

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b> .....	<b>9</b>
<b>2</b>	<b>LITERATUR</b> .....	<b>11</b>
<b>2.1</b>	<b>Das Hodgkin Lymphom</b> .....	<b>11</b>
2.1.1	Hodgkin-ähnliche Lymphome bei Haustieren.....	11
2.1.2	Maligne Zellen des Hodgkin Lymphoms .....	13
2.1.3	Überlebensstrategien der H/RS Zellen.....	15
2.1.3.1	Der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B.....	15
2.1.3.2	<i>In vivo</i> -Auswirkungen permanenter Aktivität von NF- $\kappa$ B .....	18
2.1.3.3	Die Notch-Rezeptoren.....	20
<b>2.2</b>	<b>Das Epstein-Barr Virus</b> .....	<b>24</b>
2.2.1	LMP2A als B-Zell-Rezeptor Homolog .....	26
2.2.2	<i>In vivo</i> -Auswirkungen der LMP2A Expression .....	30
<b>2.3</b>	<b>Das Versuchsmodell</b> .....	<b>34</b>
2.3.1	Der Spender-Mausstamm I $\kappa$ B $\alpha$ +/- .....	34
2.3.2	Der Empfänger-Mausstamm IgH/- .....	35
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>37</b>
<b>3.1</b>	<b>Zellkulturbedingungen</b> .....	<b>37</b>
3.1.1	Adhärente Zelllinien.....	37
3.1.2	Fötale Leberzellen.....	38
3.1.3	Stimulation von B-Zellen .....	39
3.1.4	Produktion retroviraler Überstände .....	39
3.1.5	Titration der viralen Überstände .....	40
3.1.6	Konzentrierung der viralen Überstände.....	41
3.1.7	Kryolagerung von Zellen .....	41
<b>3.2</b>	<b>Präparation der fötalen Leberzellen und Transplantation</b> .....	<b>42</b>
3.2.1	Entnahme der Föten.....	42
3.2.2	Herstellung einer Einzelzellsuspension und Kultivierung .....	42
3.2.3	Retrovirale Infektion fötaler Leberzellen.....	43
3.2.4	Transplantation.....	43
<b>3.3</b>	<b>Probenentnahme aus Mäusen</b> .....	<b>44</b>
3.3.1	Narkose .....	44
3.3.2	Tötung .....	44
3.3.3	Blutentnahme .....	44
3.3.4	Sektion .....	45
3.3.4.1	Entnahme und Aufbereitung der Lymphknoten.....	45
3.3.4.2	Entnahme der Milz .....	46
3.3.4.3	Entnahme des Knochenmarks .....	46
<b>3.4</b>	<b>Polymerase Kettenreaktion (PCR)–Analysen</b> .....	<b>46</b>
3.4.1	Typisierung der I $\kappa$ B $\alpha$ -Mäuse und Föten.....	47
3.4.2	Reverse Transkription (RT)-PCR .....	49
3.4.3	Agarosegel-Elektrophorese.....	51
3.4.4	Quantifizierung der Banden.....	52

<b>3.5</b>	<b>Durchflußzytometrische Analysen (FACS)</b> .....	<b>52</b>
3.5.1	Fluoreszenzkompensation .....	53
3.5.2	Färbung der Zellen .....	54
<b>3.6</b>	<b>Zellsortierungsverfahren</b> .....	<b>55</b>
3.6.1	Aufreinigung der B-Zellen aus der Milz durch MACS®-Säulen .....	55
3.6.2	Zellsortierung nach Fluoreszenz .....	55
<b>3.7</b>	<b>Proteinpräparation</b> .....	<b>56</b>
<b>3.8</b>	<b>Proteinmengenbestimmung nach Bradford</b> .....	<b>56</b>
<b>3.9</b>	<b>Western Blot Analysen, Immunoblottingverfahren</b> .....	<b>57</b>
3.9.1	Denaturierende Elektrophorese .....	58
3.9.2	Blotting .....	59
3.9.3	Kontrolle der gleichmäßigen Beladung anhand der Ponceau-Färbung .....	60
3.9.4	Detektion des Proteins .....	60
3.9.5	Entwicklung mit ECL-Detektionskit .....	60
<b>3.10</b>	<b>Gelretardationsanalysen (Electrophoretic Mobility Shift Assay, EMSA)</b> .....	<b>61</b>
3.10.1	Hybridisierung des NF- $\kappa$ B-DNA Oligonucleotids .....	61
3.10.2	Radioaktive Markierung des Oligonucleotids .....	61
3.10.3	Gelretardation .....	62
<b>3.11</b>	<b>Immunhistologische Analysen</b> .....	<b>63</b>
3.11.1	Anfertigung der Schnittpräparate .....	63
3.11.2	Immunhistochemische Färbungen .....	63
<b>3.12</b>	<b>Statistische Auswertungen</b> .....	<b>64</b>
3.12.1	Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben .....	64
3.12.2	U-Test nach Wilcoxon, Mann und Whitney .....	65
3.12.3	Student's t-Test .....	65
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>66</b>
<b>4.1</b>	<b>Infektionsfähigkeit retroviraler Zellkulturüberstände</b> .....	<b>66</b>
<b>4.2</b>	<b>Bildung hämatopoietischer Zellen in transplantierten Rezipienten</b> .....	<b>66</b>
<b>4.3</b>	<b>Expression von LMP2A und erhöhte DNA-Bindungsaktivität des Transkriptionsfaktors NF-<math>\kappa</math>B</b> .....	<b>70</b>
<b>4.4</b>	<b>Auswirkungen von LMP2A und NF-<math>\kappa</math>B auf den Anteil von B-Zellen in peripherem Blut, Milz und Knochenmark (durchflußzytometrische Analysen)</b> .....	<b>73</b>
<b>4.5</b>	<b>Stimulation der B-Zellen der verschiedenen Zellfraktionen</b> .....	<b>81</b>
<b>4.6</b>	<b>Auswirkungen der Expression von LMP2A und NF-<math>\kappa</math>B auf die Expression von B-Zell-Differenzierungsfaktoren (RT-PCR Analysen)</b> .....	<b>83</b>
4.6.1	Expression von EBF .....	84
4.6.2	Expression von Pax5 .....	85
4.6.3	Expression von Notch1 und Jagged1 .....	86

<b>5</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>89</b>
5.1	<b>Auswahl der Donor- und Rezipienten-Mausstämme.....</b>	<b>90</b>
5.1.1	Der Donor-Mausstamm I $\kappa$ B $\alpha$ +/- .....	90
5.1.2	Der Rezipienten-Mausstamm IgH -/-.....	90
5.2	<b>LMP2A beeinflusst die Bildung von B-Zellen und IgM (BZR) in hoher Dichte exprimierenden B-Zellen.....</b>	<b>91</b>
5.3	<b>Auswirkungen der Expression von LMP2A und der permanenten Aktivität von NF-<math>\kappa</math>B auf die Proliferation von B-Zellen .....</b>	<b>93</b>
5.4	<b>Regulation der Transkription von Zelldifferenzierungsfaktoren in B-Zellen durch LMP2A und NF-<math>\kappa</math>B.....</b>	<b>94</b>
5.4.1	Repression des B-Zell-Differenzierungsprogramms durch LMP2A.....	95
5.4.2	Gehemmte Transkription B-zellspezifischer Gene bei Überaktivität von NF- $\kappa$ B .....	97
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>99</b>
<b>7</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>101</b>
<b>8</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>103</b>
<b>9</b>	<b>ANHANG.....</b>	<b>108</b>
9.1	<b>Peripheres Blut .....</b>	<b>108</b>
9.1.1	Statistischer Vergleich der Gruppen mit und ohne permanente NF- $\kappa$ B Aktivität mit Hilfe des Mann-Whitney Tests .....	108
9.1.2	Statistischer Vergleich der Zellfraktionen mit und ohne LMP2A Expression mit Hilfe des Wilcoxon Tests .....	109
9.1.3	Statistischer Vergleich der Zellfraktionen mit schwacher und starker LMP2A Expression mit Hilfe des Wilcoxon Tests.....	110
9.2	<b>Milz.....</b>	<b>111</b>
9.2.1	Statistischer Vergleich der Zellfraktionen mit und ohne LMP2A Expression mit Hilfe des Wilcoxon Tests .....	111
9.2.2	Statistischer Vergleich der Zellfraktionen mit schwacher und starker LMP2A Expression mit Hilfe des Wilcoxon Tests.....	112
9.3	<b>Knochenmark.....</b>	<b>113</b>
9.3.1	Statistischer Vergleich der Zellfraktionen mit und ohne LMP2A Expression mit Hilfe des Wilcoxon Tests .....	113
9.3.2	Statistischer Vergleich der Zellfraktionen mit schwacher und starker LMP2A Expression mit Hilfe des Wilcoxon Tests.....	114
<b>10</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>115</b>
<b>11</b>	<b>CURRICULUM VITAE.....</b>	<b>116</b>