

4. Diskussion

Zahlreiche Tumore (z.B. Burkitt-Lymphom, M. Hodgkin, Lymphoproliferationen bei Immunsupprimierten und Nasopharynxkarzinom) weisen eine EBV-Assoziation auf. Aus diesem Grund wurden ungezählte Untersuchungen durchgeführt, um die Biologie des Virus genauer zu verstehen. Gegenstand der Untersuchungen war unter anderem die Identifikation der Zielzelle, die von EBV primär infiziert wird. Ein geeignetes Modellsystem für die Untersuchung der Primärinfektion ist die Infektiöse Mononukleose, die durch EBV hervorgerufen wird. Lange Zeit bestand die Annahme, EBV infiziere primär Epithelzellen im Oropharynx. Das Konzept beinhaltete die Vorstellung, dass von diesen Zellen ausgehend anschließend B-Lymphozyten infiziert werden. Diese Vorstellungen wurden durch Untersuchungen von Karajannis et al. [51] widerlegt, die zeigen, dass B-Lymphozyten die primäre Zielzelle des EBV darstellen. Von den infizierten B-Zellen erfolgt erst in zweiter Linie eine Infektion epithelialer Zellen. Über diese Erkenntnis hinaus konnte durch weitere Studien das Differenzierungsstadium der Zelle, in der EBV persistiert, charakterisiert werden: EBV persistiert in post-Keimzentrums-Gedächtniszellen ein Leben lang [52-54].

Welches Differenzierungsstadium primär infizierte EBV Zellen aufweisen und welchen Weg EBV wählt, um in den Gedächtniszellpool zu gelangen, ist jedoch unklar. Es existieren derzeit zwei Modelle, um die Entstehung von EBV-positiven Gedächtnis-B-Zellen zu erklären:

1. Direkte EBV-Infektion von sowohl naiven prä-Keimzentrumszellen als auch mutierten (Gedächtnis-) post-Keimzentrumszellen unter Ausschluß der Keimzentrumsreaktion [55].
2. EBV-Infektion von ausschließlich naiven prä-Keimzentrumszellen. Entstehung von mutierten (Gedächtnis-) post-Keimzentrumszellen durch die aktive Teilnahme EBV-infizierter B-Zellen an der Keimzentrumsreaktion [56].

Um zu klären, welches dieser beiden Konzepte die wirklichen Verhältnisse am besten widerspiegelt, wurde diese vorliegende Arbeit initiiert. Hierfür standen Tonsillen von vier Patienten, die an akuter Infektiöser Mononukleose erkrankt waren, zur Verfügung. Aus immungefärbten Gewebeschnitten dieser Tonsillen wurden einzelne EBV-infizierte B-Lymphozyten isoliert. Die umgelagerten Immunglobulingene wurden amplifiziert und sequenziert, um den Differenzierungszustand dieser EBV-infizierten B-Lymphozyten zu bestimmen.

4.1. Isolierung und Amplifikation des Immunglobulinschwerkettengens von Epstein-Barr Virus infizierten Zellen in der Infektiösen Mononukleose

Insgesamt wurden 843 EBV-infizierte Zellen einzeln isoliert. Die IgH-Umlagerungen konnten mit Hilfe einer Einzelkopie PCR aus 175 (~21%) Zellen erfolgreich amplifiziert und sequenziert werden. Die ausbleibende Amplifikation in nahezu 80% der Zellen erklärt sich durch die Verwendung von Gewebeschnitten, die keine vollständigen Zellkerne enthalten, so dass der zu untersuchende DNA-Abschnitt sich in einer anderen Schnittebene befinden kann. Die hier gefundene Amplifikationsrate steht im Einklang mit vorangegangenen Einzelzelluntersuchungen unserer eigenen als auch anderer Arbeitsgruppen [55;57].

4.2. Identifikation von Epstein-Barr Virus positiven Zellklonen

Durch den Vergleich der IgH-Sequenzen der EBV-positiven Zellen untereinander ließen sich neben zahlreichen nicht klonalen individuellen Zellen, EBV-infizierte Zellen mit identischen IgH-Umlagerungen nachweisen. Von den 175 sequenzierten EBV-positiven B-Zellen waren 119 Zellen nicht klonal und zeigten individuelle IgH-Umlagerungen. Die übrigen 56 Zellen (32%) waren in 14 verschiedenen Klonen organisiert, deren Größe von zwei bis 16 Zellen reichte. Die Zellen von elf Klonen waren aus der Interfollikularzone isoliert worden, die Zellen der übrigen drei Klone stammten aus dem Keimzentrum.

Das Auftreten von klonalen EBV-positiven Zellen wurde auch in einer kürzlich von Kurth et al. veröffentlichten Einzelzellstudie an zwei Fällen mit IM beschrieben [55]. Im Gegensatz zu den hier vorgestellten Ergebnissen waren die Klone EBV-positiver Zellen in dieser Studie meist wesentlich umfangreicher (bis zu 45 beteiligte Zellen) und es waren insgesamt mit 179/290 Zellen (62%) fast doppelt so viele EBV-positive Zellen klonal organisiert wie in der hier vorliegenden Untersuchung. Die Unterschiede in der Größe und Anzahl der Klone zwischen den hier beschriebenen Untersuchungen und den Ergebnissen der Studie von Kurth et al. lässt sich möglicherweise mit verschiedenen Erkrankungsstadien der untersuchten Fälle erklären. Bei den von Kurth et al. untersuchten IM Fällen könnte ein späteres Erkrankungsstadium vorgelegen haben, in dem die infizierten B-Zellen bereits stark vermehrt waren und damit zahlreiche große Klone gebildet hatten, während die in dieser Arbeit untersuchten Fälle eher früheren Erkrankungsstadien entsprechen.

4.3. Nachweis somatischer Mutationen

Durch den Sequenzvergleich der umgelagerten IgH-Gene der isolierten EBV-positiven Zellen mit den VH-Keimbahnsegmenten (Datenbank VBASE, siehe Kap. 2.7.) lassen sich die somatischen Mutationen in den IgH-Umlagerungen bestimmen. Von den 175 Sequenzen zeigten 77 (44%) der isolierten Zellen beim Vergleich mit den korrespondierenden VH-Keimbahnsegmenten null bis drei Abweichungen und wurden aufgrund der geringen Anzahl der Abweichungen als unmutiert betrachtet. In den IgH-Umlagerungen von 92 (53%) EBV-positiven Zellen zeigten sich mehr oder weniger starke Abweichungen von den korrespondierenden VH-Keimbahnsegmenten, so dass diese als mutiert angesehen werden können. In den sechs verbleibenden Zellen ließ sich die Zahl der somatischen Mutationen aufgrund von Deletionen/Insertionen und Leserasterverschiebungen nicht exakt bestimmen. Damit zeigt die Analyse der Mutationsraten, dass sowohl naive (unmutierte) B-Zellen als auch (mutierte) post-Keimzentrumszellen EBV infiziert waren.

In der bereits erwähnten Studie von Kurth et al. [55] konnte ebenfalls die Existenz von EBV-infizierten naiven B-Zellen und EBV-infizierten post-Keimzentrumszellen gezeigt werden. Allerdings wiesen deren Untersuchungen eine deutliche Prädominanz EBV-infizierter post-Keimzentrumszellen auf: 252 der untersuchten 290 Zellen waren mutiert (86,9%) und wurden als post-Keimzentrumszellen eingestuft, 38 der 290 (13,1%) EBV-positiven Zellen waren unmutiert und wurden als prä-Keimzentrumszellen interpretiert. Die Unterschiede in den B-Zelldifferenzierungsstufen der EBV-infizierten Zellen in den hier vorliegenden Ergebnissen und den Untersuchungen von Kurth et al. unterstreichen unsere Annahme, dass unsere Fälle von Infektöser Mononukleose frühere Krankheitsstadien darstellen als die Fälle, die in der Studie von Kurth et al. verwendet wurden. Dies erklärt auch das überwiegende Auftreten von EBV-positiven post-Keimzentrumszellen während lediglich eine sehr kleine Anzahl von prä-Keimzentrumszellen in der Studie von Kurth et al. beschrieben wurde. Das Auftreten unterschiedlich großer Klone, sowie das überwiegende Vorhandensein von EBV-infizierten post-Keimzentrumszellen in späten Erkrankungsstadien der IM, führt zur Frage, wie es zur Entstehung EBV-positiver B-Zellen mit somatischen Mutationen (post-Keimzentrumszellen) kommt. Hierfür bieten sich drei Möglichkeiten an:

1. EBV-positive Gedächtniszellen bzw. post-Keimzentrumszellen werden direkt von EBV infiziert,

2. EBV-positive Gedächtniszellen bzw. post-Keimzentrumszellen entstehen durch Differenzierung primär infizierter naiver B-Zellen im Rahmen der Keimzentrumsreaktion.
3. Eine Kombination der direkten Infektion von post-Keimzentrumszellen und die Infektion von naiven B-Zellen mit nachfolgender Differenzierung.

Für die Entstehung von EBV-positiven post-Keimzentrumszellen aus EBV-positiven naiven B-Zellen ist der Nachweis von EBV-positiven Zellen im Keimzentrum eine Voraussetzung. Deshalb wurden die hier untersuchten Tonsillen und der Lymphknoten von Patienten mit Infektiöser Mononukleose sowohl auf RNA-Ebene (EBER in situ-Hybridisierung) als auch auf Protein-Ebene (Immunhistologie zum Nachweis EBV-kodierter Proteine, LMP-1 und EBNA-2) auf EBV-positive Zellen in Keimzentren untersucht. Die Untersuchungen konnten eindeutig belegen, dass EBV-positive Zellen in den Keimzentren in drei der vier untersuchten Tonsillen auftraten. Die Existenz EBV-positiver Zellen im Keimzentrum steht in Einklang mit einer Studie von Foss et al. [58], die in Tonsillen brasilianischer Kinder ebenfalls Keimzentren mit EBV-positiven Zellen nachwies. Diese Beobachtungen deuten daraufhin, dass EBV-infizierte (naive) B-Zellen an der Keimzentrumsreaktion teilnehmen und damit für die Entstehung EBV-positiver post-Keimzentrumszellen (mit-)verantwortlich sind. Im Rahmen der hier angestellten Untersuchungen wurde diese Annahme durch die Isolierung und den Nachweis klonal verwandter EBV-positiver Zellen aus den Keimzentren bewiesen. 22 der 32 isolierten EBV-positiven Keimzentrumszellen bildeten drei Klone, die aus zwei, sieben und 16 Zellen bestanden. Von den 32 Keimzentrumszellen trugen 18 Zellen unmutierte IgH-Umlagerungen. Zwölf Keimzentrumszellen waren mutiert. Die Mutationsanzahl der verbleibenden beiden Keimzentrumszellen war aufgrund von Deletionen und Insertionen von 31 Basenpaaren nicht bestimmbar. Unter den zwölf mutierten Keimzentrumszellen befanden sich zehn Zellen, die zwischen einer und drei Mutationen in ihren IgH-Umlagerungen trugen. Wie unter Kapitel 2.7. beschrieben wurden normalerweise Zellen mit null bis drei Basenabweichung von der Keimbahnsequenz aufgrund des interindividuellen Polymorphismus in den einzelnen VH-Familien als unmutierte Zellen eingestuft. Zehn dieser Keimzentrumszellen mit null bis drei Abweichungen von der Keimbahnsequenz gehörten jedoch zu einem der Klone. Das Vorliegen eines Polymorphismus erscheint bei diesen klonalen Zellen ausgeschlossen, da die einzelnen Abweichungen in den IgH-Genen von dem Keimbahnsegment mehrfach durch die anderen zu dem selben Klon gehörenden Zellen bestätigt wurden. Von daher konnte bei diesen klonalen Zellen auch bei nur einer bis drei

Abweichungen der IgH-Sequenz von dem Keimsegment von einer echten somatischen Mutation ausgegangen werden.

In zwei der drei Klone konnte die aktive Teilnahme an der Keimzentrumsreaktion bewiesen werden, da diese eine intraklonale Diversität in den somatischen IgH-Mutationen aufwiesen, die charakteristisch für Keimzentrums-B-Zellen sind. Dass diese Keimzentrums-B-Zellen darüber hinaus zum Pool EBV-positiver post-Keimzentrums-Gedächtnis-B-Zellen beitragen, konnte durch das Auffinden von Zellen mit gleicher IgH-Umlagerung in der Mantelzone, welche Keimzentrumszellen durchwandern, um das Keimzentrum als post-Keimzentrumszellen zu verlassen, eindeutig belegt werden.

Diese Ergebnisse zeigen, dass sich die EBV-positiven Gedächtniszellen ganz (oder teilweise) aus EBV-positiven naiven prä-Keimzentrums-B-Zellen rekrutieren. Den hier vorliegenden Daten zufolge findet eine ausschließliche Rekrutierung EBV-positiver Gedächtniszellen durch direkte EBV-Infektion dieser Zellen, wie in der Studie von Kurth et al postuliert, nicht statt. Es kann aber nicht völlig ausgeschlossen werden, dass zusätzlich zu der Entstehung EBV-positiver Gedächtniszellen aus der Differenzierung infizierter naiver B-Zellen auch ein Teil der EBV-positiven Gedächtniszellen durch direkte EBV-Infektion entsteht. Allerdings ist zu vermuten, dass die EBV-positiven Gedächtniszellen zum überwiegenden Teil durch die Keimzentrumsreaktion aus naiven B-Zellen hervorgehen. Hierfür spricht die Tatsache, dass mit zunehmendem Krankheitsverlauf die post-Keimzentrumszellen (Gedächtniszellen) überwiegen, während in früheren Krankheitsstadien der Anteil erheblich geringer ist. Eine Projektion dieser Entwicklung auf sehr frühe praktisch nicht zu untersuchende Krankheitsstadien legt die Vermutung nahe, dass zu Beginn der EBV-Infektion überwiegend oder ausschließlich EBV-positiv naive B-Zellen vorliegen. Dementsprechend könnten die Ursachen für das Fehlen EBV-positiver Keimzentrumszellen in der Studie von Kurth et al. in dem zugrundeliegendem Krankheitsstadium der untersuchten Fälle zu finden sein. In einem späteren Krankheitsstadium, wie wir es für die von Kurth et al. untersuchten Fälle annehmen, sind EBV-positiv Keimzentrumszellen nicht oder nur noch selten zu beobachten, da die Generierung der EBV-positiven Gedächtniszellen aus Keimzentrumszellen schon weitgehend abgeschlossen ist. Dies würde die deutliche Dominanz EBV-positiver post-Keimzentrumszellen gegenüber EBV-positiven prä-Keimzentrumszellen in den von Kurth et al. untersuchten Fällen erklären. Im Gegensatz hierzu zeigen, die in dieser Arbeit untersuchten Fälle ein ausgewogenes Verhältnis von EBV-positiven prä- und post-Keimzentrumszellen, sowie EBV-positiven Keimzentrumszellen, so dass unsere IM Fälle einem früheren

Krankheitsstadium zu entsprechen scheinen, in der die Generierung von post-Keimzentrumszellen aus naiven B-Zellen noch nicht abgeschlossen ist.

Unsere Annahme basierend auf den hier dargestellten Untersuchungen, dass EBV-positive Gedächtniszellen nicht oder nicht nur durch direkte EBV-Infektion dieser Zellen entstehen, wird auch durch Untersuchungen von Babcock et al. untermauert. Eine Studie dieser Arbeitsgruppe konnte nachweisen, dass sowohl naive B-Zellen (IgM-positiv/IgD-positiv) als auch Keimzentrums- oder post-Keimzentrumszellen (IgM-positiv/IgD-negativ) EBV-infiziert waren [53]. In weiteren, erst kürzlich veröffentlichten Daten stellten sie die Ergebnisse von Untersuchungen an sortierten latent infizierten B-Lymphozyten aus acht Tonsillen mittels rTPCR (siehe Kap.7.3) auf ihr EBV-Protein-Expressionsprofil vor [56]. Um zu prüfen, ob naive B-Zellen (IgD-positiv), Keimzentrumszellen (IgD-negativ/CD10-positiv) und Gedächtniszellen (IgD-negativ/CD10-negativ) EBV-infiziert sind, separierten Babcock et al. die drei Zellpopulationen anhand der Expression von IgD in Verbindung mit dem keimzentrumscharakteristischen Oberflächenmolekül CD10 [59]. Die Frequenz der EBV-Infektion in diesen Zellpopulationen wurde mit Hilfe einer EBV-DNA PCR welche in der Lage ist, eine EBV-Kopie nachzuweisen, bestimmt. In allen drei Zellpopulationen (IgD-positive naive B-Zellen; IgD-negativ/CD10-positive Keimzentrumszellen und IgD-negativ/CD10-negativ Gedächtniszellen) fanden sich EBV-infizierte Zellen. Die verschiedenen Zellpopulationen wurden mittels reverser Transkriptase-PCR auf die Expression folgender EBV-kodierter Gene untersucht: EBNA-2 (Marker *Growth Programm*), EBNA-1 (als Marker für eingeschränkten Latenzzustand) sowie LMP-1 und LMP-2. In den unterschiedlichen Zellpopulationen (naive B-Zellen, Keimzentrumszellen und Gedächtniszellen) fand sich die RNA von verschiedenen EBV-kodierten Proteinen exprimiert. Die Verteilung der Expression auf die Zellpopulationen kann der Tabelle 4.1. entnommen werden. Ein Unterschied zwischen Keimzentrumszellen und Gedächtniszellen konnte nicht gefunden werden.

Tabelle 4.1.: Expressierung der latenten EBV Gene in naiven-, Keimzentrums- und Gedächtniszellen in der asymptomatischen Infektion nach Babcock

Zellpopulation	EBNA-1	EBNA-2	LMP-1	LMP-2
Naive B-Zellen (IgD positiv)	negativ	positiv	positiv	positiv
Keimzentrumszellen (IgD negativ, CD10 positiv)	positiv	negativ	positiv	positiv
Gedächtniszellen (IgD negativ, CD10 negativ)	positiv	negativ	positiv	positiv

Babcock et al. demonstrierten damit, dass in der asymptomatischen EBV-Infektion die viralen Genexpressionsmuster abhängig von der Differenzierungsstufe der infizierten Zelle variieren. Ihre Untersuchungen zeigten, dass ausschließlich in naiven B-Zellen das EBNA-2 abhängige Wachstumsprogramm exprimiert wird. Daraus leiteten sie ab, dass ausschließlich naive B-Zellen mit dem Virus primär infiziert werden. Das EBNA-2 Wachstumsprogramm sei notwendig, um die primär infizierten naiven B-Zellen zu aktivieren, um deren Differenzierung zu Gedächtniszellen zu ermöglichen.

In den Ergebnissen, die im Rahmen dieser Arbeit durch die Untersuchung von Gewebeproben erhoben wurden, ließ sich die Beobachtung, dass EBNA-2 ausschließlich in naiven Zellen der IM zu finden sei, nicht bestätigen. Demnach hätten die IgH-Gene der hier untersuchten EBNA-2-positiven Zellen unmutiert sein müssen. Sie waren aber häufiger mutiert als unmutiert (44,6% [25 von 56] der EBNA-2-positiven Zellen waren unmutiert, 53,6% [30 von 56] der Zellen trugen mehr als vier Mutationen in den IgH-Genen). Es gab darüber hinaus keine signifikanten Unterschiede in den Mutationsraten der LMP-1- und EBNA-2-positiven Zellen. Eine mögliche Erklärung für die nicht vorhandenen Unterschiede in den Mutationsraten der LMP-1- und EBNA-2-positiven Zellen, könnte eine parallele Doppelexpression von EBNA-2 in LMP-1-positiven Zellen sein. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Doppelmarkierungen zeigten jedoch, dass der Anteil der Zellen, die beide Proteine parallel exprimierten, allenfalls 5% betrug. Es lässt sich also anhand der vorliegenden Daten die Expressierung von EBNA-2 ausschließlich in naiven B-Zellen nicht bestätigen. Übereinstimmend mit den hier vorgelegten Daten folgerten Babcock et al. aus ihren Untersuchungen ebenfalls, dass infizierte Gedächtniszellen aus der Rekrutierung von infizierten naiven B-Zellen entstehen .

Die Unterschiede zwischen den hier vorgelegten Untersuchungen an der IM und dem Konzept von Babcock et al. aus Untersuchungen an der asymptomatischen Infektion, lassen allerdings Zweifel an der verbreiteten Vorstellung aufkommen, dass die asymptomatische Infektion mit EBV den gleichen pathogenetischen Mechanismen unterliegt wie die IM. Zur Klärung dieser Frage müssen allerdings weitere Untersuchungen durchgeführt werden, das vermag diese Arbeit nicht zu klären.

4.4. Analyse der somatischen Mutationen und der Antigenselektion:

Im Keimzentrum finden in den umgelagerten Immunglobulinen somatische Hypermutationen statt, um die Affinität des Immunglobulinmoleküls gegenüber dem Antigen zu erhöhen. Zellen mit gesteigerter Affinität werden in der Keimzentrumsreaktion positiv selektiert; Zellen, die nicht funktionale IgH-Umlagerungen tragen und solche, deren Affinität gering ist, werden durch Apoptose eliminiert. In den hier vorgestellten Untersuchungen konnte jedoch gezeigt werden, dass EBV-infizierte Zellen trotz geringer Antigenaffinität oder des Verlustes der Kodierungsfähigkeit die Selektion innerhalb des Keimzentrums überleben können. Dabei ließen sich zwei Zellgruppen unterscheiden:

Zum einen EBV-infizierte Zellen mit **nicht funktionalen** IgH-Umlagerungen und zum anderen EBV-positive Zellen mit funktionalen IgH-Umlagerungen, die mutiert aber **nicht** antigenselektiert waren. Da die Identifikation der EBV-infizierten Zellen über den Nachweis von LMP-1 und/oder EBNA-2 erfolgte, konnten auch innerhalb der beiden erwähnten Zellgruppen, jeweils LMP-1-positive bzw. EBNA-2-positive Zellen unterschieden werden. Bei dem Vergleich der LMP-1- und EBNA-2-positiven Zellen fiel auf, dass LMP-1-positive Zellen deutlich häufiger (27 von 110, ~25%) nicht funktionale IgH-Umlagerungen aufwiesen, als EBNA-2-positive Zellen (4 von 56, ~7%). Als Erklärung für das Vorliegen von nicht funktionalen LMP-1- und EBNA-2-positiven Zellen kommt eine biallelische Umlagerung in Betracht. In Zellen mit einer funktionslosen IgH-Umlagerung findet im Knochenmark eine weitere Umlagerung des in jeder Zelle vorhandenen zweiten IgH-Gens statt (biallelische Umlagerung). Wie hier dargestellt wiesen zahlreiche EBV-infizierte Zellen nicht funktional umgelagerte IgH-Gene auf, die zusätzlich zu dem nicht funktional umgelagerten IgH-Gen das zweite Allel funktional umgelagert haben könnten. Das zweite umgelagerte IgH-Gen könnte sich aber im Rahmen der Mikromanipulation dem Nachweis entzogen haben, da es sich in einer anderen Schnittebene befunden haben könnte. Die biallelische Umlagerung kann zwar das Vorliegen von nicht funktional umgelagerten B-Zellen erklären, sie vermag

allerdings nicht zu veranschaulichen, warum die LMP-1-positiven Zellen (25% der LMP-1-positiven Zellen) deutlich häufiger nicht funktionale IgH-Umlagerungen aufwiesen als EBNA-2-positive Zellen (7% der EBNA-2-positiven Zellen). Diese Beobachtung legt nahe, dass die LMP-1-Expression eine Rolle im Überleben der nicht funktionalen infizierten B-Zellen spielen könnte. Demzufolge könnte LMP-1 als Signaltransduktor [60], der die Zelle im Keimzentrum vor Apoptose schützt fungieren. LMP-1 ist als virales Pendant der Tumornekrosefaktorrezeptoren (TNF) der menschlichen Zellen in der Zellmembran als Rezeptor verankert. An seinen zytoplasmatischen Anteil binden intrazelluläre Proteine, namentlich TRAFs (*TNF-receptor-associated factors*). Die TRAFs aktivieren den nukleären Transkriptionsfaktor κ B (NF- κ B), über den eine Zellproliferation vermittelt wird. Zelluläre Mitglieder der TNF-Rezeptor Familie, wie CD30 und CD40 sind wichtige Mediatoren des lymphozytären Wachstums und der Aktivierung. [24-28;30]. LMP-1 könnte zusammen unter Ausnutzung vorhandener Mechanismen das CD40 Molekül, dessen Signal für das Überleben einer B-Zelle essenziell ist, imitieren. Ähnliches postulierten Babcock et al. basierend auf den oben erwähnten Untersuchungen an der asymptomatischen Infektion. Das EBNA-2 "*Growth Programm*" hielten sie für den "Antrieb", der die infizierten Zellen zur Proliferation und Differenzierung bringt. Die EBNA-1-Expression sei notwendig zur Retention des viralen Genoms in latent infizierten Zellen, das in der normalen B-Zelldifferenzierung notwendige T-Helfer-Zellen-Signal werde durch LMP-1 ersetzt und das erforderliche Antigenrezeptorsignal werde durch LMP-2 ersetzt. Die Expression der unterschiedlichen viralen Gene abhängig von der Differenzierungsstufe der infizierten Zelle sei also ein ausgefeiltes Programm des Virus, die infizierte naive B-Zelle zur Differenzierung zu bringen, damit das Virus in den Gedächtniszellpool gelangt, in dem es lebenslang persistieren kann.

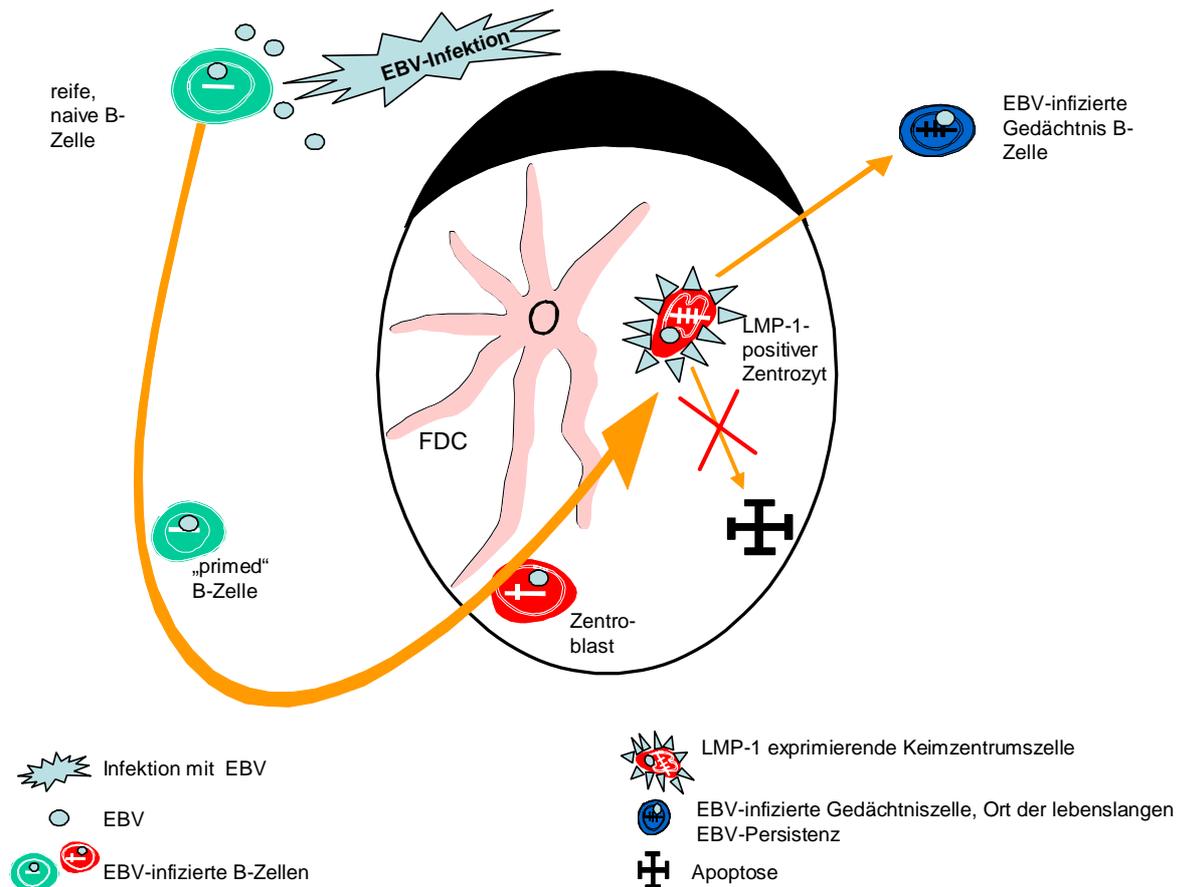


Abbildung 4.1. Modell für die EBV-Infektion von naiven B-Zellen und deren Differenzierung in Gedächtniszellen

Dargestellt ist die im Text erläuterte Differenzierung von naiven infizierten B-Zellen zu Gedächtniszellen durch die Teilnahme an der Keimzentrumsreaktion. Die nicht stattfindende Apoptose von EBV-infizierten nicht funktionalen oder antigenselektierten Zellen ist durch das durchgestrichene Kreuz symbolisiert. Die EBV-infizierte funktionale Gedächtnis-Marginalzonen-Zelle stellt den Ort der lebenslangen Persistenz dar.

In dieses Konzept lässt sich auch folgende Zellgruppe aus dieser Arbeit einbeziehen: 40 funktionale B-Zellen mit mutierten IgH-Umlagerungen aber **ohne** Anzeichen von einer Antigenselektion ließen sich in den hier dargestellten Untersuchungen identifizieren. Bei der getrennten Betrachtung der LMP-1-positiven bzw. EBNA-2-positiven Zellen zeigten LMP-1-positiv Zellen deutlich seltener Antigenselektion (in 20% der Fälle) als EBNA-2-positiv Zellen (34% der EBNA-2-positiven Zellen).

Aus diesen Beobachtungen lässt sich schließen, dass EBV-infizierte Zellen die Selektion trotz Verlust der Kodierungsfähigkeit oder nicht vorhandener Affinitätsreifung überleben. Die Expression der latenten EBV-kodierten Gene (z.B. LMP-1) könnte das Überleben der infizierten Zelle in der IM sichern. So ist anscheinend die EBV Infektion ein protektiver Faktor für die infizierten Zellen vor drohender Apoptose.

Unlängst berichtete die Arbeitsgruppe Küppers [61] über ähnliche Zellpopulationen. Sie fanden in Gewebeschnitten von Fällen mit einer Angioimmunoblastischen Lymphadenopathie mit Dysproteinämia (AILD) sowohl EBV-positive Einzelzellen als auch expandierende EBV-infizierte B-Zellklone. Sie isolierten die EBV-infizierten B-Zellen einzeln und untersuchten deren IgH-Genumlagerungen. Während EBV-negative B-Zellklone eine geringere Tendenz zur somatischen Hypermutation zeigten, formierten sich EBV-positive Zellen zu großen Klonen, deren Zellen somatische Hypermutationen trugen. Sie wiesen überdies einen EBV-infizierten B-Zellklon nach, dessen Zellen intraklonale Diversität aufwiesen. Innerhalb dieses B-Zell-Klons ließen sich Zellen mit funktionalen IgH-Umlagerungen nachweisen, aber auch Zellen, die im Rahmen der somatischen Hypermutation die vorher vorhandene Funktionalität der IgH-Gen-Umlagerung der Vorläuferzelle verloren hatten. Zudem ließen sich mutierte nicht antigenselektierte EBV-infizierte B-Zellen nachweisen. Diese Beobachtungen passen ebenfalls, wie die hier in dieser Arbeit gefundenen nicht funktionalen und nicht antigenselektierten Zellen, in das oben diskutierte Konzept, wonach die EBV Infektion eine B-Zelle, mit Verlust der Funktionalität des IgH-Gens oder nicht vorhandener Antigenselektion, diese vor der drohenden Apoptose schützt.

4.5. Konklusion der hier angestellten Untersuchungen:

Zur Klärung der Ausgangsfragen, welches Differenzierungsstadium die B-Lymphozyten aufweisen, wenn sie von EBV primär infiziert werden und welche Strategie das EBV wählt, um in den Gedächtniszellpool zu gelangen, wurde diese Arbeit initiiert. Diese Arbeit konnte nachweisen, dass EBV naive B-Zellen infiziert, die dann an der Keimzentrumsreaktion teilnehmen, aus der sie als infizierte Gedächtniszelle hervorgehen. Es ist aber nicht auszuschließen, dass zusätzlich auch noch die direkte Infektion von Gedächtniszellen durch EBV eine Rolle spielt.

Folgendes Modell lässt sich aus den hier angestellten Untersuchungen postulieren:

EBV infiziert initial naive B-Zellen. Diese differenzieren über die aktive Teilnahme an der Keimzentrumsreaktion zu Gedächtnis-B-Zellen. Infizierte B-Lymphozyten mit unfunktionalen oder nicht antigenselektierten IgH-Umlagerungen können die drohende Apoptose durch die Expression der viralen latenten Gene (z.B. LMP-1) überleben. Die aus der Keimzentrumsreaktion hervorgegangenen EBV-infizierten Gedächtnis-B-Zellen stellen den Ort der lebenslangen Persistenz dar.