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

Alternativ wurde ein schnelles Transformationsprotokoll von Chung et al. verwendet (Chung et al., 1989). Dazu wurden die zu transformierenden Bakterien in 30 ml LB-Medium bis zu einer  $OD_{600}$  von 0,4 angezogen. Diese Kultur wurde bei 3000 rpm ( $4^{\circ}\text{C}$ ) abzentrifugiert und das Pellet in 30 ml eiskaltem TFB-Puffer gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 15 ml TFB-Puffer für 15 min auf Eis inkubiert, abzentrifugiert und in 2,5 ml TFB-Puffer resuspendiert. 200  $\mu\text{l}$  dieser Zellsuspension wurden mit der DNA versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Alle weiteren Schritte erfolgten wie oben beschrieben.

SOC-Medium: 2 % Trypton; 0,5 % Hefeextrakt; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM  $\text{MgCl}_2$ ; 10 mM  $\text{MgSO}_4$ ; 0,2 % Glukose

TFB-Puffer: 10 mM K-Mes (pH 6,2), 50 mM  $\text{CaCl}_2$ , 45 mM  $\text{MnCl}_2$ , 100 mM RbCl

## 3.2. Zellkultur und Analyse von Zellen

### 3.2.1. Zellkulturbedingungen

Alle Zellen und Zelllinien wurden bei  $37^{\circ}\text{C}$  unter einer Atmosphäre von 5 %  $\text{CO}_2$  kultiviert. Das Kulturmedium RPMI 1640 wurde mit 10 % Kälberserum, 100  $\mu\text{g/ml}$  Streptomycin, 100 IE/ml Penicillin, 1 mM Natriumpyruvat und 20  $\mu\text{M}$  Bathocuproindisulfonsäure (BCS) und 0,433 %  $\alpha$ -Thioglyzerol versetzt. Der Selektion und Kultur von stabilen Maxi-EBV 293-Zelllinien wurde 80  $\mu\text{g/ml}$  Hygromycin zur Aufrechterhaltung des episomalen EBV-Plasmids zugesetzt.

#### Adhärente Zelllinien

Die adhärente Zelllinie HEK-293 wurde in RPMI 1640 Kulturmedium mit den angegebenen Zusätzen vermehrt und alle 2 bis 3 Tage 1:6 verdünnt. Zum Ablösen von adhären Linien wurde den Zellen 2 ml Trypsin zugesetzt. Nach kurzer Inkubation wurden die Zellen ab gespült und (ein Teil) in frisches Vollmedium überführt.

### **3.2.2. Aufbewahrung von Zellen**

Zellen können in einem Gemisch aus 10 % DMSO und 90% FKS in flüssigem Stickstoff eingefroren und unbegrenzt gelagert werden. Um die Zellen ( $10^7$  Zellen pro 2 ml-Gefäß von NUNC-Cryotub) schonend abzukühlen, wurden sie in einer Einfrierbox (NUNC) mit Isopropanolmantel auf  $-80^{\circ}\text{C}$  abgekühlt. Die längere Lagerung der Röhrchen erfolgte in flüssigen Stickstoff. Zur Wiederverwendung wurden die Zellen in einem  $37^{\circ}\text{C}$  warmen Wasserbad schnell aufgetaut, in 30 ml vorgewärmten Kulturmedium gewaschen und in ein Kulturgefäß mit frischem Medium überführt.

### **3.2.3. Präparation primärer B-Zellen**

Humane primäre B-Zellen wurden aus Adenoiden gewonnen, die aus Routineentnahmen stammen. Durch mechanisches Zerkleinern und anschließendes Filtrieren durch ein Zellsieb ( $100\ \mu\text{m}$  Porengröße) konnte aus diesen Geweben eine Einzel-Zellsuspension hergestellt werden. Die Rosettierung von T-Zellen erfolgte durch die Zugabe von 0,5 ml Schafsblut für 15 min bei Raumtemperatur. Anschließend wurden 15 ml eines 30 %-igen Ficoll-Gradienten (Ficoll-Dichte 1.077) mit 35 ml dieser Zellsuspension überschichtet. Die B-Zellen wurden durch eine Zentrifugation bei 1850 rpm (750g) für 45 min bei  $15^{\circ}\text{C}$  aufgereinigt. Die Interphase des Gradienten wurde abgenommen und Ficollreste durch dreimaliges fraktioniertes Waschen der Zellen (Zentrifugationen: 1700 rpm, 1500 rpm, 1200 rpm, je 7 min bei  $15^{\circ}\text{C}$ ) mit PBS entfernt. Anschließend wurden die primären B-Zellen in Kulturmedium resuspendiert und meist direkt verwendet. Die Zellen können auch über Nacht auf Eis (in 50 % FKS / 50 % Kulturmedium) aufbewahrt und am nächsten Tag für Experimente eingesetzt werden.

### **3.2.4. Separation B-Zell-Rezeptor-negativer Keimzentrums-B-Zellen**

Die Abreicherung B-Zell-Rezeptor-positiver Zellen erfolgte über die MACS-Technologie mit magnetisch gekoppelten Antikörpern („magnetic Beads“) der Firma Miltenyi (Bergisch Gladbach). Alle Schritte erfolgten bei  $4^{\circ}\text{C}$  und ausschließlich mit frisch isolierten B-Zellen, da die Zielpopulation pro-apoptotisch ist. Dabei wurden  $1,2 \times 10^8$  B-

Zellen in 500  $\mu$ l PBS / 2 % FKS resuspendiert und mit je 1,5  $\mu$ g Antikörper gegen die lambda und kappa leichte Immunglobulinkette (BD Pharmingen) für 15 min auf Eis inkubiert, danach gewaschen und wieder in 500  $\mu$ l PBS / 2 % FKS aufgenommen. Die Inkubation mit 35  $\mu$ l mit magnetischen „Beads“ gekoppelten  $\alpha$ -Maus IgG1 Antikörper (Miltenyi) erfolgte für 20 min im Kühlschrank, wobei die Suspension alle 5 min geschüttelt wurde, um ein Absinken der gekoppelten Antikörper zu verhindern. Nach 10 min wurden 35  $\mu$ l magnetisch gekoppelter  $\alpha$ -CD3 Antikörper (Miltenyi) hinzugefügt. Nach dem erneuten Waschen wurden die Zellen in 800  $\mu$ l PBS / 2 % FKS aufgenommen und in 200  $\mu$ l Portionen abwechselnd mit je 200  $\mu$ l PBS / 2 % FKS auf eine LD Separationssäule (Miltenyi) im magnetischen Feld geladen. Nicht gebundene Zellen wurden im magnetischen Feld mit 5 ml PBS / 2 % FKS von der Säule gewaschen. Der Durchfluss wurde abzentrifugiert, in 800  $\mu$ l aufgenommen und wie oben beschrieben auf eine neue Säule geladen. Der zweite Durchfluss wurde abzentrifugiert, in 500  $\mu$ l PBS / 2 % FKS resuspendiert und durch Inkubation mit 20  $\mu$ l FITC gekoppelten  $\alpha$ -CD77 Antikörper (BD Pharmingen) auf den Keimzentrumsmarker gefärbt. Als Sekundärantikörper zur Anreicherung dienten 50  $\mu$ l magnetisch gekoppelte  $\alpha$ -FITC Antikörper (Miltenyi, Bergisch Gladbach). Auf der LD Säule gebundene Zellen wurden mit 6 ml PBS / 2 % FKS außerhalb des magnetischen Feldes eluiert. Diese Fraktion enthält BCR-negative Keimzentrums-B-Zellen, die mit verschiedenen Virusmutanten infiziert wurden.

### **3.2.5. Messung der Zellproliferation: BrdU-Einbau**

Proliferierende Zellen bauen während der S-Phase das Nukleotidanalogen Bromdesoxyuridin (BrdU) in replizierende genomische DNA ein. Dieses inkorporierte BrdU wird über spezifische und Allophycocyanin (APC) gekoppelte Antikörper (BD Pharmingen) im FACS-Gerät detektiert. Die Inkubation von  $3 \times 10^5$  Zellen mit 10  $\mu$ M BrdU erfolgte in 6-Loch-Platten für zwei Stunden im Inkubator bei 37°C. Anschließend wurden die Zellen bei 300 x g abzentrifugiert, in 1 ml PBS gewaschen und entsprechend den Angaben des Herstellers weiter bearbeitet.

### 3.2.6. Messung der Apoptose: AnnexinV-Färbung

Während des „programmierten Zelltodes“ (Apoptose) wird Phosphatidylserin (PS) von der inneren Seite der Membran auf die äußere transloziert, welches dann von AnnexinV gebunden werden kann. Die Färbung erfolgte nach Angaben des Herstellers (BioCat, Heidelberg) und die Detektion des Cy5-gekoppelten AnnexinV im FACS-Gerät.

### 3.2.7. Bestimmung der Zellzahl

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit Hilfe eines Partikelzählers der Firma Coulter nach Angaben des Herstellers. Eine sehr genaue und konstante Messung der Zellzahl erfolgte alternativ mit Hilfe von Kalibrations-Kügelchen (BD Pharmingen) im FACS-Gerät. Einem definierten Zellvolumen wurde eine konstante Menge APC-gekoppelte Kalibrierungs-Kügelchen zugegeben, die im FACS-Gerät anhand ihrer Größe, Granularität und der APC-Färbung von Zellen unterschieden werden konnten. Das Gerät wurde so eingestellt, dass die Messung nach Durchfluss der Hälfte der eingesetzten Kügelchen stoppte. Die im Lymphozyten-Fenster gezählten Zellen ergaben anteilig die absolute Zellzahl der entnommenen Population.

### 3.2.8. PEI-Transfektion

293-Zellen wurden chemisch mit Poly-Ethylen-Imin (PEI) transfiziert. Dazu wurden  $2 \times 10^5$  Zellen pro Loch in einer 6-Loch-Platte in Medium ohne Selektion ausplattiert. Am nächsten Tag wurde das Medium abgesaugt und 2 ml Optimem (ohne Zusätze) zugegeben. Pro Loch wurde folgender Ansatz verwendet:

Lösung A: 100  $\mu$ l Optimem + 1  $\mu$ g zu transfizierende DNA

Lösung B: 100  $\mu$ l Optimem + 4  $\mu$ l PEI (1 mg / ml)

Beide Lösungen wurden gemischt, für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert und dann auf die Zellen gegeben. Nach 4 bis 6 Stunden wurde das Transfektionsreagenz abgesaugt und 3 ml frisches Medium (ohne Selektion) zugegeben.

### 3.2.9. Produktion infektiöser Viruspartikel und Titerquantifizierung

Zur Produktion von Viruspartikeln wurden  $2 \times 10^5$  stabile 293-Maxi-EBV-Zellklone pro Loch in einer 6-Loch-Platte ausgesät. Am folgenden Tag wurden sie mit den Expressionsplasmiden für BZLF1 (p509; 250 ng/Loch) und BALF4 (p2670; 250 ng/Loch) nach dem PEI Protokoll (3.2.8) transfiziert, um den lytischen Zyklus zu induzieren. Nach dreitägiger Kultivierung im Brutschrank wurden die Überstände abgenommen und filtriert (Porengröße  $1,2 \mu\text{m}$ ), um Zelltrümmer abzutrennen. Zur Quantifizierung dieser Überstände wurden  $3 \times 10^5$  Raji-Zellen mit 1 ml Kulturüberstand für vier Tage bei  $37^\circ\text{C}$  in 24-Loch-Platten inkubiert. Danach wurden die Zellen in PBS gewaschen und die Frequenz GFP-positiver Zellen durch FACS-Messungen bestimmt. Auf Basis dieser Daten konnten „grüne Raji-Einheiten“ (GRE) pro ml Kulturüberstand als Maß für die absolute Zahl infektiöser EBV-Partikel definiert werden.

### 3.2.10. Konzentration von Virusüberständen

Für Experimente, die eine Viruskonzentration  $> 1 \times 10^5$  benötigten, wurde der Virusüberstand in einer Ultrazentrifugation (4 Stunden;  $17000 \times g$ ;  $4^\circ\text{C}$ ; SW28-Rotor, Beckman Coulter) aufkonzentriert. Das Viruspellet wurde in  $1/10$  des Ausgangsvolumens aufgenommen und über Nacht bei  $4^\circ\text{C}$  zur vollständigen Resuspension inkubiert. Die Titerquantifizierung erfolgte wie oben (3.2.9) beschrieben.

### 3.2.11. FACS-Analysen

#### Nachweis von Oberflächenmolekülen

Für die Detektion eines Oberflächenmoleküls wurden die Zellen, wenn nicht anders angegeben, in PBS / 2 % FKS gewaschen und in  $50 \mu\text{l}$  PBS / 2 % FKS resuspendiert. Die Färbung mit den jeweiligen Antikörpern (primäre Antikörper 1:50 verdünnt; sekundäre Antikörper 1:150 verdünnt) erfolgte für 15 min auf Eis im Dunkeln. Danach wurden die Zellen gewaschen und für die Messung in  $300 \mu\text{l}$  PBS resuspendiert. Als Negativkontrolle wurden Zellen anstelle des spezifischen Erstantikörpers mit einem irrelevanten Antikörper gleichen Isotyps oder nur mit Sekundärantikörper inkubiert.



### Propidium Iodid (PI) und 7-Amino-Actinomycin D (7AAD) Färbung

Propidiumiodid (PI) oder 7-Amino-Actinomycin D (7AAD) lagert sich in die DNA ein und kann im FACS-Gerät zum Fluoreszieren angeregt werden. In unbehandelten Zellen können lebende von toten Zellen unterschieden werden, denn diese Farbstoffe dringen nur in tote Zellen ein, deren Membran permeabilisiert ist. Bei fixierten und permeabilisierten Zellen korreliert die Intensität der Fluoreszenz mit dem DNA-Gehalt der Zelle. Proliferierende Zellpopulationen besitzen zwei Spitzen in der Fluoreszenz. Der erste wird von Zellen in der G1-Phase gebildet, der zweite in doppelter Intensität von Zellen, die sich in der G2-Phase befinden. Apoptotische Zellen oder Zelltrümmer haben einen „sub-G1-peak“ mit einer geringeren Fluoreszenz als die Zellen in der G1Phase.

## **3.3. DNA-Arbeitstechniken**

Die Anwendung allgemein üblicher Techniken, die im Umgang mit Nukleinsäuren benutzt wurden, wie z.B. Protein- und DNA-Konzentrationsbestimmungen im Spektralphotometer, Ethanolpräzipitation, Auftrennung bzw. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen, Phenolextraktion, enzymatische Restriktionshydrolyse, Behandlung von DNA-Fragmenten mit Klenow-Polymerase oder T4-DNA-Polymerase, Dephosphorylierung von DNA mit alkalischer Phosphatase, Ligierung freier DNA-Enden, Präparation von Plasmid-DNA über alkalische Lyse usw. erfolgte in Anlehnung an Standardprotokolle (Sambrook et al., 1989).

### **3.3.1. Extraktion zellulärer DNA/RNA aus eukaryotischen Zellen**

Die Aufreinigung genomischer und episomaler EBV-DNA erfolgte unter Verwendung der DNeasy DNA-Adsorptionssäulen (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers.

Die Aufreinigung zellulärer RNA erfolgte unter Verwendung des Trizol-Protokolls der Firma Invitrogen nach Angaben des Herstellers.

### 3.3.2. Präparative Plasmidreinigung

#### TENS-Lyse: Schnelle Aufreinigung von Plasmiden < 20kb

Diese Methode liefert schnell DNA in einer Qualität, die eine Sequenzierung erlaubt. Ausgegangen wird von 2 ml einer stationär gewachsenen Kultur, die bei 1500 x g abzentrifugiert wurde. Das Pellet wurde in 300  $\mu$ l TENS-Puffer resuspendiert und anschließend mit 150  $\mu$ l 3 M NaAc (pH 5,0) neutralisiert. Zelltrümmer wurden bei 16000 x g abzentrifugiert, um den plasmidhaltigen Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführen zu können. Die Plasmide wurde mit 900  $\mu$ l Ethanol (96 - 100 %) gefällt und in 80 %-igen Ethanol gewaschen. Überschüssiges Ethanol wurde in der Vakuumzentrifuge für 3 bis 4 min verdampft. Das DNA-Pellet wurde in 50  $\mu$ l TE + RNase (10 $\mu$ g/ml) gelöst.

TENS-Puffer: 10 mM Tris (pH 8); 1 mM EDTA; 100 mM NaOH; 0.5 % SDS

#### Plasmide < 20 kb

Die präparative Plasmidreinigung aus einer stationär gewachsenen 400 ml Kultur erfolgte mit Hilfe von DNA-Adsorptionssäulen nach Angabe des Herstellers (Genomed). Die eluierte DNA wurde mit 0,7 Vol Isopropanol gefällt und TE-Puffer aufgenommen.

#### Endotoxin-freie Plasmide < 20 kb

Endotoxin (Lipopolysaccharid, LPS) aus *E. coli* kann sowohl die Transfektionseffizienz in einigen Zelllinien signifikant reduzieren als auch unspezifische Immunantworten in B-Zellen auslösen. Aus diesem Grund wurden Plasmide, die für Transfektionen vorgesehen waren, mit dem Endofree Pasmid Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers präpariert. Hierzu wurde von 400 ml einer stationär gewachsenen Kultur ausgegangen.

#### Plasmide > 20 kb (Maxi-EBV)

EBV-Plasmid-DNA wurde mit Nucleobond AX500 Säulen der Firma Macherey-Nagel (Düren) nach Angaben des Herstellers gewonnen. Hierzu wurde von 400ml einer stationär gewachsenen Kultur ausgegangen.

### 3.3.3. PCR-Analysen der Immunglobulingene

Die PCR-Amplifikation der Immunglobulingene erfolgte durch eine zweistufige „nested PCR“ nach einem leicht modifizierten Protokoll der Gruppe von R. Küppers (Uni Essen). Die „Taq“ DNA-Polymerase, der dazugehörige Puffer und die dNTP's wurden von der Firma Promega bezogen. Eine graphische Darstellung der relativen Bindestellen der einzelnen Oligonukleotide findet sich in der Abbildung 12.

#### Erste Runde

Chromosomale DNA	200ng
Taq-Puffer (10x)	5 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	5 $\mu$ l
Primer-Mix (s.u.)	10 $\mu$ l
dNTP's (10 mM)	2 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	ad 49 $\mu$ l

Dieser Ansatz wurde für 2 min auf 95°C erhitzt und dann mit 1  $\mu$ l Taq-Polymerase versetzt. Das Primer-Gemisch beinhaltet alle VH (VH1-6) und alle 3'-JH Oligonukleotide in einer Konzentration von je 5  $\mu$ M gelöst in 10 mM Tris-HCL. Für die Amplifikation wurde folgendes Programm gewählt:

72°C	60 sek	} 34x
95°C	50 sek	
60°C	30 sek	
72°C	60 sek	
72°C	5 min	
4°C		

#### Zweite Runde:

Nach Beendigung der ersten PCR-Runde wurden 10  $\mu$ l für ein analytisches Agarose-DNA-Gel entnommen. Bei erfolgreicher Amplifikation (300 bis 400 bp Bande) wurden 5  $\mu$ l aus diesem Ansatz für die zweite Runde eingesetzt, die in sechs Ansätze (ein Ansatz pro VH Oligonukleotid) aufgeteilt wurde:

DNA (aus Runde 1)	5 $\mu$ l	
Taq-Puffer (10x)	5 $\mu$ l	
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	3 $\mu$ l	(gilt nur für VH 2-6; 5 $\mu$ l für VH1)
VH-Primer (2,5 $\mu$ M)	5 $\mu$ l	
JH-Primer-Mix (2,5 $\mu$ M)	5 $\mu$ l	
dNTP's (10 mM)	2 $\mu$ l	
Taq-Polymerase	1 $\mu$ l	
H <sub>2</sub> O	ad 50 $\mu$ l	

Durch die Auftrennung in sechs einzelne PCR-Reaktionen in der zweiten Runde konnte einem bestimmten Klon seine jeweilige  $V_H$ -Genfamilie zugeordnet werden, denn normalerweise generierte nur ein Ansatz eine spezifische, 300 bis 400 bp lange Bande. Diese wurde über ein präparatives Agarose-DNA-Gel präpariert und in den Vektor pCR2.1 (Invitrogen) nach Angaben des Herstellers ligiert. Die Sequenzierung wurde nach Amplifikation der Bakterien von der Firma Sequiserve (Vaterstetten) durchgeführt.

### 3.3.4. Reverse Transkriptase (RT)-PCR der LMP2A Transkripte

Jeweils 0,5  $\mu\text{g}$  gesamtzelluläre RNA der mit EBV infizierten primären humane B-Lymphozyten wurde mit 50 ng „Random Hexamers“ Oligonukleotiden 5 min lang bei 65°C denaturiert und sofort auf Eis gestellt. Die Elongationsreaktion mit Superscript-II-Reverse Transkriptase (Invitrogen) erfolgte nach Angaben des Herstellers. In die anschließenden PCR-Reaktionen wurden 2  $\mu\text{l}$  aus 20  $\mu\text{l}$  des RT-Reaktionsansatzes eingesetzt. Um Kontaminationen der RNA-Präparation mit genomischer DNA zu kontrollieren, wurden zusätzlich 0,5  $\mu\text{g}$  RNA der Zelllinien in der PCR-Reaktion ohne vorherige Umschreibung in cDNA getestet.

### 3.3.5. „real-time“-PCR

Diese Methode erlaubte eine quantitative Bestimmung der Kopienzahl an 2190 bzw. 2525 Episomen in den HTNC Protein-transduzierten LCLs (Abschnitt 4.8). Standardreihen wurden mit definierten Mengen (1 pg, 100 fg, 10 fg, 1 fg) des jeweiligen Episoms, sowie 10 ng chromosomaler DNA der B-Zelllinie DG75 als DNA-Hintergrund mit der „real time“ PCR in einem „light cycler“ (Roche) kalkuliert. Zur quantitativen Abschätzung der 2190 bzw. 2525 Episome in LCLs wurden je 100 ng chromosomaler DNA der transduzierten LCLs in folgendem PCR-Ansatz verwendet:

DNA	1 $\mu\text{l}$	
MgCl <sub>2</sub> (25 mM, Roche)	0,6 $\mu\text{l}$	
Primer-Mix	1 $\mu\text{l}$	(1:1 Gemisch „LMP2A back“ und „LMP2A for“; je 5 $\mu\text{M}$ )
Polymerase-Mix (Roche)	1 $\mu\text{l}$	(enthält dNTP's, „hot-start“-DNA-Polymerase, CYBR-green I)
H <sub>2</sub> O	6,4 $\mu\text{l}$	

Die PCR-Reaktion bestand aus fünf Segmenten:

Segment	Temperatur	Zeit (sek)	Slope (°C/sek)	Detektion
A	95°C	600	20	-
B	95°C	5	20	-
	68°C	10	20	-
	72°C	12	20	single
C	95°C	0	20	-
	67°C	10	20	-
	72°C	12	20	-
D	97°C	0	20	-
	70°C	10	20	-
	97°C	0	0,15	kontinuierlich
E	20°C	3	20	-

### 3.4. Proteinarbeitstechniken

#### 3.4.1. Immunoblot Analyse

##### Immunoblot gegen die schweren und leichten Immunglobulinketten

10<sup>7</sup> Zellen pro Ansatz wurden in 50 µl eiskaltem RIPA-Puffer resuspendiert und 15 min auf Eis inkubiert. Zelltrümmer wurden abzentrifugiert (16000 x g, 4°C) und das Proteinrohlysat wurde in einem neuen Reaktionsgefäß mit 200 mM Dithiothreitol (DTT) versetzt. Vor dem Beladen auf ein 10 %-iges SDS-Gel wurde das Lysat mit SDS-Probenpuffer vermengt und 5 min aufgeköcht. Die aufgetrennten Proteine wurden mit Hilfe des „SemiPhor“-Elektroblotsystems von Hoefler auf eine Hybond-ECL-Membran (Amersham) transferiert. Der Transfer erfolgte bei 300 mA innerhalb von 42 min. Die Membran mit den gebundenen Proteinen wurde eine Stunde lang in Rotiblock (Roth) geschwenkt, um unspezifische Proteinbindungsstellen abzusättigen. Anschließend wurde die Membran dreimal in PBST für je 5 min gewaschen, dann für zwei Stunden in PBST mit dem Antikörper (α-IgA/G/M (H+L); Dianova, Hamburg; Verdünnung 1:5000) gegen die schwere und leichte Immunglobulinkette bei Raumtemperatur inkubiert.

Überschüssiger Antikörper wurde durch dreimaliges Waschen in PBST entfernt. Da der verwendete Antikörper direkt mit dem Enzym Meerrettich-Peroxidase gekoppelt war, konnte der Blot direkt entwickelt werden (ECL-Reagenz, Amersham).

RIPA-Puffer: 150 mM NaCl; 0,1 % SDS; 0,5 % Deoxycholat; 1 % Triton; 50 mM Tris (pH 8); PMSF (1:1000 Verdünnung einer in 2-Propanol gesättigten Lösung; immer frisch zugeben)

PBST: PBS; 1 % Triton

### EBNA2 Immunoblot

Für diese Analyse wurden ebenfalls die oben beschriebenen RIPA-Lysate verwendet und analog auf eine Hybond-ECL-Membran transferiert. Der Primär-Antikörper bestand aus einer 1:1 Mischung aus zwei Hybridom-Überständen (R3/1E6), die mit der die Membran in einer 1:100 Verdünnung in 1 % Magermilch bei 4°C über Nacht inkubiert wurde. Überschüssiger Antikörper wurde durch dreimaliges Waschen in PBST entfernt, bevor der Zweitantikörper ( $\alpha$ -Ratte-HRP, 1:10000, Dianova) in 1 % Magermilch für zwei Stunden bei Raumtemperatur zugegeben wurde. Die Entwicklung erfolgte nach dreimaligem Waschen in PBST mit Hilfe des ECL-Reagenz (Amersham).

## **4. Ergebnisse**

Im Zentrum dieser Arbeit stand die Aufklärung einer pathophysiologischen Konstellation, wie sie in Hodgkin-Lymphomen angetroffen wird. Dabei war die Schnittstelle zwischen B-Zellen während ihrer Differenzierung und der Infektion mit Epstein-Barr Virus von besonderem Interesse. Folgende Fragen sollten durch experimentelle Untersuchungen beantwortet werden: Gibt es einen viralen Beitrag, der das Überleben „verkrüppelter“ HRS-Zellen fördert? Ist es möglich, „verkrüppelte“ B-Zellen, die normalerweise negativ selektioniert werden, *in vitro* mit EBV zu infizieren und damit vor der Apoptose zu retten? Welche Rolle spielt LMP2A bei diesem Prozess?

Die Untersuchungen beruhen methodisch auf Keimzentrums-B-Zellen, die aus nasalen Adenoiden (umgangssprachlich Polypen) gewonnen wurden. Keimzentrums-B-Zellen, die keinen B-Zell-Rezeptor exprimieren, sollten aus diesen sekundären lymphatischen Geweben isoliert und mit Wild-Typ (WT) EBV sowie mit einer LMP2A-negativen Virus-Mutante infiziert werden. Sollte LMP2A fehlende Überlebenssignale ersetzen können und damit eine essentielle Rolle bei der Wachstums-Transformation dieser pro-apoptotischen Zellen spielen, dann würden in einem entsprechenden experimentellen Ansatz nur Zellen überleben, die mit WT-EBV infiziert wurden. B-Zellen, die mit einem LMP2A-negativen Virus infiziert sind, dürften nicht proliferieren, da ein Überlebenssignal weder vom B-Zell-Rezeptor noch von LMP2A ausgehen kann.

Um eindeutig zu zeigen, dass WT-EBV auch solche Zellen *in vitro* transformieren kann, die als pro-apoptotische Zellen keinen B-Zell-Rezeptor exprimieren können, sollten die Immunglobulingene sequenziert werden. Das erwartete Ergebnis lag im Nachweis von Mutationen in den Immunglobulingenen, die zu einem vorzeitigen Translationsstopp führen.

Um die Rolle der LMP2A-Expression für die Proliferation etablierter LCLs zu untersuchen, sollten B-Zellen mit einer EBV-Mutante infiziert werden, deren erstes LMP2A-Exon von zwei loxP Sequenzen flankiert ist. Die transiente Expression der ortsspezifischen Rekombinase CRE führt zur Deletion des relevanten ersten Exons des LMP2A-Gens. Der Phänotyp der LMP2A-negativen Zellen lässt Rückschlüsse auf die Bedeutung von LMP2A für das Überleben und die Proliferation der B-Zellen zu.

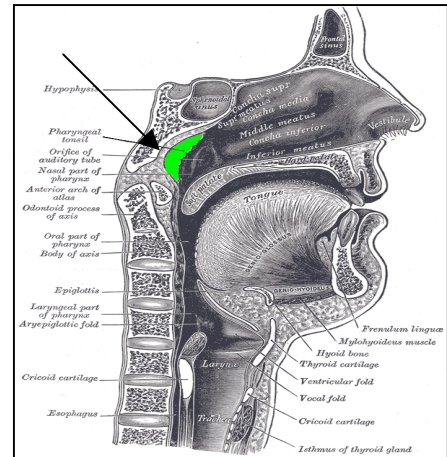


## 4.1. Isolation BZR-negativer Keimzentrums-B-Zellen

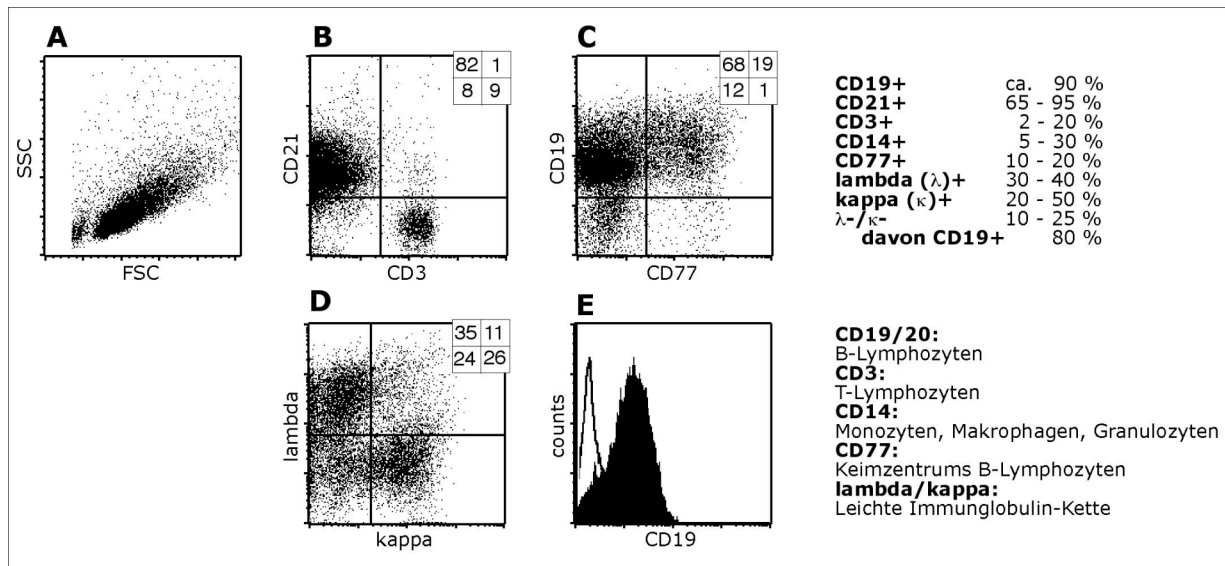
Alle B-Zellen, die in dieser Arbeit verwendet wurden, wurden wie in Abschnitt 3 beschrieben aus Adenoiden (Tonsilla pharyngealis) gewonnen. Diese lymphatischen Gewebe befinden sich im hinteren, oberen Rachenraum (Nasopharynx, Abb. 6) und sind im Kindesalter am ausgeprägtesten. Bei akuten Entzündungen können sie sich stark vergrößern, so dass sie die Atmung beeinträchtigen können und dann in Form einer Adenoidektomie entfernt werden müssen.

Lymphozyten, die aus solchen Adenoiden isoliert wurden, wurden an Hand ihrer Oberflächenmarker auf ihren Immunphänotyp im FACS-Gerät untersucht: Es

handelte sich überwiegend (65 bis 95 %) um B-Lymphozyten (Abb. 7 B-C), jedoch waren diese Präparationen gelegentlich mit bis zu 20 % T-Lymphozyten (Abb. 7 B) selbst nach Abreicherung durch Schafs-Erythrozyten-Rosettierung und 30 % Monozyten, Makrophagen und Granulozyten (Daten nicht gezeigt) kontaminiert. Bei der Charakterisierung der B-Zellen wurde besonderes Augenmerk auf die Expression der leichten Immunglobulinketten (leichte Kette, LK) lambda ( $\lambda$ ) und kappa ( $\kappa$ ) gelegt, an Hand derer drei deutlich getrennte Populationen detektiert werden konnten. Eine  $\lambda^+$ , eine  $\kappa^+$  und eine Subpopulation, die weder  $\lambda$  noch  $\kappa$  detektierbar exprimierte (Abb. 7 D). In der Drei-Farben-Analyse erkennt man, dass in der doppelt-negativen Fraktion ca. 80 % der Zellen B-Zell-spezifische Marker exprimierten (Abb. 7 D-E: 82% CD19<sup>+</sup>). Daneben befanden sich T-Zellen und Makrophagen in dieser  $\lambda^- \kappa^-$  Fraktion (Daten nicht gezeigt). Die Tabelle in Abbildung 7 gibt Durchschnittswerte an, denn abhängig vom Spender schwankten die Ergebnisse einzelner Präparationen erheblich.



**Abb. 6: Tonsilla pharyngealis.** Die verwendeten Adenoide (grün) liegen im Rachenraum und sind durch einen Pfeil gekennzeichnet.

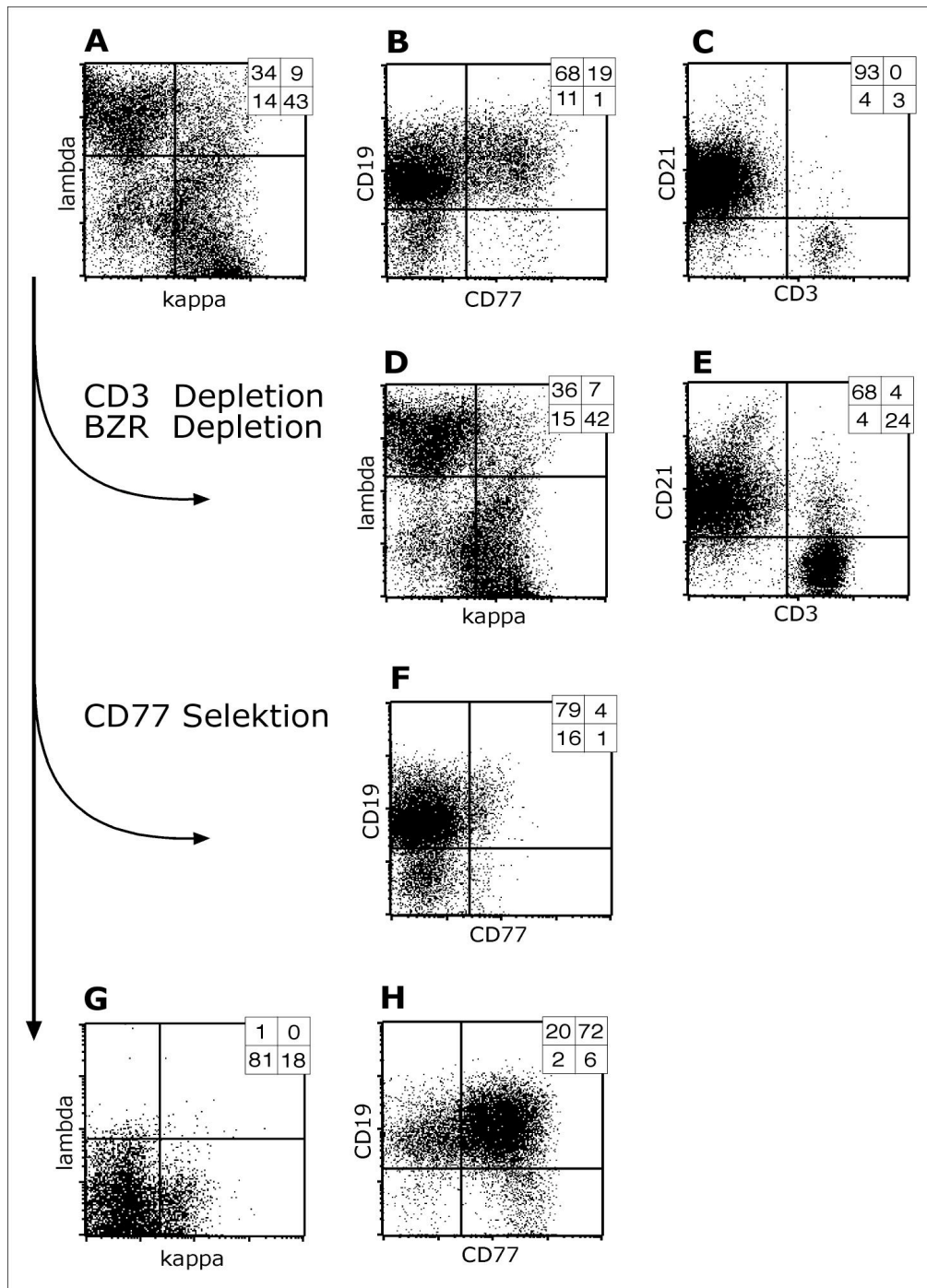


**Abb. 7 : Immunphänotyp isolierter Lymphozyten.** Die im Größen- und Granularitätskriterium (FSC und SSC) aufgetragenen Zellen (A) zeigen eine einheitliche Morphologie und setzen sich zu 80 % aus B-Zellen (B-C), zu 10 % aus T-Zellen (B) und zu 10 % aus Monozyten (nicht gezeigt) zusammen. 20% der B-Zellen sind CD77<sup>+</sup> (C). Der linke untere Quadrant der LK-Analyse zeigt die BZR-negative Zielpopulation (D). Die genauere Betrachtung dieser Zellen zeigt, dass sie zu ca. 80 % den B-Zellmarker CD19 exprimieren (E).

Ziel dieser Arbeit in diesem Abschnitt war es, aus einer heterogenen Population Rezeptor-negative B-Lymphozyten durch Infektion mit EBV und anschließender Endpunktverdünnungen Einzel-Zellklone mit einer größtmöglichen Heterogenität zu generieren. Die B-Zell-Rezeptor-negative (BZR<sup>-</sup>) Zielpopulation sollte mit Hilfe der MACS-Technologie angereichert werden, indem alle BZR<sup>+</sup> Zellen durch die Verwendung von Antikörpern mit Spezifität für die leichten Ketten (LK) des Immunglobulin-Oberflächenmoleküls abgereichert wurden. Die in einem Pilot-Experiment aus dieser einstufigen Abreicherung resultierende BZR<sup>-</sup> Fraktion bestand jedoch zu ca. 75 % aus CD3<sup>+</sup> T- und nur zu ca. 15 % aus CD21<sup>+</sup> B-Zellen (Mancao et al., 2005). Deswegen wurde die Isolierungs-Strategie erweitert, wie in Abbildung 8 schematisch dargestellt ist. Zunächst wurden T-Zellen durch CD3-spezifische Antikörper und BZR<sup>+</sup> B-Zellen durch LK-spezifische Antikörper aus der Lymphozyten-Population (Abb. 8 A-C) abgereichert. Die resultierende CD3<sup>-</sup> BZR<sup>-</sup> Population (Durchfluss) sollte nun auf Keimzentrumszellen angereichert und gleichzeitig von restlichen Monozyten separiert werden. Dazu wurden die Keimzentrumszellen in einem zweiten Schritt positiv auf den Differenzierungs-Marker CD77 selektioniert. Durch diese Anreicherung konnte der Anteil

---

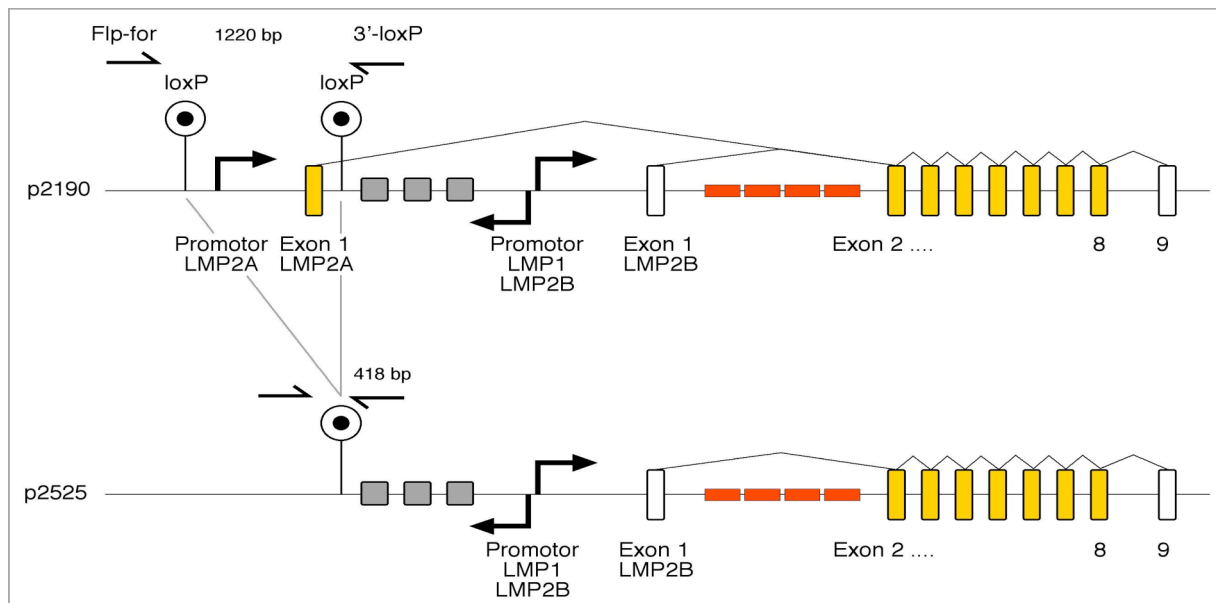
der Keimzentrums-B-Zellen in der Zielpopulation auf 72 % gesteigert werden (H), der Durchfluss zeigte erwartungsgemäß eine CD77-Abreicherung von 19 % (B) auf 4 % (F). Gleichzeitig exprimierten 81 % dieser Zellen keinen BZR (G). Die Kombination dreier Kriterien führte schließlich zu der gewünschten Reinheit der Zielpopulation: 81 % der Zellen exprimierten keinen B-Zell-Rezeptor an ihrer Oberfläche (G;  $\lambda^{-}\kappa^{-}$ ), es handelte sich zu 92 % um B-Zellen (H; CD19<sup>+</sup>), die dem Keimzentrum entstammen (H; 72 % CD77<sup>+</sup>). Diese BZR<sup>-</sup> Keimzentrums-B-Zell-Population wird im folgenden als „BZR<sup>-</sup>“ bezeichnet, während als Kontrolle immer die unsortierte Ausgangspopulation diente, die sowohl aus BZR<sup>+</sup> Zellen als auch aus BZR<sup>-</sup> Zellen besteht und nun „BZR<sup>+/-</sup>“ abgekürzt wird.



**Abb. 8: Drei-Parameter Zell-Separation.** Die Ausgangspopulation (A-C) enthält 14 %  $\lambda^{-}\kappa^{-}$ , ca. 90 %  $CD19^{+}/CD21^{+}$  B-Zellen, ca. 20 %  $CD77^{+}$  Keimzentrums-Zellen und 3 %  $CD3^{+}$  T-Zellen. Im ersten Schritt wurden T und  $\lambda^{+}\kappa^{+}$  Zellen depletiert. Die durch CD3- und BZR-Depletion abgereicherten Zellen zeigen eine deutliche Anreicherung an T-Zellen (E; 3 auf 24 %). Da diese T-Zellen  $\lambda^{-}\kappa^{-}$  sind, ist die Anreicherung für BZR<sup>+</sup> Zellen nicht erkennbar (D). Die BZR<sup>-</sup> und T-Zell-depletierte Population wurde im zweiten Schritt auf  $CD77^{+}$  Zellen angereichert. Eluierte Zellen exprimieren dadurch nur noch zu 4 %  $CD77$ , während 72 % der auf der Säule gebundenen B-Zellen dem Keimzentrum entstammen. Die resultierende Population besteht zu 92 % aus  $CD19^{+}$  B-Zellen, zu 72 % aus  $CD77^{+}$  B-Zellen und zu 81 % aus BZR<sup>-</sup> Zellen.

## 4.2. Infektion BZR<sup>-</sup> negativer Keimzentrums-Zellen

Beiden Populationen (BZR<sup>-</sup> und BZR<sup>+/-</sup>) wurden mit zwei verschiedenen Virusmutanten infiziert. Die Infektion erfolgte in Gegenwart von Cyclosporin A, um eine EBV-spezifische T-Zellantwort zu unterbinden. Die Virusmutanten waren in der Abteilung Genvektoren mit Hilfe der beschriebenen „chromosomal building“ Technik konstruiert worden (Delecluse et al., 1998). Die erste Mutante 2190 unterscheidet sich vom WT-EBV nur durch zwei loxP-Sequenzen, die vor dem LMP2A-Promotor und nach dem ersten LMP2A-Exon liegen (Abb. 9). Translatiert werden die kompletten Proteine LMP2A und LMP2B, die sich nicht von den WT-Proteinen unterscheiden. Damit ist 2190 phänotypisch dem WT Virus identisch. Die zweite Mutante 2525 stellt ein Derivat von 2190 dar und entstand durch CRE-vermittelte Deletion des LMP2A-Promotors und des ersten LMP2A-Exons in *E. coli*. Die 2525-Mutante kann nur das LMP2B Protein exprimieren, von dem keine Signale ausgehen können (Rovedo and Longnecker, 2006). LMP2A kann in dieser Mutante nicht exprimiert werden.



**Abb. 9: Genetische Komposition der EBV-Mutanten p2190 und p2525.** Zwei loxP-Sequenzen (Lollipops) flankieren den LMP2A-Promotor (Pfeil) und das erste LMP2A-Exon (gelb). Transkribiert werden die beiden WT-Proteine LMP2A und LMP2B. Nach CRE-Rekombinase vermittelter Deletion des LMP2A Promotors und des ersten Exons transkribiert p2525 nur noch LMP2B. Diese Mutante ist damit nicht mehr in der Lage, LMP2A zu exprimieren. LMP2B wird von einem bidirektionalen Promotor transkribiert, der auch die Expression von LMP1 (grau) reguliert. Die Deletion des loxP-flankierten Abschnitts kann durch eine PCR (Oligonukleotide (Haken) Flp-for und 3'-loxP) detektiert werden, die für p2190 ein 1220 bp langes und für p2525 ein 418 bp langes Fragment generiert.

### 4.3. BrdU-Einbau infizierter Zellen

Isolierte B-Zellen proliferieren *in vitro* nicht und sterben innerhalb weniger Tage, wenn sie nicht mit EBV infiziert oder z.B. durch einen CD40-Liganden stimuliert werden. Auch EBV-infizierte Zellen zeigen apoptotische Tendenzen, die zunächst zu einer deutlichen Abnahme der Zellzahl führen. Jedoch sterben nicht alle Zellen, denn EBV exprimiert eine Reihe anti-apoptotisch wirkender Genprodukte, die der zellulären Apoptose direkt oder indirekt entgegenwirken (Altmann and Hammerschmidt, 2005). Werden primäre B-Zellen mit einer transformativkompetenten Virusmutante infiziert, so werden diese Zellen aktiviert und beginnen nach wenigen Tagen zu proliferieren. Dieses Verhalten kann durch den Einbau von BrdU im FACS-Gerät detektiert werden. Der Kultur zugegebenes Nukleotid-Analogon Bromdesoxy-Uridin (BrdU) wird in der S-Phase des Zellzyklus in die genomische DNA eingebaut und kann durch Antikörper erkannt werden. Die Auswertung erfolgte vier Tage nach Infektion durch eine Drei-Farben-FACS-Analyse. Dabei können verschiedene Parameter berücksichtigt werden. Infizierte Zellen sind GFP<sup>+</sup> (10 bis 20 %; Daten nicht gezeigt), denn das fluoreszierende Protein wird von allen verwendeten EBV-Mutanten kodiert. Proliferierende Zellen bauen BrdU ein und werden doppelt positiv für 7-Amino-Actinomycin D (7AAD), ein fluoreszierender Farbstoff, der in doppelsträngige zelluläre DNA interkaliert. Dadurch kann der Ploidie-Grad ermittelt werden. S-Phase Zellen befinden sich in der Abbildung 10 im Fenster „S“. Ruhende Zellen, die einfach positiv (2n) für 7AAD sind, findet man im Fenster „G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>“. Zellen, welche die S-Phase bereits durchlaufen haben, und den zweifachen DNA Gehalt aufweisen, da sie sich mitotisch noch nicht getrennt haben, befinden sich im Fenster „G<sub>2</sub>/M“. Alle Zellen außerhalb der beschriebenen Fenster haben einen sub-G1 DNA-Gehalt und sind apoptotisch. Sie gingen deshalb nicht mit in die Berechnungen der Tabelle in Abbildung 10 ein.

### 4.3.1. Infizierte BZR<sup>+/-</sup> Zellen

Uninfizierte BZR<sup>+/-</sup> Zellen konnten kein GFP exprimieren, proliferierten nicht und starben nach wenigen Tagen (Abb. 10; erste Zeile). Im Größen- und Granularitäts-Scanner (Abb. 10; erste Spalte; FSC und SSC) des FACS-Gerätes sind diese toten Zellen deutlich zu erkennen: Während morphologisch intakte Lymphozyten eine homogene Population bilden (R1), sind tote Zellen deutlich kleiner und granulärer. Des weiteren weisen tote Zellen einen niedrigeren Ploidie-Grad als 2n auf (siehe 7-AAD Färbung) und sind anhand ihres sub-G1 DNA-Gehalts charakterisiert.

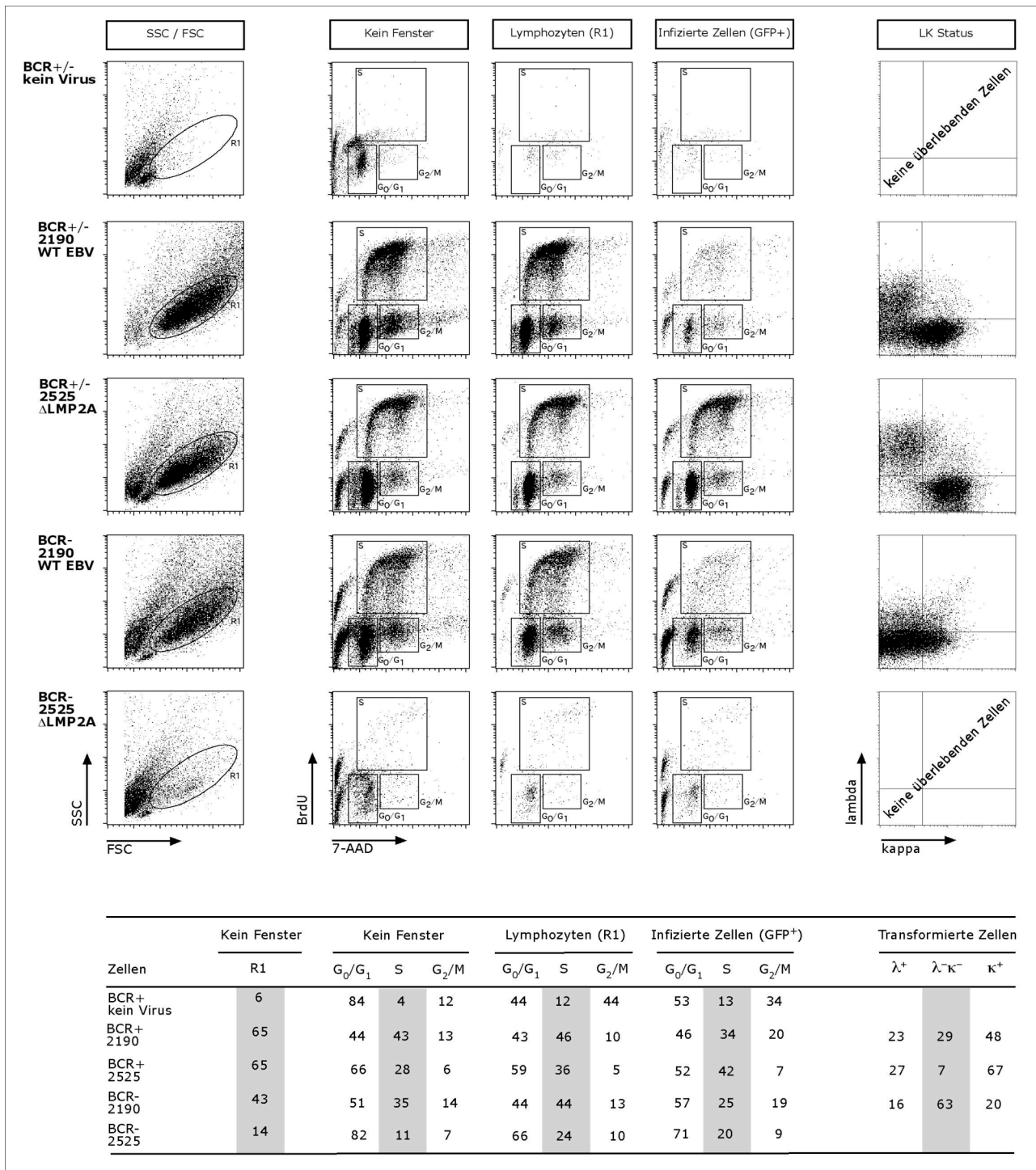
Wurde die gemischte Ausgangspopulation (BZR<sup>+/-</sup>) mit der LMP2A exprimierenden 2190 Mutante infiziert (Abb. 10; zweite Zeile), so befanden sich in der gesamten Population (zweite Spalte, „Kein Fenster“) 43 % in der S-Phase. Ähnliche Werte ergaben sich in der Lymphozyten-Population R1 (dritte Spalte, „Lymphozyten“: 46 %), sowie in der GFP<sup>+</sup> Population (vierte Spalte, „Infizierte Zellen“: 34 %). Wurde die BZR<sup>+/-</sup> Population mit der LMP2A-defizienten Mutante 2525 infiziert, so proliferierten auch diese Zellen (dritte Zeile). Dieses Ergebnis ist nicht weiter verwunderlich, da bereits gezeigt werden konnte, dass ein LMP2A defizientes Virus, wenn auch in geringerer Effektivität fähig ist, B-Zellen zu transformieren (Brielmeier et al., 1996; Speck et al., 1999).

### 4.3.2. Infizierte BZR<sup>-</sup> Zellen

Die erste Frage dieser Arbeit bestand darin, ob pro-apoptotische Keimzentrums-Zellen, die keinen B-Zell-Rezeptor an ihrer Oberfläche tragen, von EBV infiziert und wachstums-transformiert werden können. Die 2190-Infektion der BZR<sup>-</sup> Population beantwortet diese Frage positiv (Abb. 10, vierte Zeile). Der BrdU-Einbau zeigte, dass sich 35 % aller Zellen, 44 % der Lymphozyten und 25 % der infizierten Zellen in der S-Phase befanden und damit tatsächlich der Apoptose durch eine Infektion mit EBV entgingen. Diese Proliferation ist jedoch abhängig von der LMP2A Expression, wie die Infektion mit der LMP2A-negativen Mutante 2525 demonstriert (letzte Zeile). Es konnten zwar einige wenige GFP<sup>+</sup> Zellen detektiert werden, aber nur 11 % aller Zellen proliferierten. Diese infizierten Zellen starben vergleichbar mit den uninfizierten nach wenigen Tagen, und es war nicht möglich, aus diesem Ansatz stabile BZR<sup>-</sup> LCLs zu generieren.

Diese Ergebnisse zeigen, dass EBV pro-apoptotische BZR<sup>-</sup> Keimzentrumszellen *in vitro* vor der Apoptose retten kann (Abb. 10, vierte Zeile) und dass die Wachstums-Transformation absolut von der LMP2A Expression abhängig ist (Abb. 10, letzte Zeile). Ein  $\Delta$ LMP2A Virus kann B-Zellen nur transformieren, wenn sie einen B-Zell-Rezeptor exprimieren (Abb. 10, dritte Zeile).





**Abb. 10: Proliferations-Analyse infizierter BZR<sup>+/-</sup> und BZR<sup>-</sup> B-Zellen vier Tage nach Infektion.** In der ersten Spalte sind die mit verschiedenen Virusmutanten infizierten Zellen im FSC- und SSC-Kriterium aufgetragen. Die zweite Spalte zeigt den BrdU- und 7AAD-Einbau aller Zellen, der in der dritten Spalte auf morphologisch intakte Lymphozyten (R1) beschränkt ist. Die letzte Spalte bezieht sich auf infizierte (GFP<sup>+</sup>) Zellen. In die Tabelle fließen nur Werte von Zellen ein, die in einem der Zellzyklus-spezifischen Fenster detektiert werden können: ruhende G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Phase Zellen, proliferierende S-Phase Zellen oder Zellen in der Metaphase mit zweifachem DNA-Gehalt, die als G<sub>2</sub>/M bezeichnet werden. Die letzte Spalte zeigt die Expression der leichten Immunglobulin-Oberflächenmoleküle zehn Tage nach Infektion.

#### 4.4. Immunglobulin-Phänotyp der transformierten Zellen

Zehn Tage nach Infektion wurden die in Abschnitt 4.3.2 beschriebenen EBV-infizierten und transformierten Zellen erneut auf die Expression der leichten Ketten (LK) der Immunglobulin-Oberflächenmoleküle hin untersucht (Abb. 10, letzte Spalte). Die 2190 infizierte BZR<sup>+/-</sup> Fraktion zeigte eine gemischte LK-Expression, die der Ausgangspopulation sehr ähnelt. Es existierten drei Populationen: eine  $\lambda^+$ , eine leicht vergrößerte  $\kappa^+$  und eine LK doppelt negative Population (Abb. 10, zweite Zeile). Auch die 2190 infizierte BZR<sup>-</sup> Population blieb in ihrem LK-negativen Phänotyp mehrheitlich stabil (Abb. 10, vierte Zeile). Dies unterscheidet sie von der Infektion mit 2525  $\Delta$ LMP2A EBV. Wurde eine gemischte BZR<sup>+/-</sup> Population mit diesem Virus infiziert, das kein LMP2A exprimieren kann (2525), überlebten nur solche B-Zellen, die einen B-Zell-Rezeptor exprimierten (Abb. 10, dritte Zeile). Die BZR<sup>-</sup> Population konnte nicht mehr nachgewiesen werden. Dieser Befund zeigt, dass nur solche B-Zellen mit einer  $\Delta$ LMP2A-Mutante überleben, die ihren endogenen B-Zell-Rezeptor exprimieren. Dagegen überleben sowohl BZR<sup>+</sup> als auch BZR<sup>-</sup> B-Zellen, wenn sie mit Wildtyp EBV infiziert wurden. Diese Ergebnisse sind ein entscheidender Hinweis zur Rolle von LMP2A.

#### 4.5. BZR<sup>-</sup> Einzel-Zellklone: Auswahlverfahren

Teil der Aufgabenstellung war es zu untersuchen, ob eine EBV-Infektion die Apoptose von B-Zellen verhindern kann, die nicht nur phänotypisch sondern auch genotypisch keinen B-Zell-Rezeptor exprimieren (können). Denn auch ein abortiver Transport des B-Zell-Rezeptors an die Zelloberfläche würde einen phänotypisch BZR<sup>-</sup> Klon ergeben, der dennoch in der Lage wäre, von intrazellulären Membranen BZR-Signalwege zu aktivieren. Es musste deshalb durch Sequenz-Analysen der Immunglobulingene gezeigt werden, dass diese in den transformierten BZR<sup>-</sup> B-Zellen somatisch hypermutiert sind, so dass eine Expression des Rezeptors nicht mehr möglich ist. Da eine solche Sequenz-Analyse nur auf Ebene eines B-Zell-Klons möglich ist, war es zunächst entscheidend,

EBV-infizierte Einzelzellen zu klonieren. Solche Klone entsprechen genotypisch HRS-Zellen und stellen deshalb viele Aspekte dieser Tumorzellen modellhaft nach.

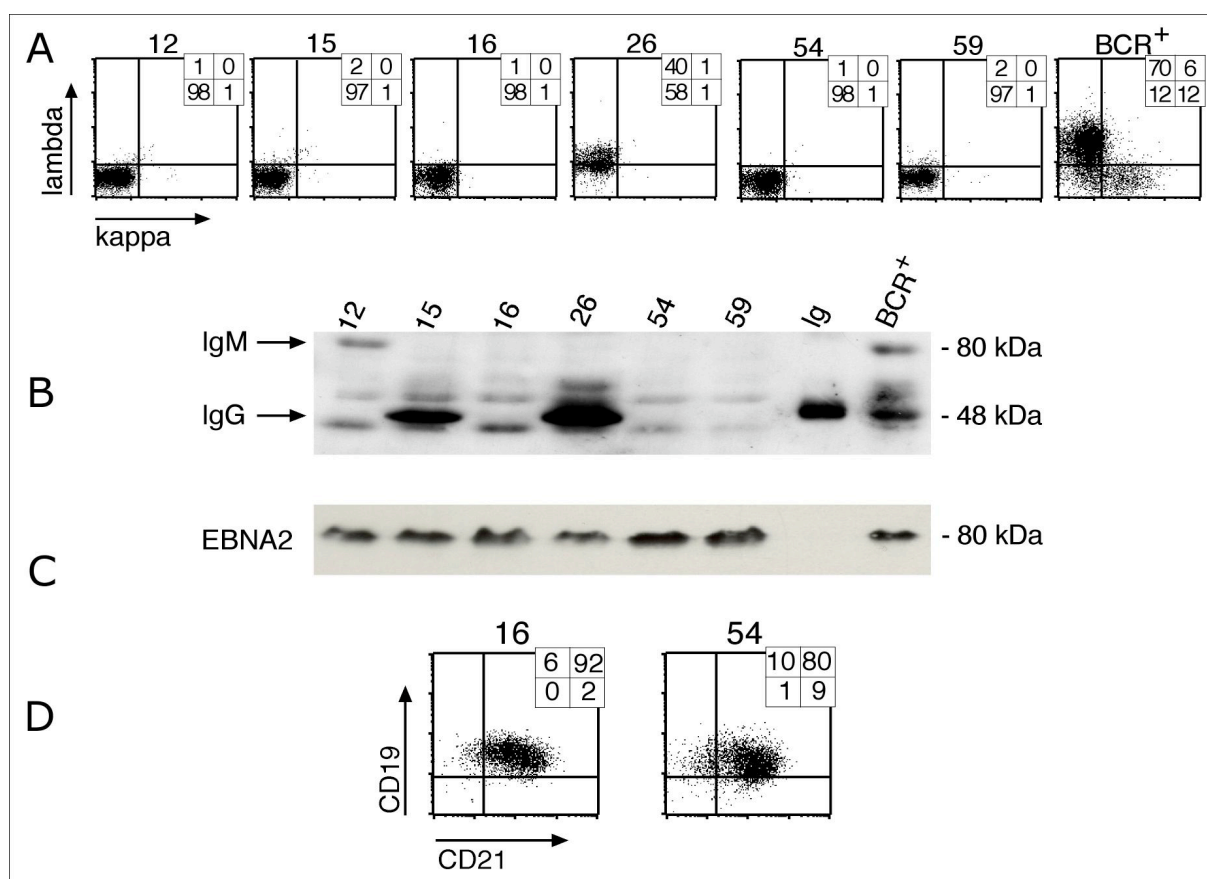
#### 4.5.1. Expression der leichten Kette

Die beschriebene mit 2190 infizierte BZR<sup>-</sup> LCL Population (Abb. 10, vierte Zeile) wurde für drei Wochen als polyklonale Zellkultur expandiert, erneut durch MACS-Separation von restlichen BZR<sup>+</sup> Zellen depletiert und dann auf 96-Loch Platten so verteilt, dass sich statistisch Einzelzellklone bildeten. Von drei verschiedenen Spendern resultierten insgesamt 321 Einzel-Zellklone, die einzeln expandiert und einem dreistufigen Auswahlverfahren unterzogen wurden. Zunächst wurden alle 321 Klone im FACS Gerät erneut auf die Oberflächen-Expression der leichten Immunglobulinketten  $\lambda$  und  $\kappa$  untersucht. 110 Klone (34 %) waren positiv für  $\lambda$  (97) oder  $\kappa$  (13) und stammen vermutlich aus kontaminierenden BZR<sup>+</sup> Zellen, da weder die initiale MACS-Selektion vor der Infektion (Abb. 3 G) noch die zweite MACS-Selektion drei Wochen später alle BZR<sup>+</sup> Zellen ausschließen konnte. Nach diesem Schritt konnten 211 Klone als phänotypisch BZR<sup>-</sup> bestätigt werden. In Abbildung 11 A sind stellvertretend für alle 321 FACS-Analysen exemplarisch sechs Klone dargestellt. Während der Klon 26 phänotypisch BZR<sup>+</sup> war, zeigten die Klone 12, 15, 16, 54 und 59 keine detektierbare LK-Expression. Die heterogene BZR<sup>+</sup> Kontrolle wurde aus 2190 infizierten BZR<sup>+</sup> Zellen generiert.

#### 4.5.2. Expression der schweren Kette

Um auszuschließen, dass diese Klone zwar den B-Zell-Rezeptor zytoplasmatisch exprimierten, aber nicht an die Zelloberfläche brachten, wurden 100  $\lambda^{-}\kappa^{-}$  Klone in einem Western-Blot untersucht. Der verwendete Antikörper erkennt sowohl die leichte als auch die meisten schweren Ketten (IgA/G/M) des B-Zell-Rezeptors. Der Western-Blot in Abbildung 11 B zeigt dieselben Klone wie in der FACS-Analyse 11 A. Einzig die Klone 16, 54 und 59 exprimierten demnach weder die leichte noch die schwere Kette in einem detektierbaren Maß. Obwohl die Klone 12 und 15 negativ für die LK Oberflächen-Expression waren (A), konnte intrazellulär die schwere IgM Kette (Klon 12) bzw. die

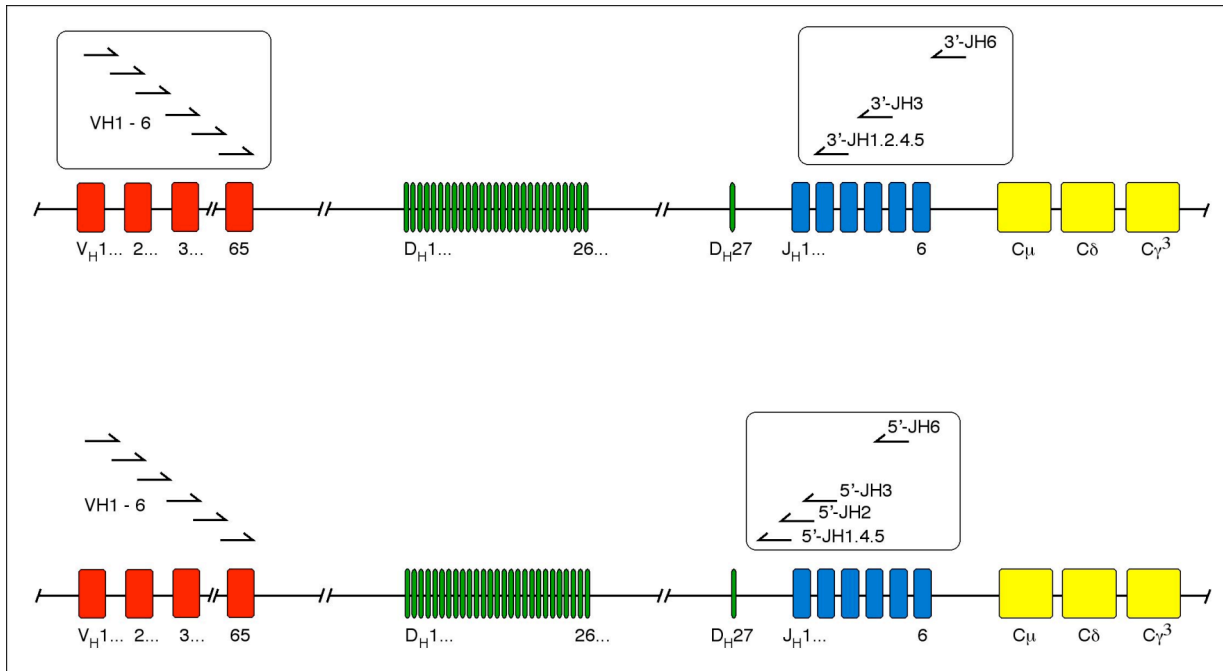
schwere IgG Kette (Klon 15) nachgewiesen werden (B). Als Kontrolle diente gereinigtes humanes Immunglobulin (Ig) sowie die BZR<sup>+</sup> Population. Ein Western-Blot gegen den viralen Transkriptionsaktivator EBNA2 diente als Ladekontrolle und zeigte die EBV-Infektion dieser Klone (Abb. 11 C), die CD19 und CD21 exprimieren und somit von B-Zellen abstammen (Abb. 11 D). Neben den Klonen 16, 54 und 59 gab es nur noch 36 weitere Klone, die weder die leichte noch die schwere Kette zu einem detektierbaren Maß exprimierten. Von diesen Klonen wurde die genomische DNA isoliert und deren Immunglobulingene amplifiziert und sequenziert.



**Abb. 11: Expression der Immunglobulin-Ketten klonaler LCLs im FACS und im Western-Blot.** (A) Exemplarische LK-Färbung und FACS-Analyse von sechs der 321 Klone sowie der Positivkontrolle (BCR<sup>+</sup>). Zahlen entsprechen den Anteilen der jeweiligen Quadranten. (B) Klone 16, 54 und 59 zeigen weder eine Oberflächen-Expression der leichten Kette noch eine intrazelluläre Expression der schweren Kette im Western-Blot. Klone 12, 15 und 26 sind positiv im Western-Blot, jedoch zeigt nur der Klon 26 auch eine Oberflächen-Expression der leichten Kette. In der Spur „Ig“ wurde gereinigtes humanes Immunglobulin als Positivkontrolle aufgetragen. (C) Der EBNA2 Western-Blot dient als Ladekontrolle und zeigt eine EBV-Infektion aller Klone an, die positiv für die B-Zellmarker CD19/CD21 sind (D).

## 4.6. Sequenzierung der Immunglobulingene

Von den 36 Klonen, die weder an der Zelloberfläche noch intrazellulär eine schwere oder leichte Kette des B-Zell-Rezeptors exprimierten, wurde die genomische DNA isoliert. In einem zweistufigen PCR-Verfahren („nested PCR“) konnte der rearrangierte Bereich der Immunglobulingene amplifiziert werden. Die schematische Lage und Kombinatorik der Oligonukleotide ist in Abbildung 12 dargestellt. In der ersten PCR-Stufe (Abb. 7 oben) wurden zwei Oligonukleotid-Gemische verwendet. Das 3'-Gemisch (VH1-6 Mix) bestand aus sechs Oligonukleotiden, die spezifisch für je eine der sechs  $V_H$  Gen-Familien sind. Das 5'-Gemisch (3'-JH-Mix) bestand aus drei Oligonukleotiden, die ihrerseits an die sechs  $J_H$  Gen-Familien binden (3'-JH1.2.4.5 erkennt die  $J_H$  Familien 1, 2, 4 und 5). Entstandene PCR-Produkte wurden als Matrize für die zweite PCR-Stufe eingesetzt (Abb. 12 unten). Dabei wurden für jeden Klon sechs PCR-Reaktionen (jedes VH-Oligonukleotid einzeln). Diese Auftrennung ermöglichte es, die Immunglobuline einer der sechs unterschiedlichen  $V_H$  Gen-Familien zuzuordnen, denn in der Regel generierte nur einer der sechs Ansätze ein spezifisches, 300 bis 400 bp großes Produkt. Als 5'-Oligonukleotide wurde in der zweiten Runde ein Gemisch aus vier Oligonukleotiden (5'-JH-Mix) eingesetzt, die etwas versetzt in 5'-Richtung der  $J_H$  Gen-Familien binden. Das Design dieser Oligonukleotide stammt aus dem Labor von Ralf Küppers und wurde in einem leicht modifizierten Protokoll verwendet (Küppers, 2004).



**Abb. 12: Amplifikation der Immunglobulin-Gene.** Schematische Lage der Oligonukleotide (Haken) für die „nested PCR“. In der ersten Runde (oben) wurden in einem PCR-Ansatz zwei Gemische (Kästen) verwendet, die alle V<sub>H</sub> (rot) und J<sub>H</sub> (blau) Gen-Familien binden. VH1-6 binden an die V<sub>H</sub> Familien 1–6 und dient in der PCR als 5'-Oligonukleotide. 3'-JH1-6 bindet an die J<sub>H</sub> Familien 1-6 und dient als 5'-Oligonukleotid. Die in der ersten Runde generierten Produkte dienen als Matrize für die zweite Runde (unten), die in je eine PCR pro V<sub>H</sub> Gen aufgeteilt wird. Als 3'-Oligonukleotid dient ebenfalls ein Gemisch, das allerdings etwas weiter in 5'-Richtung an die J<sub>H</sub> Gen-Familien binden als das 3'-JH-Gemisch. Die D<sub>H</sub> Segmente 1-27 sind in grün und die C Segmente gelb

In 24 Fällen gelang es, ein spezifisches PCR-Produkt zu generieren, dieses aus einem präparativen Agarose-Gel zu isolieren und in den Vektor pCR2.1 zu klonieren. Die Sequenz-Analyse der klonierten Immunglobulingene wurde durch die Firma Sequiserve (Vaterstetten) durchgeführt. Die erhaltenen Sequenzen wurden mit Hilfe der V BASE Datenbank ([www.dnplot.de](http://www.dnplot.de)) und dem DNA-Programm MacVector gegen die humanen Keimbahn-Sequenz (PubMed accession ng\_001019) verglichen. Die Immunglobuline aller 32 Klone konnten einer V<sub>H</sub> und einer J<sub>H</sub> Genfamilie zugeordnet werden und zeigten mehrfache Abweichungen von der Keimbahn-Sequenz. Diese Abweichungen entstanden durch somatische Hypermutationen in den Keimzentren und sind ein eindeutiger Hinweis auf B-Zellen, die eine Keimzentrumsreaktion durchlaufen haben. Da der amplifizierte und sequenzierte Bereich das Start-Kodon der Immunglobulingene nicht umfasste, musste das Leseraster von der 3'-Seite, also vom J<sub>H</sub> Segment bestimmt werden. So konnten fünf Klone identifiziert werden, die genotypisch nicht in der Lage

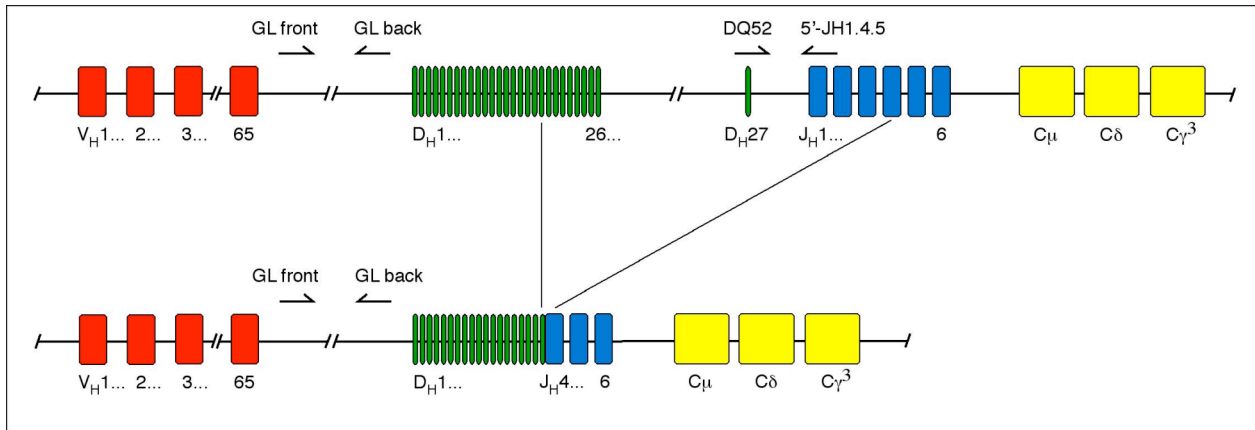
sind, einen B-Zell-Rezeptor zu exprimieren. In drei Klonen aus zwei Patienten (A54, B5 und B11) verhindert ein Stopp-Kodon im Leserahmen eine BZR-Expression. Die Transversionen im Klon A54 (Abb. 13 A; TAC -> TAG) und im Klon B11 (Abb. 13 D; GAG -> TAG) generieren ein Stopp-Kodon, während im Klon B5 (Abb. 13 C; TGG -> TGA) eine Transition ein Stopp-Kodon generiert. Der vierte Klon A16 (Abb. 13 B) ist durch eine ca. 60 Aminosäure lange Deletion charakterisiert, die sich über den kompletten Bereich der CDR2 („complement determining region“) und Teile der CDR3 erstreckt. Zusätzlich macht die Verschiebung des Leserasters, die durch die Deletion zustande kommt, die Expression eines funktionalen BZR unmöglich. Der fünfte Klon ist genotypisch BZR<sup>-</sup>, weil eine Verschiebung des Leserasters eine korrekte Translation des C-Segmentes unmöglich macht (Daten nicht gezeigt). Über die Ursache dieser Verschiebung, die wahrscheinlich im Bereich des D-Segmentes erfolgte, kann nur spekuliert werden; möglich ist eine Deletion oder eine Insertion.

**Abb. 13 (folgende Seite). Sequenz-Analyse klonaler BZR- LCLs.** Die Sequenzen von vier Einzell-Zellklonen zeigen Mutationen, die eine Translation funktionaler schwerer Immunglobulin-Ketten verhindern. Die Sequenzen der am nächsten verwandten, homologen Keimbahngene sind in der oberen, die der Klone in der unteren Linie angegeben. Eine Sequenzidentität ist durch Striche gekennzeichnet. Basenaustausche sind durch die jeweiligen Nukleotide markiert, wobei große Buchstaben für Aminosäure-Austausche und kleine Buchstaben für stille Mutationen stehen. (A) Klon A54 wird durch ein Stopp-Kodon (\*) in der CDR1 (durchgehende Striche) steril für eine BZR-Expression. (B) In Klon A16 konnte nur die V und J Region bestimmt werden, da ein großer Teil der V und die komplette D Region deletiert ist (weiße Box), was zusätzlich zu einer Verschiebung des Leserasters führt. Die Klone B5 (C) und B11 (D) können aufgrund eines Stopp-Kodons (\*) keinen BZR exprimieren. Die der Oligonukleotide homologen Sequenzen sind gestrichelt dargestellt und enthalten variable Basen: M (Adenosin oder Cytosin), Y (Cytidin oder Thymidin).





Die beschriebenen Analysen dieser fünf Klone beziehen sich auf nur ein regelrecht und vollständig rearrangiertes Immunglobulin-Allel. Um eine Expression vom zweiten Allel auszuschließen, wurde seine Komposition ebenfalls untersucht. Hierfür wurde die genomische DNA der fünf Klone PCR-Reaktionen unterzogen, in welcher nicht- oder nur unvollständig rearrangierte Keimbahnsequenzen detektiert werden können. Das Rearrangement der Immunglobulin-Segmente erfolgt im Knochenmark in zwei Schritten (Abb. 14): zunächst wird ein beliebiges *D* Segment an ein beliebiges *J* Segment umgelagert ( $D_HJ_H$  Rearrangement), der dazwischen liegende Bereich wird dabei deletiert. Im zweiten Schritt wird ein beliebiges *V* Segment an die *DJ* Kombination rekombiniert ( $V_HD_HJ_H$  Rearrangement), wobei erneut der dazwischen liegende Bereich deletiert wird. Das in dieser analytischen PCR verwendete 5' Oligonukleotid bindet im letzten *D* Segment *D<sub>H</sub>27* (wegen Homologie zum Maus-Segment auch DQ52 genannt), das kurz vor dem ersten *J<sub>H</sub>* Segment liegt (Abb. 14) und durch ein korrektes  $D_HJ_H$  Rearrangement deletiert wird (Corbett et al., 1997; Muschen et al., 2000). Im Falle einer vollständigen Keimbahnsequenz ist ein PCR-Produkt der Größe von 338 bp (Oligonukleotide: DQ52 + 5'-JH1.4.5), bzw. eine DNA-Leiter (DQ52 + 5'-JH-Mix) zu erwarten. Es gelang jedoch nicht, diese PCR-Produkte zu generieren, was zumindest auf ein  $D_HJ_H$  Rearrangement hinweist. Daraufhin wurde versucht, den intragenischen Bereich zwischen dem letzten *V<sub>H</sub>* und dem ersten *D<sub>H</sub>* Segment zu amplifizieren. Mit Hilfe der Oligonukleotide „GL front“ und „GL back“ konnte in allen fünf Klonen ein 573 bp großes spezifisches Produkt generiert werden. Somit zeigen alle fünf Klone keine vollständige Keimbahnsequenz im zweiten Allel, sondern sind  $D_HJ_H$ -, aber nicht  $V_HD_HJ_H$  arrangiert. Dadurch ist es unmöglich, vom zweiten Allel ein B-Zell-Rezeptor-Genprodukt zu transkribieren.



**Abb. 14: Darstellung eines vollständigen  $V_H D_H J_H$  Rearrangements.** Die Keimbahnsequenz (oben) erlaubt die PCR mit den Oligonukleotiden (DQ52 + 5'-JH1.4.5) und (GL front + GL back). In diesem Beispiel wird im Knochenmark zunächst das  $D_H 19$  (grün) mit dem  $J_H 4$  Segment (blau) rekombiniert, wobei der dazwischen liegende Bereich, inklusive dem  $D_H 27$  Segment deletiert wird (mitte). Somit kann die PCR (DQ52 + 5'-JH1.4.5) kein Produkt mehr ergeben. Im zweiten Schritt (unten) wird das  $V_H 3$  Segment (rot) mit dem  $D_H 19$ - $J_H 4$  Segment rekombiniert und dabei erneut der dazwischen liegende Bereich deletiert. Dadurch kann nun auch die PCR (GL front + GL back) kein Produkt mehr generieren.

Die phänotypischen Daten der FACS-Analyse für die leichten Immunglobulinketten sowie die Western-Blot-Analysen für die leichten und schweren Immunglobulinketten wurden durch die Amplifikation und Sequenzierung der kodierenden Regionen der rearrangierten Gene für die schweren Ketten in fünf Fällen genotypisch bestätigt. Das unvollständige Rearrangement des zweiten Allels verhindert eine Transkription hiervon. Diese Sequenz-Analysen zeigen eindeutig, dass fünf Einzel-Zellklone aufgrund von somatischen Hypermutationen, die Stopp-Kodons, Deletionen, Insertionen oder Verschiebungen des Leserasters einführen, nicht mehr in der Lage sind, einen B-Zell-Rezeptor zu exprimieren.

---

Aus diesen Analysen lässt sich folgern, dass die vollständig rearrangierten Immunglobulingene der beschriebenen fünf Klone im naiven B-Zell-Status funktional waren, die Zellen in die Keimzentrumsreaktion eintraten und dort durch somatische Hypermutationen die Fähigkeit verloren, einen funktionalen B-Zell-Rezeptor zu exprimieren. Normalerweise würden diese Klone durch apoptotische Prozesse negativ selektioniert werden. Die *in vitro* Infektion mit EBV jedoch verhinderte den Zelltod und transformierte diese Klone zu LCLs.

In diesem ersten Teil dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Infektion mit EBV pro-apoptische B-Zell-Rezeptor-negative Keimzentrums-B-Zellen *in vitro* vor der negativen Selektion retten und transformieren kann. Durch BrdU-Analysen konnte gezeigt werden, dass diese Population kurz nach der Infektion zu proliferieren beginnt. In der transformierten Population konnten aus 321 Einzel-Zellklonen fünf isoliert werden, die nicht nur phänotypisch, sondern auch genotypisch nicht in der Lage sind, einen funktionalen B-Zell-Rezeptor zu exprimieren. Dies konnte durch Sequenz-Analysen der Immunglobulingene bewiesen werden.

Bei dieser Transformation spielt die Expression des viralen Proteins LMP2A eine essentielle Rolle, denn derartige B-Zell-Rezeptor-negative Zellen proliferieren nach Infektion mit einem LMP2A-defizienten Virus nicht.

## 4.7. CRE vermittelte Deletion von LMP2A

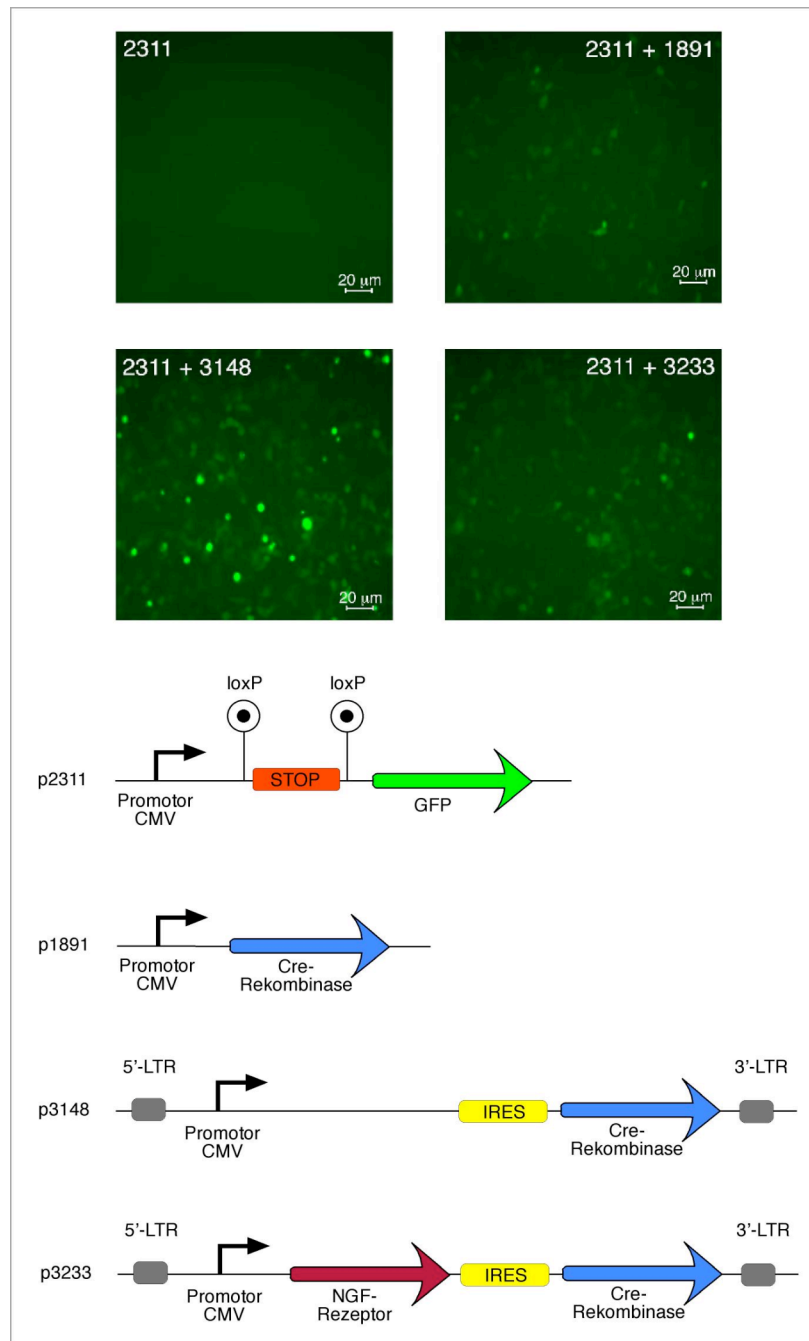
Im ersten Teil konnte zweifelsfrei gezeigt werden, dass EBV BZR<sup>-</sup> pro-apoptotische Keimzentrums-B-Zellen vor der Apoptose bewahren, transformieren und lymphoblastoide Zelllinien etablieren kann. In diesem Prozess wurde der essentielle Beitrag des viralen Proteins LMP2A offensichtlich. Warum aber wird LMP2A in HRS-Zellen nicht nur initial nach der Infektion, sondern auch in pathohistologisch residenten HRS-Tumorzellen exprimiert? Welchen Beitrag liefert LMP2A in der Aufrechterhaltung des malignen Zustandes? Denn nicht nur in HRS-Zellen wird LMP2A konstant exprimiert, auch in LCLs (Latenz III) und in EBV-infizierten peripheren Gedächtnis-B-Zellen (Latenz 0) kann dieses Signalmolekül konsistent nachgewiesen werden. Um diese Fragen zu beantworten, wurden bereits etablierte LCLs herangezogen, die mit der Virusmutante 2190 erhalten worden waren. Die Mutante ist genotypisch LMP2A<sup>+</sup> und entspricht einem Wildtyp-EBV. Das erste Exon von LMP2A ist in 2190 von zwei loxP-Sequenzmotiven flankiert, so dass die Expression der ortsspezifischen Rekombinase CRE in etablierten LCLs zur Deletion dieser signalvermittelnde Domäne führt. Der Phänotyp dieser LMP2A-deletierten Zellen wird dadurch einer Untersuchung zugänglich gemacht. Ist LMP2A auch in der Aufrechterhaltung des transformierten Zustandes essentiell, so sollten LMP2A-negative B-Zellen ihre Proliferation einstellen und in Apoptose gehen.

Die Detektion der erfolgreichen Deletion des ersten LMP2A-Exons sollte über eine PCR erfolgen (Abb. 9). Die verwendeten Oligonukleotide „Flp-for“ und „3'-LoxP“ binden vor bzw. hinter den loxP Sequenzen, die 802 bp auseinander liegen und den LMP2A Promotor sowie das erste Exon des latenten Membranproteins einschließen. Damit ergibt sich für die Mutante p2190 ein 1220 bp und für die deletierte Version p2525 ein 418 bp langes PCR-Produkt.

Wie in Abschnitt 4.2 beschrieben, wurden gemischte, BZR<sup>+</sup> und BZR<sup>-</sup> enthaltende B-Zell-Populationen mit der Virusmutante 2190 infiziert. Mehrere Wochen nach Infektion (bis zum Erreichen einer ausreichenden Zellzahl) sollten diese 2190-infizierten LCLs

mittels Elektroporation mit einem CRE-kodierenden Plasmid transformiert werden. In Kontrollversuchen mit der Nukleofektions-Methode der Firma Amaxa wurde eine Transfektionseffizienz von bis zu 50 % erreicht, was für eine phänotypische Analyse der Zellen nicht ausreichte. Es war deshalb notwendig, die erfolgreich transformierte CRE<sup>+</sup> Population zu isolieren. Diese Strategie erfordert die Ko-Expression eines detektierbaren Markers. Dazu wurde das CRE-Gen in einen retroviralen Vektor umklont, in dem es zusammen mit dem NGF-Rezeptor („nerve growth factor“, NGF-R) über ein IRES-Element („internal ribosome entry site“) ko-translatiert werden kann. Bei dem NGF-Rezeptor handelt es sich um die trunkierte Version eines Oberflächenmarkers, dessen extra-zellulärer Teil exprimiert wird, von dem aber keine Signale ausgehen können. Das resultierende retrovirale Expressions-Konstrukt p3233 (Abb. 15) wurde in der 293 Zelllinie mit dem Testplasmid p2311 auf Funktionalität getestet. In p2311 verhindert eine von zwei loxP Sequenzen flankierte Stopp-Box, die mehrere Stopp-Kodons in jedem Translations-Rahmen enthält, die GFP-Expression. Nur wenn die CRE-Rekombinase in *trans* exprimiert wird, kommt es zur Deletion der Stopp-Box und GFP kann translatiert werden. Als Positivkontrolle diente ein vom CMV-Promotor transkribiertes CRE-Protein (p1891) sowie die retrovirale Ausgangs-Plasmid p3148, das hinter einem IRES-Element für CRE kodiert. Die Ergebnisse der (Ko-) Transfektionen sind in Abbildung 15 dargestellt.

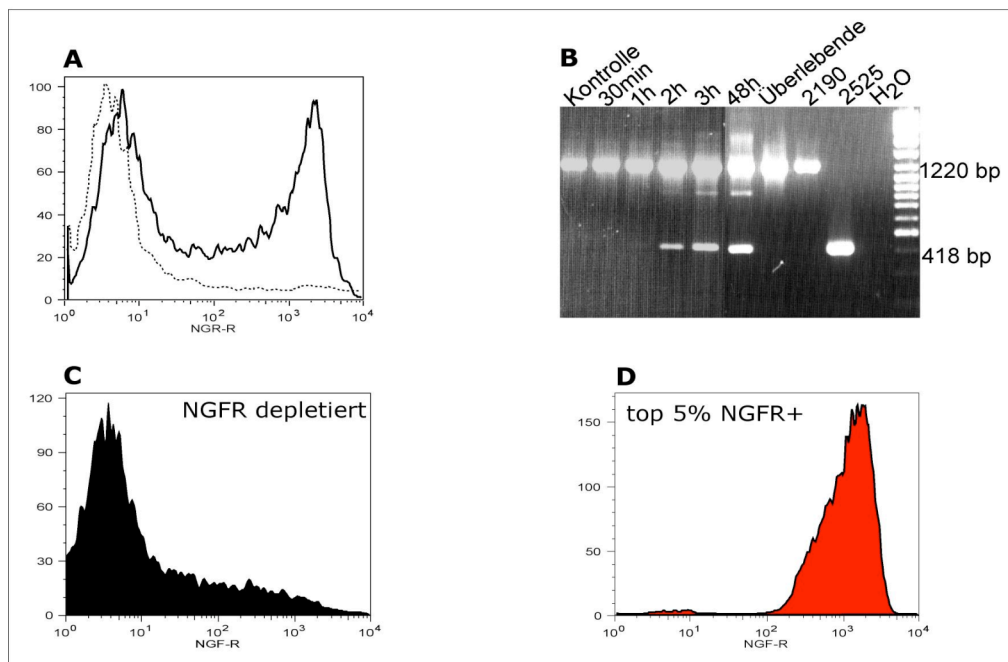
Neben dem Funktionalitäts-Test des CRE-Proteins in p3233 (Abb. 15), konnte die Ko-Expression des Marker-Proteins NGF-R nach transienter Transfektion von 293-Zellen in FACS-Analysen bestätigt werden (60 % NGFR<sup>+</sup>; Daten nicht gezeigt).



**Abb. 15: Test des CRE-Rekombinase Plasmides p3233.**

Transiente Transfektionen in 293 Zellen (oben) bestätigen die Funktionalität des CRE-Expressionsplasmides p3233. Die verwendeten Plasmide sind unten schematisch dargestellt. Vom Test-Plasmid p2311 wird GFP nur im Falle einer Kotransfektion mit einem CRE-Expressionsplasmid exprimiert, denn die Stop-Box (rot) zwischen Promotor (Pfeil) und GFP-Gen (grün) verhindert eine Transkription. Als Positivkontrolle diente das CMV-CRE Konstrukt p1891. Das retrovirale Plasmid p3233 unterscheidet sich vom Ausgangsplasmid p3148 durch den detektierbaren Marker NGF-R, der vor das IRES-Element platziert wurde. Das CRE-Gen wird mit dem Gen des NGF-Rezeptors von einer bicistronischen mRNA ko-transkribiert.

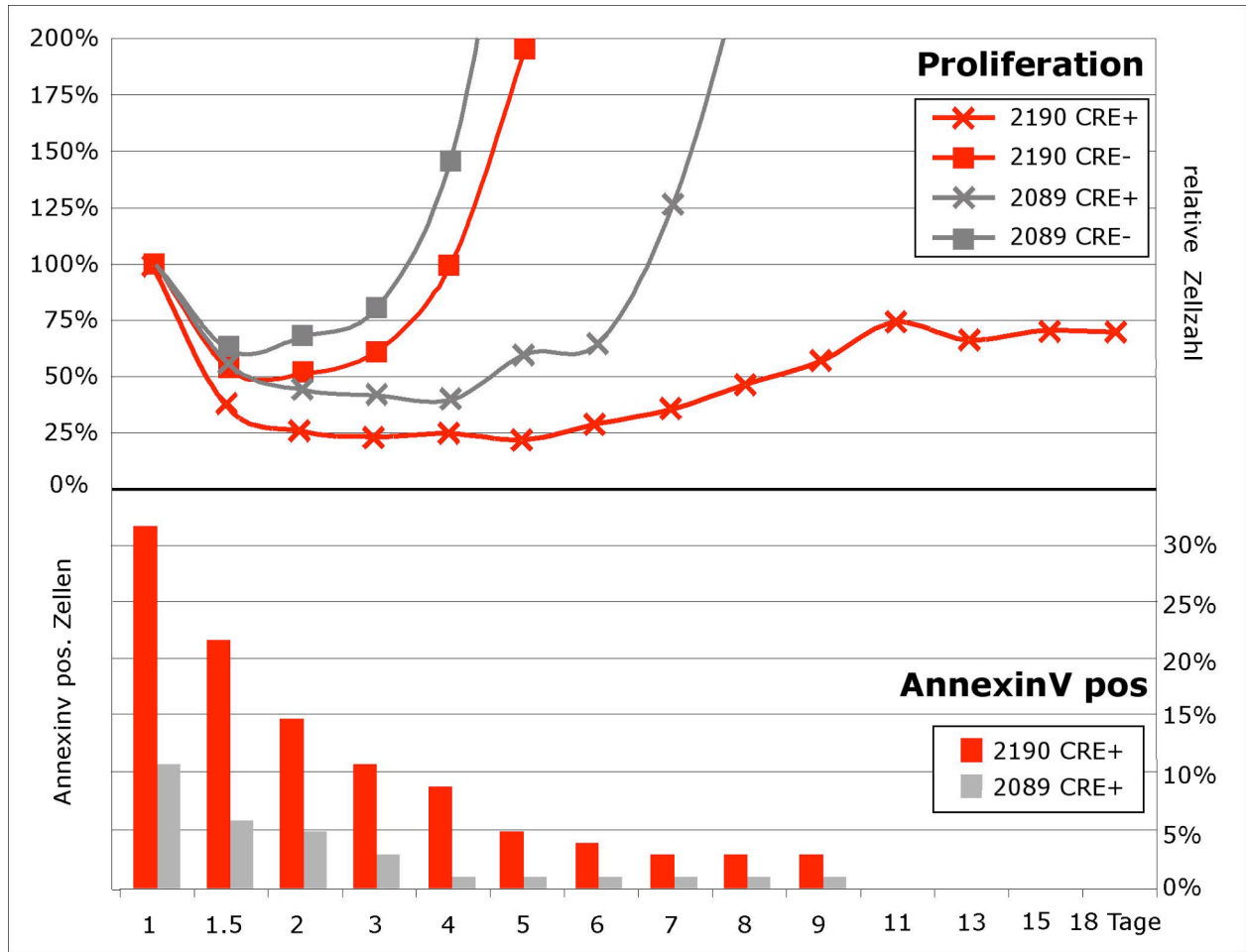
Nach diesen Versuchen konnten 2190-infizierte LCL Kulturen mit p3233 erfolgreich elektroporiert werden. Eine WT-infizierte (2089) LCL Kultur diente zur Messung der Genotoxizität der Rekombinase, denn 2089 enthält keine loxP Sequenz. Wie in der Abbildung 16 ersichtlich ist, exprimierten 18 Stunden nach Elektroporation bis zu 50 % der lebenden Zellen den NGF-Rezeptor (A). Die Expression und Funktionalität der CRE-Rekombinase konnte bereits zwei Stunden nach der Elektroporation durch die oben erwähnte PCR (Flp-for + 3'-loxP) nachgewiesen werden (Abb. 16 B). Die NGF-R-Expression ermöglichte eine positive Selektion der Sortierung der transfizierten Zellen in einem FACS-Sorter. Die 5 % am stärksten NGF-R exprimierenden Zellen (Abb. 16 D; NGF-R<sup>+</sup> / CRE<sup>+</sup>) wurden von nicht-transformierten Zellen (Abb. 16 C; NGF-R<sup>-</sup> / CRE<sup>-</sup>) durch das FACS-Gerät (MoFlo, DakoCytomation) getrennt und in gleich dimensionierten Ansätzen und in gleicher Zellkonzentrationen weiter kultiviert.



**Abb. 16: Sortierung CRE-exprimierender LCLs.** Eine 2190 LCL Kultur wurde mit dem NGF-R und CRE kodierenden Plasmid p3233 elektroporiert. Nach 18 Stunden konnten im Vergleich zur unbehandelten Population (gestrichelte Linie) bis zu 50 % elektroporierter Zellen (durchgezogene Linie) detektiert werden (A). Die Funktionalität der CRE-Rekombinase konnte in einer PCR nachgewiesen werden (B). Bereits zwei Stunden nach Elektroporation ist das spezifische 418 bp lange Produkt detektierbar. Die transfizierte heterogene Zellpopulation wurde in NGF-R depletierte (C) und NGF-R-exprimierende Populationen (D) getrennt und wieder in Kultur gebracht.

Um das Schicksal dieser Zellen zu verfolgen, wurden zwei Parameter herangezogen: die Proliferation der Zellen (relative Veränderung der Zellzahl) und die Membranintegrität (AnnexinV Färbung) zur Messung apoptotischer Zellen. Die absolute Zellzahl wurde im FACS-Gerät durch Zugabe von APC-gefärbten Kalibrierungs-Kügelchen in einer bestimmten Konzentration als Volumenstandard gemessen. Dabei wurde eine definierte Anzahl an Kügelchen herangezogen, um die absolute Zellzahl der im so genannten Lymphozyten-Fenster befindlichen Zellen zu bestimmen. In Abbildung 17 (linke Achse) sind die relativen Zellzahlen gegen die Zeit (18 Tage) aufgetragen. Die Elektroporation markiert den Tag 0 und die Ausplattierung der sortierten Zellen den Tag 1. Es wurden gleiche Zellkonzentrationen und Zellzahlen ausplattiert (100 %). Bereits 36 Stunden nach Elektroporation (Tag 1,5) war die absolute Zellzahl in allen Ansätzen auf 30 % bis 60 % der Ausgangswerte reduziert. Diese Abnahme der Zellzahl ist sehr wahrscheinlich auf den Elektroporations-Stress zurückzuführen. Beide CRE<sup>-</sup> Populationen, die weder NGF-R noch CRE exprimierten, erholten sich drei bis vier Tage nach Elektroporation und proliferierten exponentiell. Die CRE<sup>+</sup> 2089 Kultur erreichte erst eine Woche nach Elektroporation wieder das Ausgangsniveau, proliferierte dann aber ebenfalls exponentiell. Dieser Verzug ist wahrscheinlich auf die Genotoxizität der CRE-Rekombinase zurückzuführen und wurde in mehreren Versuchsreihen beobachtet. Im Gegensatz zu Wildtyp EBV transformierten B-Zellen, führte die transiente Expression von CRE in B-Zellen, die mit einem „gefloxten“ LMP2A-Allel infiziert waren (2190), zu einem steilen Abfall der Zellzahlen, die in dem Beobachtungszeitraum von 14 Tagen das Ausgangsniveau nicht mehr erreichte (Abb. 17; linke Achse; rote Kurve). Erst sechs bis acht Wochen später erreichte diese Population das Ausgangsniveau und proliferierte dann exponentiell; dieser Zeitraum entspricht dem Auswachsen eines Einzelklons. Diese mono- oder eventuell oligoklonale Subpopulation zeigte jedoch in der PCR keinerlei Anzeichen einer CRE-vermittelten Deletion (Abb. 16 B; Überlebende). Damit stellen diese wenigen Klone, die aus der CRE<sup>+</sup> 2190 Kultur auswuchsen, eine LMP2A<sup>+</sup> Subpopulation dar. Dieses Ergebnis ist überraschend eindeutig und lässt den Schluss zu, dass LMP2A absolut essentiell für die Vitalität und Proliferation von etablierten EBV-transformierten LCLs ist. Die Deletion von LMP2A führt unabhängig vom BZR-Status zum Zelltod.





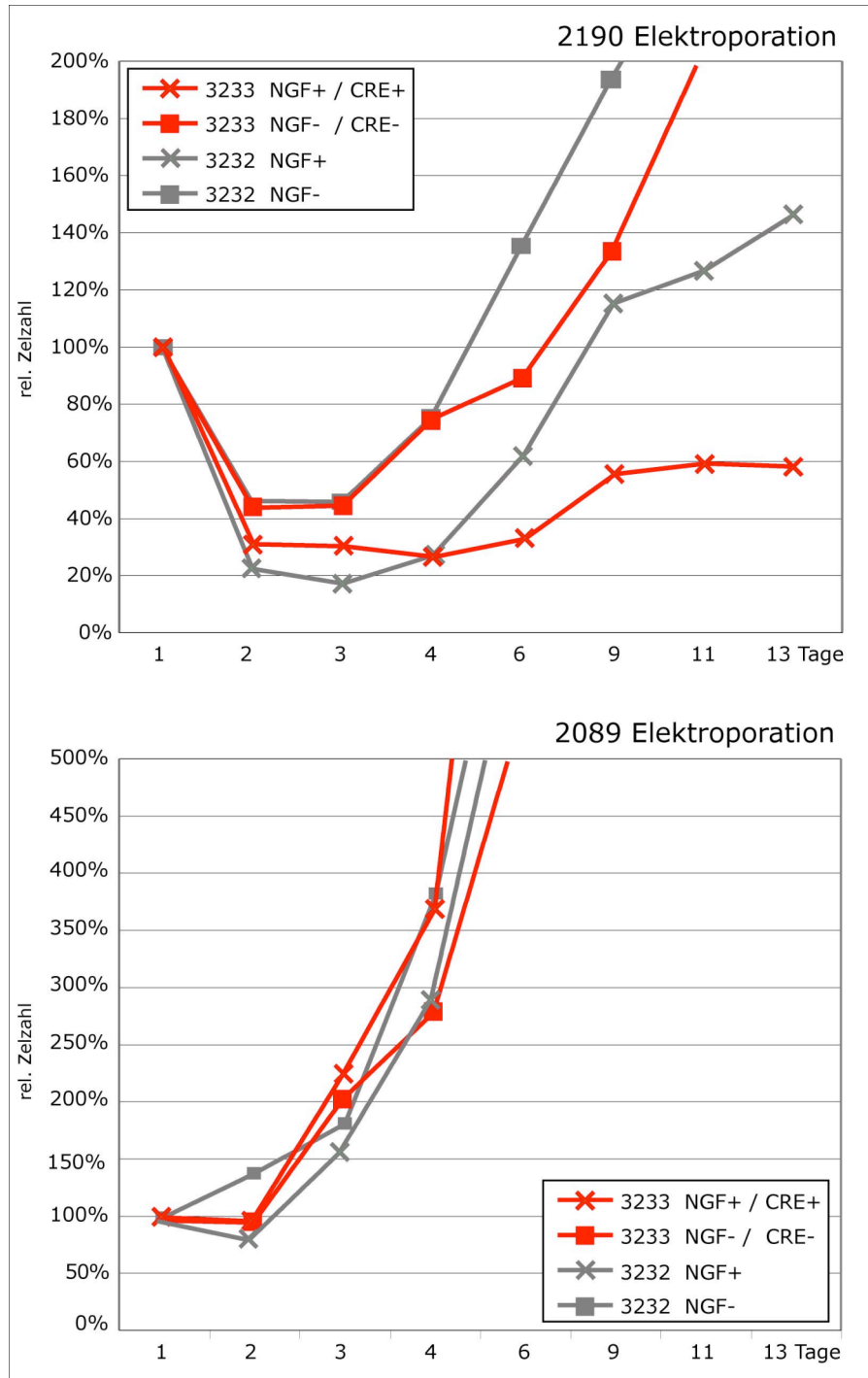
**Abb. 17: Proliferations- und Apoptose-Analyse CRE-transduzierter LCLs.** 2190- und 2089-infizierte LCLs wurden mit dem NGF-R- und CRE-exprimierenden Plasmid p3233 elektroporiert, die Zellen gemäß ihrer NGF-R-Oberflächenexpression (NGF-R<sup>+</sup> und NGF-R<sup>-</sup>) getrennt und wieder in Kultur gebracht. Die relativen Zellzahlen (Y-Achse, links) geben das Proliferationsverhalten im Laufe der Zeit (X-Achse) wieder. Während sich die CRE-negativen Populationen nach drei bis vier Tagen vom Elektroporations-Schock erholten, benötigte die CRE<sup>+</sup> 2089 Population hierfür vier Tage länger. Dieser Verzug ist auf die Genotoxizität der CRE-Rekombinase zurückzuführen. Die Deletion von LMP2A führte in CRE<sup>+</sup> 2190 Klonen (rote Kreuze) dazu, dass sie im angegebenen Zeitraum ihr Ausgangsniveau nicht wieder erreichten. Dieser massive Zelltod ist auf einen erhöhten Anteil apoptotischer Zellen zurückzuführen, wie die AnnexinV-Analyse (Y-Achse, rechts) zeigt. Nur ca. 10 % der CRE<sup>+</sup> 2089 WT Klone waren am Tag 1 apoptotisch (graue Balken) und dieser Wert ging rasch auf niedrige Werte zurück. LMP2A-deletierte Klone hingegen wiesen initial über 30 % AnnexinV<sup>+</sup> Zellen auf (rote Balken).

Dieser deutliche Phänotyp in Folge der LMP2A-Deletion beruht wie erwartet auf apoptotischen Prozessen, wie die Analyse der Membranintegrität zeigt (Abb. 17 rechte Achse). Bereits einen Tag nach Elektroporation zeigte sich in den AnnexinV-Färbungen ein deutlicher Unterschied zwischen den LCL Kulturen. Nur 5 bis 10% der nach den Sortierungskriterien NGF-R<sup>-</sup> Zellen waren AnnexinV positiv. Dies gilt gleichermaßen für die 2190 wie für die 2089 Kontrollpopulation (Daten nicht gezeigt). Ebenfalls waren nur ca. 10 % der CRE-exprimierenden WT 2089 Zellen positiv für den apoptotischen Marker (Abb. 17 unten, graue Balken). Betrachtet man hingegen CRE<sup>+</sup> 2190 LCLs, so fällt der hohe AnnexinV Wert von 30 % auf (rote Balken). Dieser Wert pendelte sich erst eine Woche später auf ein Normalmaß ein, während die CRE<sup>+</sup> 2089 Kultur bereits zwei Tage nach Elektroporation unter 5 % apoptotische Zellen aufwies. Dieser Versuch konnte mit einer anderen 2190 LCL wiederholt werden und liefert die gleiche Aussage wie das oben beschriebene Experiment.

In den elektroporierten Zellen war neben der beschriebenen Genotoxizität der CRE-Rekombinase ein Einfluss des NGF-R auf die Proliferation zwar unwahrscheinlich aber konnte nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Deswegen wurde die CRE-vermittelte LMP2A-Deletion in einem neuen Versuchansatz wiederholt und um einen Parameter erweitert. Neben dem beschriebenen CRE-Plasmid (p3233) wurden 2190- und 2089-infizierte LCLs zusätzlich mit einem Plasmid elektroporiert, das nur für den NGF-R unter CMV Promotor-Kontrolle kodiert (p3232). Die elektroporierten Kulturen wurden nach 18 Stunden in NGF-R-exprimierende und nicht-exprimierende Populationen sortiert, in Kultur gebracht und der Proliferations-Analyse unterzogen. Die Abbildung 18 (oben) zeigt die Proliferation der transfizierten 2190 LCLs. Obwohl durch den Elektroporations-Stress zunächst wieder eine Abnahme der Zellzahl zu beobachten war, erholten sich auch in diesem Versuch beide NGF<sup>-</sup> Populationen nach drei bis vier Tagen und begannen zu proliferieren. Die beiden NGF<sup>+</sup> Populationen zeigten bereits am zweiten Tag eine deutlich niedrigere Zellzahl, unabhängig davon, ob der NGF-R alleine (p3232) oder zusammen mit der CRE-Rekombinase (p3233) exprimiert wurde. Jedoch erholte sich die Population, die mit p3232 elektroporiert wurde (graue Kreuze) bereits am vierten Tag und proliferierte exponentiell, während die CRE-exprimierende und damit LMP2A-

---

deletierte Population (rote Kreuze) im gemessenen Zeitraum das Ausgangsniveau nicht wieder erreichte. Betrachtet man die WT 2089 Kontrollpopulation (Abb. 18 unten), so fällt zum einen auf, dass sich diese Zellen wesentlich schneller von der Elektroporation erholten. Dies lässt sich auf klonale Unterschiede der verwendeten Populationen zurückführen. Zum anderen erkennt man deutlich, dass weder die NGF-R<sup>+</sup> noch die NGF-R<sup>+</sup>/CRE<sup>+</sup> Population Unterschiede aufwies. Nach einem kurzfristigen Vitalitätsverlust haben die Zellen bereits am vierten Tag das Ausgangsniveau wieder erreicht. Durch diese Elektroporationen kann eindeutig bewiesen werden, dass der beobachtete Zelltod nicht mit der Elektroporation per se oder der Expression eines Transgens zusammenhängt. Auch kann ausgeschlossen werden, dass die Expression der CRE-Rekombinase genetische Alterationen hervorruft, die das Proliferationsverhalten entscheidend beeinflussen. Somit hängt der Zelltod in CRE-exprimierenden 2190 Zellen ursächlich mit der Deletion des viralen Proteins LMP2A zusammen. Diese Versuche unterstreichen die essentielle Bedeutung von LMP2A sowohl für die Etablierung als auch für die Aufrechterhaltung des transformierten Status von latent EBV-infizierten B-Zellen.

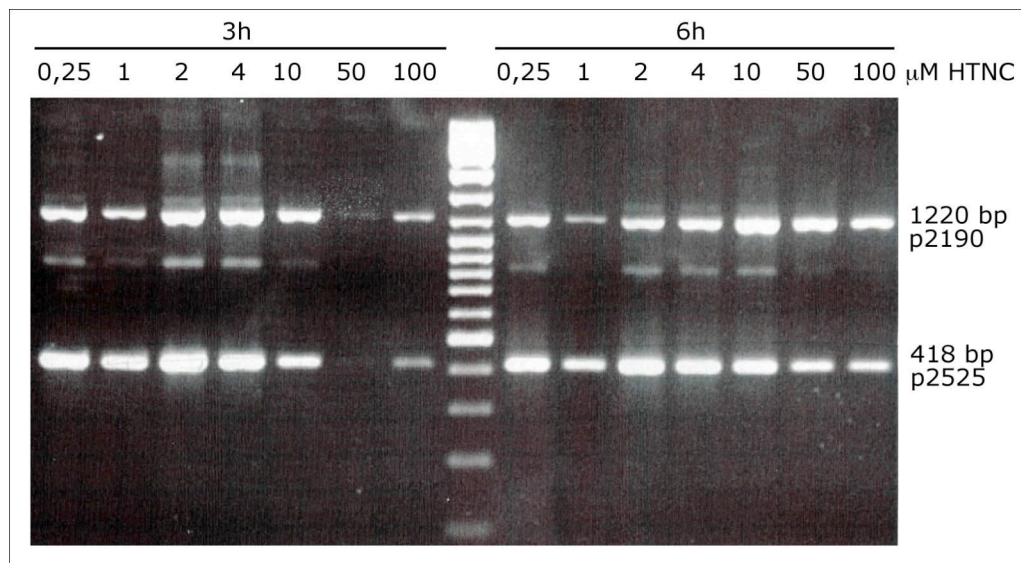


**Abb. 18: Proliferations-Analyse CRE- und NGF-R-elektroporierter LCLs.** 2190 und 2089 infizierte LCLs wurden entweder mit NGF-R (p3232) oder dem NGF-R- und CRE-kodierenden (p3233) Plasmiden elektroporiert und abhängig von der NGF-Expression in zwei Populationen getrennt. Die Analyse erfolgte wie in Abb. 12 beschrieben. Die Cre-vermittelte Deletion von LMP2A führte zu einem massiven lang andauernden Zellverlust in 2190 infizierten LCLs (oben, rote Kreuze). Genotoxische Effekte der Transgenexpression können durch die 2089 Elektroporation (unten) ausgeschlossen werden, da diese Population keine Wachstums-Retardation aufweist.

## 4.8. HTNC Protein Transduktion

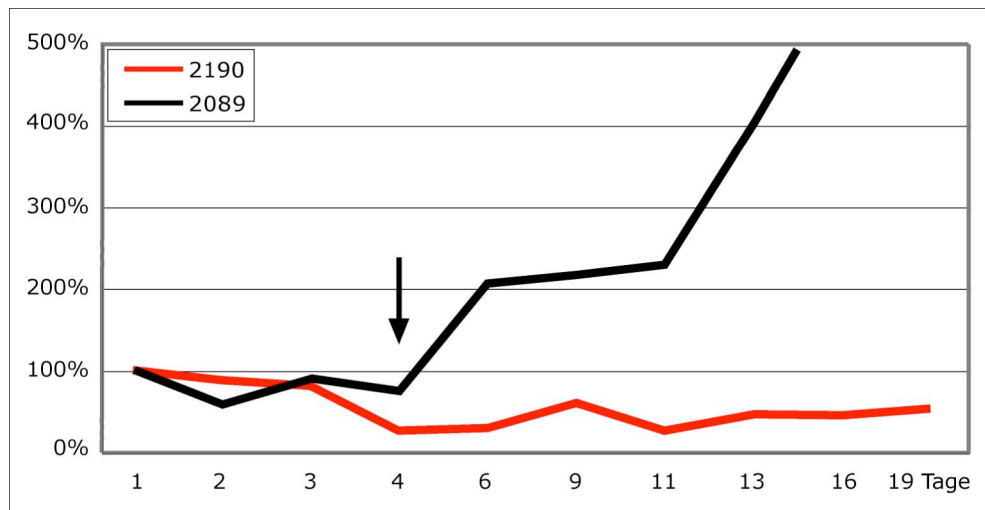
Neben der transienten Transfektion eines CRE-kodierenden Plasmids wurde in einem weiteren Experiment mit einem transduzierbaren CRE-Protein gearbeitet. Dieses Protein wurde freundlicherweise von F. Edenhofer (Universität Bonn) zur Verfügung gestellt. Es handelt sich dabei um das Fusionsprotein HTNC, das aus einem His-Tag, der Protein-Transduktionsdomäne (PTD) des HIV-Proteins TAT, einer Kernlokalisations-Sequenz (NLS) und der CRE-Rekombinase besteht (Peitz et al., 2002).

In Vorversuchen erwies sich das Protein-freie CD-CHO Medium (Invitrogen) als am besten geeignet für die LCLs, denn die Transduktion sollte in verschiedenen Proteinkonzentrationen zu verschiedenen Inkubationsdauern erfolgen. Die Abbildung 19 zeigt einen solchen Pilotversuch. Die Zellen wurden mit den angegebenen molaren Konzentrationen des CRE-Proteins drei oder sechs Stunden lang inkubiert. Die Verwendung von 1  $\mu$ M HTNC für drei Stunden erwies sich dabei als am besten geeignet.



**Abb. 19: Test der optimalen HTNC Proteintransduktion-Bedingungen.** 2190 LCLs wurden für drei bzw. 6 Stunden in angegebenen HTNC-Konzentrationen inkubiert. In allen Transduktions-Bedingungen kann durch eine anschließende PCR sowohl das Ausgangsplasmid 2190 als auch die durch CRE-Deletion entstandene Variante 2525 detektiert werden.

Diese Parameter wurden benutzt, um eine 2190 bzw. eine 2089 LCL-Kontrollpopulation zu transduzieren. Die Analyse erfolgte parallel zu den Elektroporations-Versuchen des vorangegangenen Abschnitts und das Ergebnis ist in Abbildung 20 graphisch dargestellt. Die 2089 infizierten LCLs proliferierten drei bis vier Tage nach Transduktion, dagegen blieb die 2190 Population im beobachtet Zeitraum auf einem Zellzahlniveau von ca. 50 % des Ausgangswertes. Erst Wochen nach Elektroporation begann auch diese Kultur zu proliferieren. Durch diesen experimentellen Ansatz konnte unabhängig bestätigt werden, dass LMP2A für das Überleben von etablierten LCLs essentiell ist.



**Abb. 20: Proliferations-Analyse nach HTNC-Protein-Transduktion.** 2190 und 2089 LCLs wurden für drei Stunden in 1  $\mu$ M HTNC inkubiert, gewaschen und wieder in Kultur gebracht. Die Proliferations-Analyse zeigt das Überleben der 2089 Population, während die 2190 Population das Ausgangsniveau im gemessenen Zeitraum nicht mehr erreicht. Der Einbruch der Zellzahl am vierten Tag resultiert aus der Zellentnahme am Tag zuvor (Pfeil). Aus diesen Zellen wurde DNA für die quantitative PCR gewonnen.

#### **4.8.1. Quantitative PCR zur Bestimmung der viralen Kopienzahl**

Da die Proteintransduktion nicht erlaubte, transduzierte von untransduzierten Zellen zu unterscheiden und somit die Proliferations-Analyse mit der gemischten Population durchgeführt werden musste, war unklar, wie hoch der Anteil der tatsächlich transduzierten Zellen war. Um diese Frage zu klären, wurde der transduzierten Population von 2190-infizierten LCLs am dritten Tag Zellen für eine DNA-Präparation entnommen und auf die Häufigkeit der CRE-vermittelten Deletion untersucht (Abb. 20 Pfeil). Durch die quantitative PCRs konnte die Menge der viralen Genome berechnet werden. In diesen Experimenten wurde ein 16- bis 21-facher Überschuss an 2525 ( $\Delta$ LMP2A) Episomen im Vergleich zu 2190 (WT-LMP2A) Episomen detektiert. Das Ergebnis deutet darauf hin, dass mit dieser Methode ein sehr hoher Prozentsatz der Zellpopulation erfolgreich transduziert werden konnte, was den Unterschied im Proliferationsverhalten bei LMP2A<sup>+</sup> und LMP2A<sup>-</sup> LCLs nach Transduktion in Abbildung 20 glaubhaft macht.

## **5. Diskussion**



Mehrere zum Teil widersprüchliche Funktionen werden dem LMP2A Protein des Epstein-Barr Virus Proteins zugeschrieben (Brinkmann and Schulz, 2006; Merchant et al., 2001). Besonderes Augenmerk verdient die strukturelle Homologie des B-Zell-Rezeptors (BZR) und LMP2A. Viele Publikationen zeigen, dass LMP2A wesentlich in Signalkaskaden eingreifen kann, die normalerweise vom B-Zell-Rezeptor initiiert werden. Widersprüchlich erscheinen jedoch die Resultate der experimentellen Ansätze, denn es konnten sowohl inhibierende als auch aktivierende Effekte einer LMP2A-Expression auf das B-Zell-Rezeptor-Signalnetzwerk beobachtet werden (siehe 1.3.3). Zum einen bleiben in B-Zellen nach einer LMP2A-Expression intrazelluläre Reaktionen auf eine Immunglobulin-Quervernetzung aus, weil vermutlich die Translokation des B-Zell-Rezeptors in „lipid rafts“ verhindert und der proteolytische Abbau essentieller Signalmoleküle induziert wird. Zum anderen bindet der N-Terminus von LMP2A Protein-Komplexe, die normalerweise Signalwege des B-Zell-Rezeptors initiieren können und wirkt dadurch anti-apoptotisch und proliferativ. *In vivo* Versuche zeigten, dass die LMP2A-Expression in der frühen B-Zell-Entwicklung fehlende BZR-Signale ersetzen kann (Caldwell et al., 2000; Casola et al., 2004).

Über die tatsächliche Rolle von LMP2A in verschiedenen Zelllinien oder in EBV-assoziierten Tumoren dagegen ist wenig bekannt. Die Struktur der LMP2A-Signaldomäne sowie die bisher publizierten teilweise paradoxen Ergebnisse lassen ein molekulares Mimikry des B-Zell-Rezeptors vermuten. Beobachtungen aus der Pathogenese des Hodgkin-Lymphoms erhärten diesen Verdacht. Die charakteristischen Hodgkin- und Reed-Sternberg (HRS) Zellen dieses Lymphoms, sowie Zellen aus Post-Transplantations-Lymphomen, stammen von B-Zellen ab, die typischerweise in den Keimzentren somatische Hypermutationen durchlaufen haben. Das Besondere an diesen Zellen jedoch ist, dass mindestens 25 % Mutationen in den Immunglobulingenen aufweisen, die eine korrekte Expression der Immunglobuline nicht mehr ermöglichen. Weil diese Zellen keine BZR-spezifischen Überlebenssignale akquirieren können, hätten sie noch in den Keimzentren durch Apoptose negativ selektioniert werden müssen. Da EBV-positive HRS-Zellen aber das virale Protein LMP2A exprimieren, das strukturelle und funktionelle Homologien zum fehlenden B-Zell-Rezeptor aufweist, liegt der Verdacht

nahe, dass LMP2A den B-Zell-Rezeptor ersetzen und die pro-apoptotischen Zellen mit überlebenswichtigen Signalen versorgen kann. Da wahrscheinlich ein wesentlich höherer Anteil als die gemessenen 25 % der HRS-Zellen einen funktionslosen B-Zell-Rezeptor tragen (siehe 1.4.4), wäre somit eine LMP2A-Expression eine wesentliche Voraussetzung für die Entstehung eines Hodgkin-Lymphoms und ein direkter Hinweis für die Bedeutung einer EBV-Infektion. In mehreren Arbeiten konnte bisher *in vitro* die Etablierung von LCLs aus humanen prä- und pro-B-Zellen gezeigt werden (Gregory et al., 1987; Hansson et al., 1983; Katamine et al., 1984) und obwohl EBV naive und Gedächtnis-B-Zellen gleichermaßen infizieren und transformieren kann (Ehlin-Henriksson et al., 2003), hängt das Überleben der B-Zellen von einem funktionalen B-Zell-Rezeptor ab (Kraus et al., 2004). Deswegen war unklar, ob EBV auch solche Keimzentrums-B-Zellen *ex vivo* infizieren und transformieren kann, die keinen B-Zell-Rezeptor exprimieren und damit als pro-apoptotische Zellen für die negative Selektion vorgesehen waren.

Um die Hypothese des molekularen Mimikry von LMP2A zu bestätigen, wurde die vorliegende Promotionsarbeit in zwei Teilen bearbeitet: der erste Teil beschäftigte sich mit der Frage, ob EBV pro-apoptotische B-Zell-Rezeptor-lose (BZR<sup>-</sup>) Keimzentrums-B-Zellen infizieren, transformieren und damit vor der Apoptose retten kann. Es wurde auch der Frage nachgegangen, ob LMP2A in diesem Prozess eine Rolle spielt. Der zweite Teil zielt auf die LMP2A-Expression in etablierten LCLs und damit auch im Tumor ab. Es sollte beantwortet werden, ob LMP2A-Signale auch in dieser Phase essentiell oder eventuell entbehrlich für das Überleben und die Proliferation der Zellen sind.

## 5.1. Die Rolle von LMP2A bei der Transformation BZR<sup>-</sup> B-Zellen

Zunächst wurden Lymphozyten aus Adenoiden präpariert und aus dieser gemischten B- und T-Zellpopulation die Zielzellen isoliert: B-Lymphozyten, die keinen B-Zell-Rezeptor exprimieren (BZR<sup>-</sup> abgekürzt). Experimente im Vorfeld zeigten, dass durch eine Kombination zweier Aufreinigungsschritte die höchste Reinheit erzielt werden konnte: im ersten Schritt wurden alle CD3<sup>+</sup> T-Zellen und alle BZR<sup>+</sup> B-Zellen durch spezifische magnetische Antikörper aus der Population entfernt. Die nun CD3<sup>-</sup>/BZR<sup>-</sup> Subpopulation wurde im zweiten Schritt positiv auf den Keimzentrumsmarker CD77 angereichert. Dadurch konnten zwei phänotypisch verschiedene Zellpopulationen erhalten werden. Zum einen die aufgereinigte Population, die keinen B-Zell-Rezeptor exprimiert (BZR<sup>-</sup>) und die wie breites erläutert, CD77-positive Keimzentrums-B-Zellen darstellen. Zum anderen die heterogene Ausgangspopulation, die sowohl Zellen enthält, die den B-Zell-Rezeptor exprimieren, aber auch einen ca. 30%-igen Anteil BZR<sup>-</sup> B-Zellen enthält. Diese heterogene Population wurde BZR<sup>+/-</sup> abgekürzt. Beide Populationen wurden mit zwei verschiedenen Virusmutanten infiziert. Diese Viren entsprechen entweder genotypisch dem Wildtyp EBV (Mutante 2190), tragen aber ein gefloxtes LMP2A-Allel, oder der LMP2A-negativen (LMP2A<sup>-</sup>) Mutante 2525. Die Proliferations-Analysen (Abb. 10) zeigten, wie bereits veröffentlicht (Brielmeier et al., 1996; Speck et al., 1999), dass beide Mutanten die BZR<sup>+/-</sup> Population infizieren und transformieren können. Wurde die BZR<sup>-</sup> Population mit 2190 infiziert, so wurden wie in der BZR<sup>+/-</sup> Population proliferierende Zellen detektiert. Da alle Infektionen mit derselben Virusdosis durchgeführt wurden und sich keine deutlichen Unterschiede im Proliferationsverhalten zeigten, kann davon ausgegangen werden, dass die BZR<sup>-</sup> Zellen mit der gleichen Effektivität wie BZR<sup>+</sup> Zellen infiziert und transformiert werden können. Zudem zeigten die auswachsenden BZR<sup>-</sup> LCLs keinen Phänotyp in Bezug auf ihr zelluläres Proliferationsverhalten. Wurde die BZR<sup>-</sup> Population allerdings mit der LMP2A-negativen EBV-Mutante 2525 infiziert, konnten nur sehr wenige proliferierende Zellen detektiert werden. Auch war es nicht möglich, LCLs aus diesem 2525-infizierten Pool zu

generieren, was auf die essentielle Rolle von LMP2A für die Transformation von BZR<sup>-</sup> Zellen hinweist.

Die transformierten Zellen wurden zehn Tage nach Infektion auf die Expression der leichten Immunglobulinketten getestet. Der Phänotyp der 2190-infizierten Population blieb stabil: die LCL, die aus der infizierten gemischten BZR<sup>+/-</sup> Population auswuchs, bestand immer noch aus einer sehr heterogenen Population von  $\lambda^+$ ,  $\kappa^+$  und doppelt negativen B-Zellen, die keine Oberflächenimmunglobuline tragen. Die LCL, die aus der sortierten und infizierten BZR<sup>-</sup> Population auswuchs, bestand erwartungsgemäß zum größten Teil aus  $\lambda^-/\kappa^-$  Zellen. Der Phänotyp der gemischten BZR<sup>+/-</sup> und mit 2525-infizierten Population hingegen unterschied sich deutlich. Die 2525-infizierten LCLs bestanden zehn Tage nach Infektion nur noch aus Zellen, die den B-Zell-Rezeptor hoch exprimieren, während die doppelt negative Fraktion nicht mehr detektierbar war. Diese Beobachtung unterstreicht eindrucksvoll die obigen Ergebnisse. Eine LMP2A-deletierte Virusmutante ist nicht in der Lage, BZR<sup>-</sup> B-Zellen zu transformieren. LMP2A muss demnach Signale vermitteln können, die essentiell für Zellen sind, die keinen B-Zell-Rezeptor exprimieren. BZR<sup>+</sup> Zellen sind auf diese Signale nicht angewiesen und proliferieren unabhängig einer LMP2A Expression.

Die Transformation der 2190-infizierten BZR<sup>-</sup> Population alleine kann jedoch nicht beweisen, dass EBV pro-apoptotische B-Zellen retten kann, die aufgrund fehlender BZR-Signale negativ selektioniert worden wären. Ein abortiver Transport des B-Zell-Rezeptors an die Zytoplasmamembran kann den Rezeptor an intrazelluläre Membranen dirigieren, von wo aus eine Signalvermittlung wie im Fall von LMP1 denkbar wäre (Lam and Sugden, 2003; Liu et al., 2006). Auf derartige Weise könnte in diesen phänotypisch BZR<sup>-</sup> Zellen die negative Selektion verhindert werden. Aus diesem Grund war es absolut notwendig, auf genetischer Ebene zu beweisen, dass es in dieser 2190-infizierten BZR<sup>-</sup> LCL-Kultur Klone gibt, denen es aufgrund von somatischen Hypermutationen nicht mehr möglich ist, einen funktionalen B-Zell-Rezeptor zu exprimieren. Um solche Klone zu identifizieren, wurden 321 Einzel-Zellklone aus insgesamt drei Probanden-Proben einem dreistufigen Analyseverfahren unterzogen: die erste Hürde bestand in der Expressions-Analyse der leichten Ketten (LK) des B-Zell-

Rezeptors am FACS-Gerät, wobei 34 % der Klone den B-Zell-Rezeptor exprimierten. Von diesen BZR<sup>+</sup> Zellen waren 12 % positiv für die kappa und 88 % positiv für die lambda leichte Kette. Dieses Verhältnis spiegelt nicht die normale Verteilung (65:35) im humanen Immunsystem wider, sondern ist auf die Tatsache zurückzuführen, dass es sich hier um eine vor-selektionierte BZR<sup>-</sup> Population handelt. Neben den 34 % BZR<sup>+</sup> Zellen zeigten 66 % der Klone keine messbare Expression der leichten Immunglobulinketten. Um eine intrazelluläre Expression auszuschließen, wurden aus dieser Gruppe 100 Klone einem Western-Blot zur Detektion der schweren Kette unterzogen. Diese Analyse bestätigte den Verdacht, da es einige Klone gab, die in FACS-Analysen zwar phänotypisch BZR<sup>-</sup>, aber dennoch positiv für die schwere Immunglobulinkette waren, die wahrscheinlich zytoplasmal exprimiert wird. Auf diese Weise konnten 64 Klone für weitere Analysen ausgeschlossen werden. Es gelang im folgenden Schritt die Immunglobulingene von 24 der 36 restlichen Klone, die weder eine Expression der leichten noch der schweren Kette aufwiesen, zu amplifizieren und zu sequenzieren. Dabei stellte sich heraus, dass es sich nur um neun verschiedene Klone handelte, da 15 Klone aus der ersten Patienten-Probe zumindest im sequenzierten Bereich identisch waren. Unter den neun Klonen konnten fünf identifiziert werden, die aufgrund von Mutationen in den kodierenden Bereichen der Immunglobulingene nicht in der Lage waren, einen funktionalen B-Zell-Rezeptor zu exprimieren. Da eine funktionale Rekombination des zweiten Allels ausgeschlossen werden konnte, entsprechen diese fünf Klone den gesetzten Kriterien und ähneln damit genotypisch den HRS-Zellen des Hodgkin-Lymphoms.

Dieser experimentelle Ansatz konnte beweisen, dass EBV in der Lage ist, pro-apoptotische BZR<sup>-</sup> Keimzentrums-B-Zellen zu infizieren, zu transformieren und dadurch vor der negativen Selektion zu retten. Die Verwendung einer LMP2A-negativen Mutante in diesen Infektions-Experimenten beweist zudem den essentiellen Einfluss der Signaldomäne des viralen Proteins in diesem Prozess. Diskussionswürdig erschien der Zeitpunkt der viralen Proteinexpression, denn die Überlebensdauer pro-apoptotischer Keimzentrumszellen wird mit 16 bis 24 Stunden angegeben (Lebecque et al., 1997; Liu et al., 1989; Mangeney et al., 1991), während die Expression von LMP1 und LMP2A

zwei bis drei Tage nach Infektion erwartet wird (Alfieri et al., 1991; Allday et al., 1989; Martin et al., 1993). Es konnte jedoch in dieser Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass EBV-infizierte B-Zellen bereits 24 Stunden nach Infektion zwei anti-apoptotische Proteine maximal exprimiert und damit eine später einsetzende Wirkung von LMP1 und LMP2A kompensieren kann (Altmann and Hammerschmidt, 2005). Zudem wurden im Rahmen dieser Arbeit LMP2A-Transkripte bereits 24 Stunden nach Infektion nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Deshalb kann auch in diesem frühen Stadium der Infektion von einem direkten Beitrag von LMP2A ausgegangen werden.

Die Etablierung BZR-defizienter Klone durch eine EBV-Infektion wurde zeitgleich von zwei weiteren Gruppen bestätigt (Bechtel et al., 2005; Chaganti et al., 2005; Mancao et al., 2005) und stellt einen möglichen Weg der Entstehung von EBV-positiven Hodgkin- und Post-Transplantations-Lymphomen dar. Es kann allerdings nur spekuliert werden, warum nur 40 bis 50 % aller HRS-Zellen positiv für EBV getestet wurden. Eine Möglichkeit ist der „hit-and-run“ Mechanismus, der postuliert, dass EBV die Transformation der B-Zellen eingeleitet hat. Die Akquirierung zusätzlicher somatischer Mutationen macht diese Zellen autark von EBV, so dass das Virus in der Folge verloren geht. Alternativ wird ein weiteres transformierendes Ereignis, wie z.B. Infektionen mit anderen Pathogenen, vermutet.

Die in dieser Arbeit isolierten fünf B-Zell-Klone unterscheiden sich jedoch in einem wesentlichen Punkt von HRS-Zellen: während die Tumorzellen ein virales Expressionsmuster der Latenz II aufweisen (Deacon et al., 1993; Kuppers, 2003), handelt es sich bei den in dieser Arbeit etablierten Klone um klassische LCLs, die alle elf EBV Gene der Latenz III exprimieren. Die Rolle von LMP2A in diesen sowie in den Tumorzellen kann dadurch aber nicht unterschätzt werden. Infizierte Keimzentrumzellen gesunder Virusträger zeigen die Expression von LMP2A im Rahmen eines Latenz II Musters (Babcock et al., 2000) und in LCLs wie auch in Hodgkin- und Post-Transplantations-Lymphomen wird LMP2A konsistent exprimiert (Herbst et al., 1991; Niedobitek et al., 1997; Pallesen et al., 1991).

Die Frage nach der Rolle von LMP2A in etablierten LCLs und damit wahrscheinlich auch im Tumor war Grundlage des zweiten Teils dieser Arbeit.

## 5.2. Die Rolle von LMP2A in transformierten Zellen

Um die Bedeutung einer kontinuierlichen Expression von LMP2A in etablierten LCLs zu untersuchen, wurde folgendes Experiment entworfen. Eine heterogene BZR<sup>+/-</sup> B-Zell-Population, die BZR-positive und BZR-negative Zellen enthält, wird mit einer Virusmutante infiziert, die genotypisch dem Wildtyp-EBV entspricht. Diese Virusmutante (2190) trägt allerdings ein von zwei loxP-Motiven flankiertes LMP2A Allel. Nach mehreren Wochen etabliert sich eine polyklonale BZR<sup>+/-</sup> LCL. Die Deletion des LMP2A Allels in dieser Zellpopulation könnte mit folgendem Szenario einhergehen: Alle BZR<sup>-</sup> Zellen werden in Apoptose gehen, da sie nunmehr weder von LMP2A noch vom BZR notwendige Überlebenssignale erhalten. BZR<sup>+</sup> Zellen hingegen müssten die LMP2A-Deletion überstehen, da ihnen alternativ noch die Signale des B-Zell-Rezeptors zur Verfügung stehen (Lam et al., 1997; Tze et al., 2005).

Die für diesen Versuch verwendeten LCLs wurden durch die Virusmutante 2190 transformiert, deren LMP2A-Promotor und erstes LMP2A-Exon von zwei loxP Sequenzen flankiert wird. Die transiente Expression der ortsspezifischen Cre-Rekombinase führt zur Deletion des LMP2A-Gens und damit zum Ausfall der LMP2A-vermittelten Signalaktivierung. Die transiente Transfektion des Cre-kodierenden Plasmides in LCLs war nur über die Elektroporationsmethode der Firma Amaxa möglich und selbst dadurch konnte maximal eine Transfektions-Effizienz von nur 50 % erreicht werden. Diese methodische Hürde scheint problematisch zu sein, da der Zelltod erwartungsgemäß ausschließlich die kleine Subpopulation der Cre<sup>+</sup>/BZR<sup>-</sup> Zellen betreffen sollte. Es war deshalb zu befürchten, dass der erwartete Verlust dieser Fraktion nicht detektiert werden kann, weil sie von allen Cre<sup>-</sup> und Cre<sup>+</sup>/BZR<sup>+</sup> Zellen überwachsen werden. Aus diesem Grund wurde das Rekombinase-kodierende Plasmid p3233 so kloniert, dass transfizierte Zellen durch die Ko-Expression des detektierbaren Oberflächenmarkers NGF-R identifiziert und selektioniert werden konnten. Eine 2190- und eine Wildtyp 2089-LCL Population als Kontrolle wurde gleichermaßen mit dem NGF-R-/CRE-exprimierenden Plasmid p3233 elektroporiert. Folgende Parameter flossen in die Aufreinigung 18 Stunden nach Elektroporation ein: Die Zellen mussten

morphologisch intakt sein (zum Ausschluss von toten Zellen und von Zelltrümmern); Zell-Dupletten wurden ausgeschlossen; sortiert wurden zwei Fraktionen: zum einen solche Zellen, die NGF-R am höchsten exprimierten (5 % der NGF-R-positiven Zellen) und zum anderen NGF-R-negative Zellen als Kontrollpopulation. Diese Sortierung ermöglichte es, das Verhalten zweier homogener Zellpopulationen zu untersuchen. Dabei wurde die Proliferation in Form der relativen Veränderung der Zellzahl und die Membranintegrität (Apoptose) durch AnnexinV-Färbungen gemessen.

In die Analyse der Abbildung 17 sind ausschließlich Zellen eingegangen, die den Belastungen der Elektroporation ausgesetzt waren. Dieser Stress manifestiert sich ein bis zwei Tage nach Elektroporation in einem hohen Anteil toter Zellen (bis zu 40 % nach 18 Stunden; Daten nicht gezeigt) und am Rückgang der relativen Zellzahl um ca. 50 % bezogen auf die Ausgangszellzahl. Dies gilt auch für alle Zellen, die das Plasmid nicht aufgenommen hatten, und somit NGF-R<sup>-</sup>/Cre<sup>-</sup> waren. Diese erholten sich nach zwei bis drei Tagen von der Elektroporation und proliferierten dann wie erwartet exponentiell. Die Zellen, die mit 2089 Wildtyp-EBV infiziert waren und mit dem Expressionsvektor erfolgreich transfiziert wurden (NGF-R<sup>+</sup>/CRE<sup>+</sup> in Abb.17), benötigen etwa zwei bis drei Tage länger, um sich zu erholen. Diese Verzögerung resultiert aus der Genotoxizität der Cre-Rekombinase. Wenn diese ortsspezifische Rekombinase lange und in hohen Konzentrationen exprimiert wird, kann sie Pseudo-loxP Sequenzen (Thyagarajan et al., 2000), die über das gesamte zelluläre Genom verteilt sind, als Substrat verwenden, was zu erheblichen genetischen Alterationen wie Kreuz-Rekombinationen und Deletionen führen kann (Loonstra et al., 2001; Silver and Livingston, 2001). Diese manifestieren sich *in vitro* durch einen erhöhten Zelltod (persönliche Kommunikation V. Heissmeier, GSF), der auch in dieser Arbeit beobachtet werden konnte (Abb. 17). Um diesen vom Phänotyp der LMP2A-Deletion abzugrenzen, wurde in allen Versuchen eine WT 2089 LCL-Kultur als Kontrolle mitgeführt. Im Gegensatz zu 2089-tragenden LCLs erreichte die NGF<sup>+</sup>/Cre<sup>+</sup> 2190 Population, in der das LMP2A-Allel deletiert worden war, im Beobachtungszeitraum die Ausgangszahl nicht wieder. Da sich diese beiden Populationen einzig in der LMP2A-Expression unterscheiden, korreliert der Verlust des LMP2A-Gens mit dem Zelltod oder dem Ausbleiben der zellulären Proliferation. Ein



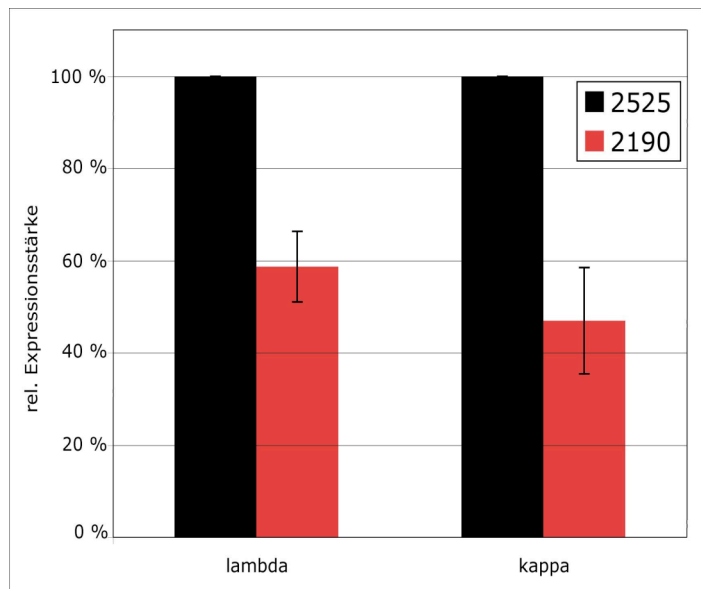
möglicher Einfluss durch die Expression des trunkierten NGF-R konnte durch Elektroporationen mit einem Plasmid ausgeschlossen werden, das nur für den NGF-Rezeptor nicht aber für die Cre-Rekombinase kodiert (Abb. 18).

Die AnnexinV-Färbungen beider NGF<sup>+</sup>/Cre<sup>+</sup> Populationen zeigte, dass Zellen, die LMP2A-negativ werden, der Apoptose unterliegen. Jedoch erkennt man, dass die Kultur nicht vollständig zusammenbrach (Abb. 17), sondern ein geringer Prozentsatz der Ausgangszellen auf niedrigem Niveau verharrte und nach acht Wochen wieder exponentiell proliferierte. Die überlebenden Klone waren allerdings ausschließlich LMP2A<sup>+</sup>, und damit der CRE-vermittelten Deletion des Gens entgangen. Offensichtlich konnten sie überleben, weil sie immer noch in der Lage waren, LMP2A zu exprimieren. Entweder deletierte die Rekombinase in diesen Zellen LMP2A nicht effizient genug (Gründe könnten an einer zu geringen Cre-Konzentration oder an durch z.B. Methylierungen unzugänglichen loxP-Sequenzen liegen) oder die Sortierung von NGF-R<sup>+</sup> Zellen war technisch unzulänglich, so dass die NGF-R<sup>+</sup> Fraktion mit wenigen NGF-R<sup>-</sup> Zellen kontaminiert war, die dann die Zellkultur dominierten.

Im eingangs skizzierten hypothetischen Szenario wurde davon ausgegangen, dass alle BZR<sup>+</sup> Zellen die LMP2A-Deletion überleben, weil ihnen alternativ die Signalkapazität des B-Zell-Rezeptors zur Verfügung steht. Gleichzeitig bestand die Annahme, dass BZR<sup>-</sup> Zellen die Deletion des LMP2A-Gens nicht überstehen würden. Diese Arbeitshypothese war jedoch nicht zutreffend, da auch BZR<sup>+</sup> Zellen die LMP2A-Deletion nicht überstanden. Wie beschrieben, überlebten nur wenige solcher Zellen, in denen die Deletion des LMP2A-Gen nicht erfolgte. Diese überlebenden Zellen stellten eine gemischte Population aus BRZ<sup>+</sup> wie BZR<sup>-</sup> Zellen dar, von denen die BZR<sup>+</sup> Zellen aber im Laufe der Zeit (diese Klone benötigten ca. 8 Wochen, bis sie wieder exponentiell proliferierten) eine niedrigere Expression des B-Zell-Rezeptors aufwiesen. Diese Reduktion der BZR-Expression von LCLs wurde bereits publiziert und konnte auch in der gänzlich unbehandelten 2190 Population beobachtet werden, die über den ganzen Versuchszeitraum parallel kultiviert wurde. Dieser Punkt wird weiter unten näher diskutiert, spielt jedoch in diesem Zusammenhang keine Rolle für die Aussage des Experimentes.

Dieses unerwartete Ergebnis lässt nur einen Schluss zu: die Expression von LMP2A ist in allen etablierten LCLs absolut notwendig, und das unabhängig von der Expression des B-Zell-Rezeptors. *In vitro* EBV-transformierte Zellen sind auf LMP2A-vermittelte Signale angewiesen, deren Ausfall zwangsläufig zum Zelltod führt. Selbst die Expression des B-Zell-Rezeptors scheint diese Signale nicht ersetzen zu können. Damit ergibt sich für diese beiden Proteine eine asymmetrische Homologie, die widersprüchlich zu sein scheint. Da LMP2A-defiziente EBV-Mutanten B-Zellen transformieren können, ersetzt der B-Zell-Rezeptor funktionell LMP2A in dieser Konstellation. Andererseits kann LMP2A den B-Zell-Rezeptor ersetzen und pro-apoptotische B-Zellen transformieren. Dabei beschränkt sich die Funktion von LMP2A nicht nur auf den Ersatz des B-Zell-Rezeptors, sondern dominiert das BZR-Signal, da in etablierten LCLs ein Ausfall des LMP2A-Signals nicht durch eine BZR-Expression kompensiert werden kann. Daraus ergibt sich folgender Widerspruch: Warum proliferieren 2525-infizierte (LMP2A-defiziente) LCLs, wohingegen LCLs sterben, wenn die Expression von LMP2A in etablierten LCLs nachträglich unterbunden wird (2190-infiziert und Cre-deletiert)? Eine

wahrscheinliche Erklärung liefert die detaillierte Betrachtung der BZR-Expressions-Niveaus (Abb. 10, letzte Spalte). LMP2A-defiziente, 2525-infizierte LCLs zeigen eine stärkere Expression der beiden leichten Immunglobulinketten  $\lambda$  und  $\kappa$  an der Zelloberfläche als 2190-infizierte LCLs. Die Abbildung 21 gibt die relativen Expressions-Stärken der  $\lambda$ - und  $\kappa$ -Ketten dreier unabhängiger Versuche wieder, wobei die Expression der leichten Ketten in 2190-infizierten LCLs im Vergleich zu 2525-infizierten LCLs deutlich



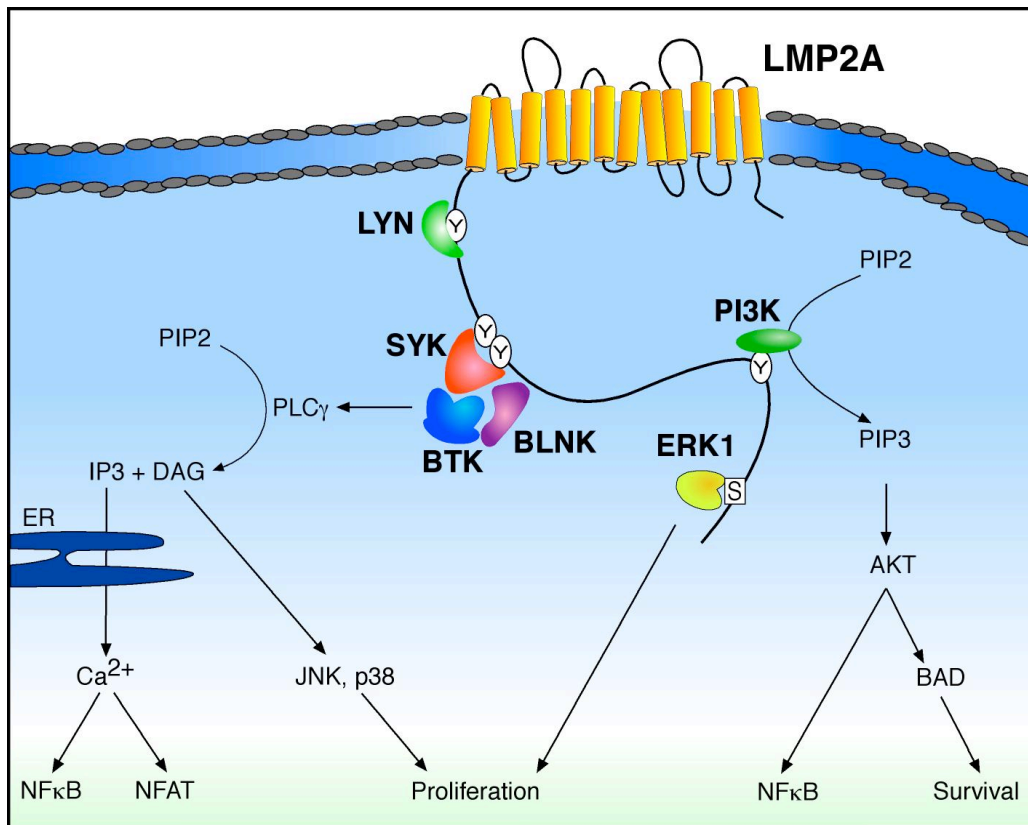
**Abb. 21: Erhöhte BZR-Expression in LMP2A-defizienten LCLs.** Die gemittelten Medianwerte der Expression der leichten Immunglobulinketten auf 2525-infizierte Kulturen (schwarz) sind auf 100 % gesetzt und gegen die auf ca. die Hälfte reduzierten Expressions-Niveaus der 2190-infizierten Kulturen (rot) aufgetragen.

---

reduziert ist. In 2525-LCLs wird das Fehlen des LMP2A-vermittelten Signals durch eine erhöhte Immunglobulin-Expression und damit durch eine erhöhte Signalaktivität des B-Zell-Rezeptors kompensiert. LMP2A<sup>+</sup> 2190-LCLs, in denen LMP2A ein konstantes Signal aufrecht erhält, sind demnach auf BZR-Signale, eines „trickling receptor“ (Kraus et al., 2004), nicht mehr angewiesen. Offensichtlich folgt aus dieser Konstellation eine veränderte Expressionsstärke des B-Zell-Rezeptors. Jochner und Kollegen konnten bereits zeigen, dass die IgM-Expression in LCLs EBNA2-abhängig reguliert wird (Jochner et al., 1996). In LMP2A-positiven LCLs wird IgM transkriptionell durch eine EBNA2-Induktion herunterreguliert. Da die LMP2A-Expression EBNA2-abhängig reguliert wird, könnten die Ergebnisse dieser Arbeit einen weiteren Erklärungsansatz für diese Beobachtung liefern. Nach Induktion von EBNA2 wird unter anderem LMP2A hochreguliert. Dessen Signalwirkung dominiert das IgM-Signal, welches dadurch herunterreguliert werden kann. Somit könnte der oben angesprochene Widerspruch gelöst werden. Wenn in 2190-infizierten LCLs die LMP2A-Expression durch eine Cre-vermittelte Deletion ausgeschaltet wird, kann die erniedrigte BZR-Expression den Verlust der Überlebenssignale nicht kompensieren und folglich sterben die Zellen ab. Das konstant hohe Expressions-Niveau des B-Zell-Rezeptors in 2525-infizierten LCLs hingegen erlaubt es diesen Zellen auch ohne die Expression von LMP2A zu überleben.

### 5.3. LMP2A und der B-Zell-Rezeptor: Synergie oder Konkurrenz?

Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstreichen die Wichtigkeit von LMP2A sowohl bei der Etablierung als auch bei der Aufrechterhaltung der EBV-Latenz. Es konnte gezeigt werden, dass die LMP2A-Signalwirkung nicht nur die Signalwirkung des B-Zell-Rezeptors ersetzen kann, sondern diese sogar dominiert. Diese Dominanz lässt die bisher veröffentlichten paradoxen Ergebnisse der *in vitro*-Effekte einer LMP2A-Expression verständlich und stimmig erscheinen. Nach einer Quervernetzung der Membran-Immunglobuline kann die Zelle, wenn sie auch LMP2A exprimiert, nicht mehr mit typischen Antworten wie der Kalzium-Mobilisierung, der Phosphorylierung von Protein-Tyrosin-Kinasen und der Transkriptions-Aktivierung reagieren (Ikeda et al., 2005). Verschiedene Möglichkeiten werden diskutiert, wie LMP2A das B-Zell-Rezeptor-Signal blockieren könnte (Abschnitt 1.3.3). Diese Blockade steht in deutlichem Widerspruch zu der Fähigkeit von LMP2A, Signalkaskaden unterschiedlichster Art zu aktivieren. Deshalb lässt die Interpretation der publizierten Experimente, die keine Signalweiterleitung des B-Zell-Rezeptors erkennen lassen, Raum für Diskussionen. Wie unten gezeigt, bindet LMP2A Proteine, die als Mediatoren der BZR-Signalweiterleitung bekannt sind und aktiviert dadurch die gleichen Signalwege wie der B-Zell-Rezeptor (Vergleich Abb. 5 und 22). Im Gegensatz zu den BZR-Signalen sind die LMP2A-vermittelten Signale konstitutiv und stärker ausgeprägt. Somit dominieren LMP2A-Signale sowohl das Niveau der BZR-Expression als auch dessen Signalwirkung. Es ist deshalb möglich, dass die Aktivierung der typischen Signalwege des B-Zell-Rezeptors durch LMP2A nicht verhindert wird, sondern sie bereits durch LMP2A maximal aktiviert sind. Wenn versucht wird, in LMP2A-positiven Zellen den B-Zell-Rezeptor durch Immunglobulin-Quervernetzungen zu aktivieren, können aufgrund der beständig hohen Signalaktivität von LMP2A keine zusätzlichen Signale mehr vom B-Zell-Rezeptor detektiert werden. Ein Vergleich der Signalkaskaden des B-Zell-Rezeptors (Abb. 5) mit den Kaskaden, die LMP2A aktivieren kann (Abb. 22), verdeutlicht die Homologie auf molekularer Ebene.



**Abb. 22: LMP2A-induzierte Signalwege.** LMP2A bindet Proteine, die auch im Signalnetzwerk des B-Zell-Rezeptors eine essentielle Rolle spielen und in dieser Graphik farbig dargestellt sind. LYN induziert die Phosphorylierung verschiedener Tyrosinreste, an die SYK und PI3K binden. An SYK binden BTK und BLNK, die durch PLC- $\gamma$  zur Bildung von IP<sub>3</sub> und DAG führen. Die folgende Kalzium-Freisetzung führt zu vielfältigen Zellaktivitäten. PI3K aktiviert AKT, das wie die aktivierten MAP-Kinasen ERK1, JNK und p38 anti-apoptotisch und proliferativ wirkt.

Im Wesentlichen sind es drei Proteine, welche sowohl die Signalwege des B-Zell-Rezeptor als auch die des LMP2A-Proteins induzieren. Erstens die Protein-Tyrosinkinase SYK, die eine Plattform für die Komplexbildung mit BTK und BLNK bildet. Dadurch wird PLC- $\gamma$  aktiviert, das PIP<sub>2</sub> in IP<sub>3</sub> und DAG spaltet. IP<sub>3</sub> verursacht eine Depolarisation der Membran des Endoplasmatischen Retikulums, was zur Freisetzung von Kalzium führt (Berridge et al., 2003). Die Erhöhung der freien Kalzium-Konzentration hat weit reichende Folgen für die Zelle. Das zweite Protein, das sowohl an den B-Zell-Rezeptor als auch an LMP2A binden kann, ist die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K), die den Anteil an PIP<sub>3</sub> im Zytoplasma erhöht. Dadurch wird AKT aktiviert und dissoziiert von der Membran (Datta et al., 1999). Aktiviertes AKT hemmt die Apoptose, indem es

pro-apoptotische Proteine wie BAD und Kaspase-9 phosphoryliert und inaktiviert. Außerdem werden I $\kappa$ B-Kinase, die CDK-Inhibitoren p21 und p27 und MDM2 phosphoryliert. All diese Prozesse fördern das Überleben der Zelle. Schließlich aktiviert die Bindung der Mitogen-aktivierte-Protein-Kinase ERK zusammen mit dem „second messenger“ DAG Signalwege der MAPK-Familie. Dazu gehören die Mediatoren ERK1/2, JNK und p38, die wichtige zelluläre Prozesse wie Genexpression, Proliferation, Apoptose und Motilität steuern (Chang and Karin, 2001). Vermutlich werden all diese Signalwege von LMP2A konstitutiv aktiviert und sichern somit das Überleben der infizierten Zellen unabhängig vom B-Zell-Rezeptor.

Bisherige Veröffentlichungen gehen davon aus, dass LMP2A zur Transformation von B-Zellen nicht benötigt wird (Briemeier et al., 1996; Pegtel et al., 2005). Dies gilt aber wahrscheinlich nur für *in vitro*-Versuche mit naiven oder muren B-Zellen. Für die *in vivo* Situation muss nach diesen Ergebnissen umgedacht werden. Zellen, die eine Keimzentrumsreaktion durchlaufen, erhalten durch LMP2A einen überlebenswichtigen Selektionsvorteil, da die Majorität der Keimzentrumszellen einen niedrig-affinen oder überhaupt keinen B-Zell-Rezeptor exprimieren. All diese Zellen werden durch eine LMP2A-Expression und die damit einhergehende Signalwirkung effektiv vor der Apoptose gerettet. Somit ergibt sich ein völlig neuer Ansatz, warum LMP2A konsistent in Gedächtnis-B-Zellen des peripheren Blutes, in LCLs und in EBV-assoziierten Tumorzellen exprimiert wird. Dieses Protein steht hierarchisch nicht neben sondern über dem B-Zell-Rezeptor und ermöglicht dadurch erst das Durchlaufen der Keimzentrumsreaktion und damit die Etablierung und Aufrechthaltung eines transformierten Status.

## 5.4. Offene Fragen und Ausblick

Wie oben beschrieben haben verschiedene Arbeitsgruppen die direkte Assoziation von LMP2A mit einer Vielzahl von Proteinen nachgewiesen. Auch konnten bereits Aktivierungen mehrerer Effektor-Proteine gezeigt werden (Portis and Longnecker, 2004). Diese Versuche wurden allerdings nicht in B-Zellen bzw. nur mit LMP2A-Expressionskonstrukten und nicht im EBV-Kontext durchgeführt. Daher kann nicht mit Sicherheit auf die tatsächliche Situation in EBV-infizierten B-Zellen geschlossen werden. Bisher ist auch unbekannt, wie genau die an LMP2A gebundenen Proteine die Signale weiterleiten. So ist unklar, ob wirklich die exakt gleichen Signalwege wie die des B-Zell-Rezeptors genutzt werden und welche zellulären Zielgene von LMP2A reguliert werden. Um auf diese Fragen einzugehen, wurden im Rahmen dieser Arbeit auch zwei weitere EBV-Mutanten kloniert, die ein chimäres LMP2A-Protein exprimieren. Dazu wurde der intrazelluläre N-Terminus von LMP2A mit den extrazellulären Domänen anderer Proteine fusioniert. Die Verwendung spezifischer Antikörper, die gegen die extrazelluläre Domäne gerichtet ist, erlaubt eine Quervernetzung und Oligomerisierung der chimären LMP2A-Proteine und damit eine konditionale Induktion der LMP2A-Signale, ähnlich wie bei LMP1 (Dirmeier et al., 2005). In LCLs, die mit diesen Virus-Mutanten transformiert werden, kann entweder durch die Quervernetzung des LMP2A-Fusionsproteins oder durch die Quervernetzung des B-Zell-Rezeptors selektiv nur eine oder beide Kaskaden gleichzeitig induziert werden. Mit Hilfe dieser Kombinatorik lassen sich Unterschiede in beiden Signalkaskaden herausarbeiten. Die Kinetik der Phosphorylierung von SYK, LYN, AKT, PLC- $\gamma$ , ERK und BTK ließe sich durch klassische Western-Blot-Analysen mit phospho-spezifischen Antikörpern untersuchen. Eine neuere Methode steht mit der Verwendung derartiger Antikörper und intrazellulärer Färbungen, die im FACS-Gerät detektiert werden können, zur Verfügung. Nach Stimulation der LMP2A- oder der BZR-Signalwege kann der veränderte Kalzium-Ausstrom und die veränderte NF $\kappa$ B-Aktivität gemessen werden. Eine globale Veränderung der Genexpression kann durch Micro-Array-Plattformen (Human Genome Survey Microarray, Applied Biosystems) sehr detailliert untersucht werden. Derartige Experimente wurden im Rahmen dieser Arbeit bereits begonnen. Sie werden zur Klärung dieser noch offenen Fragen führen und neue Erkenntnisse zum Verständnis der molekularen Mechanismen Herpesvirus-assoziiierter humaner Tumorerkrankungen beitragen.

## **6. Zusammenfassung**



Tumorzellen des Hodgkin-Lymphoms sind transformierte B-Zellen, die paradoxerweise den Verlust des genuinen B-Zell-Rezeptors (BZR) tolerieren. Ihre Immunglobulingene enthalten Mutationen, die eine Expression des B-Zell-Rezeptors verhindern, was unmittelbar zur Apoptose dieser Zellen führen müsste. Warum diese pro-apoptotischen BZR-defizienten B-Zellen die negative Selektion umgehen und auf diese Weise zur Etablierung eines Tumors beitragen, ist unklar. Die Infektion mit EBV und die Expression des viralen Proteins LMP2A liefern einen möglichen Erklärungsansatz für das Überleben dieser pro-apoptotischen B-Zellen. Aufgrund der Homologie von LMP2A zum B-Zell-Rezeptor wird angenommen, dass das virale Protein BZR-Signale simulieren und dadurch BZR-defiziente B-Zellen vor der Apoptose retten kann. Drei wesentliche Fragen sollten deshalb im Rahmen dieser Arbeit beantwortet werden. Kann eine EBV-Infektion pro-apoptotische und BZR-defiziente B-Zellen vor der Apoptose retten? Welche Rolle spielt LMP2A in diesem Prozess? Ist die Expression von LMP2A für die Aufrechterhaltung des transformierten Status essentiell?

BZR-defiziente B-Zellen konnten *in vitro* nur erfolgreich transformiert werden, wenn sie mit LMP2A-exprimierendem EBV infiziert wurden. Eine LMP2A-defiziente Virusmutante dagegen transformierte ausschließlich B-Zellen, die den B-Zell-Rezeptor auf hohem Niveau exprimierten. Das Überleben dieser LMP2A-negativen Zellen hängt wesentlich von diesem hohen Expressionsniveau des B-Zell-Rezeptors ab, während LMP2A-positive Zellen die Expression des B-Zell-Rezeptors herunterregulieren. Ursprünglich LMP2A-positive Zellen überleben die CRE-induzierte Deletion des LMP2A Gens nicht, da in diesen Zellen das niedrige Expressions-Niveau des B-Zell-Rezeptors das ausbleibende LMP2A Signal nicht kompensieren konnte. Diese Versuche zeigen, dass LMP2A Signale des B-Zell-Rezeptors nicht nur ersetzt, sondern sogar dominiert. Diese Ergebnisse liefern ein Erklärungsmodell, das scheinbar widersprüchliche publizierte Daten neu beleuchtet. BZR-Signale können in LMP2A-positiven Zellen nicht induziert werden, da LMP2A die gemeinsamen Signalwege maximal aktiviert und dominiert. Die Expression von LMP2A ist sowohl in der initialen Phase der Infektion als auch in der latenten Phase von essentieller Bedeutung für den transformierten Status, weil sie für B-Zellen konstitutiv überlebenswichtige Stimuli liefert, die den BZR-Signalen analog sind.

Neben LMP1, das einem konstitutiven CD40-L ähnelt, besitzt EBV damit in Form von LMP2A ein zweites Protein, das durch molekulare Mimikry überlebenswichtige B-Zell-Signalwege aktiviert und zur Transformation der infizierten B-Zellen einen wesentlichen Beitrag liefert.

## **7. Abkürzungen**

---

$\alpha$	anti
Abb.	Abbildung
APC	Allophycocyanin
APS	Ammoniumperoxidisulfat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderalbuminserum („bovine serum albumin“)
BZR	B-Zell-Rezeptor
ca.	zirka
CD	Oberflächenantigen („cluster of differentiation“)
CMV	Cytomegalovirus
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Dsoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EBNA	Epstein-Barr Virus nukleäres Antigen
EBV	Epstein-Barr Virus
bzw.	beziehungsweise
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FKS	Fötales Kälberserum
GFP	Grünes fluoreszierendes Protein („green fluorescence protein“)
HL	Hodgkin-Lymphom
HRP	gekoppelte Meerrettich-Peroxidase („horseradish peroxidase“)
HRS	Hodgkin- und Reed-Sternberg Zelle
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
$\kappa$	kappa leichte Immunglobulinkette
Kb	Kilobasenpaar(e)
kDa	Kilodalton
$\lambda$	lambda leichte Immunglobulinkette
l	Liter
LB	Luria Bertani
LK	leichte Immunglobulinkette
LMP	Latentes Membranprotein
LCL	Lymphoblastoide Zelllinie („lymphoblastoid cell line“)
mA	Milliampere
min.	Minute
MOI	Virusdosis („multiplicity of infection“)
mRNA	Boten-RNA („messenger RNA“)
NGF-R	Nerven-Wachstumsfaktor-Rezeptor („nerve growth factor receptor“)
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion („polymerase chain reaction“)
PE	Phycoerythrin
PI	Propidium-Iodid
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
SDS	Natriumdodecylsulfat

---

TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
UZ	Ultrazentrifuge
V	Volt
Vol.	Volumen
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

## **8. Literatur**

- Alexander, F. E., Daniel, C. P., Armstrong, A. A., Clark, D. A., Onions, D. E., Cartwright, R. A., and Jarrett, R. F. (1995). Case clustering, Epstein-Barr virus Reed-Sternberg cell status and herpes virus serology in Hodgkin's disease: results of a case-control study. *Eur J Cancer* *31A*, 1479-1486.
- Alexander, F. E., Jarrett, R. F., Lawrence, D., Armstrong, A. A., Freeland, J., Gokhale, D. A., Kane, E., Taylor, G. M., Wright, D. H., and Cartwright, R. A. (2000). Risk factors for Hodgkin's disease by Epstein-Barr virus (EBV) status: prior infection by EBV and other agents. *Br J Cancer* *82*, 1117-1121.
- Alfieri, C., Birkenbach, M., and Kieff, E. (1991). Early events in Epstein-Barr virus infection of human B lymphocytes. *Virology* *181*, 595-608.
- Allday, M. J., Crawford, D. H., and Griffin, B. E. (1989). Epstein-Barr virus latent gene expression during the initiation of B cell immortalization. *J Gen Virol* *70 (Pt 7)*, 1755-1764.
- Allen, M. D., Young, L. S., and Dawson, C. W. (2005). The Epstein-Barr virus-encoded LMP2A and LMP2B proteins promote epithelial cell spreading and motility. *J Virol* *79*, 1789-1802.
- Altmann, M., and Hammerschmidt, W. (2005). Epstein-Barr virus provides a new paradigm: a requirement for the immediate inhibition of apoptosis. *PLoS Biol* *3*, e404.
- Ambinder, R. F., Browning, P. J., Lorenzana, I., Leventhal, B. G., Cosenza, H., Mann, R. B., MacMahon, E. M., Medina, R., Cardona, V., Grufferman, S., and et al. (1993). Epstein-Barr virus and childhood Hodgkin's disease in Honduras and the United States. *Blood* *81*, 462-467.
- Anagnostopoulos, I., Herbst, H., Niedobitek, G., and Stein, H. (1989). Demonstration of monoclonal EBV genomes in Hodgkin's disease and Ki-1-positive anaplastic large cell lymphoma by combined Southern blot and in situ hybridization. *Blood* *74*, 810-816.
- Andersson, J. (2006). Epstein-Barr virus and Hodgkin's lymphoma. *Herpes* *13*, 12-16.
- Babcock, G. J., Hochberg, D., and Thorley-Lawson, A. D. (2000). The expression pattern of Epstein-Barr virus latent genes in vivo is dependent upon the differentiation stage of the infected B cell. *Immunity* *13*, 497-506.
- Bechtel, D., Kurth, J., Unkel, C., and 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*, 4345-4350.
- Berridge, M. J., Bootman, M. D., and Roderick, H. L. (2003). Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* *4*, 517-529.
- Bonadonna, G. (2000). Historical review of Hodgkin's disease. *Br J Haematol* *110*, 504-511.
- Borza, C. M., and Hutt-Fletcher, L. M. (2002). Alternate replication in B cells and epithelial cells switches tropism of Epstein-Barr virus. *Nat Med* *8*, 594-599.
- Brauninger, A., Schmitz, R., Bechtel, D., Renne, C., Hansmann, M. L., and Kuppers, R. (2006). Molecular biology of Hodgkin's and Reed/Sternberg cells in Hodgkin's lymphoma. *Int J Cancer* *118*, 1853-1861.

- Brielmeier, M., Mautner, J., Laux, G., and 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), 2807-2818.
- Brinkmann, M. M., and Schulz, T. F. (2006). Regulation of intracellular signalling by the terminal membrane proteins of members of the Gammaherpesvirinae. *J Gen Virol* 87, 1047-1074.
- Brousset, P., Schlaifer, D., Meggetto, F., Bachmann, E., Rothenberger, S., Pris, J., Delsol, G., and Knecht, H. (1994). Persistence of the same viral strain in early and late relapses of Epstein-Barr virus-associated Hodgkin's disease. *Blood* 84, 2447-2451.
- Burns, D. M., and Crawford, D. H. (2004). Epstein-Barr virus-specific cytotoxic T-lymphocytes for adoptive immunotherapy of post-transplant lymphoproliferative disease. *Blood Rev* 18, 193-209.
- Caldwell, R. G., Brown, R. C., and Longnecker, R. (2000). Epstein-Barr virus LMP2A-induced B-cell survival in two unique classes of EmuLMP2A transgenic mice. *J Virol* 74, 1101-1113.
- Caldwell, R. G., Wilson, J. B., Anderson, S. J., and Longnecker, R. (1998). Epstein-Barr virus LMP2A drives B cell development and survival in the absence of normal B cell receptor signals. *Immunity* 9, 405-411.
- Cartwright, R. A., and Watkins, G. (2004). Epidemiology of Hodgkin's disease: a review. *Hematol Oncol* 22, 11-26.
- Casola, S., Otipoby, K. L., Alimzhanov, M., Humme, S., Uyttersprot, N., Kutok, J. L., Carroll, M. C., and Rajewsky, K. (2004). B cell receptor signal strength determines B cell fate. *Nat Immunol* 5, 317-327.
- Chaganti, S., Bell, A. I., Pastor, N. B., Milner, A. E., Drayson, M., Gordon, J., and Rickinson, A. B. (2005). Epstein-Barr virus infection in vitro can rescue germinal center B cells with inactivated immunoglobulin genes. *Blood* 106, 4249-4252.
- Chang, K. L., Albuja, P. F., Chen, Y. Y., Johnson, R. M., and Weiss, L. M. (1993). High prevalence of Epstein-Barr virus in the Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease occurring in Peru. *Blood* 81, 496-501.
- Chang, L., and Karin, M. (2001). Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* 410, 37-40.
- Chen, S. Y., Lu, J., Shih, Y. C., and Tsai, C. H. (2002). Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A regulates c-Jun protein through extracellular signal-regulated kinase. *J Virol* 76, 9556-9561.
- Chung, C. T., Niemela, S. L., and Miller, R. H. (1989). One-step preparation of competent Escherichia coli: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 2172-2175.
- Connors, J. M. (2005). State-of-the-art therapeutics: Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* 23, 6400-6408.
- Corbett, S. J., Tomlinson, I. M., Sonnhammer, E. L., Buck, D., and Winter, G. (1997). Sequence of the human immunoglobulin diversity (D) segment locus: a systematic



- analysis provides no evidence for the use of DIR segments, inverted D segments, "minor" D segments or D-D recombination. *J Mol Biol* *270*, 587-597.
- Datta, S. R., Brunet, A., and Greenberg, M. E. (1999). Cellular survival: a play in three Akts. *Genes Dev* *13*, 2905-2927.
- Dawson, C. W., George, J. H., Blake, S. M., Longnecker, R., and Young, L. S. (2001). The Epstein-Barr virus encoded latent membrane protein 2A augments signaling from latent membrane protein 1. *Virology* *289*, 192-207.
- Deacon, E. M., Pallesen, G., Niedobitek, G., Crocker, J., Brooks, L., Rickinson, A. B., and Young, L. S. (1993). Epstein-Barr virus and Hodgkin's disease: transcriptional analysis of virus latency in the malignant cells. *J Exp Med* *177*, 339-349.
- Delecluse, H. J., Hilsendegen, T., Pich, D., Zeidler, R., and Hammerschmidt, W. (1998). Propagation and recovery of intact, infectious Epstein-Barr virus from prokaryotic to human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *95*, 8245-8250.
- Diehl, V., Thomas, R. K., and Re, D. (2004). Part II: Hodgkin's lymphoma--diagnosis and treatment. *Lancet Oncol* *5*, 19-26.
- Dirmeier, U., Hoffmann, R., Kilger, E., Schultheiss, U., Briseno, C., Gires, O., Kieser, A., Eick, D., Sugden, B., and Hammerschmidt, W. (2005). Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus coordinately regulates proliferation with control of apoptosis. *Oncogene* *24*, 1711-1717.
- Drexler, H. G. (1992). Recent results on the biology of Hodgkin and Reed-Sternberg cells. I. Biopsy material. *Leuk Lymphoma* *8*, 283-313.
- Dykstra, M. L., Longnecker, R., and Pierce, S. K. (2001). Epstein-Barr virus coopts lipid rafts to block the signaling and antigen transport functions of the BCR. *Immunity* *14*, 57-67.
- Ehlin-Henriksson, B., Gordon, J., and Klein, G. (2003). B-lymphocyte subpopulations are equally susceptible to Epstein-Barr virus infection, irrespective of immunoglobulin isotype expression. *Immunology* *108*, 427-430.
- Epstein, M. A., Achong, B. G., and Barr, Y. M. (1964). Virus Particles In Cultured Lymphoblasts From Burkitt's Lymphoma. *Lancet* *15*, 702-703.
- Fruehling, S., Swart, R., Dolwick, K. M., Kremmer, E., and 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*, 7796-7806.
- Gires, O., Kohlhuber, F., Kilger, E., Baumann, M., Kieser, A., Kaiser, C., Zeidler, R., Scheffer, B., Ueffing, M., and Hammerschmidt, W. (1999). Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus interacts with JAK3 and activates STAT proteins. *Embo J* *18*, 3064-3073.
- Gires, O., Zimmer-Strobl, U., Gonnella, R., Ueffing, M., Marschall, G., Zeidler, R., Pich, D., and Hammerschmidt, W. (1997). Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus mimics a constitutively active receptor molecule. *Embo J* *16*, 6131-6140.
- Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C., and Nairn, R. (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* *36*, 59-74.

- Greene, F. L. (2002). *AJCC Cancer Staging Handbook*, 6th edn (New York, Berlin, Heidelberg: Springer).
- Gregory, C. D., Kirchgens, C., Edwards, C. F., Young, L. S., Rowe, M., Forster, A., Rabbitts, T. H., and Rickinson, A. B. (1987). Epstein-Barr virus-transformed human precursor B cell lines: altered growth phenotype of lines with germ-line or rearranged but nonexpressed heavy chain genes. *Eur J Immunol* *17*, 1199-1207.
- Gulley, M. L., Eagan, P. A., Quintanilla-Martinez, L., Picado, A. L., Smir, B. N., Childs, C., Dunn, C. D., Craig, F. E., Williams, J. W., Jr., and Banks, P. M. (1994). Epstein-Barr virus DNA is abundant and monoclonal in the Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease: association with mixed cellularity subtype and Hispanic American ethnicity. *Blood* *83*, 1595-1602.
- Haluska, F. G., Brufsky, A. M., and Canellos, G. P. (1994). The cellular biology of the Reed-Sternberg cell. *Blood* *84*, 1005-1019.
- Hammerschmidt, W., and Sugden, B. (1988). Identification and characterization of oriLyt, a lytic origin of DNA replication of Epstein-Barr virus. *Cell* *55*, 427-433.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* *166*, 557-580.
- Hanahan, D. (1985). Techniques for transformation of *E. coli*: D. e. In Glover, ed. (Oxford).
- Hansson, M., Falk, K., and Ernberg, I. (1983). Epstein-Barr virus transformation of human pre-B cells. *J Exp Med* *158*, 616-622.
- Harris, N. L. (1999). Hodgkin's lymphomas: classification, diagnosis, and grading. *Semin Hematol* *36*, 220-232.
- Herbst, H. (1996). Epstein-Barr virus in Hodgkin's disease. *Semin Cancer Biol* *7*, 183-189.
- Herbst, H., Dallenbach, F., Hummel, M., Niedobitek, G., Pileri, S., Muller-Lantzsch, N., and Stein, H. (1991). Epstein-Barr virus latent membrane protein expression in Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *88*, 4766-4770.
- Hjalgrim, H., Askling, J., Rostgaard, K., Hamilton-Dutoit, S., Frisch, M., Zhang, J. S., Madsen, M., Rosdahl, N., Konradsen, H. B., Storm, H. H., and Melbye, M. (2003). Characteristics of Hodgkin's lymphoma after infectious mononucleosis. *N Engl J Med* *349*, 1324-1332.
- Hodgkin, T. (1832). On some morbid appearances of the absorbent glands and spleen. *Medical Chirurgical Transaction* *17*, 69-97.
- Humme, S., Reisbach, G., Feederle, R., Delecluse, H.-J., Bousset, K., Hammerschmidt, W., and Schepers, A. (2003). The EBV nuclear antigen 1 (EBNA1) enhances B-cell immortalization several thousand-fold. *Proc Natl Acad Sci U S A* *in press*.
- Ikeda, M., Fukuda, M., and Longnecker, R. (2005). *Epstein-Barr Virus: Function of Latent Membrane Protein 2A*, Chapter 25, Caister Academic Press.

- Ikeda, M., Ikeda, A., Longan, L. C., and Longnecker, R. (2000). The Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A PY motif recruits WW domain-containing ubiquitin-protein ligases. *Virology* *268*, 178-191.
- Ingham, R. J., Raaijmakers, J., Lim, C. S., Mbamalu, G., Gish, G., Chen, F., Matskova, L., Ernberg, I., Winberg, G., and Pawson, T. (2005). The Epstein-Barr virus protein, latent membrane protein 2A, co-opts tyrosine kinases used by the T cell receptor. *J Biol Chem* *280*, 34133-34142.
- Jarrett, R. F., and MacKenzie, J. (1999). Epstein-Barr virus and other candidate viruses in the pathogenesis of Hodgkin's disease. *Semin Hematol* *36*, 260-269.
- Jerusalem, G., Beguin, Y., Fassotte, M. F., Najjar, F., Paulus, P., Rigo, P., and Fillet, G. (2001). Whole-body positron emission tomography using <sup>18</sup>F-fluorodeoxyglucose compared to standard procedures for staging patients with Hodgkin's disease. *Haematologica* *86*, 266-273.
- Jochner, N., Eick, D., Zimmer-Strobl, U., Pawlita, M., Bornkamm, G. W., and 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*, 375-382.
- Kamesaki, H., Fukuhara, S., Tatsumi, E., Uchino, H., Yamabe, H., Miwa, H., Shirakawa, S., Hatanaka, M., and Honjo, T. (1986). Cytochemical, immunologic, chromosomal, and molecular genetic analysis of a novel cell line derived from Hodgkin's disease. *Blood* *68*, 285-292.
- Kanzler, H., Kuppers, R., Hansmann, M. L., and 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*, 1495-1505.
- Katamine, S., Otsu, M., Tada, K., Tsuchiya, S., Sato, T., Ishida, N., Honjo, T., and Ono, Y. (1984). Epstein-Barr virus transforms precursor B cells even before immunoglobulin gene rearrangements. *Nature* *309*, 369-372.
- Khan, G., Lake, A., Shield, L., Freeland, J., Andrew, L., Alexander, F. E., Jackson, R., Taylor, P. R., McCrudden, E. A., and Jarrett, R. F. (2005). Phenotype and frequency of Epstein-Barr virus-infected cells in pretreatment blood samples from patients with Hodgkin lymphoma. *Br J Haematol* *129*, 511-519.
- Kieff, E., and Rickinson, A. B. (2001). Epstein-Barr Virus and its replication. In *Fields Virology: (Philadelphia, Lippincott - Williams & Wilkins)*.
- Kieser, A., Kaiser, C., and Hammerschmidt, W. (1999). LMP1 signal transduction differs substantially from TNF receptor 1 signaling in the molecular functions of TRADD and TRAF2. *Embo J* *18*, 2511-2521.
- Kieser, A., Kilger, E., Gires, O., Ueffing, M., Kolch, W., and 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*, 6478-6485.
- Kraus, M., Alimzhanov, M. B., Rajewsky, N., and Rajewsky, K. (2004). Survival of resting mature B lymphocytes depends on BCR signaling via the Igalpha/beta heterodimer. *Cell* *117*, 787-800.

- Kuppers, R. (2002). Molecular biology of Hodgkin's lymphoma. *Adv Cancer Res* 84, 277-312.
- Kuppers, R. (2003). B cells under influence: transformation of B cells by Epstein-Barr virus. *Nat Rev Immunol* 3, 801-812.
- Kuppers, R. (2004). Molecular single-cell PCR analysis of rearranged immunoglobulin genes as a tool to determine the clonal composition of normal and malignant human B cells. *Methods Mol Biol* 271, 225-238.
- Kuppers, R., and Rajewsky, K. (1998). The origin of Hodgkin and Reed/Sternberg cells in Hodgkin's disease. *Annu Rev Immunol* 16, 471-493.
- Kuppers, R., Rajewsky, K., Zhao, M., Simons, G., Laumann, R., Fischer, R., and Hansmann, M. L. (1994). Hodgkin disease: Hodgkin and Reed-Sternberg cells picked from histological sections show clonal immunoglobulin gene rearrangements and appear to be derived from B cells at various stages of development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 10962-10966.
- Kuppers, R., Schmitz, R., Distler, V., Renne, C., Brauning, A., and Hansmann, M. L. (2005). Pathogenesis of Hodgkin's lymphoma. *Eur J Haematol Suppl* 66, 26-33.
- Lam, K. P., Kuhn, R., and Rajewsky, K. (1997). In vivo ablation of surface immunoglobulin on mature B cells by inducible gene targeting results in rapid cell death. *Cell* 90, 1073-1083.
- Lam, N., and Sugden, B. (2003). CD40 and its viral mimic, LMP1: similar means to different ends. *Cell Signal* 15, 9-16.
- Laux, G., Perricaudet, M., and Farrell, P. J. (1988). A spliced Epstein-Barr virus gene expressed in immortalized lymphocytes is created by circularization of the linear viral genome. *Embo J* 7, 769-774.
- Lebecque, S., de Bouteiller, O., Arpin, C., Banchereau, J., and Liu, Y. J. (1997). Germinal center founder cells display propensity for apoptosis before onset of somatic mutation. *J Exp Med* 185, 563-571.
- Lister, T. A., Crowther, D., Sutcliffe, S. B., Glatstein, E., Canellos, G. P., Young, R. C., Rosenberg, S. A., Coltman, C. A., and Tubiana, M. (1989). Report of a committee convened to discuss the evaluation and staging of patients with Hodgkin's disease: Cotswolds meeting. *J Clin Oncol* 7, 1630-1636.
- Liu, H. P., Wu, C. C., and Chang, Y. S. (2006). PRA1 promotes the intracellular trafficking and NF-kappaB signaling of EBV latent membrane protein 1. *Embo J* 25, 4120-4130.
- Liu, Y. J., Grouard, G., de Bouteiller, O., and Banchereau, J. (1996). Follicular dendritic cells and germinal centers. *Int Rev Cytol* 166, 139-179.
- Liu, Y. J., Joshua, D. E., Williams, G. T., Smith, C. A., Gordon, J., and MacLennan, I. C. (1989). Mechanism of antigen-driven selection in germinal centres. *Nature* 342, 929-931.
- Longnecker, R. (2000). Epstein-Barr virus latency: LMP2, a regulator or means for Epstein-Barr virus persistence? *Adv Cancer Res* 79, 175-200.

- Loonstra, A., Vooijs, M., Beverloo, H. B., Allak, B. A., van Drunen, E., Kanaar, R., Berns, A., and Jonkers, J. (2001). Growth inhibition and DNA damage induced by Cre recombinase in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *98*, 9209-9214.
- Malpighi, M. (1666). *De viscerum structura exercitatio anatomica* (Bologna).
- Mancao, C., Altmann, M., Jungnickel, B., and Hammerschmidt, W. (2005). Rescue of 'crippled' germinal center B cells from apoptosis by Epstein-Barr virus. *Blood* *106*, 4339-4344.
- Mangeney, M., Richard, Y., Coulaud, D., Tursz, T., and Wiels, J. (1991). CD77: an antigen of germinal center B cells entering apoptosis. *Eur J Immunol* *21*, 1131-1140.
- Martin, J. M., Veis, D., Korsmeyer, S. J., and Sugden, B. (1993). Latent membrane protein of Epstein-Barr virus induces cellular phenotypes independently of expression of Bcl-2. *J Virol* *67*, 5269-5278.
- Matskova, L., Ernberg, I., Pawson, T., and Winberg, G. (2001). C-terminal domain of the Epstein-Barr virus LMP2A membrane protein contains a clustering signal. *J Virol* *75*, 10941-10949.
- Merchant, M., Swart, R., Katzman, R. B., Ikeda, M., Ikeda, A., Longnecker, R., Dykstra, M. L., and Pierce, S. K. (2001). The effects of the Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A on B cell function. *Int Rev Immunol* *20*, 805-835.
- Miller, C. L., Burkhardt, A. L., Lee, J. H., Stealey, B., Longnecker, R., Bolen, J. B., and Kieff, E. (1995). Integral membrane protein 2 of Epstein-Barr virus regulates reactivation from latency through dominant negative effects on protein-tyrosine kinases. *Immunity* *2*, 155-166.
- Miller, C. L., Longnecker, R., and Kieff, E. (1993). Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A blocks calcium mobilization in B lymphocytes. *J Virol* *67*, 3087-3094.
- Moody, C. A., Scott, R. S., Amirghahari, N., Nathan, C. A., Young, L. S., Dawson, C. W., and Sixbey, J. W. (2005). Modulation of the cell growth regulator mTOR by Epstein-Barr virus-encoded LMP2A. *J Virol* *79*, 5499-5506.
- Mueller, N., Evans, A., Harris, N. L., Comstock, G. W., Jellum, E., Magnus, K., Orentreich, N., Polk, B. F., and Vogelmann, J. (1989). Hodgkin's disease and Epstein-Barr virus. Altered antibody pattern before diagnosis. *N Engl J Med* *320*, 689-695.
- Muschen, M., Rajewsky, K., Brauninger, A., Baur, A. S., Oudejans, J. J., Roers, A., Hansmann, M. L., and Kuppers, R. (2000). Rare occurrence of classical Hodgkin's disease as a T cell lymphoma. *J Exp Med* *191*, 387-394.
- Naumann, R., Beuthien-Baumann, B., Reiss, A., Schulze, J., Hanel, A., Bredow, J., Kuhnel, G., Kropp, J., Hanel, M., Laniado, M., *et al.* (2004). Substantial impact of FDG PET imaging on the therapy decision in patients with early-stage Hodgkin's lymphoma. *Br J Cancer* *90*, 620-625.
- Nemerow, G. R., Mold, C., Schwend, V. K., Tollefson, V., and Cooper, N. R. (1987). Identification of gp350 as the viral glycoprotein mediating attachment of Epstein-Barr virus (EBV) to the EBV/C3d receptor of B cells: sequence homology of gp350 and C3 complement fragment C3d. *J Virol* *61*, 1416-1420.

- Niedobitek, G., Kremmer, E., Herbst, H., Whitehead, L., Dawson, C. W., Niedobitek, E., von Ostau, C., Rooney, N., Grasser, F. A., and Young, L. S. (1997). Immunohistochemical detection of the Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 2A in Hodgkin's disease and infectious mononucleosis. *Blood* *90*, 1664-1672.
- Pallesen, G., Sandvej, K., Hamilton-Dutoit, S. J., Rowe, M., and Young, L. S. (1991). Activation of Epstein-Barr virus replication in Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *Blood* *78*, 1162-1165.
- Panousis, C. G., and Rowe, D. T. (1997). Epstein-Barr virus latent membrane protein 2 associates with and is a substrate for mitogen-activated protein kinase. *J Virol* *71*, 4752-4760.
- Pegtel, D. M., Subramanian, A., Sheen, T. S., Tsai, C. H., Golub, T. R., and Thorley-Lawson, D. A. (2005). Epstein-Barr-virus-encoded LMP2A induces primary epithelial cell migration and invasion: possible role in nasopharyngeal carcinoma metastasis. *J Virol* *79*, 15430-15442.
- Peitz, M., Pfannkuche, K., Rajewsky, K., and Edenhofer, F. (2002). Ability of the hydrophobic FGF and basic TAT peptides to promote cellular uptake of recombinant Cre recombinase: a tool for efficient genetic engineering of mammalian genomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* *99*, 4489-4494.
- Pierce, S. K. (2002). Lipid rafts and B-cell activation. *Nat Rev Immunol* *2*, 96-105.
- Portis, T., Dyck, P., and 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*, 4166-4178.
- Portis, T., Ikeda, M., and Longnecker, R. (2004). Epstein-Barr virus LMP2A: regulating cellular ubiquitination processes for maintenance of viral latency? *Trends Immunol* *25*, 422-426.
- Portis, T., and Longnecker, R. (2003). Epstein-Barr virus LMP2A interferes with global transcription factor regulation when expressed during B-lymphocyte development. *J Virol* *77*, 105-114.
- Portis, T., and Longnecker, R. (2004). Epstein-Barr virus (EBV) LMP2A mediates B-lymphocyte survival through constitutive activation of the Ras/PI3K/Akt pathway. *Oncogene* *23*, 8619-8628.
- Pulvertaft, J. V. (1964). Cytology Of Burkitt's Tumour (African Lymphoma). *Lancet* *39*, 238-240.
- Reed, D. (1902). The pathological changes in Hodgkin's disease, with special reference to its relation to tuberculosis. *Johns Hopkins Hops Rep* *10*, 133.
- Rickinson, A. B., and Kieff, E. (2001). Epstein-Barr virus, In *Fields' Virology*, D. M. Knipe, P. M. Howley, D. E. Griffin, M. A. Martin, R. A. Lamb, B. Roizman, and S. E. Straus, eds. (Philadelphia: Lippincott - Williams & Wilkins), pp. 2575-2627.
- Rovedo, M., and Longnecker, R. (2006). Epstein Barr Virus Latent Membrane Protein 2B (LMP2B) Modulates LMP2A Activity. *J Virol* *81*, 84-94.
- Sambrook, J., E.F., F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning. A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press).

- Scholle, F., Bendt, K. M., and Raab-Traub, N. (2000). Epstein-Barr virus LMP2A transforms epithelial cells, inhibits cell differentiation, and activates Akt. *J Virol* *74*, 10681-10689.
- Schwering, I., Brauning, A., Klein, U., Jungnickel, B., Tinguely, M., Diehl, V., Hansmann, M. L., Dalla-Favera, R., Rajewsky, K., and Kuppers, R. (2003). Loss of the B-lineage-specific gene expression program in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of Hodgkin lymphoma. *Blood* *101*, 1505-1512.
- Silver, D. P., and Livingston, D. M. (2001). Self-excising retroviral vectors encoding the Cre recombinase overcome Cre-mediated cellular toxicity. *Mol Cell* *8*, 233-243.
- Simons, K., and Ikonen, E. (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature* *387*, 569-572.
- Speck, P., Kline, K. A., Cheresch, P., and Longnecker, R. (1999). Epstein-Barr virus lacking latent membrane protein 2 immortalizes B cells with efficiency indistinguishable from that of wild-type virus. *J Gen Virol* *80* (Pt 8), 2193-2203.
- Sternberg, C. (1898). Über eine eigenartige unter dem Bilde der Pseudoleukämie verlaufende Tuberkulose des lymphatischen Apparates. *Zeitschrift für Heilkunde* *19*, 21-90.
- Sternberg, C. (1998). Über eine eigenartige unter dem Bilde der Pseudoleukämie verlaufende Tuberkulose des lymphatischen Apparates. *Zeitschrift für Heilkunde* *19*, 21-90.
- Swart, R., Ruf, I. K., Sample, J., and Longnecker, R. (2000). Latent membrane protein 2A-mediated effects on the phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt pathway. *J Virol* *74*, 10838-10845.
- Thompson, M. P., and Kurzrock, R. (2004). Epstein-Barr virus and cancer. *Clin Cancer Res* *10*, 803-821.
- Thyagarajan, B., Guimaraes, M. J., Groth, A. C., and Calos, M. P. (2000). Mammalian genomes contain active recombinase recognition sites. *Gene* *244*, 47-54.
- Tinguely, M., Rosenquist, R., Sundstrom, C., Amini, R. M., Kuppers, R., Hansmann, M. L., and Brauning, A. (2003). Analysis of a clonally related mantle cell and Hodgkin lymphoma indicates Epstein-Barr virus infection of a Hodgkin/Reed-Sternberg cell precursor in a germinal center. *Am J Surg Pathol* *27*, 1483-1488.
- Trumper, L. H., Brady, G., Bagg, A., Gray, D., Loke, S. L., Griesser, H., Wagman, R., Braziel, R., Gascoyne, R. D., Vicini, S., and et al. (1993). Single-cell analysis of Hodgkin and Reed-Sternberg cells: molecular heterogeneity of gene expression and p53 mutations. *Blood* *81*, 3097-3115.
- Tze, L. E., Schram, B. R., Lam, K. P., Hogquist, K. A., Hippen, K. L., Liu, J., Shinton, S. A., Otipoby, K. L., Rodine, P. R., Vegoe, A. L., et al. (2005). Basal immunoglobulin signaling actively maintains developmental stage in immature B cells. *PLoS Biol* *3*, e82.
- Wang, D., Liebowitz, D., and Kieff, E. (1985). An EBV membrane protein expressed in immortalized lymphocytes transforms established rodent cells. *Cell* *43*, 831-840.
- Watts, C. (1997). Capture and processing of exogenous antigens for presentation on MHC molecules. *Annu Rev Immunol* *15*, 821-850.

Weiss, L. M., Movahed, L. A., Warnke, R. A., and Sklar, J. (1989). Detection of Epstein-Barr viral genomes in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease. *N Engl J Med* *320*, 502-506.

Yamaguchi, H., and Wang, H. G. (2001). The protein kinase PKB/Akt regulates cell survival and apoptosis by inhibiting Bax conformational change. *Oncogene* *20*, 7779-7786.

Young, L. S., and Rickinson, A. B. (2004). Epstein-Barr virus: 40 years on. *Nat Rev Cancer* *4*, 757-768.



# Lebenslauf

## Persönliche Daten

Name	Christoph Mancao
Geburtsdatum	19.03.1978
Geburtsort	Sigmaringen
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch

## Schulischer Werdegang

1984 – 1988	Geschwister-Scholl-Grundschule Sigmaringen, BW
1988 – 1997	Hohenzollern-Gymnasium Sigmaringen, BW
Juni 1997	Abitur

## Studium

1998 – 2002	Studium der Biologie, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen
Mai 2002	Diplomprüfung im Studium der Biologie
Juli 2002 – März 2003	Diplomarbeit bei Prof. W. Hillen am Lehrstuhl für Mikrobiologie, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen
Juli 2003 – Nov. 2006	Promotion in der Arbeitsgruppe von Prof. W. Hammerschmidt, Abteilung für Genvektoren; GSF, München

# Danksagung

Zu guter letzt möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen haben. Dazu gehören insbesondere:

Prof. Dr. Wolfgang Hammerschmidt für dieses Projekt, das ich in alle Richtungen frei gestalten konnte. Für die exzellente Betreuung, jegliche Hilfestellung und den wissenschaftlichen Rat – zu jeder Tages- und Nachtzeit.

Prof. Dr. Dirk Eick für kritische Diskussionen, die Übernahme der offiziellen Betreuung und die schnelle Korrektur.

Prof. Dr. Ralf Küppers für eine offene und faire Zusammenarbeit bei der Publikation.

Prof. Dr. Frank Edenhofer für die Beratung und Bereitstellung der Protein-Transduktion.

Dr. Gilbert Reisbach für die Einführung in die Geheimnisse der FACS-Analysen.

Dr. Joachim Ellwart und Karin Nispel für die Zusammenarbeit bei der Zellsortierung.

Den (ehemaligen) Mitstreitern in der Abteilung, insbesondere Markus Altmann, Ulrike Dirmeier, Daggy Pich (...in the jungle, the mighty jungle), Heidi, Magda, Markus, Romana, Patrizia, und Rosi, die nun wirklich jedes Problem in den Griff bekommt. Doro fürs Korrekturlesen und Olivier fürs Zuhören.

Meiner Familie, die alles erst ermöglicht hat.

Und Eva.

# Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit mit dem Titel

„Rolle des Epstein-Barr Virus Proteins LMP2A in transformierten B-Zellen“

von mir selbstständig und ohne unerlaubte Hilfsmittel angefertigt wurde und ich mich dabei nur der ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfsmittel bedient habe. Diese Arbeit wurde weder in der jetzigen noch in einer abgewandelten Form einem anderen Prüfungsausschuss vorgelegt.

München, im November 2006

Christoph Mancao