

4 Ergebnisse

4.1 Infektionsfähigkeit retroviraler Zellkulturüberstände

Um die Expression von LMP2A in fötalen hämatopoietischen Stammzellen zu erreichen, wurden diese mit einem LMP2A- und eGFP-kodierenden Retrovirus infiziert. Die Produktion des Retrovirus fand in der Verpackungszelllinie Phoenix-GP statt. Dazu war es erforderlich, die Zellen mit Hilfe der Kalzium-Phosphat Methode mit dem LMP2A und eGFP kodierenden retroviralen Plasmid zu transfizieren. Die Phoenix-GP Zellen integrierten das virale Genom und waren so in der Lage, die Retroviren an den Zellkulturüberstand abzugeben. Um die Infektionsfähigkeit der produzierten Viren nachzuweisen, infizierten wir NIH3T3 Zellen mit den retroviralen Überständen der Phoenix-GP Zellen. Die grüne Fluoreszenz der NIH3T3 Zellen war Indikator für deren Infektion durch das Retrovirus und gleichzeitig indirekt für die Expression von LMP2A. Außerdem konnte über die Menge an infizierten NIH3T3 Zellen auf die Menge an infektiösen Viren im retroviralen Überstand geschlossen werden. Zur Quantifizierung der grün fluoreszierenden Zellen wurden die Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Abbildung 11 belegt die Infektionsfähigkeit der mit Hilfe der Phoenix-GP Zellen produzierten Viren anhand der dargestellten Fluoreszenz.

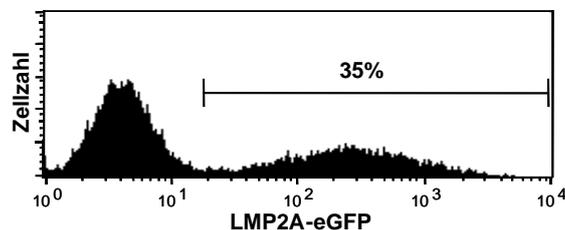


Abb. 11: Histogramm-Darstellung der grünen Fluoreszenz mit dem LMP2A-Retrovirus infizierter NIH3T3 Zellen

Werden 10 μ l des retroviralen Überstands auf 1×10^5 NIH3T3 Zellen gegeben und über 48 h inkubiert, so fluoreszieren nach 48 h 35 % der Zellen grün. Daraus ergibt sich ein Titer von $3,5 \times 10^6$ (vgl. Kapitel 3.1.5). Das heißt, dass sich in 1 ml des viralen Überstandes $3,5 \times 10^6$ infektiöse Viren befinden.

4.2 Bildung hämatopoietischer Zellen in transplantierten Rezipienten

Die in ihrer Konzentration quantifizierten retroviralen Überstände konnten zur Infektion der fötalen hämatopoietischen Zellen eingesetzt werden. Um gleiche Voraussetzungen für alle infizierten Zellen zu schaffen, wurden alle Zellen mit der gleichen Menge an Viren infiziert. Die Zellen wurden dafür mit einer *multiplicity of*

infection (MOI) von 3-4 infiziert. Die Infektionsdosis lag somit bei 3-4 infektiösen Viren pro Zelle. Die so infizierten Zellen konnten in B-Zell-defiziente Empfängermause (IgH $-/-$, (Kitamura et al. 1991; Kitamura und Rajewsky 1992)) transplantiert werden. Dieser Empfängermausstamm zeichnet sich durch eine fehlende B-Zell-Entwicklung aufgrund eines genetischen Defektes in der Ausbildung der Immunglobulin-Schwerkettengene aus. Abbildung 12 zeigt die ursprüngliche B-Zell-Defizienz der Empfängermause vor der Transplantation anhand einer durchflusszytometrischen Punktdiagramm Darstellung.

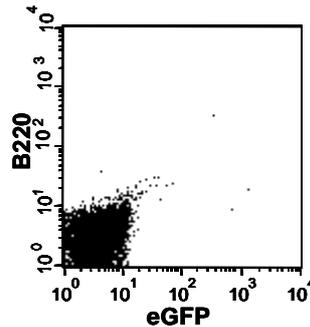


Abb. 12: B-Zell-Defizienz des IgH $-/-$ Empfängermausstamms

Punktdiagramm Darstellung der durchflusszytometrischen Analyse des peripheren Blutes einer nicht transplantierten IgH $-/-$ Maus. Die Zellen wurden mit dem pan-B-Zell-Marker B220 gefärbt. Im peripheren Blut gab es keine B220-positiven Zellen. Außerdem waren vor der Transplantation keine grün fluoreszierenden Zellen vorhanden.

Erste Analysen 5 Wochen nach der Transplantation zeigten eine erfolgreiche Rekonstitution der hämatopoietischen Stammzellen bzw. die Entwicklung aller hämatopoietischen Linien im peripheren Blut. Um diese darzustellen, erfolgte eine Färbung des peripheren Blutes mit zellspezifischen, fluoreszenzmarkierten Antikörpern (in Abbildung 13 B-D abgebildet sind der pan-B-Zell-Marker B220, der T-Zell-Marker CD90 und der Granulozyten-Marker Gr1). Abbildung 13 zeigt verschiedene hämatopoietische Zelltypen im peripheren Blut der transplantierten Mäuse. Dabei ist zu beachten, dass sich sowohl LMP2A-eGFP-positive als auch -negative Zellen entwickelten. Das ist darauf zurückzuführen, dass nicht alle hämatopoietischen Stammzellen durch das LMP2A-Retrovirus infiziert wurden und dass hämatopoietische Zellen, die die Bestrahlung überlebt haben, proliferierten. Die vorhandene bzw. nicht vorhandene Fluoreszenz ermöglichte die separate Auswertung der Eigenschaften LMP2A-exprimierender und nicht exprimierender Zellpopulationen.

Da tote Zellen unspezifisch gefärbt sein können und stark fluoreszieren, wurden diese zu Beginn durch Definition eines Rahmens, in dem sich nur vitale Zellen befanden (schwarzer Rahmen in Abbildung 13 A), aus jeder weiteren Analyse

eliminiert. In alle Auswertungen wurden nur die Zellen innerhalb des Rahmens einbezogen. Der Zelldebris entstand durch die vorhergehende Lyse der Erythrozyten und durch Zerstörung der Zellen während der Aufbereitung.

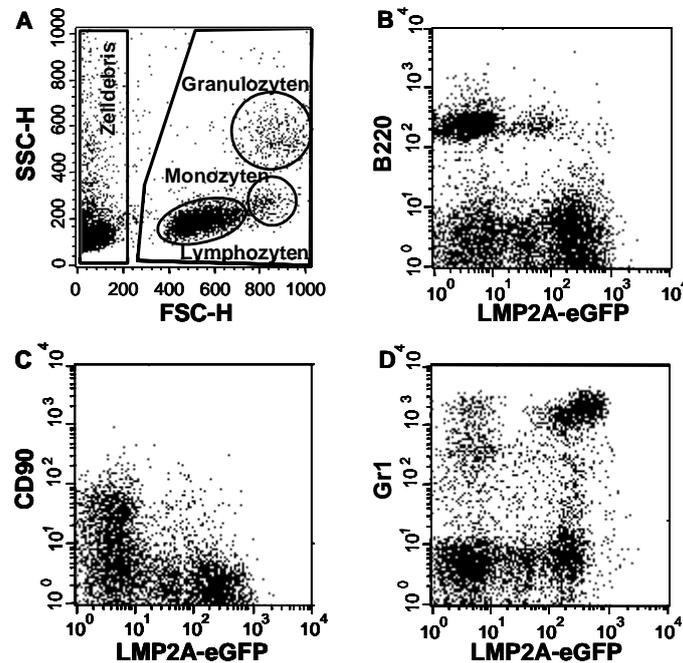


Abb. 13: Entwicklung verschiedener hämatopoietischer Zellen im peripheren Blut

Darstellung der Rekonstitution hämatopoietischer Zellen im peripheren Blut nach Transplantation am Beispiel einer $+/+I\kappa B\alpha/LMP2A$ Chimäre.

(A) Das Durchflusszytometer erkennt Zellen anhand ihrer Größe (FSC) und Granularität (SSC). Das hier gezeigte Punkt Diagramm stellt die unterschiedlichen Populationen hämatopoietischer Zellen 5 Wochen nach Transplantation anhand des Vorwärts- (FSC-H)- Seitwärtsdurchlicht (SSC-H)-Bildes dar. Die Zellen innerhalb des schwarzen Rahmens (hämatopoietische Zellen ohne Zelldebris) dienen als Grundlage für die weiteren Auswertungen.

(B,C,D) Punktdiagramm-Darstellung verschiedener hämatopoietischer Zellpopulationen (dargestellt sind der pan-B-Zell-Marker B220 (B), der T-Zell-Marker CD90 (C) und der Granulozyten-Marker Gr1 (D))

(B) In den ursprünglich B-Zell-defizienten Empfängermäusen hatten sich nach der Transplantation B-Zellen entwickelt, die sowohl LMP2A-eGFP-negativ als auch LMP2A-eGFP-positiv waren.

(C, D) Die exprimierten T-Zellen und Granulozyten in transplantierten Mäusen waren sowohl LMP2A-eGFP-negativ als auch -positiv.

Nicht nur im peripheren Blut, sondern auch in Knochenmark und Milz konnten LMP2A-eGFP-positiv und -negativ hämatopoietische Zellen nachgewiesen werden. Diese konnten durch eine erfolgreiche Einnistung der transplantierten hämatopoietischen Stammzellen im Knochenmark bis zu 18 Monaten (Zeitpunkt des

Todes der ältesten Mäuse) bestehen. Abbildung 14 zeigt die Entwicklung hämatopoietischer Zellen in Milz und Knochenmark am Beispiel von B-Zellen.

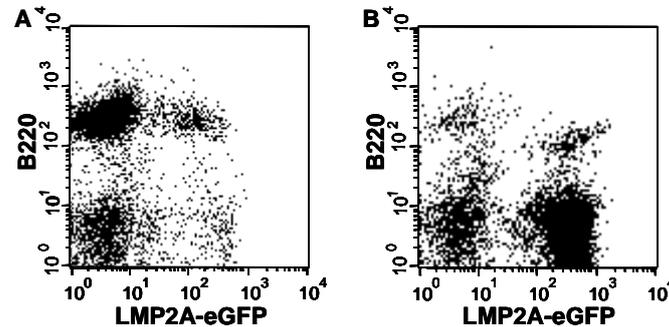


Abb. 14: Entwicklung von B-Zellen in Milz und Knochenmark transplantierter Mäuse

Transplantierte Empfängermause (hier ist beispielhaft eine $+/\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ /LMP2A Chimäre dargestellt) entwickeln LMP2A-eGFP-negative und -positive B-Zellen in Milz (**A**) und Knochenmark (**B**).

Die in den Abbildungen 13 und 14 gezeigten Zellpopulationen belegen die Fähigkeit der retroviral infizierten hämatopoietischen Stammzellen von $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -Wildtyp- Donoren im Knochenmark einzunisten, zu differenzieren und in der Peripherie zu zirkulieren. In Mäusen, die mit Zellen von $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -defizienten Donoren transplantiert wurden, findet ebenfalls eine Rekonstitution statt (nicht dargestellt). Die Unterscheidung von LMP2A-exprimierenden und nicht exprimierenden Zellen ist dabei aufgrund der eGFP-Fluoreszenz möglich.

Da bei der subletalen Bestrahlung der Rezipienten zwar die Hämatopoese im Knochenmark reprimiert wird, eine vollständige Zerstörung aller hämatopoietischer Stammzellen aber nicht gewährleistet werden kann, stammen die hämatopoietischen Zellen der transplantierten Mäuse sowohl von eigenen als auch von Stammzellen der Spendermäuse. Der unterschiedliche genetische Hintergrund der Spender und Empfänger ermöglichte es, beide Populationen anhand eines Oberflächenmarkers zu unterscheiden: Die Zellen der Empfängermause exprimieren den Oberflächenmarker CD45.1 (Ly5.1), Zellen der Spendermause den Oberflächenmarker CD45.2 (Ly5.2). Es handelt sich um einen genetischen Polymorphismus, der durch einen genetischen Locus kontrolliert wird. Das Oberflächenantigen Ly5.1 wird dabei kontrolliert vom Allel $\text{Ly}5^a$, Ly5.2 vom Allel $\text{Ly}5^b$. Die Nomenklatur ordnet dem Mausstamm C57Bl/6 immer das mit „b“ benannte Allel und die „2“ Spezifität zu (Morse et al. 1987). In Abbildung 15 wird der Chimärismus hinsichtlich der T-Zell Bildung anhand durchflusszytometrischer Analysen des Blutes mit dem pan-T-Zell Marker CD90 und dem Empfänger-Marker CD45.1 dargestellt.

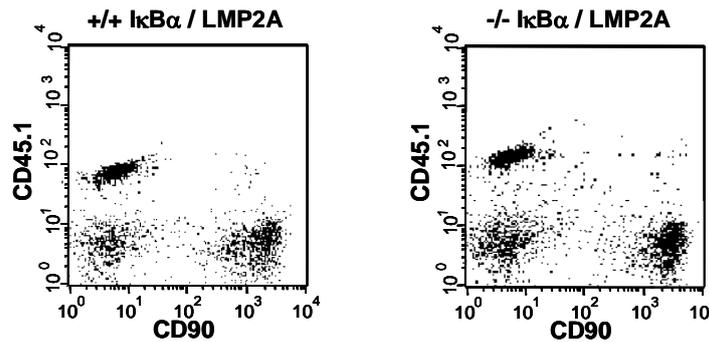


Abb. 15: Chimärismus der transplantierten Mäuse (Blut)

Sowohl in IκBα-Wildtyp (linkes Diagramm) als auch in IκBα-defizienten Rezipienten (rechtes Diagramm) entwickelten sich Zellen aus spender- und empfängereigenen hämatopoietischen Stammzellen. Die Zellen aus empfängereigenen Stammzellen sind positiv für den Marker CD45.1. Die Zellen aus spendereigenen Stammzellen exprimieren diesen Marker nicht. CD90 und CD45.1 doppelt positive Zellen entsprechen T-Zellen, die aus empfängereigenen Stammzellen gebildet wurden. CD90-positive und CD45.1-negative Zellen sind spendereigene T-Zellen.

4.3 Expression von LMP2A und erhöhte DNA-Bindungsaktivität des Transkriptionsfaktors NF-κB

Die Infektion der hämatopoietischen Stammzellen der Spendermäuse mit einem LMP2A kodierenden Retrovirus führte zum stabilen Einbau der genetischen Information in das Genom dieser Zellen. Im Folgenden soll die Expression von LMP2A belegt werden. Abbildung 16 zeigt die Transkription und Translation von LMP2A in den B-Zellen der transplantierten Mäuse anhand von RT-PCR und Western-Blot Analysen. B-Zellen aus der Milz wurden 3 bzw. 6 Monate nach Transplantation separiert, die RNA bzw. die Proteine extrahiert und in RT-PCR und Western-Blot Analysen eingesetzt. Da innerhalb des retroviralen Vektors an LMP2A Histamine angehängt sind (LMP2A-*His-tagged*), ist das in den Milz B-Zellen exprimierte LMP2A im Western Blot größer als das der Positivkontrolle B95-8 (eine LMP2A-exprimierende, Epstein-Barr Virus produzierende Marmoset-Affen Lymphozyten Zelllinie). Die Histamine sind eine weitere Möglichkeit der Detektion des Proteins mit Hilfe eines gegen Histamin gerichteten Antikörpers. In nicht transplantierten Mäusen des Stammes C57Bl/6, auf den der IgH ^{-/-} und der IκBα Mausstamm rückgekreuzt sind, ist kein LMP2A detektierbar.

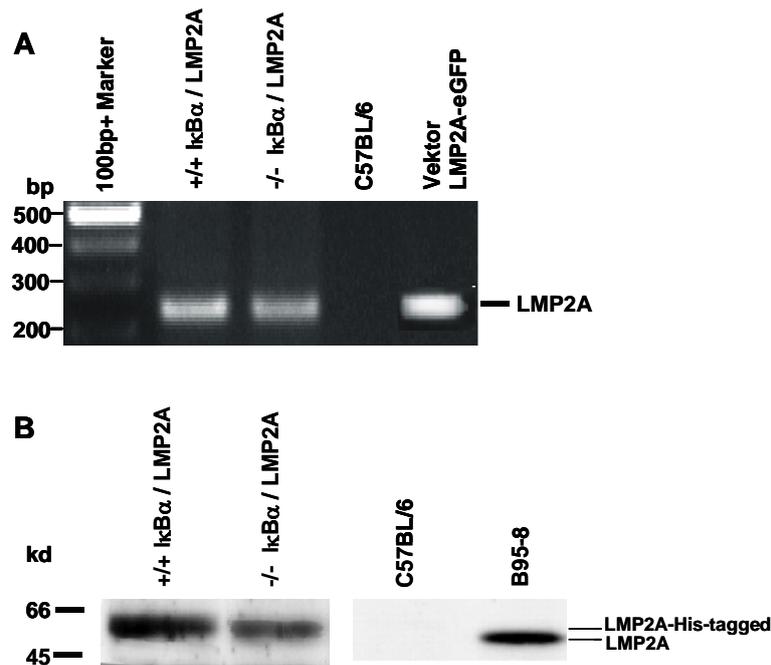


Abb. 16: Expression von LMP2A in Milz B-Zellen der Chimäre

Die hämatopoietischen Stammzellen der Donoren wurden mit den LMP2A kodierenden Retroviren infiziert. In Rezipienten, die mit diesen Stammzellen transplantiert wurden, war die Detektion von LMP2A in Milz B-Zellen in RT-PCR (**A**) und Western-Blot Analysen (**B**) möglich. C57Bl/6 Mäuse exprimierten kein LMP2A. (**A**) Der 100bp+ DNA-Marker wurde als Maß für die Größe des Amplifikates genutzt. Die spezifische Bande ist bei 220 bp zu sehen. Das LMP2A kodierende retrovirale Vektorkonstrukt diente in der RT-PCR als Positivkontrolle. (**B**) Als Positivkontrolle im Western Blot diente die LMP2A-exprimierende Zelllinie B95-8. Wegen der angehängten Histamine an das LMP2A im retroviralen Vektor verläuft die Bande in der -/- IκBα/LMP2A und +/+ IκBα/LMP2A Probe leicht oberhalb der Kontrolle B95-8. (Linke Spalte: Größenmarker in Kilodalton [kd].)

In der Milz der Chimäre konnte die Expression von LMP2A immunhistologisch nachgewiesen werden. Abbildung 17 zeigt die Detektion von LMP2A durch den Antikörper 4H11 in zwei Chimären in 20- und 40-facher Vergrößerung.

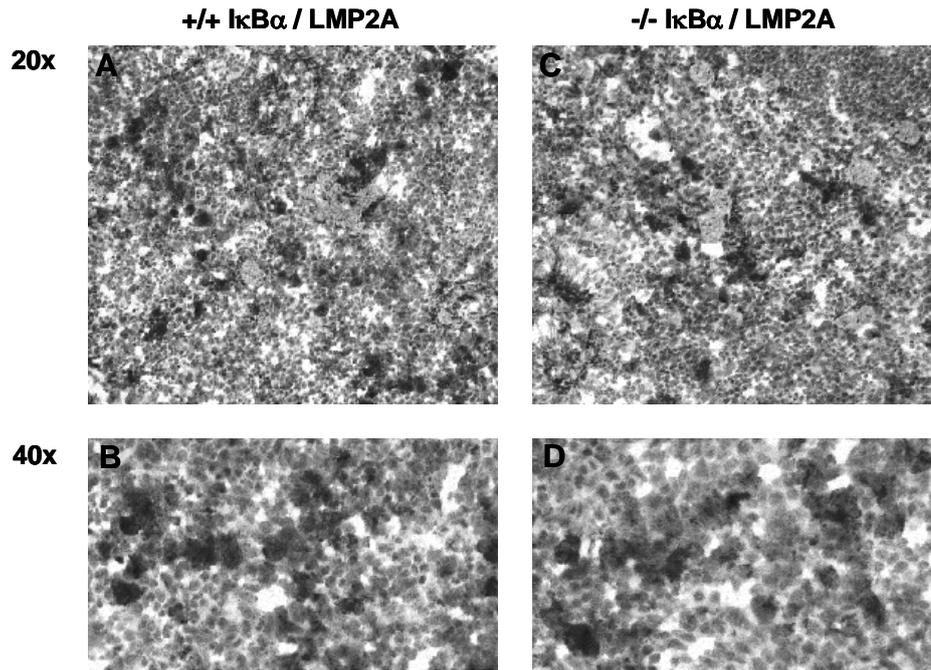


Abb. 17: Immunhistologische Detektion von LMP2A in der Milz der Chimäre

In kryohistologischen Schnittpräparaten der Milz der Chimäre (**A, B** Wildtyp-Chimäre, **C, D** knockout-Chimäre) wurde mittels des Antikörpers 4H11 LMP2A detektiert. Das Signal konnte mit Hilfe des alkalische Phosphatase Anti-alkalische Phosphatase (APAAP) Systems verstärkt und mit dem Chromogen Red angefärbt werden. **A** und **C** zeigen die Färbung in 20-facher, **B** und **D** zeigen die Färbung in 40-facher Vergrößerung.

Neben der Expression von LMP2A war die permanente Aktivität des Transkriptionsfaktors NF- κ B in den mit I κ B α -defizienten Stammzellen transplantierten Rezipienten ein Ziel der Transplantation. Schließlich sollte der Einfluss der Kombination der konstitutiven Aktivität von NF- κ B und der Anwesenheit von LMP2A untersucht werden. Gelretardationsanalysen belegten diese verstärkte DNA-Bindungsaktivität des Transkriptionsfaktors und eine Bindung des Proteins an einen Antikörper gegen die p50 Untereinheit von NF- κ B (Abbildung 18).

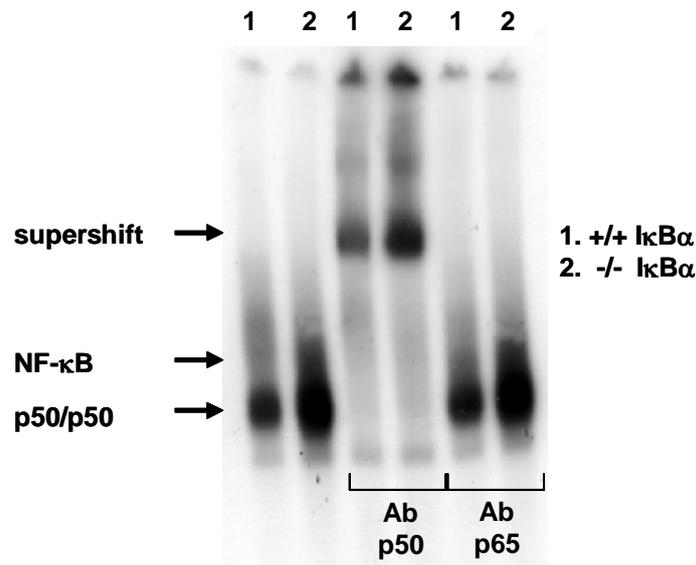


Abb. 18: Verstärkte DNA-Bindungsaktivität des Transkriptionsfaktors NF- κ B

Die Gelretardationsanalyse von Milz B-Zellen aus $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -defizienten und $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -Wildtyp Rezipienten zeigt eine verstärkte DNA-Bindungsaktivität in den $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -defizienten Rezipienten. Supershifts mit den Antikörpern p50 (Ab p50, 3. und 4. Spalte) und p65 (Ab p65, 5. und 6. Spalte) zeigen, dass sich vornehmlich p50 Homodimere in den NF- κ B Komplexen befinden.

Die Expression von LMP2A und die permanente Aktivität von NF- κ B in den $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -defizienten Rezipienten, die hier nachgewiesen wurden, sind die Grundlage des etablierten Mausmodells. Die permanente NF- κ B Aktivität ist ein charakteristisches Merkmal aller untersuchter Hodgkin Lymphome. LMP2A wird in ca. der Hälfte der Fälle exprimiert. Mit Hilfe der folgenden Versuche sollten die Auswirkungen der Expression von LMP2A und der permanenten Aktivität von NF- κ B untersucht werden.

4.4 Auswirkungen von LMP2A und NF- κ B auf den Anteil von B-Zellen in peripherem Blut, Milz und Knochenmark (durchflusszytometrische Analysen)

Im Folgenden werden die Daten dargelegt, die in diesem Modell aufgrund der permanenten Aktivität des Transkriptionsfaktors NF- κ B in Kombination mit der Expression des Epstein-Barr Virus Genprodukts LMP2A in B-Zellen erhoben werden konnten. Die schon dargelegte Funktion von LMP2A als B-Zell-Rezeptor Homolog macht dessen Einfluss auf die B-Zell-Entwicklung interessant und ist auch schon verschiedentlich belegt (vergleiche die Ausführungen in den Kapiteln 2.2.1 und

2.2.2). Ebenso ist der Einfluss von NF- κ B auf die B-Zell-Entwicklung belegt (vergleiche Kapitel 2.1.3.1 und 2.1.3.2). Die Auswirkungen der Kombination von NF- κ B und LMP2A innerhalb eines Mausmodells sind allerdings bis jetzt unbekannt.

Die Daten für die B-Zellmarker B220 und IgM wurden in den in Tabelle 4 aufgeführten Gruppen und Gruppengrößen ermittelt. Chimäre, die weniger als 20 % eGFP exprimierende Zellen aufwiesen, wurden aus der Analyse ausgeschlossen und sind in den Gruppen nicht berücksichtigt. Bei einer Gruppengröße kleiner als $n = 5$ werden die ermittelten Daten dargelegt, ohne statistische Analysen durchzuführen. Aufgrund der geringen Gruppengröße findet in diesen Fällen eine Fallbeschreibung statt. Dies ist in Abstimmung mit dem Institut für Biometrie des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin geschehen.

Tab. 4: Zur durchflusszytometrischen Analyse verwendete Zellmarker und Anzahl der analysierten Mäuse innerhalb der Gruppen

Genotyp	Blut		Milz		Knochenmark	
	+/+ I κ B α	-/- I κ B α	+/+ I κ B α	-/- I κ B α	+/+ I κ B α	-/- I κ B α
B220	8	8	2	6	2	6
IgM	8	8	2	6	2	6

Soweit möglich wurden die Gruppen +/+ I κ B α und -/- I κ B α mit Hilfe des U-Test nach Wilcoxon, Mann und Whitney für unverbundene Stichproben ausgewertet. Die LMP2A-positiven bzw. -negativen Zellen innerhalb der beiden Gruppen konnten durch den Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben verglichen werden. Das Signifikanzniveau wurde auf $p \leq 0,05$ festgelegt.

Graphische Darstellungen der statistischen Auswertungen, deren genaue Signifikanzniveaus und die Fallbeschreibungen befinden sich in den Anhängen in Kapitel 9.

Der Einfluss von LMP2A auf die B-Zell-Entwicklung in Blut, Milz und Knochenmark von I κ B α -Wildtyp bzw. I κ B α -defizienten Rezipienten konnte anhand des Vergleiches LMP2A-eGFP-positiver und -negativer Zellpopulationen innerhalb der I κ B α -Wildtyp bzw. I κ B α -defizienten Gruppe analysiert werden.

Sowohl im peripheren Blut der Mäuse als auch in Milz und Knochenmark war der Anteil an B-Zellen (identifiziert als B220-positive Zellen) in LMP2A-eGFP-negativen Zellfraktionen höher als in -positiven Fraktionen.

Im Blut der $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -Wildtyp transplantierten Mäuse war innerhalb der LMP2A-negativen Zellfraktion der B-Zell-Anteil im Median 2,5-fach (Minimum 1,4-fach, Maximum 5-fach) höher als in der -positiven Fraktion. Bei den $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -defizienten Rezipienten war der Anteil an B-Zellen im peripheren Blut in der LMP2A-negativen Fraktion im Median doppelt so hoch (Minimum 1,2-fach, Maximum 6-fach).

In der Milz $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -defizienter Rezipienten war im Median ein 1,3-fach höherer (Minimum 1-fach, Maximum 3,6-fach) Anteil an B-Zellen in den LMP2A-negativen Zellfraktionen zu beobachten.

Am deutlichsten war die Veränderung im Knochenmark mit einem im Median 2,6-fach (Minimum 1,6-fach, Maximum 10,2-fach) höheren Anteil.

Die zwei untersuchten $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -Wildtyp Rezipienten zeigten einen 2,2- und 2,6-mal so hohen Anteil an B-Zellen in der Milz und einen 2,59- und 3,65-mal so hohen Anteil an B-Zellen im Knochenmark innerhalb der LMP2A-negativen im Vergleich zur -positiven Fraktion.

Abbildung 19 zeigt am Beispiel eines Mauspaars den verringerten B-Zellanteil im Blut in den LMP2A-positiven Zellfraktionen. Die B-Zellanteile in Milz und Knochenmark waren dem B-Zellanteil im peripheren Blut vergleichbar und sind nicht dargestellt.

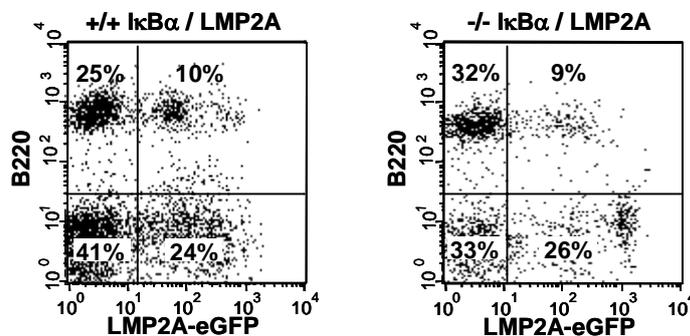


Abb. 19: Verringerter Anteil an B-Zellen in der LMP2A-positiven Zellfraktion im peripheren Blut

Punkt Diagramm Darstellungen durchflusszytometrischer Analysen des peripheren Bluts. Die Zellen wurden mit dem B-Zell-Marker B220 gefärbt. Der Anteil an B-Zellen ist sowohl in der $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -Wildtyp (linkes Punkt Diagramm) als auch in der $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -defizienten Chimäre (rechtes Punkt Diagramm) innerhalb der LMP2A-positiven Zellfraktion geringer als in der -negativen Zellfraktion.

Innerhalb der Gruppen fielen Mäuse auf, deren LMP2A-eGFP Expression zwei Maxima hatte. Das erste Maximum lag zwischen 10^1 und 10^2 , das zweite lag über 10^2 . Abbildung 20 zeigt beispielhaft das Histogramm des peripheren Blutes eines Wildtyp- $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ Empfängers mit zwei Maxima bei der LMP2A-eGFP Expression. Es war

von Interesse, ob die Stärke der LMP2A Expression Einfluss hatte auf die Bildung von B-Zellen.

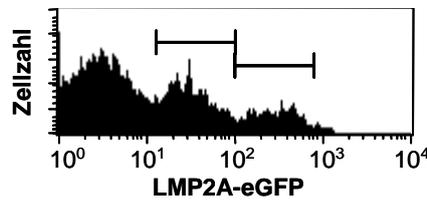


Abb. 20: Expression von LMP2A-eGFP mit zwei Maxima

Histogramm Darstellung der LMP2A-eGFP Expression im peripheren Blut einer Wildtyp- $I\kappa B\alpha$ Chimäre. Die Fluoreszenz des LMP2A-eGFP weist zwei Maxima auf. Das erste Maximum liegt zwischen 10^1 und 10^2 , das zweite liegt zwischen 10^2 und 10^3 .

Tabelle 5 stellt die Gruppengrößen für die jeweiligen Parameter dar.

Tab. 5: Zur durchflusszytometrischen Analyse verwendete Zellmarker und Anzahl der analysierten Mäuse innerhalb der Gruppen

Genotyp	Blut		Milz		Knochenmark	
	+/+ $I\kappa B\alpha$	-/- $I\kappa B\alpha$	+/+ $I\kappa B\alpha$	-/- $I\kappa B\alpha$	+/+ $I\kappa B\alpha$	-/- $I\kappa B\alpha$
B220	5	6	2	5	2	4
IgM	5	6	2	5	2	4

Die Gruppen beinhalten nur Mäuse, deren LMP2A-eGFP Expression zwei Maxima aufwies. Das erste Maximum lag zwischen 10^1 und 10^2 , das zweite war größer als 10^2 .

Bei einer Gruppengröße kleiner als $n = 5$ werden die ermittelten Daten dargelegt, ohne von Signifikanzen auszugehen. Hier kann aufgrund der geringen Gruppengröße nur eine Fallbeschreibung stattfinden.

Soweit möglich wurden die Gruppen +/+ $I\kappa B\alpha$ und -/- $I\kappa B\alpha$ mit Hilfe des U-Test nach Wilcoxon, Mann und Whitney für unverbundene Stichproben ausgewertet. Die LMP2A schwach bzw. stark positiven Zellen innerhalb der beiden Gruppen konnten durch den Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben verglichen werden. Das Signifikanzniveau wurde bei $p \leq 0,05$ festgelegt.

Graphische Darstellungen der statistischen Auswertungen, deren genaue Signifikanzniveaus und die Fallbeschreibungen finden sich in Kapitel 9.

Vergleiche der Anteile von B-Zellen zwischen stark und schwach LMP2A-eGFP exprimierenden Zellfraktionen belegten, dass in Blut und Milz bei starker Expression der Anteil an B-Zellen niedriger war. Dieses Ergebnis ist für die Expression der B-Zell-Marker B220 und IgM nachvollziehbar (Abbildung 21).

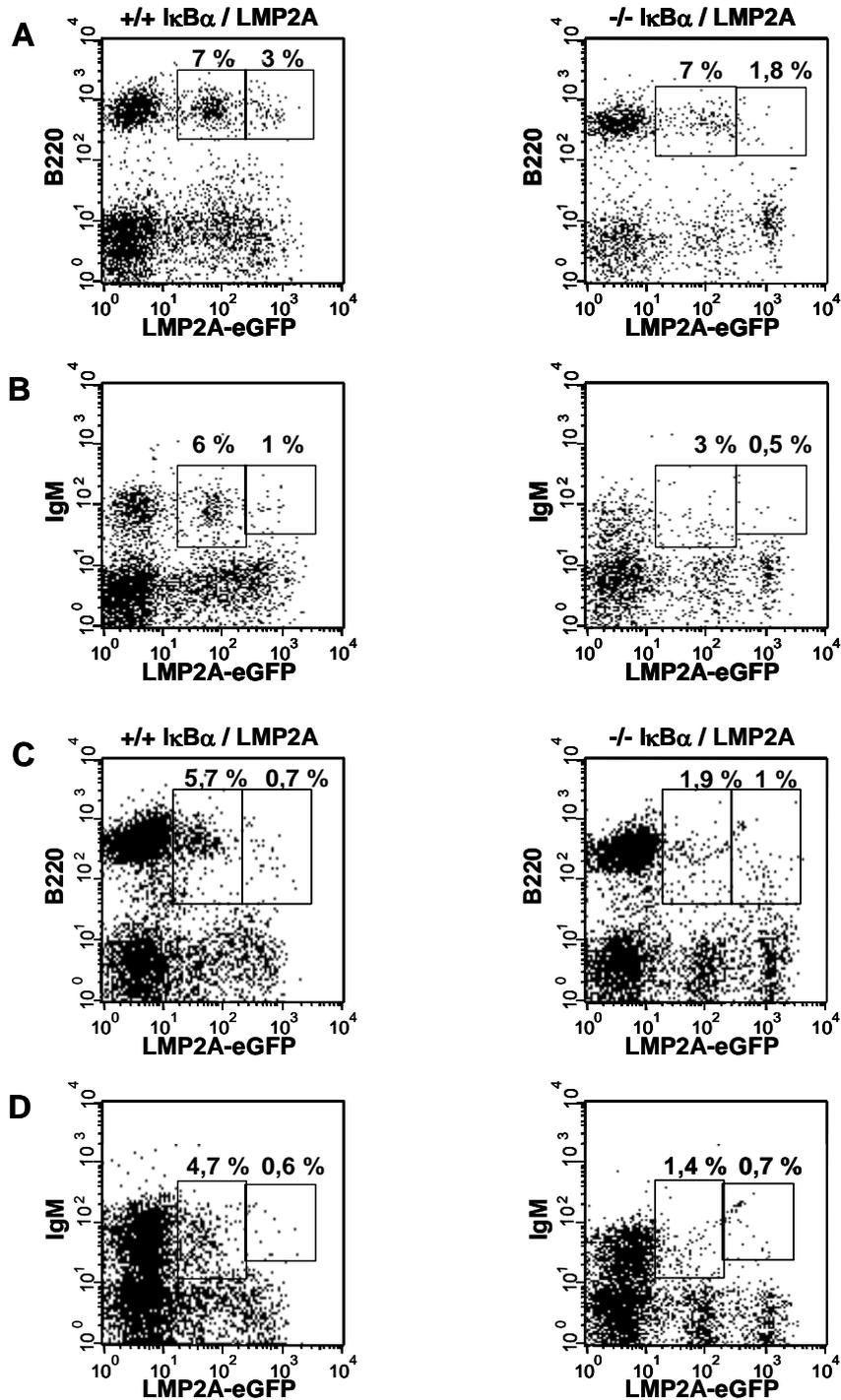


Abb. 21: Verringerter Anteil von B-Zellen bei starker LMP2A Expression

(A-D) Punkt Diagramm Darstellung der B220 und IgM Expression in peripherem Blut (A, B) und Milz (C, D) zweier Chimäre mit physiologischer (linke Spalte) und

permanenter (rechte Spalte) NF- κ B Aktivität. Die Bildung von B220 und IgM ist bei starker Expression von LMP2A verringert.

Ein weiterer interessanter Gesichtspunkt hinsichtlich des Einflusses von LMP2A und NF- κ B auf den Anteil der B-Zellen in Blut, Milz und Knochenmark war die den BZR nachahmende Funktion von LMP2A. Caldwell et al. konnten 1998 zeigen, dass in Milz und Knochenmark LMP2A transgener Mäuse der Anteil an BZR-defizienten (identifiziert als IgM-negative B-Zellen) B-Zellen erhöht war. Sie schlossen daraus, dass LMP2A die Funktion des BZR nachahmte und so die BZR-defizienten B-Zellen vor Apoptose schützte. Im Rahmen dieses Modells stellte sich die Frage, ob diese Eigenschaft des LMP2A nachzuvollziehen war und ob sie durch die permanente Aktivität von NF- κ B beeinflusst wurde. Als Marker für den BZR diente IgM, da dieses in der B-Zell-Entwicklung als erster Immunglobulin-Isotyp von allen B-Zellen exprimiert wird. Auf der Zellmembran bildet es zusammen mit Ig α und Ig β einen funktionsfähigen BZR-Komplex.

Es war von großem Interesse, ob die IgM Expression innerhalb der LMP2A und B220 doppelt positiven Fraktion verringert war. So erhielt man Auskunft über die Auswirkungen von LMP2A auf die Bildung BZR-defizienter B-Zellen innerhalb der jeweiligen Zellfraktion. In den hier untersuchten Mäusen zirkulierten keine IgM - negativen B-Zellen in der Peripherie. In der Milz gab es aber einen signifikanten Unterschied bei IgM in hoher Dichte exprimierenden B-Zellen (*IgM high*) der κ B α Empfänger. Hier verringerte sich der Anteil an *IgM high* exprimierenden B-Zellen durch Expression von LMP2A. In Blut und Knochenmark veränderte sich der Anteil an dicht IgM exprimierenden B-Zellen innerhalb der gesamten LMP2A-positiven Zellfraktionen nicht signifikant. Unterschiede wurden erst deutlich bei der Betrachtung der stark LMP2A-exprimierenden B-Zellen, auf die zu einem späteren Zeitpunkt eingegangen wird. Abbildung 22 zeigt die verringerte Bildung *IgM high* exprimierender B-Zellen in der Milz bei Expression von LMP2A anhand eines Beispiels. Zusätzlich wird ein Wildtyp- κ B α Empfänger dargestellt. Der Anteil der IgM in hoher bzw. geringer Dichte (*IgM low*) exprimierenden B-Zellen innerhalb der B-Zell-Population ist in der Abbildung bezogen auf 100 % B-Zellen.

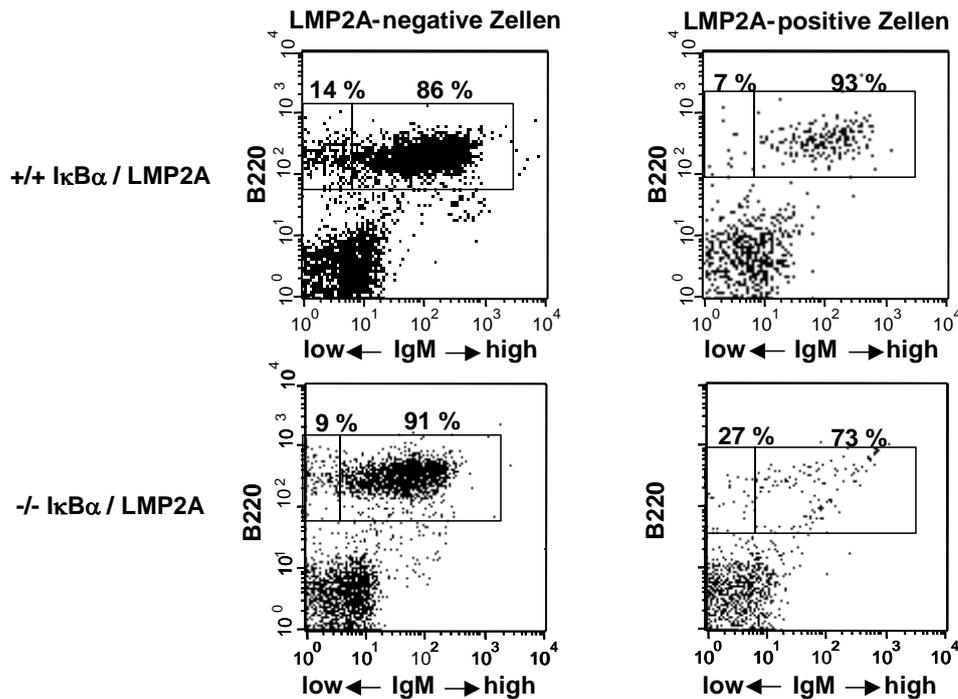


Abb. 22: Verringerter Anteil *IgM high* exprimierender B-Zellen (B220) in der LMP2A-positiven Zellfraktion in der Milz

Punkt Diagramm Darstellungen durchflusszytometrischer Analysen der Milz. Die Zellen wurden gegen die B-Zell-Marker B220 und IgM gefärbt. Zur Auswertung wurden die Diagramme nur auf LMP2A-negative (linke Spalte) bzw. -positive (rechte Spalte) Zellen bezogen. Der Anteil an IgM in hoher Dichte exprimierenden B-Zellen (*IgM high*) verringerte sich in knockout Chimären innerhalb der B220-positiven B-Zell-Fraktion in LMP2A-positiven Populationen (rechts) im Vergleich zur -negativen (links). Der Gesamtanteil von B-Zellen an der Gesamtzellzahl wurde als 100 % festgelegt. Die *IgM high* und *IgM low* exprimierenden Zellen sind anteilig ausgedrückt.

Da bereits festgestellt werden konnte, dass die Stärke der LMP2A Expression Einfluss hat auf den Anteil der B-Zellen (vgl. Abb. 21), war von Interesse, ob auch die Bildung hoch IgM exprimierender B-Zellen durch sie beeinflusst wurde.

Der schon in der Milz der knockout IκBα Chimäre festgestellte verringerte Anteil von dicht IgM exprimierenden B-Zellen in LMP2A-positiven Zellfraktionen war bei starker LMP2A Expression auch im Knochenmark zu sehen. Hier beschränkte er sich nicht nur auf die knockout IκBα Chimären, sondern war auch in den zwei untersuchten Wildtyp-Chimären vorhanden (vgl. Abb. 37C).

Zusätzlich war ein Einfluss von permanenter NF-κB Aktivität auf den Anteil *IgM high* exprimierender B-Zellen festzustellen, wenn man stark und schwach LMP2A-exprimierende Zellfraktionen verglich.

Es ist hervorzuheben, dass bei starker LMP2A Expression und permanenter Aktivität von NF- κ B der Anteil an *IgM high* exprimierenden B-Zellen niedriger war als bei physiologischer Aktivität von NF- κ B. Abbildung 23 stellt die Verminderung des Anteils der *IgM high* exprimierenden B-Zellen innerhalb der stark LMP2A-exprimierenden Fraktion bei permanenter Aktivität von NF- κ B in einem Box Diagramm dar.

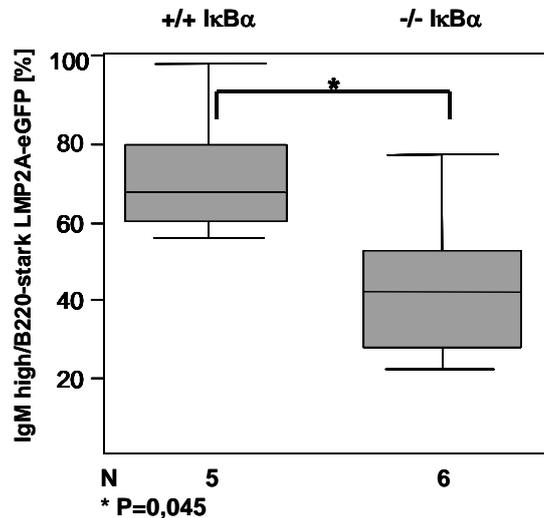


Abb. 23: Verringerter Anteil *IgM high* exprimierender B-Zellen im Blut in der Gruppe mit Überaktivität von NF- κ B bei starker Expression von LMP2A

Box Diagramm Darstellung der B220- und *IgM high*-Expression im Blut in der stark LMP2A-exprimierenden Zellfraktion in Wildtyp- κ B α (linkes Box Diagramm) und κ B α -defizienten (rechtes Box Diagramm) Rezipienten. Die Linie innerhalb der Boxen steht für den Median. Die obere Begrenzung der Boxen (oberes Quartil) ist der Messwert, unter dem 75 % der Werte liegen. Die untere Begrenzung der Boxen (unteres Quartil) ist der Messwert, unter dem 25 % der Werte liegen. Die oberen und unteren Balken markieren die Maxima und Minima. Das Signifikanzniveau wurde als $p < 0,05$ festgelegt. Die y-Achse zeigt den Anteil an *IgM high* exprimierenden B-Zellen in der LMP2A stark positiven Zellfraktion in % an.

Zusätzlich zu der bereits beschriebenen LMP2A abhängigen verminderten Bildung *IgM high* exprimierender B-Zellen in der Milz, konnte diese also auch bei starker Expression von LMP2A im Knochenmark und bei gleichzeitiger permanenter Aktivität von NF- κ B und starker Expression von LMP2A im peripheren Blut festgestellt werden. Hinweise darauf finden sich auch in Milz und Knochenmark. Weil hier nur 2 Wildtyp- κ B α Chimäre untersucht werden konnten, ist allerdings keine statistische Auswertung möglich.

4.5 Stimulation der B-Zellen der verschiedenen Zellfraktionen

Die durchflusszytometrischen Analysen von peripherem Blut, Milz und Knochenmark zeigten eine deutliche Veränderung des Anteils an B-Zellen und BZR-defizienten B-Zellen in Abhängigkeit von LMP2A und permanenter Aktivität von NF- κ B. Diese Erkenntnisse führten zur Untersuchung der B-Zell-Antwort auf spezifische Stimulantien (IgM(F(ab')₂) und LPS). Es sollte geklärt werden, ob beide Faktoren funktionelle Einflüsse auf die Reaktion der B-Zellen auf externe Stimuli haben.

Um die verschiedenen Zellfraktionen zu unterscheiden, wurden die Zellen aus Milz und Knochenmark der Chimäre als LMP2A-eGFP-positive und -negative B-Zell-Fraktionen (B220-positive Zellen) sortiert. Abbildung 24 zeigt eine Punkt Diagramm Darstellung mit den Rahmen, die als Grundlage zur Sortierung der Zellen dienten.

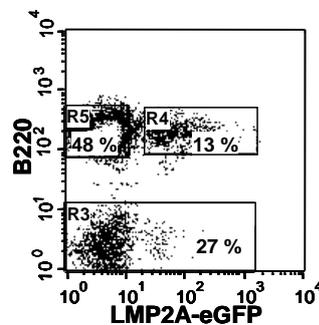


Abb. 24: Sortierte Zellfraktionen

Punkt Diagramm Darstellung der Rahmen, die als Grundlage für die Sortierung der Zellen dienten. Die Zellen wurden mit dem B-Zell-Marker B220 gefärbt. Sortiert wurden B220-positive und LMP2A-eGFP-negative Zellen (R5) und B220 und LMP2A-eGFP doppelt positive Zellen (R4). R3 bezeichnet B220-negative Zellen mit und ohne eGFP Expression, die nicht sortiert wurden.

Die Übereinstimmung von eGFP-Expression und LMP2A-Bildung konnte durch die RT-PCR Analyse der sortierten Zellen nachgewiesen werden. cDNA der sortierten Zellen wurde auf die Expression von LMP2A überprüft. B-Zellen, die als eGFP-positive Zellen sortiert wurden, zeigten die Transkription von LMP2A während diese in Zellen ohne eGFP nicht auftrat. Abbildung 25 zeigt beispielhaft die Analyse sortierter Zellen aus Milz und Knochenmark.

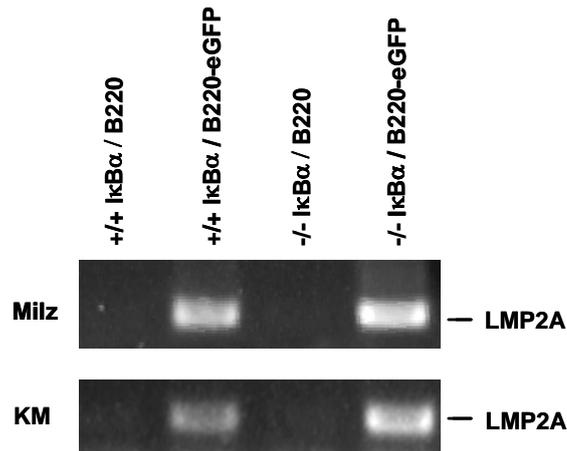
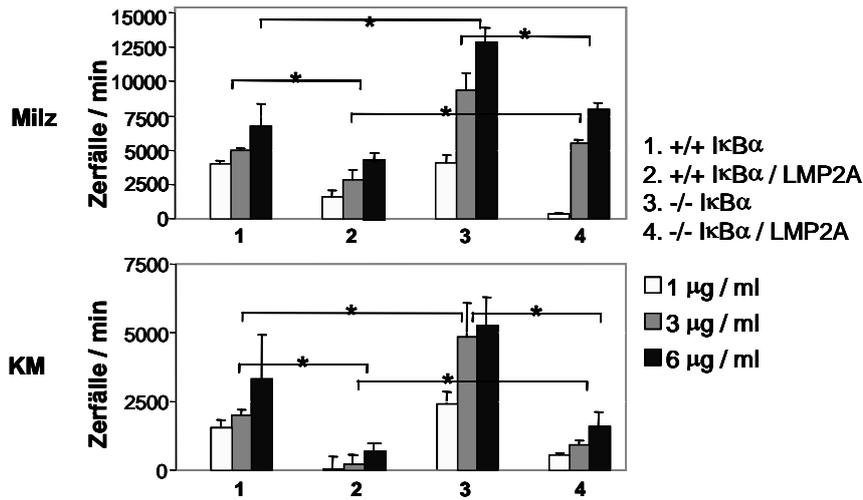


Abb. 25: RT-PCR Ergebnis der LMP2A Expression in sortierten Zellen aus Milz und Knochenmark

Darstellung der Amplifikate der RT-PCR auf LMP2A nach elektrophoretischer Auftrennung im Agarosegel. Die Expression von LMP2A trat nur in den Zellen auf, die als eGFP-positive Zellen sortiert wurden (Spalte 2 und 4 der Gele).

Die nach der Expression von LMP2A-eGFP und Aktivität von NF- κ B sortierten B-Zellen aus Milz und Knochenmark wurden *in vitro* stimuliert. Thymidin, das dem Medium zugesetzt wurde, konnte von den proliferierenden Zellen aufgenommen und in die DNA eingebaut werden. Die radioaktive Strahlung der Zellen (gemessen als Zerfälle / Minute) war abhängig von der aufgenommenen Menge Thymidin und somit von der Proliferation der Zellen.

Eine permanente Aktivität von NF- κ B in den -/- I κ B α Chimären führte zu gesteigerter Proliferation der B-Zellen (vergleiche Säulengruppen 1 und 3 bzw. 2 und 4, Abbildung 26). Die Bildung von LMP2A dagegen hemmte die Proliferation der sortierten B-Zellen (vergleiche Säulengruppen 1 und 2 bzw. 3 und 4, Abbildung 26). In Abbildung 26 wird ein Beispiel der Proliferationsversuche dargestellt.



Signifikanzniveau ermittelt mit dem Student t-Test	Milz			KM		
	1 $\mu\text{g/ml}$	3 $\mu\text{g/ml}$	6 $\mu\text{g/ml}$	1 $\mu\text{g/ml}$	3 $\mu\text{g/ml}$	6 $\mu\text{g/ml}$
+/+; +/+ LMP2A (1; 2)	0,013	0,026	0,000	0,001	0,001	0,002
+/+; -/- (1; 3)	0,793	0,020	0,054	0,002	0,000	0,028
-/-; -/- LMP2A (3; 4)	0,046	0,037	0,011	0,038	0,001	0,028
+/+ LMP2A; -/- LMP2A (2; 4)	0,020	0,007	0,002	0,028	0,000	0,002

Abb. 26: B-Zell-Stimulation mit $\text{IgM}(\text{F}(\text{ab}'))_2$ und LPS

Die nach der Expression von LMP2A-eGFP und Aktivität von NF- κ B sortierten B-Zellen aus Milz und Knochenmark wurden *in vitro* mit 1, 3 und 6 $\mu\text{g/ml}$ (jeweils 1., 2., 3. Säule) $\text{IgM}(\text{F}(\text{ab}'))_2$ und LPS stimuliert. Die Stimulation fand in Triplets statt und wurde 3-mal wiederholt. Die Proliferation wurde mittels Thymidinaufnahme und darauf folgender Messung des radioaktiven Zerfalls in den Zellen bestimmt (y-Achse, Zerfälle/Minute). Jeweils drei Säulen repräsentieren Mittelwerte und Standardabweichungen einer stimulierten Zellfraktion (1. +/+ κ B α , 2. +/+ κ B α /LMP2A, 3. -/- κ B α , 4. -/- κ B α /LMP2A). Eckige Klammern mit * über den Säulengruppen symbolisieren Signifikanzen zwischen den verglichenen Gruppen ($p < 0,05$, Student t-Test). Genaue Signifikanzniveaus sind der abgebildeten Tabelle zu entnehmen.

Eine permanente Aktivität von NF- κ B in den -/- κ B α Chimären führte zu gesteigerter Proliferation (vergleiche Säulengruppen 1 und 3 bzw. 2 und 4). Die Bildung von LMP2A hemmte die Proliferation (vergleiche Säulengruppen 1 und 2 bzw. 3 und 4).

4.6 Auswirkungen der Expression von LMP2A und NF- κ B auf die Expression von B-Zell-Differenzierungsfaktoren (RT-PCR Analysen)

Wie bereits in Kapitel 2.1.3 dargelegt wurde, treten in H/RS Zellen Regulationen verschiedener Transkriptionsfaktoren (z. B. EBF, Pax5, Notch1) auf (Hertel et al. 2002; Jundt et al. 2002b). Außerdem ist bekannt, dass bei Expression von LMP2A in LMP2A transgenen Mäusen einige dieser Faktoren reguliert werden (vgl. Kapitel 2.2, Portis et al. 2003). Diese Daten und die bereits beschriebenen Einflüsse von NF- κ B und LMP2A auf die Anteile der B-Zellen in Blut, Milz und Knochenmark und deren

proliferatives Verhalten, führten zur Untersuchung verschiedener Zelldifferenzierungsfaktoren in B-Zellen. Es sollte die Frage beantwortet werden, ob und wie die Regulationen der Differenzierungsfaktoren in Beziehung zu LMP2A und NF- κ B stehen.

Mit Hilfe von RT-PCR Analysen konnte semiquantitativ die Expression (Transkription) verschiedener Differenzierungsfaktoren untersucht werden. Die RNA für die cDNA Synthese wurde aus Zellen präpariert, die, wie in Kapitel 4.5 beschrieben, sortiert wurden. Für jede RT-PCR wurden gleiche Mengen cDNA eingesetzt. Wegen seiner ubiquitären Expression diente β 2-Mikroglobulin als Maßstab dafür, wie viel cDNA in den jeweiligen Reaktionen eingesetzt wurde. Diese Ladekontrolle ist in den Abbildungen dargestellt. Als Positivkontrolle (in den folgenden Abbildungen nicht dargestellt) diente cDNA aus B-Zellen von C57BL/6 Mäusen, als Negativkontrolle (in den folgenden Abbildungen nicht dargestellt) diente ein cDNA-freier Ansatz. Mit Hilfe der Software „ImageQuant“ konnte die Intensität der einzelnen Banden quantifiziert werden.

4.6.1 Expression von EBF

Der *early B cell factor* (EBF) ist essentiell für die Entwicklung der gemeinsamen lymphoiden Vorläuferzellen zur Pro-B-Zelle. Ein Verlust führt zur Blockierung der B-Zell-Entwicklung in diesem Stadium. Auch während der weiteren Differenzierung der B-Zellen wird der Faktor exprimiert. Seine Rolle in reifen B-Zellen ist allerdings unbekannt.

In Milz und Knochenmark der knockout und Wildtyp-I κ B α Chimären war eine Verminderung der Transkription von EBF innerhalb der LMP2A-exprimierenden Zellfraktionen zu sehen. Einen Unterschied zwischen knockout und Wildtyp-I κ B α Chimären konnte reproduzierbar in der Milz gezeigt werden. Hier war das Expressionsniveau von EBF in den knockout Chimären niedriger als im Wildtyp. Im Knochenmark war das Bild unterschiedlich. Im hier abgebildeten Beispiel ist die Expression im knockout ebenfalls niedriger als im Wildtyp. Da es sich im Knochenmark aber um einen Pool aus B-Zellen unterschiedlicher Entwicklungsstadien handelt, kann keine Aussage darüber gemacht werden, welche B-Zellen welcher Differenzierungsstufe betroffen sind. Es ist möglich, dass alle Reifestadien im Knochenmark betroffen sind oder dass sich der Effekt auf ein Stadium begrenzt. Abbildung 27 stellt exemplarisch die Ergebnisse der EBF RT-PCR Analysen der B-Zellen aus Milz und Knochenmark dar.

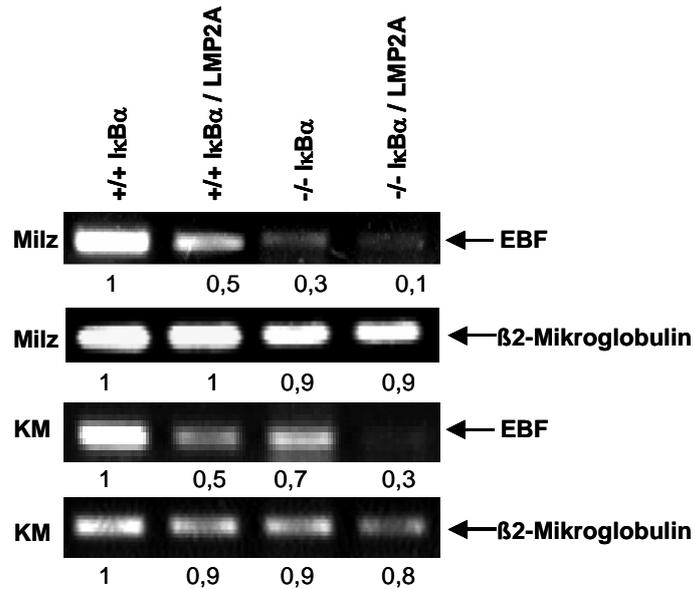


Abb. 27: RT-PCR Ergebnis der EBF Expression

Darstellung der Amplifikate der RT-PCR auf EBF nach elektrophoretischer Auftrennung im Agarosegel. Die Expression von EBF war bei Expression von LMP2A (2. und 4. Spalte) in Milz und Knochenmark (KM) verringert. In der Milz und im hier abgebildeten Beispiel aus dem Knochenmark wurde die Expression bei permanenter Aktivität von NF-κB in den knockout Chimären (3. und 4. Spalte) verringert. Die Menge an cDNA, die in jeder RT-PCR Reaktion eingesetzt wurde, konnte mit Hilfe der Amplifikation von β2-Mikroglobulin Genabschnitten überprüft werden. Die Zahlenwerte dienen als Maßstab für die Stärke der Banden und verstehen sich relativ zur Bande der Wildtyp-Chimäre.

4.6.2 Expression von Pax5

Wie auch EBF spielt Pax5 eine wichtige Rolle für die Entwicklung der gemeinsamen lymphoiden Vorläuferzelle zur Pro-B-Zelle sowie für den Erhalt der B-Zell-Identität reifer B-Zellen (Nutt et al. 1997; Thevenin et al. 1998; Nutt et al. 1999).

In Milz und Knochenmark von knockout und Wildtyp-IκBα Chimären war eine Reduktion der Transkription von Pax5 innerhalb der LMP2A-exprimierenden Zellfraktionen zu sehen. Eine Veränderung der Pax5 Bildung zwischen knockout und Wildtyp-IκBα Chimären gab es reproduzierbar in der Milz. Hier war das Expressionsniveau von Pax5 in den knockout Chimären niedriger als im Wildtyp. Im Knochenmark war das Bild unterschiedlich. Im hier abgebildeten Beispiel ist die Expression im knockout ebenfalls niedriger als im Wildtyp. Ebenso wie für die Transkription von EBF kann auch hier keine Aussage über das beeinflusste B-Zell-Reifungsstadium gemacht werden, weil es sich bei den untersuchten Zellen um einen Pool aus B-Zellen verschiedener Stadien handelt. Abbildung 28 stellt exemplarisch die Ergebnisse der Pax5 RT-PCR Analysen der verschiedenen Organe dar.

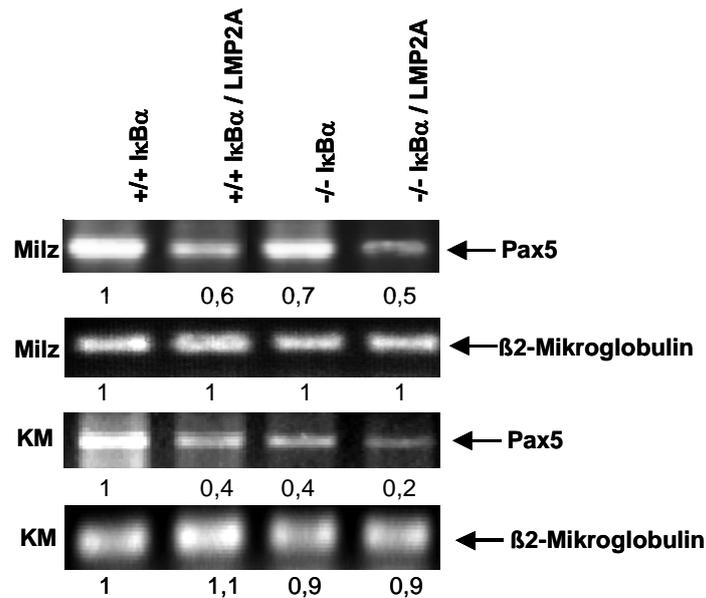


Abb. 28: RT-PCR Ergebnis der Pax5 Expression

Darstellung der Amplifikate der RT-PCR auf Pax5 nach elektrophoretischer Auftrennung im Agarosegel. Die Expression von Pax5 war bei Expression von LMP2A (2. und 4. Spalte) in Milz und Knochenmark (KM) verringert. In der Milz und im hier dargestellten Beispiel des Knochenmarks wurde die Transkription bei permanenter Aktivität von NF- κ B in den knockout Chimären (3. und 4. Spalte) verringert. Die Menge an cDNA, die in jeder RT-PCR Reaktion eingesetzt wurde, konnte mit Hilfe der Amplifikation von β 2-Mikroglobulin Genabschnitten überprüft werden. Die Zahlenwerte dienen als Maßstab für die Stärke der Banden und verstehen sich relativ zur Bande der Wildtyp-Chimäre.

4.6.3 Expression von Notch1 und Jagged1

Unter physiologischen Umständen unterdrückt die Expression von Notch-Rezeptoren die B-Zell-Entwicklung zugunsten der T-Zell Entwicklung. Allerdings sind verschiedene B-Zell-assoziierte Lymphome (z. B. das Hodgkin Lymphom) bekannt, bei denen die Expression von Notch1 hochreguliert ist (Jundt et al. 2002a; Jundt et al. 2004). Eine Untersuchung der Transkriptionsniveaus dieses Rezeptors sollte zeigen, ob sich die permanente Aktivität von NF- κ B und die Bildung von LMP2A auf dessen Expression auswirken.

Die Expression von Notch1 war sowohl in der Milz als auch im Knochenmark bei Bildung von LMP2A erhöht. Auffällig war, dass dieser Effekt durch gleichzeitige permanente Aktivität von NF- κ B verstärkt wurde. In der Milz trat die stärkste Notch1 Expression reproduzierbar in Zellen auf, die eine erhöhte Aktivität von NF- κ B und die Bildung von LMP2A aufwiesen. Im Knochenmark war das Ergebnis nicht einheitlich, was auf die Anwesenheit verschiedener B-Zell-Entwicklungsstadien zurückzuführen sein könnte. Abbildung 29 zeigt diese Effekte exemplarisch.

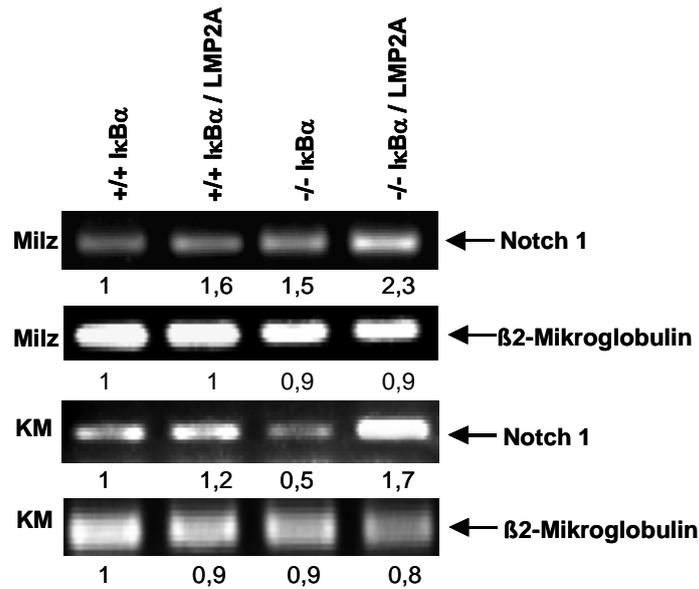


Abb. 29: RT-PCR Ergebnis der Notch1 Expression

Darstellung der Amplifikate der RT-PCR auf Notch1 nach elektrophoretischer Auftrennung im Agarosegel. Die Expression von Notch1 war bei Expression von LMP2A (2. und 4. Spalte) in Milz und Knochenmark (KM) erhöht. Bei permanenter Aktivität von NF- κ B war die Transkription von Notch1 ebenfalls erhöht (1. und 3. Spalte). Die Transkription war bei permanenter Aktivität von NF- κ B und gleichzeitiger Bildung von LMP2A (4. Spalte) am stärksten. Die Menge an cDNA, die in jeder RT-PCR Reaktion eingesetzt wurde, konnte mit Hilfe der Amplifikation von β 2-Mikroglobulin Genabschnitten überprüft werden. Die Zahlenwerte dienen als Maßstab für die Stärke der Banden und verstehen sich relativ zur Bande der Wildtyp-Chimäre.

Der Nachweis der erhöhten Transkription von Notch1 im Zusammenhang mit der Anwesenheit von LMP2A und der permanenten Aktivität von NF- κ B führte zur Frage nach der Expression der Liganden des Rezeptors.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Bildung von Jagged1 untersucht. Jagged1 wurde in der Milz nicht reguliert. Im Knochenmark waren die Ergebnisse nicht homogen. Ebenso wie für die Transkription von EBF, Pax5 und Notch1 kann auch hier keine Aussage über das beeinflusste B-Zell-Reifungsstadium gemacht werden, weil es sich bei den untersuchten Zellen um einen Pool aus B-Zellen verschiedener Stadien handelt. Abbildung 30 zeigt die im Zusammenhang mit LMP2A und der permanenten Aktivität von NF- κ B regulierte Jagged1 Expression.

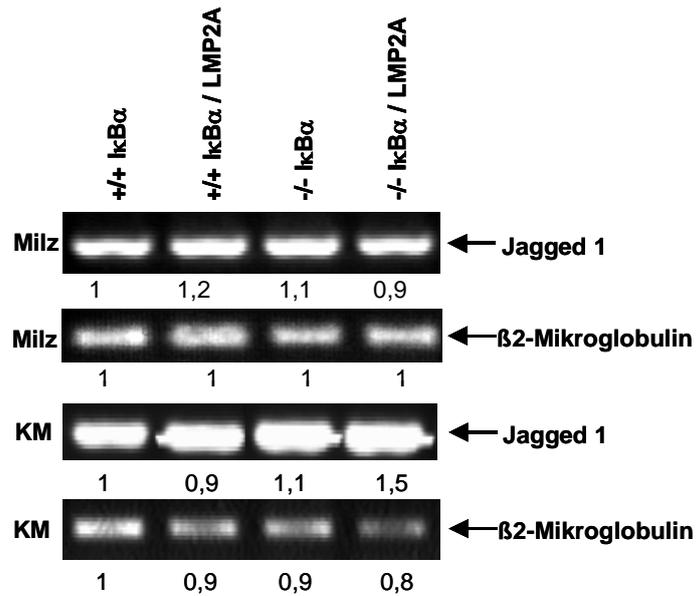


Abb. 30: RT-PCR Ergebnis der Jagged1 Expression

Darstellung der Amplifikate der RT-PCR auf Jagged1 nach elektrophoretischer Auftrennung im Agarosegel. Die Expression von Jagged1 war bei Expression von LMP2A (2. und 4. Spalte) und bei permanenter Aktivität von NF- κ B (3. und 4. Spalte) in der Milz nicht verändert. Im Knochenmark kommt es bei Expression von LMP2A zu verringerter Transkription (2. und 4. Spalte), bei permanenter Aktivität von NF- κ B (3. und 4. Spalte) ist die Transkription gesteigert. Die Zahlenwerte dienen als Maßstab für die Stärke der Banden und verstehen sich relativ zur Bande der Wildtyp-Chimäre.