

## 2 Literatur

### 2.1 Das Hodgkin Lymphom

Hodgkin Lymphome gehören zu den häufigsten malignen Erkrankungen des lymphatischen Systems. Bereits 1832 beschrieb Thomas Hodgkin, der Namensgeber des Lymphoms, erste Fälle von Patienten mit hochgradig vergrößerten Lymphknoten. Sie treten mit einer Häufigkeit von 3 Erkrankungen pro 100000 pro Jahr und gehäuft im dritten bzw. im siebten Lebensjahrzehnt auf.

Klinisch fallen die Patienten durch generalisierte Lymphknotenschwellungen und Splenomegalie sowie häufig durch so genannte B-Symptome (Fieber, Nachtschweiß, Gewichtsverlust) auf.

Eine Unterteilung der Hodgkin Lymphome in verschiedene Subklassen erfolgt aufgrund der histologischen Merkmale. Die mit ca. 46 % häufigste Form ist der nodulär-sklerosierende Typ. Charakteristisch sind hier streifenförmige Sklerosierungsareale. Der lymphozytenreiche Typ (ca. 12 % der Fälle) zeichnet sich durch besonders wenige maligne Zellen vom Reed-Sternberg Typ (eine genauere Beschreibung der malignen Zellen der Hodgkin Lymphome erfolgt in Kapitel 2.1.2) aus und ist eine langsam wachsende B-Zell-Neoplasie. Eine Form mit nur wenigen Lymphozyten ist der lymphozytenarme Subtyp (ca. 10 % der Fälle). Etwa 30 % der Hodgkin Lymphome lassen sich keinem der drei beschriebenen Subtypen zuordnen und zählen so zum gemischtzelligen Typ, der sich besonders durch Eosinophilie auszeichnet.

#### 2.1.1 Hodgkin-ähnliche Lymphome bei Haustieren

Bei Tieren wurden verschiedene Hodgkin-ähnliche Lymphome beschrieben. Allerdings handelte es sich meist um Einzelfallbeschreibungen, z.B. von Stinktier, Killerwahl, Ratte, Maus, Hund und Katze (Wells 1974; Roperto et al. 1983; Smith und Barker 1983; Nakayama et al. 1984; Majeed und Gopinath 1985; Yonezawa et al. 1989; Maeda et al. 1993; Day et al. 1999). Die Diagnosen wurden anhand von histologischen und immunhistologischen Untersuchungen gestellt. Zwei Studien aus den Jahren 1999 und 2001 (Day et al. 1999; Walton und Hendrick 2001) untersuchten 8 bzw. 20 Fälle von Hodgkin-ähnlichen Lymphomen bei Katzen. Die erkrankten Katzen waren mit Ausnahme von zwei Tieren älter als 6 Jahre. Klinisch fielen sie in den meisten Fällen durch unilaterale mandibulare oder zervikale Lymphadenopathien auf. Nur wenige Tiere zeigten generalisierte

Lymphadenopathien. Zusätzliche Ultraschalluntersuchungen des Thorakal- und Abdominalraumes bei 6 der Katzen zeigten keine pathologischen Veränderungen bezüglich der Lymphknoten und parenchymatösen Organe. Bei der Klassifizierung der Lymphome wurde ein Unterschied zu humanen Hodgkin Lymphomen deutlich. Die vorherrschende Form war in beiden Studien der lymphozytenreiche Subtyp, gefolgt vom Mischtyp. Nur zwei Fälle in der Studie von Walton und Hendrick waren dem nodulär sklerosierenden Typ zuzuordnen. Immunhistologisch konnten die malignen lymphohistiozytären Zellen mit den B-Zell-Markern *B-lymphozyte antigen 36* (BLA.36, wird auf Reed-Sternberg Zellen und frühen bzw. aktivierten B-Zellen exprimiert) und CD79a markiert werden (Walton und Hendrick 2001). Reed-Sternberg Zellen wiesen diese Antigene nicht auf. In allen untersuchten Fällen war der Anteil an Reed-Sternberg Zellen geringer als in humanen Lymphomen. Virale Infektionen mit dem *felinen Leukämie Virus* (FeLV) oder dem *felinen Immundefizienz Virus* (FIV) wurden bei 12 Katzen untersucht. Bei nur einer Katze konnte das FeLV nachgewiesen werden, die anderen waren für beide Viren negativ (Walton und Hendrick 2001).

Die therapeutische Strategie der behandelnden Tierärzte war unterschiedlich. Ein Teil der Tiere wurde auf Wunsch der Besitzer euthanasiert. Der Verzicht auf eine Behandlung führte zu Überlebenszeiten zwischen 7 Monaten und 4 Jahren. Dies lässt ein weniger aggressives Wachstum von Hodgkin-ähnlichen Lymphomen bei Katzen im Vergleich zu Non-Hodgkin Lymphomen vermuten. Um statistisch gesicherte Aussagen treffen zu können, bedarf es jedoch weiterer Untersuchungen. Die in vier Fällen angewandten Chemotherapien waren unterschiedlich und setzten sich wie folgt zusammen: 1. wöchentlich aufeinander folgendes Protokoll bestehend aus Prednison, Vincristin, Cyclophosphamid, initiale Einzeldosis Adriamycin; 2. Prednison, Cyclophosphamid, Doxorubicin; 3. Prednison, intraläsional Vincristin, Adriamycin; 4. MOPP Protokoll bestehend aus Mechlorethamin, Vincristin, Procarbazin, Prednison. Diese Therapien führten zu Überlebenszeiten zwischen 6 und 15 Monaten; zwei der Katzen wurden nicht länger beobachtet, die anderen wurden wegen anderer Erkrankungen euthanasiert.

Molekularbiologische und genetische Untersuchungen zu Hodgkin-ähnlichen Lymphomen bei Tieren sind in der Literatur nicht bekannt. Hinweise auf eine bessere Prognose für Hodgkin-ähnliche Lymphome im Vergleich zu Non-Hodgkin Lymphomen machen eine zuverlässige Unterscheidung der Lymphome notwendig, um die Überlebenschancen der Tiere einschätzen zu können. Die Seltenheit der malignen Zellen in Hodgkin-ähnlichen Lymphomen erschwert eine sichere Diagnose.

Diese ist in jedem Fall von histologischen Untersuchungen abhängig. Es besteht die Möglichkeit, dass viele Lymphome aufgrund der schwierigen Diagnose nicht als Hodgkin-ähnliche Lymphome erkannt wurden. Molekularbiologische und genetische Untersuchungen könnten Einblick in die Pathogenese verschiedener Lymphome geben und zu neuen Therapiemodellen führen.

### **2.1.2 Maligne Zellen des Hodgkin Lymphoms**

Als charakteristische maligne Zellen des Hodgkin Lymphoms gelten die einkernigen Hodgkin-Zellen und die mehrkernigen Reed-Sternberg-Zellen. Lange war die Herkunft der Hodgkin/Reed-Sternberg Zellen (H/RS Zellen) ungeklärt. Dies lag nicht zuletzt an der Tatsache, dass diese malignen Zellen im Lymphom nur etwa 1 % der Zellen ausmachen, so dass sich deren Isolation und Analyse schwierig gestalteten. Umgeben sind die H/RS Zellen von benignen Entzündungszellen, zu denen T-Zellen, Makrophagen, Monozyten, Fibroblasten und eosinophile Granulozyten gehören. Diese Zellen gelangen zum Teil durch die von den H/RS Zellen freigesetzten Chemokine und Zytokine (z.B. Eotaxin, TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-2, IL-6, IL-8) in das Gewebe (Jundt et al. 1999; Staudt 2000).

Im klassischen Hodgkin Lymphom konnten histologisch zunächst keine einheitlichen Marker für H/RS Zellen gefunden werden, so dass eine eindeutige Zuordnung zu einer hämatopoietischen Linie nicht möglich war (Drexler und Minowada 1992). Es ließen sich Marker unterschiedlicher hämatopoietischer Zellen wie B-, T- oder myeloische Zellen nachweisen. Einen Anhaltspunkt lieferten die H/RS Zellen des lymphozytenprädominanten Subtyps des Hodgkin Lymphoms, bei dem die malignen Zellen aufgrund der Expression der Oberflächenantigene CD19 und CD20 einer Abstammung von B-Zellen zugeordnet werden konnten. Diese Oberflächenantigene sind jedoch im klassischen Hodgkin Lymphom nicht zu finden. Hier werden von den malignen Zellen beispielsweise CD30 (ein B-Zell-Aktivierungsmarker), CD15, CD25 (Interleukin-2-Rezeptor) oder CD71 (ein Transferrinrezeptor) exprimiert.

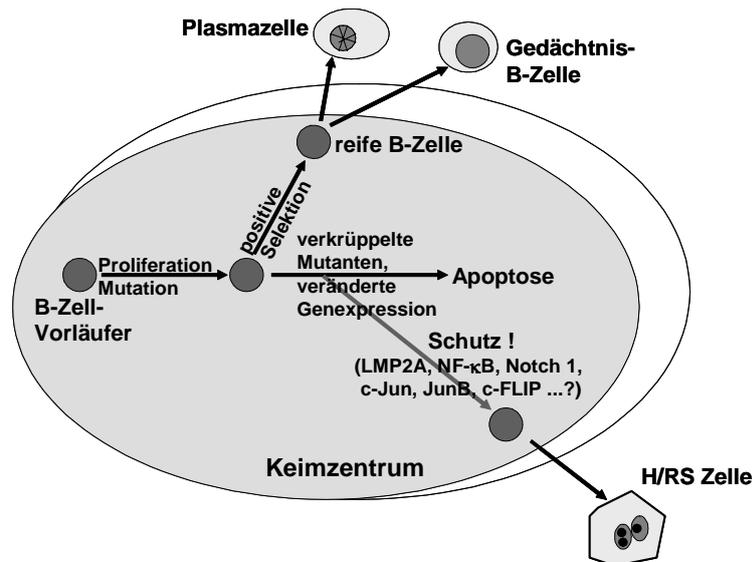
Einen Durchbruch in der Charakterisierung der Zellen brachte die von Küppers et al. angewendete Mikromanipulation von Einzelzellen. Mit Hilfe dieser Methode war die Isolation der Zellen aus dem Gewebe und anschließend eine Amplifikation von DNA mittels Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) möglich geworden (Küppers et al. 1993). So konnten H/RS Zellen erstmals auf Einzelzell-Ebene molekularbiologisch untersucht werden. Küppers et al. (1993) zeigten, dass in H/RS Zellen ein Rearrangement der Immunglobulingene stattgefunden hat.

Außerdem konnte man anhand des nachgewiesenen Rearrangements auf eine Abstammung der H/RS Zellen von B-Zellen schließen (Küppers und Rajewsky 1998). Zusätzlich waren somatische Mutationen in den rearrangierten Immunglobulingen vorhanden (Kanzler et al. 1996), was auf die Abstammung der malignen Zellen aus Keimzentrum-B-Zellen hinwies. Im physiologischen Zustand kommt es während der B-Zell-Reifung im Lymphfollikel zur somatischen Hypermutation um damit von B-Zellen klonale Varianten mit hoher Affinität für spezifische Antigene zu erhalten. Dabei werden bei Antigenkontakt B-Zellen mit hoher Affinität zum Antigen positiv selektiert, während diejenigen mit niedriger Affinität zum Antigen durch Apoptose eliminiert werden.

H/RS Zellen durchlaufen den Prozess der somatischen Hypermutation ohne spezifische Immunglobuline zu exprimieren. Ein Grund dafür könnte die Tatsache sein, dass innerhalb der Immunglobulingene Mutationen, so genannte *crippling mutations* (verkrüppelnde Mutationen) die Antikörperbildung verhindern (Kanzler et al. 1996). Von größerer Bedeutung ist die Erkenntnis, dass eine gestörte Transkription die Expression der Immunglobuline verhindert (Marafioti et al. 2000). Eine Repression der B-zellspezifischen Transkriptionsfaktoren Oct2 und PU.1 sowie des Koaktivators BOB.1/OBF.1 führt in H/RS Zellen zu einem Verlust der Transkription der Immunglobulingene (Stein et al. 2001; Jundt et al. 2002b). Außerdem sind die Transkriptionsfaktoren E2A, EBF und Pax5 herunterreguliert. Die Transkriptionsfaktoren stehen in Verbindung mit immunglobulinspezifischen Promotoren bzw. Enhancern, die in H/RS Zellen inaktiv sind (Hertel et al. 2002). Reporterassays konnten zeigen, dass B-zellspezifische Promotoren in H/RS Zelllinien, die mit den beschriebenen Transkriptionsfaktoren transfiziert wurden, wieder aktiviert wurden (Hertel et al. 2002; Jundt et al. 2002b).

Warum die Zellen trotz des nicht vorhandenen aber für das Überleben physiologischer B-Zellen unbedingt notwendigen B-Zell-Rezeptors nicht apoptotisch zugrunde gehen, ist bisher nicht geklärt. Wichtige Rollen spielen der Transkriptionsfaktor Nuclear factor κ B (NF-κB) sowie Notch-Rezeptoren, auf die im Folgenden eingegangen wird.

Abbildung 1 zeigt schematisch die Abstammung der H/RS Zellen des klassischen Hodgkin Lymphoms (Küppers und Rajewsky 1998)



(eigene Abbildung, modifiziert nach Küppers und Rajewsky, 1998)

## Abb. 1: Die Abstammung der H/RS Zellen des klassischen Hodgkin Lymphoms

B-Zell-Vorläufer gelangen aus dem Knochenmark in die peripheren lymphatischen Organe und bilden dort bei Antigen-Kontakt Keimzentren. Durch Mutationen und Rearrangement in den Immunglobulin Genen bilden sich B-Zellen mit hochspezifischen Antikörpern, die positiv selektiert werden und sich in Antikörperproduzierende Plasmazellen oder B-Gedächtniszellen differenzieren. Unter physiologischen Bedingungen werden Zellen mit unspezifischem Antikörperrepertoire durch Apoptose eliminiert. H/RS Zellen werden in diesem Stadium durch verschiedene, zum Teil unbekannte Mechanismen vor Apoptose geschützt (eigene Abbildung modifiziert nach (Küppers und Rajewsky 1998)).

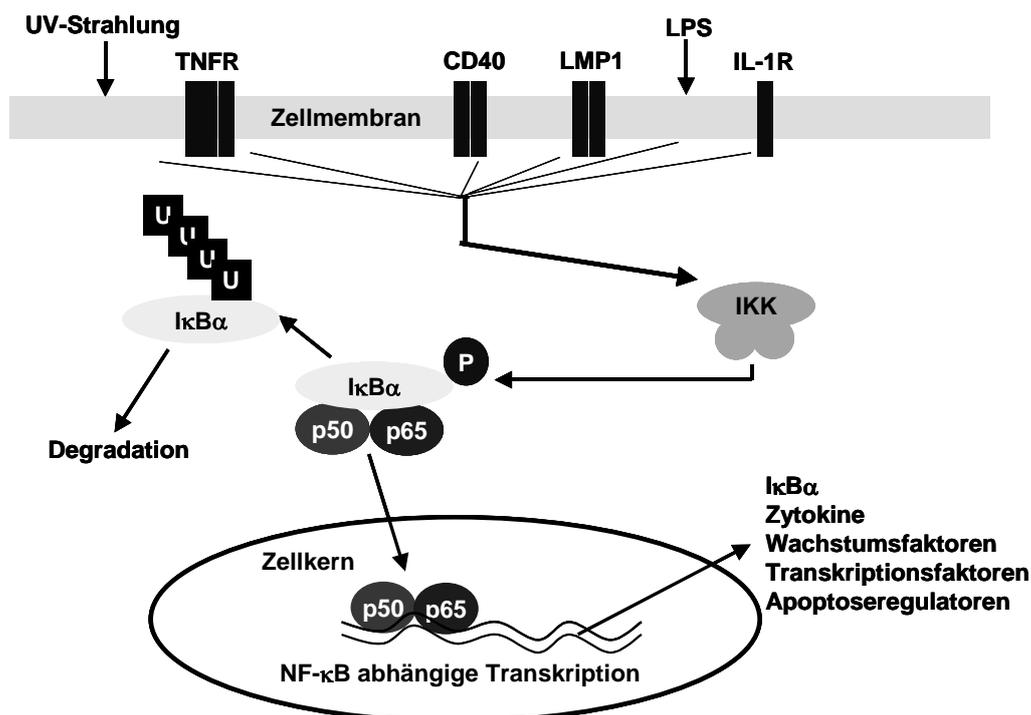
### 2.1.3 Überlebensstrategien der H/RS Zellen

#### 2.1.3.1 Der Transkriptionsfaktor NF-κB

Einer der wichtigsten Signalwege für das Überleben und die Proliferation von B-Zellen ist der NF-κB-Signalweg. NF-κB-Moleküle sind Dimere, die sich aus zwei gleichen oder verschiedenen Rel-Proteinen, zu denen p50, p52, p65 (RelA), RelB und c-Rel gehören, zusammensetzen. Die überwiegende und für das Hodgkin Lymphom relevante Form ist das Heterodimer aus p50/p65, das allgemein als NF-κB bezeichnet wird. In dieser Form kommt NF-κB sonst nur nach Aktivierung der Zellen, z. B. durch den Tumor Nekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) vor. Unter physiologischen Bedingungen ist der Transkriptionsfaktor an seinen Inhibitor gebunden und liegt als inaktive Form im Zytoplasma von Zellen vor. Zur Familie der Inhibitoren gehören z.B. I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$ , I $\kappa$ B $\gamma$ , I $\kappa$ B $\epsilon$  und Bcl-3. Zusätzlich fungieren die Vorläuferproteine von p50

(p105) und p52 (p100) als Inhibitoren. Der am besten charakterisierte Inhibitor ist  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ .

Um NF- $\kappa$ B als Transkriptionsfaktor zu aktivieren, bedarf es der Freisetzung vom Inhibitor. Eine Reihe von Zytokinen (z.B. Zytokine der TNF-Familie), bakteriellen Produkten (z.B. Lipopolysaccharid), verschiedenen Entzündungsstimuli oder auch Apoptose-induzierenden Agenzien sind in der Lage, diesen Prozess in Gang zu setzen (Pahl 1999). Trifft ein solcher Stimulus auf die Zelle, so wird der  $\text{I}\kappa\text{B}$ -Kinase-Komplex (IKK) aktiviert (Karin 1999), der  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  phosphoryliert, so dass dieser sich von NF- $\kappa$ B löst, ubiquitiniert und proteasomal abgebaut werden kann. Das freie NF- $\kappa$ B-Molekül transloziert in den Zellkern, wo es die Expression verschiedener Gene steuert. Zielgene von NF- $\kappa$ B sind für die Regulation des Immunsystems, Zellproliferation, Entzündungen oder virale Replikationen verantwortlich. Auch die Transkription des eigenen Inhibitors  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  wird durch NF- $\kappa$ B initiiert. Eine schematische Darstellung der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B wird in Abbildung 2 gezeigt.



**Abb. 2: Der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B wird durch verschiedene Stimuli aktiviert**

Verschiedene rezeptorvermittelte und nicht rezeptorvermittelte Ereignisse sind in der Lage, den NF- $\kappa$ B-Signalweg zu aktivieren. Hier ist nur eine kleine Auswahl der Stimuli dargestellt (Tumor Necrosis Factor Receptor, TNFR; CD40; latentes Membranprotein 1, LMP1; Lipopolysaccharid, LPS; Interleukin-1 Receptor, IL-1R, Ultraviolette Strahlung, UV-Strahlung). Es wird zunächst der  $\text{I}\kappa\text{B}$ -Kinase Komplex

(IKK) aktiviert, der den an NF- $\kappa$ B (p50/p65) gebundenen Inhibitor I $\kappa$ B $\alpha$  phosphoryliert. Der Inhibitor wird abgespalten, ubiquitiniert und proteasomal abgebaut. NF- $\kappa$ B transloziert in den Zellkern und initiiert die Transkription einer Vielzahl von Genen (eigene Abbildung).

Bargou et al. beschrieben schon 1996 eine permanente Aktivität des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B p50/p65 als ein gemeinsames Merkmal der ansonsten wegen des Fehlens von einheitlichen Markern so heterogenen H/RS Zellen (Bargou et al. 1996). Sie konnten NF- $\kappa$ B p50/p65 in DNA gebundener Form im Zellkern der malignen Zellen nachweisen. Welchen Einfluss diese konstitutive DNA-bindende Aktivität hatte, wurde klar, als eine dominant negative, trunkierte Form des Inhibitors I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\alpha$  $\Delta$ N, stabil in H/RS Zellen transfiziert wurde. Diese Mutante des Inhibitors hat die Eigenschaft, an NF- $\kappa$ B zu binden. Durch die Deletion des N-terminalen Teils konnte das Molekül nicht abgebaut werden, so dass eine permanente Bindung an den Transkriptionsfaktor die Folge war. Eine deutliche Reduktion der Proliferation der H/RS Zellen sowohl *in vitro* als auch im SCID-Mausmodell *in vivo* waren die Folge. Außerdem führte es zu einer erhöhten Apoptoserate in H/RS Zellen (Bargou et al. 1997). Letzteres weist auf eine Funktion von NF- $\kappa$ B beim Schutz vor Apoptose hin. Eine stärkere Expression von I $\kappa$ B $\alpha$  $\Delta$ N durch adenoviralen Gentransfer führte sogar zu einer Steigerung der spontanen Apoptose (Hinz et al. 2001).

Für die permanente Aktivität von NF- $\kappa$ B gibt es verschiedene Ursachen. In 2 von 7 H/RS Zelllinien und in einem von 10 primären Fällen von Hodgkin Lymphomen konnten Mutationen im Inhibitormolekül I $\kappa$ B $\alpha$  dafür verantwortlich gemacht werden (Emmerich et al. 1999). Dadurch wurde die Bindung an NF- $\kappa$ B verhindert (Cabannes et al. 1999; Emmerich et al. 1999; Jungnickel et al. 2000). Eine weitere wichtige Erkenntnis war eine konstitutive Aktivität des IKK, die die Halbwertszeit von I $\kappa$ B $\alpha$  deutlich verringerte (Krappmann et al. 1999), was zu einer schnelleren Freisetzung von NF- $\kappa$ B führte. Eine zusätzliche Expression von Zytokinen durch H/RS Zellen (z.B. IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, TGF- $\beta$ ) und durch Zellen des umgebenden Gewebes (z.B. IL-8, CD40-Ligand) lässt auf eine autokrine und parakrine Aktivierung des IKK und des NF- $\kappa$ B-Signalwegs schließen (Krappmann et al. 1999; Skinnider und Mak 2002). Diese spielen allerdings für die permanente DNA-bindende Aktivität von NF- $\kappa$ B in H/RS Zellen wahrscheinlich eher eine untergeordnete Rolle.

Eine weitere Bedeutung haben in diesem Zusammenhang Genprodukte des Epstein-Barr Virus. Als Äquivalent zu einem aktivierten CD40-Rezeptor, der in der Lage ist, NF- $\kappa$ B zu aktivieren, könnte das latente Membranprotein 1 (LMP1) hier eine Ursache

für eine permanente Aktivität von NF- $\kappa$ B sein (Eliopoulos et al. 1996; Eliopoulos und Rickinson 1998; Ardila-Osorio et al. 1999).

Nicht allein die Tatsache der konstitutiven DNA Bindungsaktivität von NF- $\kappa$ B war von Interesse. Mit Hilfe eines NF- $\kappa$ B p50/p65 knockout-Mausmodells sollten die Folgen eines Verlustes der Expression des Transkriptionsfaktors eruiert werden. Der Versuch, eine p50/p65-knockout-Maus zu generieren, scheiterte an der embryonalen Sterblichkeit an Tag 12,5 nach der Gestation. Es kam zur massiven Apoptose sich entwickelnder Hepatozyten (Horwitz et al. 1997). In Transplantationsexperimenten, in denen fötale hämatopoietische Stammzellen aus 12 Tage alten embryonalen Lebern von p50/p65-knockout-Mäusen in letal bestrahlte und damit Knochenmark-reprimierte Empfängermause transplantiert wurden, konnte die Relevanz von NF- $\kappa$ B für die B-Zell-Entwicklung gezeigt werden. Weder in Knochenmark, Milz noch im Blut waren B-Zellen oder deren Vorläufer zu finden. Die T-Zell Entwicklung im Thymus war außerdem stark verringert und es kam zu einer massiven Granulozytose (Horwitz et al. 1997). Eine Kotransplantation von NF- $\kappa$ B-defizienten fötalen hämatopoietischen Stammzellen und unverändertem Knochenmark bewirkte allerdings eine Entwicklung sowohl von NF- $\kappa$ B-defizienten B-Zellen aus den fötalen hämatopoietischen Stammzellen als auch von B-Zellen mit NF- $\kappa$ B Expression aus dem unveränderten Knochenmark. Horwitz et al. (1997) schlossen daraus, dass durch NF- $\kappa$ B die Expression eines (nicht näher definierten) extrazellulären Faktors stimuliert werden müsse, der entweder durch Signalgebung für Wachstum und Differenzierung der Zellen notwendig ist oder für den Schutz der Vorläuferzellen vor dem Zelltod.

### **2.1.3.2 *In vivo*-Auswirkungen permanenter Aktivität von NF- $\kappa$ B**

Mausexperimente, in denen der Inhibitor I $\kappa$ B $\alpha$  ausgeknockt wurde, zeigten einen auffälligen Phänotyp der defizienten Mäuse im Vergleich zum Wildtyp. Durch das Fehlen des Inhibitors wurde eine permanente NF- $\kappa$ B Aktivität bewirkt. Der Verlust des Inhibitors führte innerhalb von 3-6 Tagen nach der Geburt zu generalisierten Hautdefekten und hochgradiger Granulozytose (Beg et al. 1995; Klement et al. 1996; Chen et al. 2000). Sezierte, 3-6 Tage alte Mäuse zeichneten sich durch eine verkleinerte und anämische Milz sowie durch einen atrophierten Thymus und eine anämische Leber aus. Die Verkleinerung der Milz wurde vorwiegend auf die Verringerung der B-Zell-Zahl zurückgeführt. Trotz einer verminderten B-Zell-Zahl konnten diese B-Zellen zu einem höheren Prozentsatz als IgM-positiv und

differenziert identifiziert werden. Ähnliches beobachtet man auch in der T-Zell-Population (Chen et al. 2000). Im Gegensatz dazu konnte bei Neugeborenen noch kein Unterschied in der Organbildung entdeckt werden. Bereits etwa 8 Tage nach der Geburt starben die Knockout-Mäuse.

Als Ursache für den Phänotyp der  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -defizienten Mäuse lässt sich die durch den Verlust des Inhibitors hervorgerufene konstitutive Aktivität des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B annehmen. In Kernextrakten von Thymus und Milz der defizienten Mäuse konnten erhöhte Spiegel von NF- $\kappa$ B der Untereinheiten p50/p50 und p50/p65 nachgewiesen werden. Außerdem war die Expression verschiedener NF- $\kappa$ B-abhängiger Zielgene erhöht (z.B. der *granulozyte-colony stimulating factor*, G-CSF).

Um langfristige Effekte eines Verlustes von  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  auf die Entwicklung hämatopoietischer Zellen zu untersuchen, transplantierte man fötale hämatopoietische Stammzellen aus 12,5 Tage alten fötalen,  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -defizienten Lebern in RAG-2-defiziente (und aus diesem Grund B-Zell-defiziente) Empfängermäuse (Chen et al. 2000). Die Genprodukte der Rekombinase aktivierenden Gene sind während der Zellentwicklung für das Rearrangement der Immunglobulingene verantwortlich und spielen somit eine Schlüsselrolle für die Spezifität der B-Zellen. Der Verlust des Gens führt zur B-Zell-Defizienz der Mäuse. Eine Transplantation mit  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -defizienten hämatopoietischen Stammzellen ermöglicht die Identifizierung aller nach der Transplantation entstehenden B-Zellen als  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -defizient. In den Rezipienten entwickelten sich vergleichbare Mengen von B- und T-Zellen in Wildtyp- und  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -defizienten transplantierten Empfängern. Auch eine erhöhte Menge an Makrophagen war zu beobachten.

*In vitro*-Stimulationen der Milz-Lymphozyten mit B- bzw. T-zellspezifischen Stimulantien ergaben für B- und T-Zellen ein unterschiedliches Bild. Während die konstitutive Aktivität von NF- $\kappa$ B bei T-Zellen eine um 50% verringerte Proliferation zur Folge hatte, proliferierten die B-Zellen 2-3 mal stärker als B-Zellen mit physiologischer NF- $\kappa$ B Aktivität. NF- $\kappa$ B hat folglich auf Aktivierung und Proliferation von T- und B-Zellen einen unterschiedlichen Einfluss (Chen et al. 2000).

In der B-Zell-Entwicklung scheint NF- $\kappa$ B auf die Immunglobulin-Produktion und auf die Isotypveränderung Einfluss zu nehmen. Während die Serumspiegel von IgM, IgG2b, IgG3 und Ig $\kappa$  in  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -defizienten, transplantierten RAG-2-defizienten Empfängern unverändert waren, waren die Serumspiegel von IgG2a, IgA, IgE, IgG1 und Ig $\lambda$  bis zu zehnfach erhöht. Die Immunisierung der Mäuse mit T- und B-

zellspezifischen Stimulantien führte zu einer Verschiebung dieser Verhältnisse. Spezifische Antikörper vom Typ IgG1, IgG2a und IgG2b waren bei T-Zell-spezifischer Stimulation verringert, IgG3 bei B-zellspezifischer Stimulation. Die verminderte Stimulationsfähigkeit der Immunglobulinexpression ist Folge eines Defektes der B-Zell-Funktion, der auf die konstitutive Aktivität des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B zurückzuführen ist. Histologisch stellte sich ein Verlust der Keimzentrumbildung dar.

NF- $\kappa$ B scheint bis zu einem bestimmten Punkt in der B-Zell-Differenzierung eine wichtige Rolle zu spielen. Seine permanente Aktivität wirkt sich allerdings negativ auf deren terminale Differenzierung aus (Chen et al. 2000).

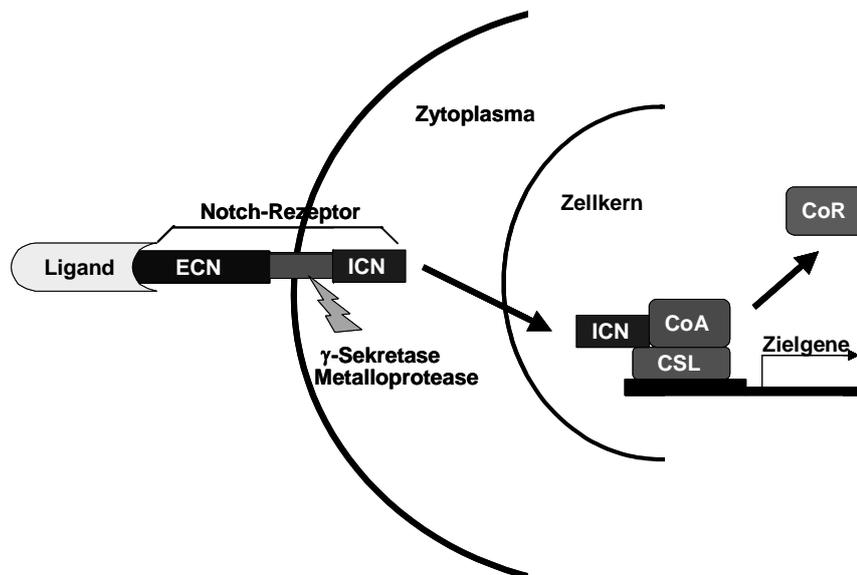
Die Effekte der permanenten Aktivität von NF- $\kappa$ B wiesen auf den großen Einfluss des Transkriptionsfaktors in der Pathogenese der H/RS Zellen hin. Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit wurden I $\kappa$ B $\alpha$ -defiziente hämatopoietische Stammzellen in B-Zell-defiziente Empfängermäuse transplantiert. Die I $\kappa$ B $\alpha$ -defizienten hämatopoietischen Stammzellen wurden aus fötalen Lebern der Nachkommen aus der Verpaarung heterozygoter Mäuse für den I $\kappa$ B $\alpha$ -defizienten Genotyp (I $\kappa$ B $\alpha$ +/- x I $\kappa$ B $\alpha$ +/-), die von Beg et al. (1995) entwickelt wurden, gewonnen. Die Verwendung von B-Zell-defizienten Empfängermäusen (Kitamura et al. 1991; Kitamura und Rajewsky 1992) erlaubte nach der Transplantation eine eindeutige Identifikation aller sich entwickelnder B-Zellen als I $\kappa$ B $\alpha$ -defizient (bzw. -Wildtyp in der Kontrollgruppe). Die B-Zellen der Empfängermäuse zeichneten sich durch eine permanente Aktivität des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B aus und stimmten in diesem Merkmal mit H/RS Zellen überein.

Neben NF- $\kappa$ B spielen weitere Faktoren in der Überlebensstrategie der H/RS Zellen wichtige Rollen. Eine zentrale Aufgabe wird den Notch-Rezeptoren zugeschrieben, auf die im Folgenden eingegangen wird.

### **2.1.3.3 Die Notch-Rezeptoren**

Notch-Rezeptoren (Notch1-4) spielen in der Entwicklung hämatopoietischer Zellen eine große Rolle. Es handelt sich um transmembrane Proteine mit einem als Rezeptor fungierenden, extrazellulären Anteil und einem als Transkriptionsfaktor wirkenden, intrazellulären Anteil, die durch eine nicht-kovalente Bindung im Transmembranbereich miteinander verbunden sind. Nach Bindung eines Liganden (Jagged1, Jagged 2, Delta 1, Delta 3), der von der Zelle selbst oder vom umliegenden Gewebe exprimiert wird, an den extrazellulären Rezeptorteil wird der

intrazelluläre Anteil durch mehrere Enzyme mit  $\gamma$ -Sekretase- und Metalloprotease-Aktivität abgespalten. Er stellt so den funktionell aktiven Teil des Proteins dar. Der intrazytoplasmatische Teil transloziert in den Zellkern, wo er als Transkriptionsfaktor wirkt (Brenner 2000; Pear und Radtke 2003). Da dieses Protein sehr instabil ist, wird als Nachweis seiner Aktivität die Transkription von Zielgenen (z.B. Hes1) genutzt. Abbildung 3 zeigt schematisch die Aktivierung des Transkriptionsfaktors Notch.



(eigene Abbildung, modifiziert nach Pear et al., 2003)

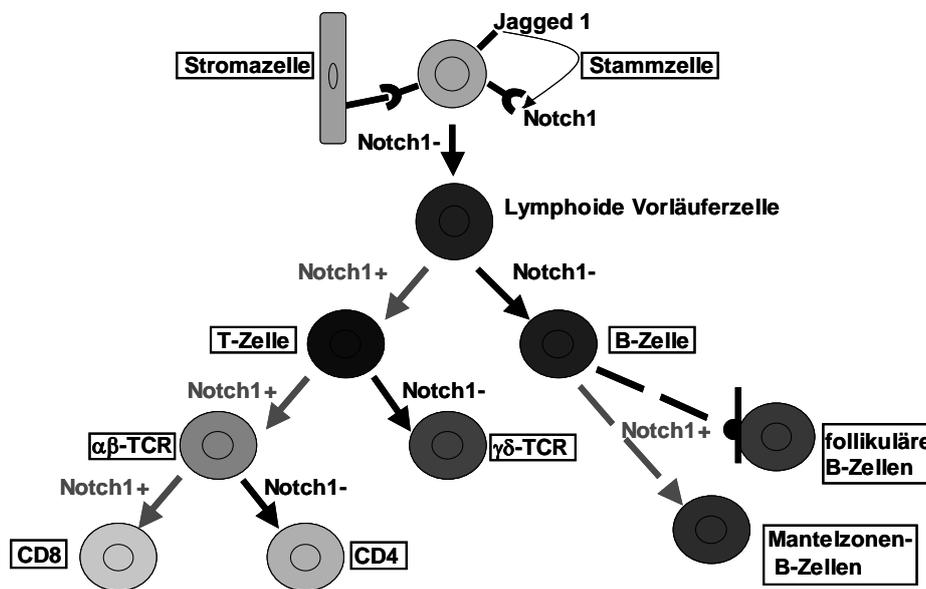
### Abb. 3: Darstellung der Aktivierung des Transkriptionsfaktors Notch

Der Notch-Rezeptor setzt sich aus drei Anteilen zusammen: 1. Der extrazelluläre, als Rezeptor fungierende Anteil (ECN), 2. der transmembrane Anteil und 3. der intrazelluläre, als Transkriptionsfaktor fungierende Anteil (ICN).

Bindet ein Ligand an den Rezeptor, wird ICN durch mehrere Enzyme (mit  $\gamma$ -Sekretase- und Metalloprotease-Aktivität) abgespalten und transloziert in den Zellkern. Dort bindet es an einen Proteinkomplex bestehend aus dem Transkriptionsfaktor CSL und einem Korepressor (CoR). Der CoR wird abgespalten und stattdessen ein Koaktivator Komplex (CoA) rekrutiert, der so die Transkription der Zielgene (z.B. Hes1) initiiert (eigene Abbildung).

Durch Studien, in denen die Notch1-Expression in lymphatischen Vorläuferzellen stimuliert oder gehemmt wurde, konnte dessen Einfluss auf die Richtung der Differenzierung der lymphatischen Zellen gezeigt werden. Ohne Notch1 wurde die Entwicklung von T-Zellen zugunsten einer fehlgeleiteten B-Zell-Entwicklung im Thymus verhindert (Wilson et al. 2000). Wird Notch1 dagegen schon in gemeinsamen lymphatischen Vorläuferzellen im Knochenmark exprimiert (und nicht erst im Thymus), kommt es zu einer Blockierung der B-Zell-Entwicklung und einer forcierten T-Zell Entwicklung bereits im Knochenmark (Pui et al. 1999).

Abbildung 4 zeigt eine schematische Darstellung des Einflusses von Notch1 auf die Lymphozytenentwicklung.



nach Brenner, 2000 und Pear, 2003

#### Abb. 4: Der Einfluss von Notch1 auf die Entwicklung der Lymphozyten

Die Aktivität des Notch1-Signalweges ist mit „Notch1+“ dargestellt, die Inaktivität des Signalweges mit „Notch1-“. Das Schema zeigt Entwicklungsstadien, in denen die Aktivität bzw. die Inaktivität des Signalweges von Bedeutung ist (eigene Abbildung, modifiziert nach Brenner, 2000 und Pear, 2003).

Neueste Arbeiten unserer Arbeitsgruppe zeigen deutlich einen Einfluss von Notch1 beim Hodgkin Lymphom, in großzellig anaplastischen Lymphomen sowie beim Multiplen Myelom (Jundt et al. 2002a; Jundt et al. 2004). Wir konnten nachweisen, dass sowohl in kultivierten Zelllinien als auch im Patientenmaterial dieser Erkrankungen Notch1 und Notch2 exprimiert werden, obwohl die malignen Zellen in beiden Fällen von B-Zellen abstammen. Weiterhin war es möglich, die malignen Zellen durch eine Stimulation mit Jagged1, einem Liganden des Notch-Rezeptors, zu einer deutlichen Steigerung der Proliferation zu bringen. Außerdem verringerte sich bei stimulierten H/RS Zellen die Apoptoserate nach Behandlung mit einem arsenhaltigen Präparat (nicht veröffentlichte Daten). Letzteres war ein Hinweis darauf, dass der aktivierte Notch-Signalweg in H/RS Zellen zusätzlich zu NF-κB weitere Überlebens- und Proliferationssignale auslöst. Vorangegangene Studien konnten belegen, dass Arsenid über die Hemmung des NF-κB Signalweges sowohl in H/RS Zelllinien als auch im Mausmodell die Apoptoserate steigerte (Mathas et al. 2003).

Auch im Zusammenhang mit dem Epstein-Barr Virus scheint Notch von Bedeutung zu sein. Strobl und Mitarbeiter konnten zeigen, dass das Epstein-Barr Virus nukleäre Antigen 2 (EBNA 2) die Gen-Expression in B-Zellen ähnlich verändert wie Notch1 (Strobl et al. 2000). Beide stimulierten die Expression von CD21, einem B-Zell-Aktivierungsmarker und hemmten die Ausbildung von IgM. Außerdem stimulieren beide die Expression des latenten Membranproteins 2A (LMP2A) des Epstein-Barr Virus. In H/RS Zellen wird EBNA 2 allerdings nicht gebildet. Trotzdem ist interessant, dass Notch1 das Potential hat, B-Zellen ähnlich wie EBNA 2 zu immortalisieren.

Unter physiologischen Umständen wird in B-Zellen Notch1 nicht gebildet. Ein Grund dafür ist nach Ansicht von Souabni et al. (2002) die Hemmung von Notch1 durch den B-zellspezifischen Transkriptionsfaktor Pax5, der während der frühen Entwicklung der B-Zellen im Knochenmark massiven Einfluss hat. So aktiviert oder koaktiviert Pax5 eine Reihe von B-zellspezifischen Genen, wie z.B. CD 19, SLP-65 und Ig $\alpha$ . Gene, deren Expression die Entwicklung anderer hämatopoietischer Zellen begünstigen, werden durch Pax5 dagegen unterdrückt (Nutt et al. 1997; Thevenin et al. 1998; Nutt et al. 1999). Ein Verlust des Transkriptionsfaktors Pax5 führte im Mausmodell nicht nur zur Blockade der B-Zell-Entwicklung im pro-B-Zell-Stadium; die blockierten Zellen konnten nach *in vitro*-Stimulation durch spezifische Stimuli sogar in unterschiedliche hämatopoietische Zellen (z.B. Makrophagen, Granulozyten, natürliche Killerzellen) differenzieren (Nutt et al. 1999). Der Verlust in adulten B-Zellen zog eine Dedifferenzierung und Veränderungen in der Genexpression der reifen B-Zellen nach sich, die eine Multipotenz entwickelten (Horcher et al. 2001).

Die Expression von Notch2 steigert sich, je weiter die B-Zelle in der Entwicklung voranschreitet. Für die Entwicklung von Marginalzonen B-Zellen ist sie sogar essentiell (Saito et al. 2003).

Wie schon in Kapitel 2.1.3.1 ausgeführt, spielt der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B eine essentielle Rolle für das Überleben der H/RS Zellen. Interessant ist ein offensichtlicher Zusammenhang zwischen Notch1 und NF- $\kappa$ B. Cheng et al. konnten 2001 zeigen, dass die Expression und Funktion von NF- $\kappa$ B-Proteinen von der Expression des Notch1 Rezeptors abhängig ist. In Notch-Antisense-transgenen Mäusen fanden sie eine verringerte DNA-Bindungsaktivität durch NF- $\kappa$ B und eine verringerte Expression von p50, p65, RelB und c-Rel, verschiedener Untereinheiten des Transkriptionsfaktors. Wurde aber Notch1 transfiziert, so konnte die NF- $\kappa$ B-Aktivität wiederhergestellt werden. Zusätzlich zeigte sich eine auf ein Drittel

verringerte Stimulation von B-Zellen durch LPS in Notch-Antisense-transgenen Mäusen (Cheng et al. 2001).

Es ist bemerkenswert, dass auch eine negative Regulation von NF- $\kappa$ B und seinen Zielgenen durch Notch1 stattfindet. Aminosäurehomologien zwischen Notch1 und I $\kappa$ B $\alpha$  wurden als Hinweis auf eine ähnliche Funktion der beiden Proteine gesehen und konnten für ein Notch-Homolog (*Translocation-associated Notch homologue-1*, TAN-1), das in T-Zell Leukämien zu finden ist, nachgewiesen werden (Guan et al. 1996; Wang et al. 2001). Vergleichbare Ankyrin Wiederholungen zwischen TAN-1 und I $\kappa$ B Proteinen werden für die Inhibition der p50 Untereinheit von NF- $\kappa$ B durch dieses Notch-Homolog verantwortlich gemacht. Außerdem inhibiert Notch1 spezifisch die Transkription von NF- $\kappa$ B-p50-abhängigen Genen, indem es die Bindung von p50 an die DNA verhindert (Wang et al. 2001). Eine Interaktion mit p65 war nicht vorhanden. Diese Ergebnisse weisen auf umfassende Aufgaben von Notch1 im Hinblick auf die Regulation von NF- $\kappa$ B hin.

## 2.2 Das Epstein-Barr Virus

In etwa 50 % der Erkrankungsfälle sind in den H/RS Zellen Genprodukte des Epstein-Barr Virus exprimiert. Es werden allerdings nur wenige der Gene des Epstein-Barr Virus von H/RS Zellen gebildet: Das Epstein-Barr Virus nukleäre Antigen 1 (EBNA-1) und die latenten Membranproteine 1 und 2A (LMP1 und LMP2A) (Kieff und Rickinson 2001). LMP1 und LMP2A scheinen für die Eigenschaften der H/RS Zellen wichtige Rollen zu spielen. Von LMP1 ist bekannt, dass es die Funktion eines permanent aktiven CD40 Rezeptors übernehmen kann (Eliopoulos und Rickinson 1998). Dieser übermittelt zusammen mit dem B-Zell-Rezeptor (BZR) Überlebenssignale an die B-Zelle. LMP2A dagegen scheint Funktionen des BZR nachzuahmen (Caldwell et al. 1998; Caldwell et al. 2000), so dass dessen Bildung für das Überleben der Zellen im Keimzentrum nicht notwendig ist.

Das Epstein-Barr Virus ist ein humanes  $\gamma$ -Herpesvirus. Nach Primärinfektion ist es in der Lage, lebenslang in einem latenten Zustand im Wirt zu persistieren. Der Lebenszyklus von EBV weist - wie der anderer Herpesviren - eine lytische und eine latente Phase auf. Die Primärinfektion verläuft über Epithelzellen des Oropharynx. Sie ist durch lytische DNA-Replikation, Expression nahezu aller viraler Gene, Virusproduktion und Lyse der befallenen Zellen gekennzeichnet. Diese akute Phase der EBV-Infektion verläuft in der Regel im frühen Kindesalter ohne Symptome. Im weiteren Verlauf der Virus-Wirt-Beziehung herrscht eine latente Infektion vor, die nur

zeitweilig von einer lytischen Phase der Virusproduktion unterbrochen wird. Während der Latenz werden nur noch elf der ca. 90 viralen Gene exprimiert. In diesem Zustand, der als Latenz III bezeichnet wird, verändern sich die infizierten B-Zellen zu proliferierenden lymphoblastoiden Zellen (LCLs, lymphoblastoid cell lines) und induzieren in der Folge eine massive humorale und zelluläre Immunantwort des Wirts. Proliferierende B-Zellen werden auf diese Weise eliminiert, und es entsteht ein EBV-spezifisches, immunologisches Gedächtnis. In einigen B-Zellen, vermutlich Gedächtnis-B-Zellen, ändert EBV das Muster seiner Genexpression zur so genannten Latenz I oder II. Es werden nur noch wenige virale Gene exprimiert, die Zellen ändern sowohl ihren Phänotyp als auch die Expression von zellulären Oberflächenproteinen und hören auf zu proliferieren. Diese Latenz I oder Latenz II B-Zellen entgehen der Überwachung durch das Immunsystem und können somit im Wirt lebenslang persistieren. Die Frequenz infizierter B-Zellen im peripheren Blut liegt im Bereich von 1-30 infizierten Zellen pro  $5 \times 10^6$  Zellen. Sporadisch kann es zu erneuter Aktivierung lytischer Gene und der Proliferation solcher Zellen kommen, die in der Regel sofort durch das Immunsystem eliminiert werden. In Fällen von geschwächter Immunabwehr, wie z.B. bei einer HIV-Infektion oder nach Immunsuppression im Verlauf von allogenen Transplantationen, kann EBV jedoch an der Entstehung von B-Zell-Tumoren, den lymphoblastischen Lymphomen beteiligt sein (Young und Rickinson 2004).

EBV wird ätiologisch eng mit einer Reihe von Krebserkrankungen assoziiert, wie z.B. dem Hodgkin-Lymphom, dem Burkitt-Lymphom, dem Nasopharynx-Karzinom, bestimmten T-Zell-Lymphomen und dem immunoblastischen Lymphom (Kieff und Rickinson 2001). Tumore entstehen oft erst viele Jahre nach der primären EBV-Infektion, was auf einen mehrstufigen Entstehungsprozess hinweist.

Die Rolle des EBV für das Hodgkin-Lymphom wurde bereits zu Beginn des Kapitels beschrieben. Burkitt-Lymphome zeichnen sich durch spezifische chromosomale Translokationen des Protoonkogens *c-myc* aus, die zu einer konstitutiven Aktivierung des Gens führen.

Nasopharynxkarziome sind epitheliale Tumore des Nasen-Rachenraums. Sie treten besonders gehäuft in China auf, was auf eine zusätzliche genetische oder umweltbedingte Komponente bei deren Entstehung hinweist.

Proliferierende, EBV-infizierte B-Zellen stehen in einem engen Zusammenhang mit einer fehlenden Immunabwehr. Generell variiert die Expression der viralen Gene zwischen den verschiedenen Tumoren. Burkitt-Lymphome exprimieren nur das EBV

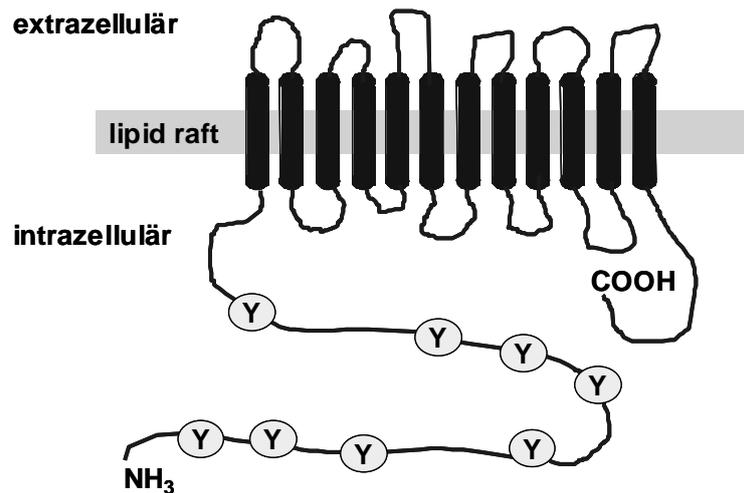
nukleäre Antigen EBNA1 und zwei kurze, nicht kodierende virale RNAs. Ein Zustand, der der Latenz I entspricht. Die Expression von EBNA1, den latenten Membranproteinen (LMP)1, 2A und 2B entspricht der Latenz II. Diese tritt in Nasopharynxkarzinomen, Hodgkin- und T-Zell-Lymphomen auf. Das Expressionsmuster der Latenz III, d.h. die Expression der EBV nukleären Antigene EBNA1, 2, 3A, 3B, 3C und EBNA-LP, der drei latenten Membranproteine LMP1, 2A und 2B sowie von kleinen, nicht-polyadenylierten RNAs, EBER1 und 2, ist charakteristisch für immunoblastische B-Zell-Lymphome.

Lymphoblastoide Zelllinien, so genannte LCLs, exprimieren virale Proteine, wie sie für die Latenzstufe III beschrieben sind. Diese können als *in vitro* Modell für die latente EBV-Infektion und die pathogenetischen Mechanismen bei der Tumorentstehung durch die Immortalisierung primärer B-Zellen mit EBV leicht *in vitro* etabliert werden (Thorley-Lawson und Mann 1985). Nicht alle der oben genannten Gene sind absolut notwendig für den Prozess der B-Zell-Immortalisierung. EBERs und EBNA3B scheinen keine Rolle zu spielen, EBNA1, 2, 3A und 3C sowie LMP1 gelten als essentiell. EBNA-LP soll lediglich die Effizienz der Immortalisierung verbessern (Young et al. 2000). Die Rolle von LMP2A und B wird kontrovers diskutiert (Briemeier et al. 1996; Speck et al. 1999).

### **2.2.1 LMP2A als B-Zell-Rezeptor Homolog**

Die Zuordnung von H/RS Zellen zu den B-Zellen war lange unklar, weil diese Zellen auf ihrer Oberfläche keine Immunglobuline exprimieren und somit auch keinen B-Zell-Rezeptor (BZR) ausbilden. Im regulären physiologischen Entwicklungsprozess kann eine solche B-Zelle die Keimzentrumreaktion nicht überstehen, da ihr der Überlebensstimulus ohne Antigenkontakt über den BZR fehlt. Sie geht in der Regel durch Apoptose zugrunde.

Anders verhalten sich die Hodgkin/Reed Sternberg Zellen. Neben weiteren Faktoren könnte LMP2A für diejenigen H/RS Zellen, die dieses Protein exprimieren, ein Grund für das Überleben der Zelle sein (vergleiche Abbildung 5).



(eigene Abbildung, modifiziert nach Merchant et al., 2001)

### Abb. 5: Schematische Darstellung der Struktur von LMP2A

Das Protein besteht aus einer 119 Aminosäuren langen, aminoterminalen zytoplasmatischen Domäne, 12 hydrophoben Transmembrandurchgängen und einer 27 Aminosäure langen carboxyterminalen zytoplasmatischen Domäne. In latent infizierten B-Lymphozyten ist es in der Plasmamembran aggregiert exprimiert. Im N-terminalen Anteil befinden sich verschiedene Homologien zum BZR, wie zum Beispiel verschiedene Tyrosine (Y), die zum Teil mit prolinreichen Regionen im Zusammenhang stehen sowie ein ITAM (*immunoreceptor tyrosin-based activation motive*). Diese Strukturen dienen dem BZR zur Signalübertragung (eigene Abbildung, modifiziert nach Merchant et al., 2004).

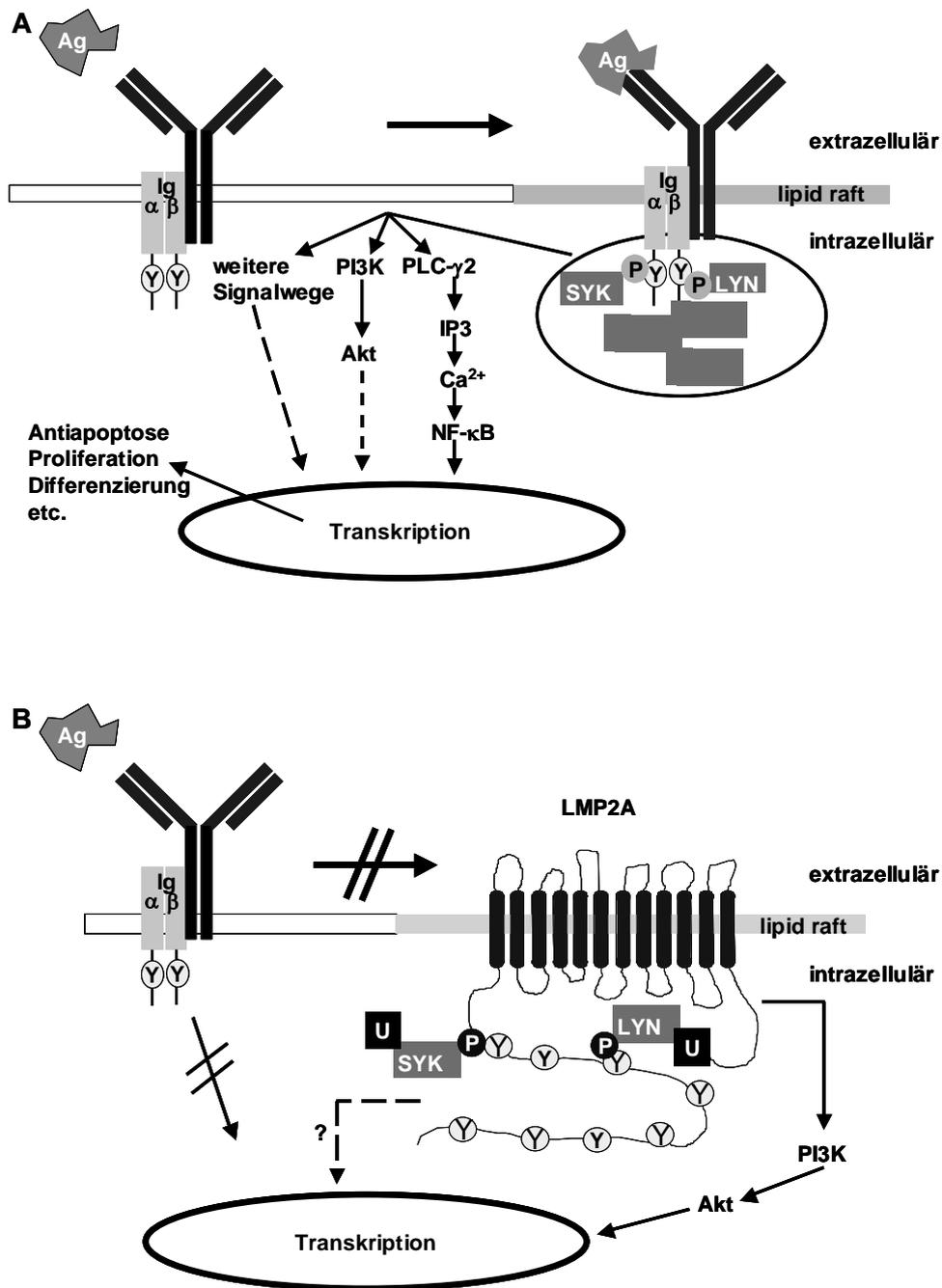
In der Literatur wird die Blockade der B-Zell-Rezeptor-Funktionen durch LMP2A als dessen Hauptaufgabe beschrieben (Portis et al. 2002). LMP2A ist ein Typ II Transmembranprotein. Es besteht aus drei Abschnitten: Einer aminoterminalen, 119 Aminosäuren langen Domäne, 12 Transmembrandurchgängen und einer 27 Aminosäuren langen carboxyterminalen Domäne. Sowohl die aminoterminalen als auch die carboxyterminale Domäne befindet sich im Zytoplasma (Abbildung 5).

Der genetische Locus besteht aus neun Exons, die über die *terminal repeats* hinweg zu einer mRNA gespleisst werden. Dies ist nur möglich, wenn das Genom von EBV in der zirkulären Form als extrachromosomales Plasmid vorhanden ist (Laux et al. 1988). In der Plasmamembran liegt das Protein in hoher lokaler Dichte als Oligomer aktiviert in *lipid rafts* (cholesterin- und sphingolipid-reiche Mikrodomänen) vor (Dykstra et al. 2001) und stellt vermutlich einen konstitutiv aktiven Pseudorezeptor dar. Zur Homooligomerisierung wird ein Motiv benötigt, das innerhalb der kurzen carboxyterminalen Domäne zu finden ist (Matskova et al. 2001). Die Homologie von LMP2A zum B-Zell-Rezeptor wird durch ein *immunorezeptor tyrosin-based activation motive* (ITAM) Aminosäuremotiv sowie zwei prolinreiche Tyrosin Regionen (PY) und

mehreren konservierten potentiellen Bindestellen für Proteine mit Src-Homologie Domänen in der größeren, aminoterminalen Domäne bestimmt (Portis et al. 2002). Diese Abschnitte dienen der Signalübertragung.

Die Blockade von B-Zell-Rezeptor-Signaltransduktionsfunktionen und der Internalisierung des gebundenen Antigens durch LMP2A erfolgt durch unterschiedliche Mechanismen. Durch Homooligomerisierung aktiviertes LMP2A verhindert die Translokation des aktivierten B-Zell-Rezeptors in die *lipid rafts* und die Internalisierung des gebundenen Antigens (Dykstra et al. 2001). Die Sequestrierung der Proteintyrosinkinasen Lyn und Syk an LMP2A verhindert die Teilnahme dieser essentiellen Kinasen an der B-Zell-Rezeptor Signaltransduktion (Miller et al. 1995). Diese binden an die PY Motive von LMP2A und führen zu einer raschen Degradierung von LMP2A selbst sowie gebundener Kinasen wie Lyn (Ikeda et al. 2001a).

Abbildung 6 zeigt die Signalübertragung durch den BZR sowie dessen Blockierung durch LMP2A.



**Abb. 6: Signaltransduktion durch den B-Zell-Rezeptor und von LMP2A**

(A) In ausdifferenzierten B-Lymphozyten führt die Bindung des B-Zell-Rezeptors mit seinem Antigen zur Aktivierung des Rezeptors. Dieser Komplex transloziert in cholesterin- und sphingolipid-reiche Mikrodomänen (*lipid rafts*). Dort phosphoryliert die *non receptor*-Protein Tyrosin Kinase Lyn sich selbst und zwei Tyrosine des ITAM (*i*mmunoreceptor *t*yrosin-*b*ased *a*ctivation *m*otive) innerhalb der zytoplasmatischen Domänen von Igα/β. An dieses Aminosäuremotiv bindet die Proteintyrosinkinase Syk und wird phosphoryliert. Sie aktiviert direkt den Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K)/Akt Signaltransduktionsweg und rekrutiert gleichzeitig weitere Proteine an den

B-Zell-Rezeptor-Proteinkomplex. Diese bilden zusammen ein Signalosom, das die Phospholipase  $C\text{-}\gamma 2$  (PLC- $\gamma 2$ ) aktiviert und so über Inositoltriphosphat (IP3) und Kalziummobilisierung NF- $\kappa$ B freisetzt. Zusätzlich sorgt die Aktivierung weiterer Signalwege für die Transkription von Genen, deren Produkte z.B. für Proliferation und Differenzierung der B-Zelle notwendig sind (eigene Abbildung).

(B) LMP2A aggregiert über ein *clustering* Signal in seiner carboxyterminalen Domäne in den *lipid rafts*. Dadurch wird die Translokation des B-Zell-Rezeptors in diese Mikrodomäne der Plasmamembran verhindert. Zusätzlich bindet die aminoternale Domäne von LMP2A die Proteintyrosinkinasen Lyn und Syk, die damit nicht zur Ausbildung des Signalosoms am B-Zell-Rezeptor zur Verfügung stehen. Der einzige beschriebene Signalweg, der direkt durch LMP2A aktiviert wird, ist der PI3K/Akt Weg, durch den Proliferations- und Überlebenssignale induziert werden. Durch Nedd4 ähnliche E3 Protein Ubiquitin Ligasen, die ebenso an LMP2A binden, werden LMP2A selbst, Syk und Lyn ubiquitiniert und dadurch zum Abbau im Proteasom gekennzeichnet (eigene Abbildung).

### 2.2.2 *In vivo*-Auswirkungen der LMP2A Expression

Schon die *in vitro* Erkenntnisse zur Funktion von LMP2A lassen auf dessen Bedeutung für die B-Zell-Entwicklung schließen. Mausmodelle geben in dieser Hinsicht einen noch deutlicheren Einblick in die Auswirkungen der Expression von LMP2A.

Transgene Mäuse, bei denen die Expression von LMP2A unter den Immunglobulin-Schwerketten *Enhancer* und *Promotor* ( $E\mu$ ) gestellt wurde, zeigen einen interessanten Phänotyp (Caldwell et al. 1998; Caldwell et al. 2000). Es kam zu einem Verlust der Immunglobulinexpression in ansonsten immunkompetenten Mäusen. Die B-Zell-Zahl in der Milz und im Knochenmark war deutlich verringert. Allerdings wurde eine Vielzahl von CD19 (einem pan-B-Zellmarker) -positiven Zellen gefunden, die keinen B-Zell-Rezeptor ausbildeten. Es scheint also, als würde LMP2A Veränderungen in der B-Zell-Entwicklung bewirken und sich positiv auf deren Überleben auswirken. Auch das Rearrangement der Immunglobulingene war gestört. Es fand ein Rearrangement der D-J Schwerkettengene sowie der V-J  $\kappa$ -Leichtkettengene statt. Das finale Rearrangement der V-DJ Schwerkettengene fehlte. Das ist insofern bemerkenswert, als dass eine Leichtkettengenumordnung unter physiologischen Umständen erst nach vollständiger Schwerkettengenumordnung stattfinden kann.

Mäuse, die nur eine schwache Expression von LMP2A aufwiesen, hatten im Übrigen eine normale B-Zell-Entwicklung, was auf einen dosisabhängigen Effekt von LMP2A zurückzuführen sein könnte.

Es trat nun die Frage auf, ob LMP2A in der Lage ist, die BZR-Funktion innerhalb der B-Zell-Entwicklung zu übernehmen. Um diese Frage zu beantworten, kreuzten Caldwell et al. die LMP2A-transgenen Mäuse mit einem Mausstamm, dem das *Recombinase activating gene* (RAG)-1 fehlte. RAG-1-defiziente Mäuse sind nicht in der Lage, Genrearrangements zu initiieren, was zu einem vollständigen Verlust der B-Zell-Entwicklung führt. Die Nachkommen der Verpaarung dieser Mausstämmen exprimierten BZR-defiziente B-Zellen. Dabei war nicht ausschlaggebend, ob die Expression von LMP2A stark oder schwach war. Außerdem konnten die Knochenmarkzellen der Nachkommen in *in vitro* Versuchen durch den B-zellspezifischen Wachstumsfaktor IL-7 zur Proliferation stimuliert werden.

Diese Befunde stützen die Hypothese, dass LMP2A nicht nur die Funktion eines vorhandenen B-Zell-Rezeptors unterdrückt, sondern sogar für die Reifung früher B-Lymphozyten notwendige Entwicklungssignale des B-Zell-Rezeptors nachahmt und eine Differenzierung von frühen B-Lymphozyten ohne funktionsfähigen B-Zell-Rezeptor ermöglicht.

Durch welche unterschiedlichen Mechanismen LMP2A den BZR nachahmt, konnten Merchant et al. 2000 und Engels et al. 2001 teilweise aufklären.

Das zum BZR homologe ITAM des LMP2A schien für die Signalübermittlung von Bedeutung zu sein. Eine Mutation dieses Motivs, die einen Verlust der Bindungsfähigkeit der Proteintyrosinkinase Syk zur Folge hatte, bewirkte, dass die Mäuse eine unveränderte B-Zell-Entwicklung aufwiesen (Merchant et al. 2000). Man kann davon ausgehen, dass die Interaktion zwischen ITAM und Syk für die LMP2A Funktion ausschlaggebend ist.

Die Einkreuzung LMP2A transgener Mäuse in verschiedene Knockout-Mausstämmen sollte die Bedeutung der fehlenden Proteine für die Signalübertragung in der späteren Signalkaskade des LMP2A klären.

Der Phänotyp von *Burton's tyrosine kinase* (Btk)-defizienten Mäusen schien im Hinblick auf LMP2A interessant zu sein. Die Btk ist ein Schlüsselement in der Induktion verschiedener Signalwege durch den BZR (z.B. MAPK, NF- $\kappa$ B, Akt). Eine Kreuzung von LMP2A transgenen Mäusen mit Btk-defizienten Mäusen (Khan et al. 1995; Khan et al. 1997) führte zu einer deutlichen Verringerung der B-Zell-Zahl in der Peripherie im Vergleich zu nur Btk-defizienten Mäusen. Eine Kreuzung der LMP2A/Btk  $-/-$  Mäuse mit RAG-1  $-/-$  Mäusen führte wieder zur Entwicklung von B-Zellen ohne BZR, was auf eine Unabhängigkeit der LMP2A Funktion von Btk

hinweist. Eine ebenfalls vorhandene konstitutive Phosphorylierung der Btk in LMP2A-exprimierenden Zellen legte wiederum einen Einfluss der Btk nahe.

LMP2A ist also mit und ohne Beteiligung der Btk in der Lage, die B-Zell-Entwicklung zu beeinflussen und das B- Zell-Überleben zu forcieren.

In seiner Rolle als Adaptorprotein für einige BZR-aktivierte Signalfaktoren tritt das *src-homology 2 domain containing lymphocyte protein* (SLP)-65 hervor. Mäuse, die für diesen Faktor defizitär sind, zeigen ebenfalls einen xid-Phänotyp, der sich durch die Expression von nur wenigen unreifen B-Zellen äußert (Xu et al. 2000). LMP2A-exprimierende Mäuse wurden mit SLP-65 <sup>-/-</sup> Mäusen gekreuzt. Der Phänotyp der Nachkommen unterschied sich nicht von dem der SLP-65 <sup>-/-</sup> Mäuse. Sie zeigten keine verbesserte B-Zell-Entwicklung und kein verbessertes Überleben der B-Zellen (Engels et al. 2001). Die Wirkungsweise von LMP2A ist also abhängig von SLP-65. Diese Erkenntnis wird zusätzlich von der konstitutiven Phosphorylierung des Proteins in LMP2A-exprimierenden Zelllinien gestützt.

Neueste Studien von Casola und Mitarbeitern (2004) zeigen ebenfalls den Einfluss von LMP2A auf die B-Zell-Entwicklung. Sie kontrollierten die Expression von LMP2A in Mäusen mit einem genetischen Defekt in der BZR-Entwicklung, der zu BZR-defizienten B-Zellen führt, mit Hilfe des starken ( $V_H$ ) bzw. des schwachen ( $D_H$ ) Promotors (Casola et al. 2004). Sie konnten zeigen, dass eine schwache Expression von LMP2A die Entwicklung von folliculären und Marginalzonen-B-Zellen fördert, während eine starke Expression die Entwicklung von B1-Zellen unterstützt.

Ein weiteres Ergebnis dieser Arbeit war die spontane Entwicklung von Keimzentren im Darm-assoziierten lymphoiden Gewebe (*gut associated lymphoid tissue*, GALT). Obwohl die dort angesiedelten B-Zellen aufgrund des durch LMP2A ersetzten BZR keine Spezifität gegen ein Antigen besaßen, hatten die Keimzentren Bestand. Die B-Zellen existierten, so lange sie ein BZR-Signal durch LMP2A erhielten, unabhängig vom spezifischen Antigenkontakt, allerdings abhängig von der mikrobiellen Darmflora. Ein ähnliches Phänomen ist bei Mäusen und Kaninchen zu sehen, deren Keimzentrenbildung ebenfalls von der Mikroflora des Darms abhängig ist. Ebenso finden sich im Blinddarm von Kaninchen, die nur über ein geringes Antikörperrepertoire verfügen, Keimzentren. Diese sind vermutlich für somatische Hypermutationen verantwortlich, um die ursprüngliche Antikörperdiversität durch den hier stattfindenden Antigenkontakt zu steigern (Lanning et al. 2000). Hühner, deren B-Zell-Entwicklung in der Bursa fabricii stattfindet, und Schafe, deren Peyersche Platten im Ileum von besonderer Bedeutung sind, entwickeln dagegen ihre B-Zell-

Diversität ohne Einfluss von Antigenkontakt durch somatische Hypermutation oder Neukombination von Genen (Reynaud et al. 1987; Reynaud et al. 1991; Jenne et al. 2003). Ähnliche Mechanismen könnte es im Immunsystem des Menschen geben.

LMP2A verhindert demnach, dass B-Zellen in Keimzentren apoptotisch werden, obwohl sie keine Spezifität aufweisen. Es ist also mitverantwortlich für das Überleben der Zellen.

In weiteren Analysen der LMP2A-transgenen Mäuse zeigten (Hertel et al. 2002), dass LMP2A auch Einfluss auf B-zellspezifische Transkriptionsfaktoren wie zum Beispiel den *early B-cell factor* (EBF), E2A und Pax5 und deren Regulatoren hat und so die B-Zell-Entwicklung beeinflusst. Im Folgenden werden die Funktionen einiger dieser B-zellspezifischen Transkriptionsfaktoren beschrieben.

Die Transkriptionsfaktoren EBF, E2A, Pax5, Notch und Id2 sind während der frühen B-Zell-Entwicklung von besonderer Bedeutung. EBF und E2A wird eine gleiche und kooperative Wirkung zugeschrieben (O'Riordan und Grosschedl 1999). Ein Verlust führt, wie auch der Verlust von Pax5, zu einer Blockade der B-Zell-Entwicklung im pro-B-Zell-Stadium. Dies ist darauf zurückzuführen, dass kein Rearrangement der Immunglobuline stattfindet (Bain et al. 1994; Lin und Grosschedl 1995). Eine Überexpression der Transkriptionsfaktoren in hämatopoietischen Vorläuferzellen induziert eine Überexpression B-zellspezifischer Gene ( $\lambda 5$ , VpreB, Ig $\alpha$ , Ig $\beta$ ) sowie der für das Rearrangement von B- und T-Zell-Rezeptoren verantwortlichen Gene RAG-1 und RAG-2 (Sigvardsson et al. 1997; Kee und Murre 1998). Das Notch1 Zielgenprodukt Hes1 und der Transkriptionsfaktor Id2 wirken antagonistisch auf die B-Zell-Entwicklung. Sie bilden Heterodimere mit E2A und blockieren so dessen Funktion (Benezra et al. 1990; Jarriault et al. 1995). Die Aufgaben von Pax5 und Notch sind in Kapitel 2.1.3.3 detaillierter beschrieben.

Durch LMP2A wird die Expression des Transkriptionsfaktors E2A sowie dessen DNA-Bindungsaktivität gehemmt. Gleichzeitig wird die Bildung von Id2 und SCL, Inhibitoren von E2A, hochreguliert. Die Expression des Transkriptionsfaktors Pax-5, der kurze Zeit nach E2A in der B-Zell-Entwicklung von Bedeutung ist, wird herunterreguliert (Portis und Longnecker 2003).

In *Real-Time* PCR Analysen und vor allem mittels RNA-*Microarrays* konnten Portis et al. (2003) darlegen, dass LMP2A die Genexpression von Zellzyklus stimulierenden Genen steigerte, die von B-zellspezifischen Genen veränderte und die von Apoptose-unterstützenden Genen herunterregelte (Portis et al. 2003). Einige dieser

Veränderungen stimmen mit denen überein, die in Hodgkin-Reed Sternberg Zellen in Hodgkin Lymphomen gefunden wurden. Allerdings basieren die meisten dieser Daten auf *Microarray*-Analysen und sind weder durch *Reverse Transkription* (RT)-PCR Analysen oder *Northern Blot* (mRNA)- noch durch *Western Blot* (Protein)-Analysen überprüft worden. Sie geben aber einen Hinweis auf die Tragweite der Auswirkungen der Expression von LMP2A auf die B-Zell-Entwicklung im Hinblick auf die Regulation B-zellspezifischer Gene.

## 2.3 Das Versuchsmodell

Im Rahmen dieser Arbeit konnten zwei Eigenschaften, die für die Entstehung von Hodgkin Lymphomen von großer Bedeutung sind, in einem Mausmodell vereint werden: Die permanente Aktivität des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B und die Expression des Epstein-Barr Virus Proteins LMP2A. Die Hypothese, dass die konstitutive Aktivität von NF- $\kappa$ B zusammen mit der Expression des BZR-Homologs LMP2A Veränderungen in B-Zellen hervorruft, die denen in H/RS Zellen ähnlich sind, konnte so *in vivo* untersucht werden. Dadurch sollte ein näheres Verständnis des Einflusses der beiden Faktoren auf die Entwicklung der B-Zellen gewonnen werden. Das besondere Interesse lag dabei in der Funktion von NF- $\kappa$ B in Bezug auf Proliferation und Überleben der Zellen sowie in der Rolle von LMP2A als BZR-Homolog und dessen Auswirkungen auf die BZR-unabhängige Entwicklung der B-Zellen. Außerdem konnten erstmals die Effekte der Kombination beider Ereignisse auf BZellen untersucht werden.

Um die permanente Aktivität von NF- $\kappa$ B und die Expression von LMP2A in einem Mausmodell zu untersuchen, wurden Knochenmarkchimäre entwickelt. Knochenmarkchimäre sind Mäuse, deren hämatopoietisches System nach Transplantation von hämatopoietischen Zellen aus dem Knochenmark oder anderen hämatopoietischen Geweben einer Spender-Maus weitgehend ausgetauscht ist. Durch subletale Bestrahlung mit Röntgenstrahlung wurde das hämatopoietische System des Rezipienten zuvor weitgehend zerstört. In diesem Fall wurden fötale Leberzellen als Quelle für hämatopoietische Stammzellen genutzt.

### 2.3.1 Der Spender-Mausstamm $\kappa$ B $\alpha$ +/-

In den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Mausexperimenten dienten die Lebern von Föten aus der Verpaarung von  $\kappa$ B $\alpha$ +/- Mäusen (Beg et al. 1995) als Spenderzellen für die Transplantation hämatopoietischer Stammzellen.

Wie schon in Kapitel 2.1.3.2 beschrieben, konnten adulte Mäuse wegen der ca. am 8. Tag nach der Geburt auftretenden Letalität nicht untersucht werden, die aufgrund des Verlustes des Inhibitors  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  eine permanente Aktivität des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa\text{B}$  aufwiesen. Dies konnte erst gelingen, als hämatopoietische Stammzellen aus fötalen Lebern von  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -defizienten Föten in RAG-2-defiziente Empfängermäuse transplantiert wurden.

Auch wir nutzten die konstitutive NF- $\kappa\text{B}$  Aktivität in Stammzellen aus fötalen Lebern von  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -defizienten Föten. Wir verpaarten  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha^{+/-}$  Mäuse und erhielten ca. 50% heterozygote, 25%  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -defiziente und 25% Wildtyp-Föten.

Diese Zellen wurden während einer 48-stündigen Kultivierung mit einem Retrovirus infiziert, das für LMP2A und das *enhanced green fluorescent protein* (eGFP) kodiert. Diese Zellen wurden in den B-Zell-defizienten Mausstamm IgH $^{-/-}$  (Kitamura et al. 1991; Kitamura und Rajewsky 1992) transplantiert. Abbildung 7 zeigt eine schematische Darstellung der wichtigsten Abschnitte des verwendeten retroviralen Vektors.



### Abb. 7: Schematische Darstellung des retroviralen Vektors

Der retrovirale *long terminal repeat* (LTR) Promotor kontrolliert die Expression von LMP2A und eGFP. Die Trennung der Gene durch die *internal ribosome-entry site* (IRES) hat zur Folge, dass beide Abschnitte unabhängig transkribiert werden, so dass bei der Translation kein Fusionsprotein aus LMP2A und eGFP entsteht, sondern zwei unabhängige Proteine.

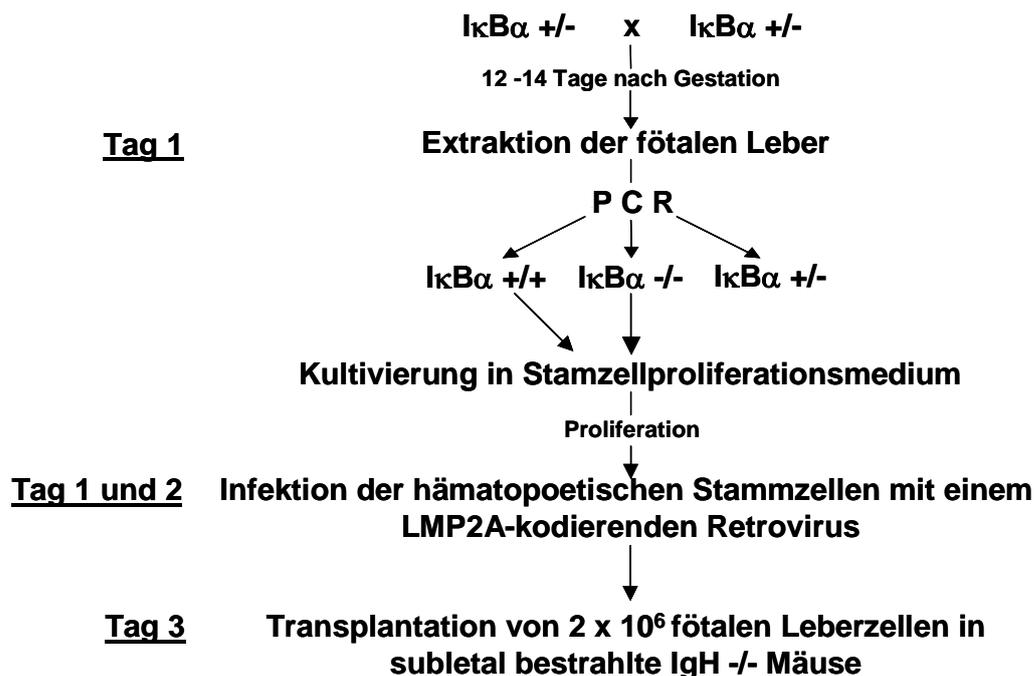
### 2.3.2 Der Empfänger-Mausstamm IgH $^{-/-}$

B-Zell-defiziente Mäuse vom Stamm IgH $^{-/-}$  (Kitamura et al. 1991; Kitamura und Rajewsky 1992) dienten als Empfängermäuse. Kitamura et al. deletierten in Mäusen das Membranexon der schweren Ketten des Immunglobulins IgM ( $\mu$ -Kette). Der Verlust der Kette führte zu einer Blockierung der B-Zell-Entwicklung im prä-B-Zell-Stadium. Diese Blockierung wurde auf die essentielle Funktion der  $\mu$ -Kette als frühe Form des BZR zurückgeführt. Aufgrund der frühen Unterbrechung der B-Zell-Entwicklung ist dieser Mausstamm für B-Zellen defizient.

Durch die Transplantation der LMP2A-bildenden hämatopoietischen Stammzellen mit konstitutiver (bzw. als Kontrolle auf physiologischem Niveau) NF- $\kappa$ B-Aktivität in B-Zell-defiziente Empfängermäuse war es möglich, alle B-Zellen in den Empfängern als konstitutiv (bzw. physiologisch) NF- $\kappa$ B exprimierend zu identifizieren. Eine Kontrolle über die LMP2A Expression war über die gleichzeitige grüne Fluoreszenz durch das eGFP als indirektem Marker und Nachweise von LMP2A in RT-PCR und *Western Blot* Analysen möglich.

Durch die ständige Selbsterneuerung der hämatopoietischen Stammzellen blieben die konstitutive NF- $\kappa$ B-Aktivität und die LMP2A Expression bis zum Tod der Mäuse bestehen. So konnten die Auswirkungen einer permanenten Aktivität des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B und der Expression des Epstein-Barr Virus Genproduktes LMP2A in diesem Modell analysiert werden.

Abbildung 8 zeigt eine schematische Darstellung des Versuchsablaufs.



**Abb. 8: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs**

$\text{IkB}\alpha \text{ +/-}$  Mäuse wurden verpaart. Anhand des Vaginalpfropfes wurde der Zeitpunkt der Gestation bestimmt. 12-14 Tage nach der Gestation konnten die Föten entnommen und deren Lebern extrahiert werden. Die Genotypisierung der Föten erfolgte über PCR Analysen. Knockout- und Wildtyp-fötale Leberzellen wurden jeweils in Stammzellproliferationsmedium kultiviert. Nach Einsetzen der Proliferation wurden die Zellen dreimal retroviral infiziert. 24 Stunden nach der letzten Infektion erfolgte die Transplantation von  $2 \times 10^6$  Zellen in die IgH-/- Empfängermäuse. Eine detaillierte methodische Beschreibung ist in Kapitel 3.2 zu lesen.