

2. Material und Methoden

2.1. Gewebe

Für die Untersuchungen standen Gewebeproben von vier Patienten mit Infektiöser Mononukleose aus dem Archiv des Pathologischen Instituts des Universitätsklinikums Benjamin Franklin zur Verfügung. Drei der Fälle waren Tonsillektomiepräparate, von denen sowohl Gefrierblöcke als auch in Paraffin eingebettetes Gewebe existierten. Von einem Fall lag ein Lymphknoten vor, hier stand nur Gefriermaterial zur Verfügung. Die Diagnose wurde durch klinische, histologische und immunhistologische Kriterien gesichert: Alle Fälle exprimierten die EBV-kodierten Proteine (LMP-1, EBNA-2 und BZLF1); EBER (*EBV-encoded small nuclear RNA*) konnte in jedem Fall in zahlreichen Zellen mit Hilfe der in situ-Hybridisierung nachgewiesen werden.

2.2. Immunhistologie

2.2.1. Prinzip

Mit Hilfe der Immunhistologie lassen sich zelluläre Antigene selektiv nachweisen. In der hier vorliegenden Arbeit wurden sowohl Paraffin- als auch Gefrierschnitte gefärbt. Im Paraffinmaterial ist die Morphologie besonders gut erhalten. Bei der Fixierung mit Formalin allerdings wird die DNA stark degradiert, so dass diese nur bedingt mittels PCR amplifizierbar ist. Gefrierschnitte weisen zwar eine schlechtere Morphologie als Paraffinschnitte auf andererseits sind aber die Proteine und die DNA weitgehend erhalten und damit häufig besser zu untersuchen.

Die immunhistologischen Färbungen wurden mittels der APAAP-Methode angefertigt. Die Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase-Methode ermöglicht einen indirekten Nachweis der Bindung eines Primärantikörpers. Für diese immunhistologische Färbereaktion benötigt man drei Antikörper:

1. Einen primären Antikörper, der gegen das nachzuweisende Antigen gerichtet ist.
2. Einen sogenannten Brückenantikörper, welcher sowohl den primären als auch den dritten benötigten Antikörper, den monoklonalen Maus-anti-alkalische-Phosphatase-Antikörper bindet.

3. Einen monoklonalen Maus-anti-alkalische-Phosphatase-Antikörper, der von dem Brückenantikörper gebunden wird und die anschließend hinzugegebene alkalische Phosphatase des APAAP-Komplexes bindet.

Setzt man nach der Bindung des letzten Antikörpers Naphthol-As-Biphosphat, das Substrat der alkalischen Phosphatase, hinzu, ergibt sich ein Spaltprodukt, das mit Neufuchsin einen roten Farbniederschlag bewirkt. Die Abbildung 2.1. zeigt eine schematische Darstellung einer immunhistologischen Färbung unter Verwendung der APAAP-Methode.

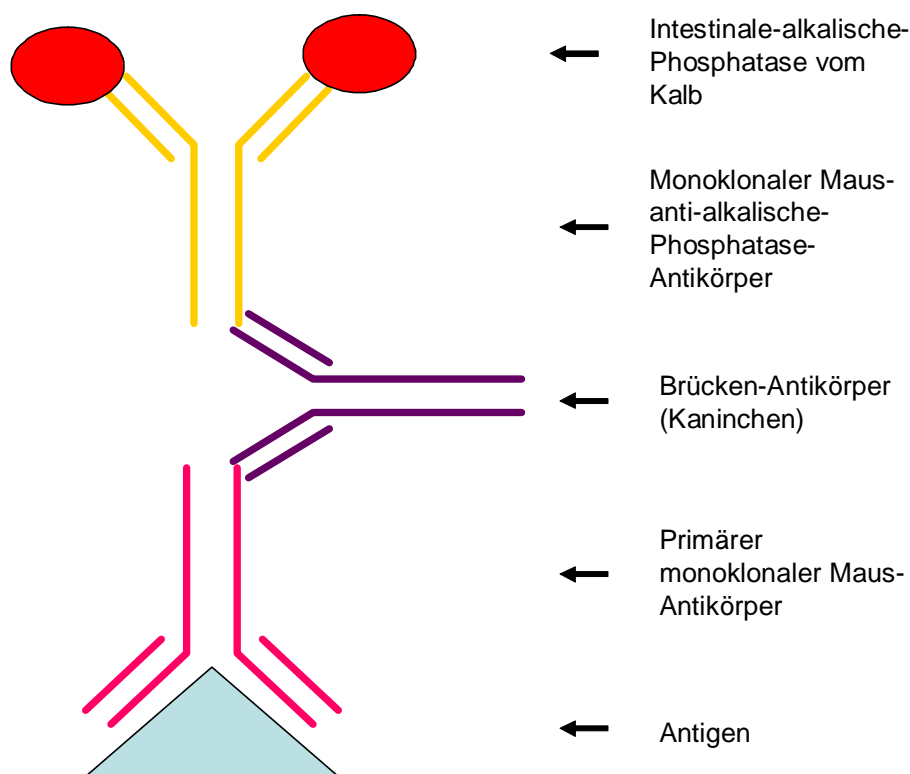


Abbildung 2.1. Färbeschema mit monoklonalem primärem Antikörper unter Verwendung der APAAP- Methode

Der primäre Maus Antikörper (pink) erkennt und bindet das Antigen. Der Brückenantikörper (lila) bindet als ein anti-Maus-Antikörper (aus dem Kaninchen) sowohl den Primärantikörper als auch den Maus-anti-alkalische-Phosphatase Antikörper (gelb). An diesen Maus-anti-alkalische-Phosphatase Antikörper ist die intestinale-alkalische-Phosphatase gebunden. Diese wiederum ergibt durch Hinzufügen ihres Substrates des Naphthol-As-Biphosphates ein Spaltprodukt, welches mit Neufuchsin einen roten Niederschlag bewirkt.

Neben der APAAP-Methode kam in der hier vorliegenden Arbeit die Streptavidin-Biotin-Peroxidase-Methode zum Einsatz. Dabei ist der sekundäre Antikörper ein mit Biotin konjugierter anti-Maus Antikörper. In der dritten Inkubation mit einem Avidin-Meerrettich-

Peroxidase-Komplex bindet das Streptavidin an das Biotin des zweiten Antikörpers. Die Entwicklung des Färberegebnisses erfolgt durch eine Diaminobenzidin-Reaktion, bei der ein brauner Farbniederschlag entsteht.

In der hier vorliegenden Arbeit wurden mit Hilfe von primären Antikörpern hauptsächlich EBV-kodierte Proteine (LMP-1 und EBNA-2) nachgewiesen: Der gegen das latente Membran Protein-1 des EBV gerichtete monoklonale Antikörper (mAK) CS1-4 erzeugt eine Membranfärbung. Mit dem mAK PE2, der gegen EBNA-2 gerichtet ist, lässt sich eine Kernfärbung erzeugen. Die optimalen Verdünnungen der primären Antikörper (siehe Tabelle 2.1) wurden mit RPMI (s. Kap. 7.2.) eingestellt.

Tabelle 2.1. Verwendete Antikörper und deren Zielantigen

Zielantigen	Klon (Antikörper)	Markierter Zelltyp	Verdünnung des Antikörpers	Herkunft
CD20	L26	B-Zellen	1:100	DAKO Cytomation
CD30	Ber-H2	Hodgkin Zellen und Reed-Sternbergzellen	1:10	Prof. Dr. Stein
MiB1	Ki-67	Proliferierende Zellen	1:2000	Prof. Dr. Gerdes
LMP-1	CS1-4	EBV-infizierte Zellen mit Expression des latenten Membranprotein-1	1:50	DAKO Cytomation
EBNA-2	PE-2	EBV-infizierte Zellen mit Expression des nukleären Antigens (EBNA)-2	1:25	DAKO Cytomation
BZ-1	ZEBRA	EBV-infizierte Zellen mit Expression des BamHI Z Replikations-trans Aktivator Proteins	1:20	DAKO Cytomation
CD3	polyklonal	T-Zellen	1:100	DAKO Cytomation

2.2.2. Durchführung der einfachen Immunhistologie

Tiefgefrorene Gewebelöcke wurden in flüssigem Stickstoff von der -80°C Truhe zum Kryostaten transportiert. Bei -20°C wurden 4 µm dicke Schnitte angefertigt und auf beschichtete Objektträger gezogen. Die Schnitte trockneten dann 4-24 Stunden an der Luft und wurden anschließend für 30 Minuten in Aceton (siehe Kap. 7.2.1.) fixiert. Schnitte, die nach der Fixierung nicht direkt gefärbt wurden, wurden nur 10 Minuten lang in Aceton fixiert und anschließend in einer Kühlbox mit Calcium-Chlorid (siehe Kap. 7.2.1.) zum Schutz vor Wasserbildung bei -80°C eingefroren. Die eingefrorenen Schnitte wurden bei Bedarf zu einem späteren Zeitpunkt langsam aufgetaut und dann nochmals mit Aceton fixiert. Nicht zwischengefrorene Schnitte wurden direkt nach der Fixierung, zwischengefrorene Schnitte erst nach der nochmaligen Fixierung mit dem primären Antikörper inkubiert. Paraffinschnitte trockneten ca. 12 Stunden bei 68°C. Vor der Färbung wurde das Paraffin entfernt. Dies geschah durch zweimalige Inkubierung in Xylol (siehe Kap. 7.2.1.) (10 Minuten). Zur Entfernung des Xylols wurde eine absteigende Alkoholreihe durchgeführt. Paraffinschnitte wurden vor der Inkubation mit dem primären Antikörper zwei Minuten in Citrat-Puffer gekocht. Durch die Hitzebehandlung mit Citrat-Puffer erfolgt eine Demaskierung der Proteine, das heißt, dass Epitope freigelegt werden, die durch die Formalinfixierung verändert wurden.

Färbeschema: Die Schnitte wurden mit dem primären Antikörper, verdünnt in RPMI (siehe 7.2.1.), 45 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Um nicht gebundene Antikörper zu entfernen, wurden die Schnitte intensiv mit Tris-Puffer gewaschen, bevor die Inkubation des Schnittes mit dem Brückenantikörper, verdünnt in RPMI (siehe 7.2.1.), für 30 Minuten erfolgte. Nach erneutem Waschen wurde der Schnitt für 30 Minuten mit dem APAAP-Komplex überschichtet. Die Inkubation mit dem Brückenantikörper und dem APAAP-Komplex konnte mehrmals wiederholt werden, um das Färbeergebnis zu intensivieren. Für die Entwicklung gab man Naphthol-As-Biphosphat, das Substrat der alkalischen Phosphatase, hinzu. Das Spaltprodukt ergab mit Neufuchsin einen roten Niederschlag (Entwicklungspuffer, Entwicklerlösung und Neufuchsin siehe Kap. 7.2.1.). Zur Sichtbarmachung der Kerne wurde mit Hämalaun (siehe Kap. 7.2.1) und unter fließendem Wasser 1 Minute gegengefärbt und die Schnitte mit Kaisers Glycerin-Gelatine (siehe Kap. 7.2.1.) eingedeckt. Schnitte für die Einzelzellisolierung wurden nicht eingedeckt, sondern direkt in der Einzelzelluntersuchung verwendet oder mit absteigender Alkoholreihe entwässert und mit Calcium-Chlorid bei -80°C eingefroren.

2.2.3. Doppelfärbungen

Für die Darstellung EBNA-2- und LMP-1-positiver Zellen wurden Doppelfärbungen angefertigt. Um die beiden Antigene mit unterschiedlichen Farben darzustellen, wurde neben der APAAP-Methode zusätzlich der Streptavidin-Biotin-Peroxidase-Komplex benutzt. Die APAAP-Methode liefert ein rotes-, die Streptavidin-Biotin-Peroxidase-Methode ein braunes Färberergebnis.

Bei der Doppelmarkierung handelt es sich um zwei hintereinandergeschaltete immunhistologische Färbungen mit unterschiedlichen Entwicklungssystemen. Die Schnitte wurden wie bei der einfachen Immunhistologie (siehe 2.2.2.) hergestellt und vorbehandelt. Vor der Inkubation mit dem ersten Antikörper wurden die Schnitte für 2 Minuten in Citrat-Puffer (siehe Kap. 7.2.1.) gekocht. Diese Behandlung führt zu einer Freilegung der durch die Formalinfixierung veränderten Proteine. Danach begann die Färbung mit der Inkubation gegen das erste Antigen (EBNA-2) mit dem primären Antikörper (PE2) für 45 Minuten bei Raumtemperatur. Nicht gebundene Antikörper wurden mit Tris-Puffer gewaschen. Danach wurden die Schnitte mit dem biotinylierten Antikörper inkubiert und gewaschen. Darauf schloss sich die Inkubation mit einem Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase-Konjugat (siehe Kap. 7.2.1.) an. Die letzten beiden Schritte konnten wiederholt werden, um das Färbeergebnis zu intensivieren. Die Entwicklung des Färbeergebnisses durch die Diaminobenzidin-Reaktion ergab einen braunen Niederschlag. Vor der Färbung des zweiten Antigens, erfolgte zweiminütiges Kochen der Schnitte in Citrat-Puffer (siehe Kap. 7.2.1.). Das zweite Antigen, LMP-1, wurde mit Hilfe der oben ausgeführten APAAP-Methode nachgewiesen. Das Resultat war ein braun gefärbter Kern durch die Anfärbung von EBNA-2 mit der Streptavidin-Biotin-Methode und eine rote Membran durch die Färbung des LMP-1 Antigens mit der APAAP-Methode.

2.2.4. Fluoreszenz-Doppelmarkierung

Diese Färbungen wurden an Paraffinschnitten angefertigt. Um Epitope, die aufgrund der Formalinfixierung verändert wurden, den Antikörpern zugänglich zu machen, erfolgte eine Vorbehandlung der Schnitte durch Kochen zwei Minuten lang in Citrat-Puffer. Da ebenfalls Doppelfärbungen angefertigt wurden, wurden dazu zwei verschiedene fluoreszierende Antikörper benötigt. Das erste Antigen wurde wie in der einfachen Immunhistologie beschrieben mit dem APAAP-System nachgewiesen (siehe 2.2.2.). Die Entwicklung fand mit Fastred (siehe Kap. 7.2.1.) statt, wodurch eine rote Fluoreszenz der markierten Zelle erreicht

wurde. Die Detektion des zweiten Antigens fand mit einem biotinyliertem Anti-Maus-Antikörper statt. An diesen wurde in einem zweiten Schritt ein Cy2-konjugierter Streptavidin Antikörper gebunden. Cy2 ist ein grün fluoreszierender Farbstoff. Tabelle 2.2 zeigt eine Auflistung der in der Immunfluoreszenz eingesetzten Antikörper.

Tabelle 2.2. Antikörper zur Charakterisierung der EBV-positiven Zellen

Klon	Zielantigen	Markierter Zelltyp	Herkunft
CS1-4	LMP-1	EBV pos. Zellen	DAKO
PE-2	EBNA-2	EBV pos. Zellen	DAKO
Pax 5	BSAP (B-Zell spezifisches Aktivierungsprotein)	B-Zellen	BD-Pharmingen
MUM 1	IRF4 (interferon regulating factor)	Plasma-B-Zellen und deren Vorläufer	Prof. Falini

2.3. In situ-Hybridisierung

2.3.1. Prinzip

Mit Hilfe der in situ-Hybridisierung, ein Verfahren zum Nachweis von DNA und RNA auf Einzelzellebene im Gewebeschnitt, werden kurze EBV-kodierte RNA-Moleküle nachgewiesen (=EBER). EBER kodiert nicht für ein Protein, es liegt aber in hoher Kopienzahl (ca. 10^6 EBER-Moleküle) in den Kernen latent infizierter Zellen vor.

Im Rahmen der in situ-Hybridisierung werden Gewebeschnitte mit einer Biotin oder Digoxigenin markierten EBER-Sonde inkubiert. Durch Erhitzen werden sowohl die Nukleinsäuren des Gewebeschnittes als auch die Sonde denaturiert, so dass sie als Einzelstränge vorliegen. Nach der Zugabe der sogenannten „*antisense*“ Sonde, welche komplementär zur nachzuweisenden RNA ist, kann sich diese an die „Ziel RNA“ anlagern. Aufgrund der Biotin- oder Digoxigeninmarkierung lassen sich die gebundenen Sonden im Gewebe (in situ) darstellen. Die Kontrollhybridisierung erfolgt mit „*sense*“ Sonden. Diese sind mit der sich in situ befindlichen RNA identisch, so dass keine komplementäre Anlagerung der Sonde an die „Ziel RNA“ möglich ist.

2.3.2. Durchführung

Zur Vermeidung von RNase Kontaminationen wurden alle Arbeitsschritte der in situ-Hybridisierung unter RNase-freien Bedingungen durchgeführt. Dies wurde erreicht durch Verwendung von gesonderten Pipetten und RNase freien Pipettenspitzen, DEPC-Wasser (siehe Kap.7.2.2.) zur Bereitung der Lösungen sowie Benutzung von "gebackenen" Glasgeräten (4h bei 250°C zerstört kontaminierende RNase).

Der Nachweis erfolgte an Paraffinschnitten. Die Schnitte wurden wie folgt vorbehandelt: 4-6 µm dicke Paraffinschnitte wurden auf beschichtete Objektträger gezogen und über Nacht bei 37°C getrocknet. Darauf wurden sie für 15 min bei 60°C inkubiert und danach mit Xylol entparaffiniert. Die Rehydrierung der Schnitte erfolgte mit 100% Aceton und einem Aceton PBS-Puffergemisch (siehe Kap.7.2.2.) je zur Hälfte. 20 Minuten wurden die Schnitte mit 0,2 N HCl/DEPC-Wasser (siehe Kap. 7.2.2.) behandelt, um basische Proteine zu entfernen. Einer fünfminütigen Spülung mit DEPC-Wasser folgte ein Proteinverdau mit Proteinase K, um die EBER-Moleküle, die sich im Kern befinden, den Sonden zugänglich zu machen. Nach 20 Minuten bei Raumtemperatur wurde dieser Verdau mit Glycin (siehe Kap. 7.2.2.) gestoppt. Es folgte mehrmaliges Spülen der Schnitte mit 1x PBS Puffer und DEPC-Wasser. Die sich daran anschließende aufsteigende Ethanolreihe diente der Entwässerung. Nach der Lufttrocknung wurde der Hybridisierungsmix (siehe Kap. 7.2.2.) mit der darin enthaltenden digoxin-markierten EBER „*antisense*“ Sonde (siehe Kap.7.2.2.) pipettiert. Davon wurden 50 µl auf die Schnitte gegeben und abgedeckt. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 42 °C. Am nächsten Morgen wurde der Hybridisierungsmix durch zehminütiges Waschen mit TES (siehe Kap.7.2.2.) beseitigt. Nichtgebundene Einzelstrangsonden wurden mit einer Mischung aus TES und 20 µg/ml RNase entfernt. Darauf wurde wieder mit TES und SSC (siehe Kap.7.2.2.) gespült. Bis zur Entwicklung wurden die Schnitte mit TBS (siehe Kap.7.2.2.) inkubiert. Die Detektion der spezifisch gebundenen Digoxigenin-markierten EBER-Sonde erfolgte mit einem an alkalischer Phosphatase gekoppelten Dig-Fab-Fragment (siehe Kap. 7.2.2.). Dieser Antikörper wurde in einer Lösung aus RPMI 1:100-fach verdünnt und bedeckte die Schnitte 45 Minuten lang bei Raumtemperatur. Danach wurde mit 1xTBS gespült. Darauf wurden die Schnitte 20 Minuten mit Entwicklerlösung inkubiert (wie unter 2.2.2. beschrieben). Die EBER-positiven Zellen zeigten ein deutliches rotes nukleäres Signal.

2.4. Einzelzellanalyse

2.4.1. Prinzip

Die Einzelzellanalyse ist eine Technik zur Isolierung einzelner Zellen aus dem Gewebeverband. Unter mikroskopischer Kontrolle wird eine geeignete Zelle herausgesucht, die dann mit einer spitzen Glaskapillare aus dem Zellverband herausgelöst wird. Diese Zelle, an der spitzen Kapillare haftend, wird dann mit Hilfe eines Mikromanipulators in eine offene Glaskapillare transferiert. Die so vom Schnitt entfernte Zelle wird in ein Eppendorfgefäß eingebracht und steht für weitere Untersuchungen zur Verfügung.

2.4.2. Durchführung

Die Einzelzellanalyse erfolgte an immunhistologisch gefärbten Gefrierschnitten. Diese wurden auf den Objektträger des Mikromanipulators gelegt und zum Schutz vor Austrocknung mit 1xPBS (siehe Kap. 7.2.3.) überschichtet. Der Zellisolierungsprozess begann mit dem Heraussuchen einer geeigneten, selektiv angefärbten (z.B. LMP-1 positiver-) Zelle unter dem Mikroskop des Mikromanipulators. Von dieser Zelle und ihrer Umgebung wurde zur Dokumentation ein Foto erstellt. Anschließend wurde sie mit einer hydraulisch betriebenen Manipulationskapillare unter mikroskopischer Sicht aus dem Zellverband herausgelöst. Diese Zelle wurde dann in eine offene Glaskapillare, die ebenfalls hydraulisch betrieben im Raum frei beweglich war, überführt. Die Spitze dieser offenen Glaskapillare, die die isolierte Zelle enthielt, wurde behutsam in ein mit Proteinase K (siehe Kap. 7.2.3.) gefülltes Eppendorfgefäß eingetaucht und vorsichtig abgebrochen. Die Isolierung der Zelle und die Unversehrtheit der angrenzenden Zellen wurden fotografisch dokumentiert. Gleich im Anschluss an die Isolation wurde das Eppendorfgefäß mit der sich darin befindlichen Zelle zentrifugiert. Durch das Zentrifugieren wurde die Zelle sicher in die Proteinase befördert. Die Proteinase bewirkte den Verdau sämtlicher Proteine (Zytoplasmamembran, Kernmembran, an die DNA gebundene Proteine), wodurch die DNA freigesetzt wurde. Um sicher sein zu können, dass die in der anschließenden PCR nachgewiesene DNA tatsächlich der selektiv angefärbten und „gepickten“ Zelle entstammte, wurden Negativkontrollen benötigt. Diese wurden dem Puffer, mit dem der Schnitt überschichtet war, nach jeder gepickten Zelle entnommen. Die Untersuchung dieser Pufferproben diente dem Ausschluss von Kontaminationen des Überschichtungspuffers durch aus dem Gefrierschnitt herausgelöster

DNA. Pro Picksitzung wurden elf Zellen und elf Pufferproben isoliert. Die verwendeten Schnitte wurden zwecks Dokumentation aufbewahrt.

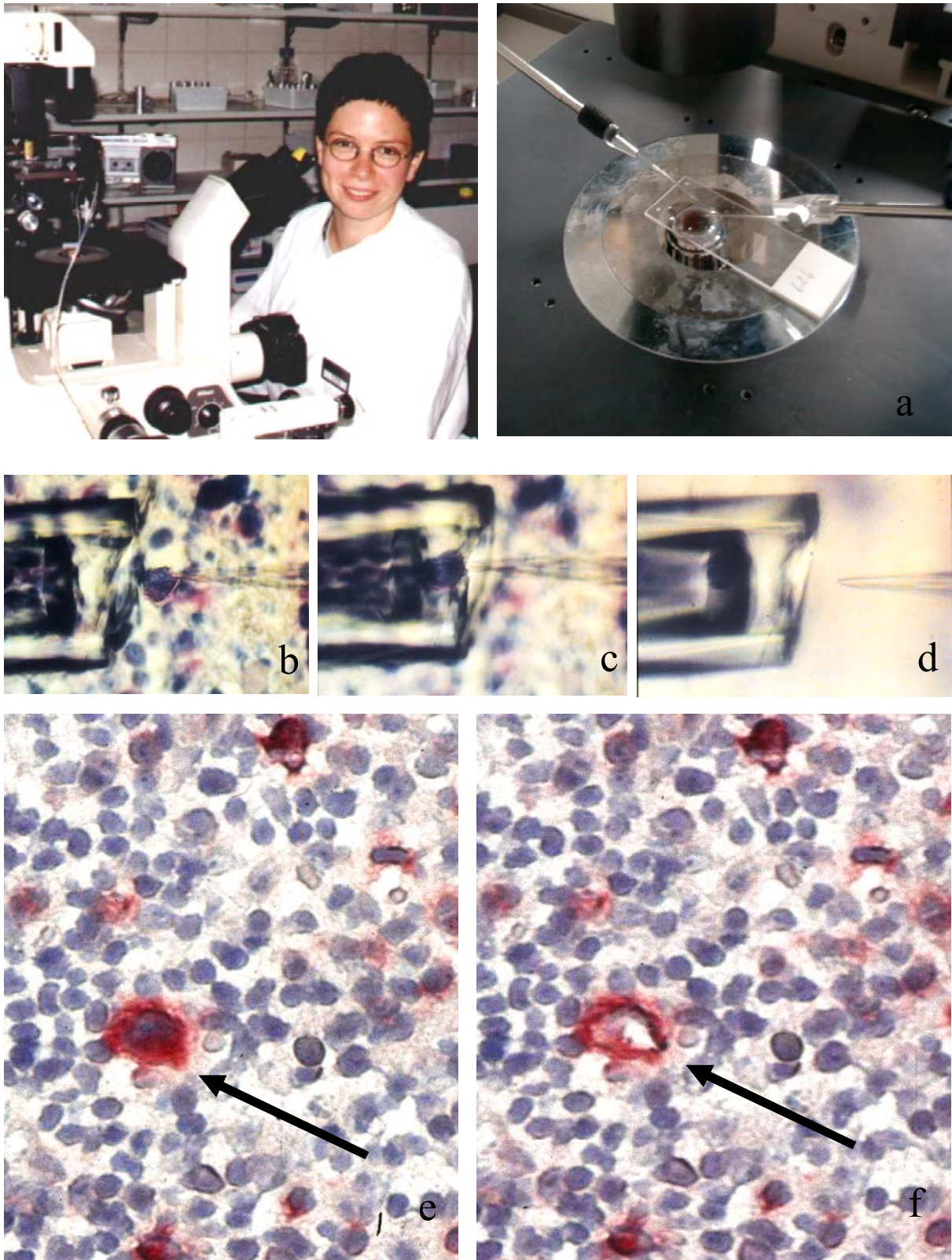


Abbildung 2.2. Pickvorgang

a Elisabeth Hock am Mikromanipulationsgerät mit Objektisch und Kapillaren
 b-d Transfer der Zelle, die auf der spitzen Kapillare aufgespießt ist, in die offene Kapillare
 e-f gepickte Zelle vor (e siehe Pfeil) und nach der Isolierung (f siehe Pfeil)

2.5. Polymerasekettenreaktion

2.5.1. Prinzip

Mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) lassen sich definierte DNA-Abschnitte vervielfältigen. Dazu werden Startermoleküle, Bausteine, aus denen die neue DNA zusammengesetzt werden kann und die Taq-Gold-Polymerase, welche die DNA-Bausteine verbindet, benötigt. Im ersten Schritt ist eine Denaturierung der DNA erforderlich, um sie als Einzelstrang-DNA vorliegen zu haben, damit sich dann im zweiten Schritt die Startermoleküle anlagern können. Im dritten Schritt fügt dann die Taq-Gold-Polymerase aus den DNA-Bausteinen einen zur Ursprungs-DNA komplementären neuen DNA-Strang zusammen. Jeder einzelne Schritt benötigt eine bestimmte Temperatur. Den schnellen Wechsel zwischen den einzelnen Temperaturen gewährleistet ein Thermocycler (siehe Kap.7.1). Es werden mehrere Zyklen von Denaturierung, Startermolekülanlagerung und Neusynthese der DNA hintereinandergeschaltet. Nach jeder neuen Syntheserunde liegt theoretisch die doppelte DNA-Menge vor. Um die Sensitivität zu erhöhen, können zwei Amplifikationsrunden durchgeführt werden. Dabei wird in der zweiten Amplifikationsrunde ein Aliquot aus der ersten Amplifikationsrunde eingesetzt. Um mit der DNA aus der ersten Amplifikationsrunde eine zweite PCR durchzuführen, müssen in der Reamplifikation die Primer jeweils weiter zum 3' Ende im DNA-Fragment liegen. Diese Form der PCR nennt man "*nested PCR*". Aufgrund der hohen Sensitivität dieser PCR lassen sich einzelne Kopien der Zielsequenz nachweisen.

2.5.2. Durchführung

Isolierte Zellen wurden mit 0,1 mg/mL Proteinase K eine Stunde lang bei 50 °C verdaut, die Reaktion wurde durch zehnmütige Denaturierung bei 96 °C gestoppt. Daran schloss sich die PCR des Immunglobulinschwerkettengens (IgH) an. Es wurden bei der Primäramplifikation sechs familienspezifische Framework-1 Primer zusammen mit einem Primer, der für die J-Region spezifisch ist, verwendet (FR1FS/LJH).

Primersequenzen für die Primäramplifikation

FR1FS:

VH1	5´	CCT CAG TGA AGG TYT CCT GCA AGG C	3´
VH2	5´	GTC CTG CGC TGG TGA AAS CCA CAC A	3´
VH3	5´	GGG GTC CCT GAG ACT CTC CTG TGC AG	3´
VH4	5´	GAC CCT GTC CCT CAC CTG CRC TGT C	3´
VH5	5´	AAA AAG CCC GGG GAG TCT CTG ARG A	3´
VH6	5´	ACC TGT GCC ATC TCC GGG GAC AGT G	3´

LJH:

5´ TGA GGA GAC GGT GAC C 3´

Die Cyclerbedingungen der Primäramplifikation waren: 95°C 10 Minuten, 5 x (95°C 25 Sekunden; 63°C 30 Sekunden; 72°C 30 Sekunden; Ramp 45 Sekunden); 35 x (95°C 25 Sekunden; 57°C 30 Sekunden; 72°C 30 Sekunden; Ramp 45 Sekunden).

Für die Reamplifikation stand ein Primersatz von 6 familienspezifischen Framework-2 Primern zusammen mit einem „*nested*“ Primer, der für die J-Region spezifisch war, zur Verfügung (FR2FS/VLJH).

Primer für die Reamplifikation

FR2FS:

FR2 . 1	5´	TGG GTG CGA CAG GCC CCT GG	3´
FR2 . 2	5´	TGG ATC CGT CAG CCC CCA GG	3´
FR2 . 3	5´	TGG GTC CGC CAG GCT CCA GG	3´
FR2 . 4	5´	TGG RTC CGS CAG CCC CCA GG	3´
FR2 . 5	5´	TGG GTG CGC CAG ATG CCC GG	3´
FR2 . 6	5´	TGG ATC AGG CAG TCC CCA TCG	3´

VLJH:

5´ GTG ACC AGG GTN CCT TGG CCC CAG 3´

Für die Reamplifikation wurde ein Aliquot (1%) der Primäramplifikation eingesetzt. Die Cyclerbedingungen der Reamplifikation waren: 95°C 10 Minuten, 40 x (95°C 25 Sekunden; 63°C 30 Sekunden; 72°C 30 Sekunden; Ramp 45 Sekunden).

Reaktionsansatz der PCR für 10 Proben enthielten:

	Primärampifikation 10 fach	Reampifikation 10 fach
H ₂ O	699,5 µl	797,5µl
10x Goldpuffer	100 µl	100µl
Magnesiumchlorid 25 mM	60 µl	60 µl
dNTP	8 µl	8 µl
LJH 100 ng/µl oder VLJH 200 ng/µl	7,5µl	10 µl
FR1 300 ng/µl oder FR2FS 200 ng/µl	10 µl	10 µl
Taq Gold 5 U/µl	5 µl	5 µl
Proteinase K oder H ₂ O	10 µl	
Pro Ansatz DNA	~1µl	1 µl

Die PCR-Produkte wurden auf 6%igen Polyacrylamidgelen getrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt. Banden mit der richtigen Größe wurden mit Microcentrifuge-Filtern (siehe Kap. 7.2.3.) aufgereinigt.

2.6. Sequenzierung

Die isolierten PCR-Produkte wurden direkt ohne Klonierung sequenziert. Die Sequenzreaktion wurde mit einem Kit durchgeführt (Durchführung nach Angaben des Herstellers siehe Kap. 7.2.3.) Die Sequenzierung erfolgte mittels eines automatischen DNA Sequenzierers (ABI 377A) unter getrennter Verwendung der Reampifikationsprimer. Nach der erfolgten Sequenzierung wurde aus beiden Sequenzen (Strang und Gegenstrang) eines Amplifikats eine Konsensussequenz erstellt, die für die weitere Auswertung verwendet wurde. Nur solche Sequenzen, welche die Erstellung einer eindeutigen Konsensussequenz erlaubten, wurden für den Datenvergleich eingesetzt

2.7. Sequenzauswertung

Die erstellten Konsensussequenzen der umgelagerten Immunglobulinschwerkettengene aller isolierten Einzelzellen wurden mit gespeicherten Sequenzen der Datenbanken VBASE

(*catalogue of human V gene segments and alleles*; siehe Kap 7.3.) und der Datensammlung des Pathologischen Instituts der Charité-Universitätsmedizin, CBF (siehe Kap.7.3.) verglichen. Die Datenbank VBASE sammelt und speichert weltweit publizierte IgH-Keimbahnsequenzen. In der Datenbank des pathologischen Instituts der Charité, CBF sind alle in diesem Institut ermittelten IgH-Sequenzen enthalten. Der Vergleich der Sequenzen untereinander sowie mit Sequenzen der eigenen Datenbanken diente dem Ausschluss von Kontaminationen. Durch die Gegenüberstellung der ermittelten Sequenz mit Sequenzen aus oben genannten Datenbanken konnte die umgelagerte VH-Familie und die Kodierungsfähigkeit der Genumlagerung („*frame*“ oder „*frameshift*“, Stopkodons) ermittelt werden. Darüber hinaus ließ sich die Zell-individuelle NDN-Region der Sequenz bestimmen. Des weiteren konnten durch den Vergleich der Sequenz mit der ähnlichsten Keimbahnsequenz die somatischen Mutationen im IgH-Gen ermittelt werden. Abweichungen der IgH-Sequenz der isolierten Zelle vom Keimbahnsegment mit der besten Übereinstimmung zeigten die Mutationen an. Aufgrund der interindividuellen Polymorphismen in den verschiedenen VH-Familien wurden null bis drei Abweichungen der Sequenzen von der Keimbahnkonfiguration mit der besten Übereinstimmung nicht als somatische Mutationen gewertet.

Von der Sequenz jeder Zelle wurde die Mutationsrate errechnet. Bezogen auf die Länge des Immunglobulinschwerkettengens, gemessen in Basenpaaren, wurde der Prozentsatz der Mutationsanzahl ermittelt. Die Länge des Immunglobulinschwerkettengens ist abhängig von dem jeweilig umgelagerten VH-Segment, da diese in ihrer Länge differieren. Aus den Mutationsraten aller Sequenzen wurden verschiedene Mittelwerte gebildet. Zuerst wurden die Mutationsraten aller isolierten Zellen gemittelt. Danach wurden die Mittelwerte aller LMP-1-, EBNA-2-positiven Zellen und doppelmarkierten Zellen getrennt voneinander gebildet. Es wurden diese Berechnungen auch an den vier Fällen getrennt voneinander vorgenommen.

Zur Prüfung der Kodierungsfähigkeit mussten die Sequenzen auf Stopkodons, Deletionen oder Insertionen und auf Leserasterverschiebungen untersucht werden. Das Vorliegen von einem Stopkodon bewirkt bei der Translation der RNA zum Protein einen Abbruch der Proteinsynthese, wodurch die Herstellung eines intakten Antikörpers verhindert wird. Zu Leserasterverschiebungen kommt es, wenn in den NDN-Bereich eine nicht durch drei teilbare Menge an Basenpaaren eingefügt oder deletiert wird. Dadurch kommt es zu Verschiebungen der Basen-Triplets, woraus in den meisten Fällen ein Stopkodon mit nachfolgendem Abbruch der Proteinsynthese resultiert.

Um Aussagen über eine Antigenselektion der IgH-Gene der isolierten B-Zellen treffen zu können, waren weitere Analysen nötig. Unmutierte und damit von den naiven B-Lymphozyten abstammende Zellen wurden hinsichtlich der Antigenselektion als nicht definierbar (nd) klassifiziert. Die mutierten Zellen wurden folgender Prüfung unterworfen. In der CDR2- (*complementarity determining region*) und der FW3-Region (*framework region*) wurde überprüft, ob stattgehabte Mutationen zu Veränderungen der Aminosäuresequenz führten. Mutationen, die die Aminosäuresequenz veränderten, wurden „*replacement*“-Mutationen genannt, Mutationen, die keine Aminosäuresequenzänderung nach sich zogen, wurden „*silent*“-Mutationen genannt. Aus dem Quotienten „*replacement*“ zu „*silent*“-Mutationen ließen sich Aussagen über die Antigenselektion machen. War der Quotient „*replacement/silent*“-Mutationen in der CDR2-Region größer als 2,5 lag Antigenselektion vor, ebenso bei einem Quotienten „*replacement/silent*“ kleiner 1,5 in der FW3-Region.

Alle isolierten, amplifizierten und sequenzierten IgH-Gene wurden auf ihre Übereinstimmung untereinander überprüft. Klonale B-Zellen lassen sich anhand ihrer identischen NDN-Region in den IgH-Genen identifizieren. Auch klonale B-Zellen können in ihren IgH-Genen leicht differieren. Diese Differenzen entstehen durch die im Keimzentrum stattfindende Antigenaffinitätsreifung, bei der Mutationen in die IgH-Gene eingebracht werden. Dies ist Ausdruck einer aktiven Teilnahme an der Keimzentrumsreaktion. In der normalen B-Zellentwicklung "überleben" nur solche B-Zellklone die Keimzentrumsreaktion, die durch die Mutierung eine höhere Affinität erlangt haben, die anderen werden durch Apoptose eliminiert. Um die Situation am Institut für Pathologie der Charité-Universitätsmedizin Berlin Campus Benjamin Franklin in der EBV-infizierten Zellen bezüglich der Teilnahme an der Keimzentrumsreaktion und der Affinitätsreifung zu klären, wurden die isolierten und sequenzierten EBV-infizierten Zellen sämtlich auf Klonalität untersucht. Die in dieser Arbeit sequenzierten IgH-Gene wurden stetig in die Datensammlung des pathologischen Instituts der Charité-Universitätsmedizin Campus Benjamin Franklin übernommen. So konnten durch den Vergleich jeder IgH-Sequenz mit den Sequenzen aus den oben genannten Datenbanken Zellen, die in einem klonalen Zusammenhang zueinander standen, identifiziert werden.