

## 5 Diskussion

Hodgkin Lymphome gehören zu den häufigsten malignen Erkrankungen des lymphatischen Systems beim Menschen. Die malignen Hodgkin/Reed-Sternberg (H/RS) Zellen sind ein- oder mehrkernige Riesenzellen, deren zellulärer Ursprung lange ungeklärt war. Der geringe Anteil dieser Zellen (ca. 1 % der Zellen des Lymphoms) erschwerte die Möglichkeiten der Analysen. Küppers et al. gelang es 1993 mit Hilfe der Methode der Mikromanipulation von Einzelzellen die H/RS Zellen zu isolieren und mittels PCR zu charakterisieren. So wurde den Zellen wegen des vorhandenen Rearrangements der Immunglobulingene eine B-Zell-Abstammung zugeschrieben.

Ein gemeinsames Merkmal aller H/RS Zellen ist die permanente DNA-bindende Aktivität des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B in der Form des Heterodimers p50/p65 (Bargou et al. 1996). Die permanente Aktivität dieses Transkriptionsfaktors ist eine essentielle Grundlage für das Überleben der Zellen. Gene, deren Transkription durch NF- $\kappa$ B induziert wird, kodieren für Zytokine, Wachstumsfaktoren, Apoptose-regulatoren und einen Inhibitor von NF- $\kappa$ B, I $\kappa$ B $\alpha$ . Der Verlust oder Mutationen dieses Inhibitors können u.a. Ursachen für die permanente Aktivierung des Transkriptionsfaktors sein (Emmerich et al. 1999), (Cabannes et al. 1999; Emmerich et al. 1999; Jungnickel et al. 2000).

Auch die Genprodukte des Epstein-Barr Virus spielen eine Rolle für die malignen Eigenschaften der H/RS Zellen. Diese werden in 50 % der Erkrankungsfälle in den Zellen exprimiert. Allerdings wird nur ein geringer Teil der Gene des EBV als Protein exprimiert (Kieff und Rickinson 2001). Von besonderem Interesse ist hier das latente Membranprotein 2A (LMP2A). Es scheint die Funktionen eines B-Zell-Rezeptors (BZR) nachzuahmen und so das Überleben von B-Zellen in den Keimzentren der Milz zu ermöglichen, die keinen funktionsfähigen Rezeptor bilden (Caldwell et al. 1998; Caldwell et al. 2000). Damit würde die Anwesenheit von LMP2A in EBV-positiven Hodgkin Lymphomen das Überleben von H/RS Zellen trotz fehlender BZR-Bildung erklären.

Bis heute gibt es keine Untersuchungen über die Auswirkungen der permanenten DNA-bindenden Aktivität des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B in Kombination mit der Expression von LMP2A. Im Rahmen dieses Dissertationsprojektes konnten erstmals diese beiden für die Malignität der H/RS Zellen relevanten Ereignisse in einem Mausmodell gemeinsam untersucht werden.

Wegen des B-zellulären Ursprungs der H/RS Zellen liegt der Fokus dieser Arbeit auf der Analyse der B-Zellen. Diese konnten in verschiedenen hämatopoietisch und immunologisch aktiven Organen (Blut, Milz und Knochenmark) beurteilt werden. Die

Möglichkeiten der Unterscheidung der B-Zellen hinsichtlich der DNA-bindenden Aktivität des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B und der Expression von LMP2A ermöglichten Vergleiche bezüglich der NF- $\kappa$ B Aktivität, der LMP2A Expression und der Kombination beider Ereignisse.

## 5.1 Auswahl der Donor- und Rezipienten-Mausstämme

Wegen der komplexen Anforderungen an das Mausmodell wurden sowohl Spender- als auch Empfängermause auf einen C57Bl/6 Hintergrund rückgekreuzt. Der hohe immunologische Verwandtschaftsgrad sollte eventuelle Stammesunterschiede vermeiden und das Risiko von immunologischen Abstoßungsreaktionen nach der Transplantation möglichst niedrig halten.

### 5.1.1 Der Donor-Mausstamm I $\kappa$ B $\alpha$ +/-

Der Donor-Mausstamm I $\kappa$ B $\alpha$  +/- ist in der Literatur mehrfach beschrieben (Beg et al. 1995; Klement et al. 1996; Chen et al. 2000). In I $\kappa$ B $\alpha$ -knockout-Nachkommen dieses Mausstammes, die acht Tage nach der Geburt sterben, ist eine permanente Aktivität des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B nachgewiesen. In dieser Arbeit konnte sie mit Hilfe von Gelretardations-Analysen der B-Zellen, die sich aus fötalen hämatopoietischen Stammzellen mit I $\kappa$ B $\alpha$  knockout nach der Transplantation entwickelten, bestätigt werden (vgl. Abbildung 18). Um die permanente Aktivität von NF- $\kappa$ B in adulten Mäusen beurteilen zu können, war es notwendig, hämatopoietische Stammzellen aus den fötalen Lebern von Nachkommen des I $\kappa$ B $\alpha$  +/- Mausstammes (es wurden Stammzellen von knockout- und Wildtyp-I $\kappa$ B $\alpha$  Föten verwendet) in den Empfängermausstamm zu transplantieren.

Die Nutzung der hämatopoietischen Stammzellen ermöglichte mit Hilfe des LMP2A-kodierenden Retrovirus die zusätzliche Integration des LMP2A-Gens in das Genom der Stammzellen.

### 5.1.2 Der Rezipienten-Mausstamm IgH -/-

Aufgrund der Fokussierung des Projektes auf die Einflüsse der permanenten Aktivität des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B und der Expression von LMP2A auf die B-Zellen, war es von Vorteil, einen Empfänger-Mausstamm auszuwählen, der eine eindeutige Zuordnung der B-Zellen zum Spender ermöglichte. Nur so konnte sichergestellt werden, dass jede B-Zelle hinsichtlich des Genotyps von NF- $\kappa$ B bekannt war. Denn obwohl die subletale Bestrahlung vor der Transplantation eine Repression der Hämatopoiese im Knochenmark zur Folge hat, war zu erwarten, dass Stammzellen des Empfängertieres überleben, aus denen sich eigene hämatopoietische Zellen entwickeln. Es kommt also zu einer Koexistenz von hämatopoietischen Zellen des

Spenders und Empfängers, d.h. zu einem Chimärismus, der in dieser Arbeit durch die Unterscheidung der Spender- und Empfänger- T-Zellen mittels der Ly5.1 (CD45.1) Expression belegt ist. Die Zellen der Empfängermäuse exprimieren den Oberflächenmarker CD45.1 (Ly5.1), Zellen der Spendermäuse 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 *Ly5<sup>a</sup>*, Ly5.2 vom Allel *Ly5<sup>b</sup>*. Die Nomenklatur ordnet dem Mausstamm C57Bl/6 immer das mit „b“ benannte Allel und die „2“-Spezifität zu (Morse et al. 1987). Der hier gewählte B-Zell-defiziente Mausstamm IgH -/- ermöglichte die eindeutige Zuordnung jeder B-Zelle zum Spender. Die B-Zell-Defizienz ist in diesem Mausstamm Folge eines Defekts in der Bildung der Immunglobulin-Schwerkette, der einen Verlust der Immunglobulinbildung nach sich zieht (Kitamura et al. 1991; Kitamura und Rajewsky 1992).

## 5.2 LMP2A beeinflusst die Bildung von B-Zellen und IgM (BZR) in hoher Dichte exprimierenden B-Zellen

Die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten aus durchflusszytometrischen Analysen zeigten, dass sowohl in  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -knockout als auch in  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -Wildtyp Chimären in denjenigen Zellfraktionen, die LMP2A exprimieren, ein verminderter Anteil an B-Zellen im Vergleich zu nicht LMP2A-exprimierenden Zellfraktionen vorlag. Dies galt für Milz, Knochenmark und peripheres Blut.

Interessanterweise war auch die Stärke der LMP2A Expression von Bedeutung. Durch die Stärke der eGFP-Fluoreszenz in durchflusszytometrisch analysierten Zellen ließen sich stark und schwächer LMP2A-exprimierende Zellen unterscheiden. Der Anteil an B-Zellen (hier identifiziert als B220 exprimierende Zellen) in den generierten Mäusen veränderte sich bei unterschiedlich starker Expression von LMP2A. In stark LMP2A-exprimierenden Zellfraktionen entwickelten sich signifikant weniger B-Zellen als bei schwacher LMP2A Expression. Die hier erhobenen Daten stützen Ergebnisse von Caldwell et al. und Casola et al. und erweitern sie durch Daten aus peripherem Blut. In Versuchen von Caldwell et al. bewirkte eine schwache LMP2A Bildung keine veränderte B-Zell-Entwicklung, während eine starke Bildung in Milz und Knochenmark zu den hier beschriebenen Effekten führte (Caldwell et al. 1998; Caldwell et al. 2000). Untersuchungen des peripheren Blutes wurden nicht beschrieben. Die Regulation der LMP2A Expression mittels schwacher ( $D_H$ ) bzw. starker ( $V_H$ ) Promotoren (Casola et al. 2004) veränderte sogar die Entwicklung unterschiedlicher B-Zell-Gruppen. B-Zellen aus Knochenmark und peripheren lymphatischen Organen, bei denen LMP2A vom starken  $V_H$  Promotor kontrolliert wurde, entwickelten sich verstärkt zu B1-Zellen, bei Kontrolle durch den schwachen  $D_H$  Promotor wurde die Bildung von Marginalzonen-B-Zellen gefördert. Diese

Erkenntnisse legen die Vermutung nahe, dass die Regulation der LMP2A Expression durch das EBV die Entwicklung, Differenzierung, Aktivierung und das Überleben der B-Zellen modifizieren kann.

Besonders hervorzuheben ist der hier nachgewiesene verringerte Anteil an B-Zellen, die in hoher Dichte IgM exprimieren (*IgM high*). Dieser trat innerhalb der LMP2A-exprimierenden Zellfraktionen in der Milz der knockout Chimäre und im Knochenmark bei starker Expression von LMP2A auf. Bei starker Expression von LMP2A wurde dieser Effekt durch die permanente Aktivität von NF- $\kappa$ B unterstützt. Hier konnte gezeigt werden, dass im Blut der I $\kappa$ B $\alpha$ -knockout Chimäre weniger *IgM high* exprimierende B-Zellen gebildet wurden als bei Wildtyp-Chimären. Mögliche Ursache der verringerten B-Zell- und *IgM high*-Bildung könnte die gehemmte Expression der B-Zell-Differenzierungsfaktoren EBF und Pax5 sein. Diese konnte in RT-PCR Analysen nachgewiesen werden. Wie Lin et al. 1995 und Nutt et al. 1999 zeigen konnten, führt die Deletion von EBF und Pax5 im Mausmodell zur Unterbrechung der B-Zell-Entwicklung im pro-B-Zell-Stadium. Eine verminderte Bildung könnte also auch die Entwicklung von B-Zellen beeinträchtigen.

Caldwell et al. zeigten 1998 und 2000, dass in LMP2A transgenen Mäusen in der Peripherie B-Zellen ohne BZR auftraten. Die verringerte Expression des BZRs (IgM) ließ vermuten, dass LMP2A die Funktion des BZRs übernimmt und die Entwicklung der B-Lymphozyten verändert. So wird die Ansiedlung von B-Zellen ohne BZR in der Peripherie ermöglicht. Der Ersatz der Funktion des BZR in der Entwicklung der B-Zellen durch LMP2A konnte durch Kreuzung LMP2A transgener Mäuse mit RAG-1-defizienten Mäusen bewiesen werden (Caldwell et al. 2000). Der Verlust der Expression des RAG-1-Gens führt bei diesen Mäusen zum Ausbleiben des Rearrangements der Immunglobulingene. Das zieht eine B- (und T-) Zelldefizienz nach sich. Nachkommen aus der Kreuzung dieser Mausstämmen verfügten über BZR-defiziente, LMP2A-exprimierende B-Zellen. LMP2A übernahm also die Funktion des BZR und ermöglichte das Überleben von B-Zellen trotz fehlenden BZRs, d.h. trotz fehlender Spezifität gegen Antigene. In der vorliegenden Arbeit konnte dieses Phänomen nicht nachvollzogen werden. Als Grund dafür wird die Koexistenz von LMP2A-positiven und -negativen B-Zellen und B-Zell-Vorläufern, sowie aller anderer hämatopoietischer Zellen angenommen. Die Unterdrückung der Bildung BZR-defizienter, LMP2A-positiver B-Zellen durch LMP2A-negative B-Zellen ist in diesem Modell möglich. Außerdem ist ein Wachstumsvorteil der LMP2A-negativen B-Zellen auf Kosten der LMP2A-positiven B-Zellen möglich. Hinweis darauf ist die gehemmte Proliferation von LMP2A-positiven B-Zellen, die im Proliferations-Assay nachgewiesen wurde.

### 5.3 Auswirkungen der Expression von LMP2A und der permanenten Aktivität von NF- $\kappa$ B auf die Proliferation von B-Zellen

Die Beobachtung, dass der Anteil an B-Zellen und an BZR-defizienten B-Zellen durch die permanente Aktivität von NF- $\kappa$ B bzw. durch die Expression von LMP2A beeinflusst wurde, warf die Frage nach deren Reaktionsfähigkeit auf externe Stimuli auf. Es sollte geklärt werden, ob die beiden Faktoren Einfluss haben auf das Proliferationsverhalten der Zellen.

*In vitro* Proliferations-Assays, in denen die nach LMP2A-eGFP Expression sortierten B-Zellen aus Milz und Knochenmark mit B-zellspezifischen Stimulantien inkubiert wurden, ermöglichten die Untersuchung der Effekte, erstens der Expression von LMP2A, zweitens der permanenten NF- $\kappa$ B Aktivität sowie drittens der Kombination beider Ereignisse auf das Proliferationsverhalten der B-Zellen. Ob das unterschiedliche Proliferationsverhalten der sortierten Zellen im Knochenmark auf die Veränderung der Proliferationsfähigkeit der gesamten Population oder von Subgruppen unterschiedlicher Entwicklungsstadien zurückzuführen ist, kann hier nicht geklärt werden weil die Zellen nicht ihren Entwicklungsstadien entsprechend sortiert wurden.

Wir konnten zeigen, dass die permanente Aktivität von NF- $\kappa$ B, unabhängig von der Expression von LMP2A, bei B-Zellen aus Milz und Knochenmark eine gesteigerte Reaktionsfähigkeit auf die Stimulation mit IgM(F(ab))<sub>2</sub> und LPS bewirkte (vgl. Abbildung 26). Dieses Ergebnis stimmt mit den Daten von Chen et al. von 2000 überein. Eine *in vitro* Stimulation von I $\kappa$ B $\alpha$ -defizienten B-Zellen mit anti-CD40, anti-IgM und LPS führte im Vergleich zu I $\kappa$ B $\alpha$ -Wildtyp B-Zellen zu einer 2-3-fach erhöhten Proliferation der Zellen. Die gemessene Proliferation war dosisabhängig und steigerte sich sowohl in den Versuchen von Chen et al. als auch in den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuchen mit der Konzentration der Stimulantien. Der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B ist also verantwortlich für den Proliferationsvorteil der Zellen und könnte mit ausschlaggebend sein für die tumoröse Entartung der Zellen.

Die Expression von LMP2A führte im Vergleich zu nicht-LMP2A-exprimierenden B-Zellen zu verringerter Proliferation der B-Zellen nach Stimulation.

Die Hauptaufgabe von LMP2A wird in der Literatur in der Unterdrückung des lytischen Zyklus und der Aufrechterhaltung der Latenz in EBV infizierten Zellen gesehen. Um dies zu erreichen, hemmt LMP2A die Proliferation der B-Zellen nach Stimulation. Durch die von LMP2A induzierte Blockade der Signaltransduktion des BZR nach Aktivierung durch sein Antigen, soll der Eintritt in die lytische Replikationsphase von EBV verhindert werden (Longnecker 2000). Dazu kann LMP2A einen aktivierten B-Zell-Rezeptor oder ein B-Zell-Rezeptor-Signalsom

nachahmen, die für die Signaltransduktion des B-Zell-Rezeptors wichtige Proteine rekrutieren und diese – wie auch sich selbst - zur Degradierung kennzeichnen (Fruehling und Longnecker 1997; Fruehling et al. 1998; Ikeda et al. 2001a; Ikeda et al. 2001b). Durch diese Aufrechterhaltung der Latenz und der Expression nur weniger viraler Proteine entgehen infizierte Zellen der Immunüberwachung durch zytotoxische T-Zellen (Portis et al. 2002).

#### 5.4 Regulation der Transkription von Zelldifferenzierungsfaktoren in B-Zellen durch LMP2A und NF- $\kappa$ B

Dass die permanente Aktivität des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B und die Expression von LMP2A Auswirkungen auf den Anteil an B-Zellen und in hoher Dichte IgM (BZR) exprimierenden B-Zellen haben, wurde im Rahmen dieser Arbeit bereits gezeigt. Auch die Effekte auf die proliferative Antwort der B-Zellen auf externe Stimuli wurden deutlich. Vorhergehende Studien belegten bereits, dass verschiedene Faktoren, die in der B-Zell-Differenzierung und der Expression von Immunglobulinen von Bedeutung sind, in H/RS Zellen dereguliert sind (vgl. Ausführungen in Kapiteln 2.1.3 und 2.2.2). Es stellte sich für uns die Frage, ob diese Regulationen im Zusammenhang stehen mit der permanenten Aktivität von NF- $\kappa$ B und der Expression von LMP2A.

Mit Hilfe von RT-PCR Analysen der B-Zellen aus Milz und Knochenmark wurde die Regulation der Transkription der Zelldifferenzierungsfaktoren EBF, Pax5 und Notch1 untersucht. Zusätzlich war die Expression des Notch-Rezeptors Jagged1 interessant. Um alle B-Zell-Fraktionen separat analysieren zu können, wurden die B-Zellen hinsichtlich der LMP2A-eGFP Expression durchflusszytometrisch sortiert. Zellen mit permanenter NF- $\kappa$ B Aktivität waren anhand des Genotyps der transplantierten hämatopoietischen Stammzellen zu identifizieren.

Die Transkription von EBF, Pax5 und Notch1 wurde durch die Expression von LMP2A und die permanente Aktivität von NF- $\kappa$ B reguliert. Die in den B-Zellen der Milz erhobenen Ergebnisse waren reproduzierbar, während die Regulation der Faktoren durch NF- $\kappa$ B in Knochenmark-B-Zellen nicht einheitlich war. Ob die Regulation der Transkription verschiedener Differenzierungsfaktoren im Knochenmark ein Phänomen ist, das sich auf die gesamte sortierte B-Zell-Fraktion bezieht oder auf bestimmte Subgruppen bzw. B-Zell-Entwicklungsstadien, konnte hier nicht geklärt werden. Die unterschiedliche Zusammensetzung des Knochenmarks der untersuchten Mäuse hinsichtlich der B-Zell-Entwicklungsstadien könnte auch Ursache für die hier nicht ganz konsistenten Ergebnisse sein.

Nicht zu vergessen ist auch die Möglichkeit der Interaktion LMP2A-exprimierender und nicht-exprimierender Zellen in der Maus. Die beobachteten Effekte können also

zurückzuführen sein auf direkte Einflüsse des Proteins LMP2A oder/und auf Faktoren, die von den unterschiedlichen Zellfraktionen sezerniert werden. Die Koexistenz von LMP2A-exprimierenden und nicht-LMP2A-exprimierenden Zellen ist ein Vorteil dieses Mausmodells, da es in dieser Hinsicht der Situation in EBV assoziierten Hodgkin Lymphomen gleicht.

Im Folgenden werden die Effekte der Expression von LMP2A, der Überaktivität von NF- $\kappa$ B und der Kombination beider Ereignisse auf die Regulation von Differenzierungsfaktoren in B-Zellen aus Milz und Knochenmark diskutiert.

#### **5.4.1 Repression des B-Zell-Differenzierungsprogramms durch LMP2A**

Die forcierte Bildung und Aktivität des Notch Signalweges in H/RS Zellen wurde als eine Ursache des Überlebens- und Wachstumsvorteils von H/RS Zellen beschrieben (Jundt et al. 2002a). Im hier untersuchten Mausmodell konnte nachgewiesen werden, dass in B-Zell-Fractionen mit LMP2A-eGFP Expression eine erhöhte Transkription des Rezeptors und Transkriptionsfaktors Notch1 vorlag. Die Aktivität von Notch1 wurde von Wilson et al. 2000 als essentiell für die Entwicklung von T-Zellen auf Kosten der B-Zell-Entwicklung beschrieben. Außerdem ist bekannt, dass die Notch1 Expression mit der Reifung der B-Zellen abnimmt (Saito et al. 2003). Eine durch LMP2A forcierte Bildung von Notch1 ist möglicherweise die Ursache für eine gehemmte B-Zell-Reifung und Differenzierung. Dies könnte in den hier untersuchten Mäusen Grund für die verminderte B-Zell-Anzahl bei Bildung von LMP2A sein. Schon frühere Arbeiten beschrieben einen Zusammenhang zwischen Notch1 und LMP2A. So aktiviert Notch1 in ähnlicher Weise wie EBNA2 den LMP2A-Promotor (Strobl et al. 2000). Als eine indirekte Interaktion bei vorhandener LMP2A Expression wurde die Konkurrenz um Ubiquitin Ligasen angenommen. Beide Proteine werden nach Ubiquitinierung proteasomal abgebaut. Dabei kommen in beiden Fällen Ubiquitin Ligasen der E3 Familie zum Einsatz (Cornell et al. 1999; Winberg et al. 2000; Lai 2002; Ikeda et al. 2003). Werden diese von LMP2A rekrutiert, fehlen sie zur Ubiquitinierung von Notch1, was einen verringerten Abbau und damit eine Anreicherung zur Folge haben könnte. Das Prinzip der Rekrutierung spezieller, für die B-Zell-Entwicklung bzw. -Funktion notwendiger Faktoren durch LMP2A spielt nicht nur hier eine Rolle. Es ist auch schon für die Hemmung der BZR Funktion durch Sequestrierung von Protein Tyrosin Kinasen (Syk und Lyn) beschrieben (Miller et al. 1995). LMP2A könnte also den Notch Signalweg zur Regulation der B-Zell-Differenzierung nutzen und eine Reifung der B-Zellen durch indirekte Aktivierung von Notch1 hemmen.

Die These der durch LMP2A unterdrückten B-Zell-Differenzierung wird ebenfalls durch die hier gezeigte verminderte Transkription der B-zellspezifischen Differenzierungsfaktoren EBF und Pax5 unterstützt. Diese wie auch andere

Faktoren, die bei der Transkription von Immunglobulinen und der Differenzierung der B-Zellen eine Rolle spielen, sind in H/RS Zellen herunterreguliert. Besondere Bedeutung kommt hier neben E2A, EBF und Pax5 (Hertel et al. 2002) auch PU.1, Oct2 und BOB.1 zu (Stein et al. 2001; Jundt et al. 2002b). Eine Reduktion der Transkription dieser und weiterer B-zellspezifischer Differenzierungsfaktoren (z.B. E2A, PU.1, CD19) konnte auch in LMP2A transgenen Mäusen festgestellt werden (Portis et al. 2003; Portis und Longnecker 2003). Ein Großteil der Daten von Portis et al. stützt sich auf *Real-Time* PCR Analysen und vor allem RNA-*Microarrays*. Sie sind in den meisten Fällen weder durch *Reverse Transkription* (RT)-PCR Analysen oder *Northern Blot* (mRNA)- noch durch *Western Blot* (Protein)-Analysen überprüft worden. Sie geben aber einen Hinweis auf die Tragweite der Auswirkungen der Expression von LMP2A auf die B-Zell-Entwicklung im Hinblick auf die Regulation B-zellspezifischer Gene. Es ist zu vermuten, dass in LMP2A-positiven Hodgkin Lymphomen dieses Protein mit Ursache für die veränderte Genexpression ist. Allerdings treten diese Veränderungen auch in LMP2A-negativen H/RS Zellen auf. Hier könnte eine spontane genetische Veränderung der Zellen vorliegen, die die Effekte von LMP2A kopiert. Denkbar ist auch, dass eine erhöhte Bildung von Notch1 an der Regulation dieser Faktoren beteiligt ist.

Bemerkenswert ist die Tatsache, dass die Hemmung von Pax5 und EBF nicht nur im Knochenmark stattfindet. Hier sind sie unter physiologischen Bedingungen für die Unterdrückung B-zellfremder bzw. die Stimulation B-zellspezifischer Gene zuständig, die die Reifung von der gemeinsamen lymphoiden Vorläuferzelle zur pro-B-Zelle vorantreiben. Vielmehr findet sie auch in der Milz statt. Von Pax5 ist bekannt, dass ein Verlust des Faktors in reifen B-Zellen zu deren Dedifferenzierung und zu veränderter Genexpression führt (Horcher et al. 2001). LMP2A könnte also die Hemmung von Pax5 nutzen, um die spätere B-Zell-Differenzierung zu unterbrechen. Eine weitere Ursache der dauerhaften Hemmung von Pax5 könnte dessen Funktion als Aktivator des  $W_p$  Promotors des EBV sein (Tierney et al. 2000). Dieser Promotor ist in der Infektionsphase des EBV aktiv. Die Aktivierung mit Hilfe von Pax5 ermöglicht eine B-zellspezifische Etablierung der Infektion. Nach der Infektionsphase kommt es durch EBNA2 zur Aktivierung des  $C_p$  Promotors, durch den die Transkription von Genen des Latenzprogramms induziert wird (Woisetschlaeger et al. 1990). Die auch hier gezeigte Hemmung von Pax5 durch LMP2A könnte in EBV-infizierten B-Zellen die Aktivität des frühen  $W_p$  Promotors beenden bzw. eine erneute Aktivierung und eine damit verbundene Erneuerung der Infektionsphase verhindern. Dadurch würde die Entdeckung und Elimination des Virus' durch das Immunsystem verhindert.

Als weiterer Effekt der gehemmten Pax5 Bildung kommt die verstärkte Notch1 Transkription in Betracht. Es wurde beschrieben, dass Pax5 während der B-Zell-Entwicklung die Bildung von Notch1 hemmt, um eine Entwicklung der Vorläuferzelle



zur B-Zelle zu unterstützen (Souabni et al. 2002). Eine verminderte Pax5 Bildung ist möglicherweise mit Ursache für eine verstärkte Notch1 Transkription. Denkbar ist auch eine gegenseitige Beeinflussung der Expression. So könnte eine durch LMP2A erhöhte Notch1 Bildung die Expression von Pax5 hemmen.

In Betracht zu ziehen ist der Effekt von EBF auf die Pax5 Expression. In EBF knockout Mäusen konnten Lin et al. 1995 dessen Einfluss auf die Bildung B-zellspezifischer Gene zeigen. Unter anderem wurde Pax5 nicht mehr exprimiert, so dass es möglich ist, dass die hier beschriebene verminderte Pax5 Transkription nicht nur mit der Expression von LMP2A, sondern auch mit der verminderten Bildung von EBF im Zusammenhang steht.

Über die Rolle von EBF in reifen B-Zellen gibt es bis heute keine Erkenntnisse. Die Hemmung der Transkription von EBF durch LMP2A in den B-Zellen der Milz könnte ein Hinweis darauf sein, dass der Faktor hier notwendig ist, den B-Zell-Status zu erhalten (ähnlich wie Pax5) oder auch die Expression des BZR zu gewährleisten.

#### **5.4.2 Gehemmte Transkription B-zellspezifischer Gene bei Überaktivität von NF- $\kappa$ B**

Es ist bekannt, dass NF- $\kappa$ B auf unterschiedlichen Wegen Einfluss auf das Überleben und die Proliferation von B-Zellen sowie auf deren Differenzierung hat. Wie bereits ausgeführt (vgl. Kapitel 2.1.3.1 und 2.1.3.2), spielt die Deregulation verschiedener B-Zell-assoziiierter Faktoren in H/RS Zellen eine zentrale Rolle bei deren Entartung.

In diesem Mausmodell konnten wir belegen, dass Veränderungen der Transkription dieser Gene zum Teil im Zusammenhang mit der permanenten Aktivität von NF- $\kappa$ B stehen.

Interessant ist, dass die Transkription von Notch1 in den B-Zellen der Mäuse mit alleiniger permanenter NF- $\kappa$ B-Aktivität in der Milz hochreguliert wurde. Hier ist eine deutliche Parallele zur gesteigerten Notch1 Bildung in H/RS Zellen zu ziehen. Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass der Notch1 Signalweg beim Hodgkin Lymphom, in großzellig anaplastischen Lymphomen sowie beim Multiplen Myelom eine Rolle spielt (Jundt et al. 2002a; Jundt et al. 2004). Wir konnten nachweisen, dass sowohl in kultivierten Zelllinien als auch im Patientenmaterial dieser Erkrankungen Notch1 exprimiert wird, obwohl die malignen Zellen in allen Fällen von B-Zellen abstammen.

Im hier vorliegenden Mausmodell war die permanente NF- $\kappa$ B-Aktivität ausschlaggebend, um die Transkription von Notch1 in den B-Zellen der Milz zu erhöhen. Die gesteigerte Transkription des Rezeptors in den B-Zellen der Milz fällt insofern besonders ins Auge, als dass die malignen H/RS Zellen von Keimzentrum B-Zellen abstammen (Kanzler et al. 1996; Küppers und Rajewsky 1998). Diese

Steigerung der Transkription in der Milz als Vertreter der peripheren lymphatischen Organe könnte ein Hinweis auf die essentielle Rolle der deregulierten Aktivität von NF- $\kappa$ B und Notch1 bei der Transformation der Keimzentrum B-Zellen zu malignen H/RS Zellen sein.

Die weitere Verstärkung der Notch1 Transkription bei Kombination von LMP2A und NF- $\kappa$ B-Aktivität in diesem Mausmodell (in Milz und Knochenmark) zeigte hier einen synergistischen Effekt der beiden Faktoren. Die proliferativen und anti-apoptotischen Eigenschaften von Notch1 könnten mit Ursache sein für das Überleben BZR-defizienter B-Zellen in der Peripherie.

Ob die Hochregulation eines anderen Liganden als Jagged1 mit der erhöhten Transkription von Notch1 im Zusammenhang steht, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht. Dass Jagged1 in der Milz nicht reguliert war, könnte für eine direkte Interaktion von LMP2A bzw. NF- $\kappa$ B mit Notch1 sprechen (vgl. auch Ausführungen in 5.4.1). Die Regulation im Knochenmark ist schwer zu interpretieren, da die Knochenmark B-Zellen nicht nach Reifungsstadien differenziert betrachtet wurden.

Die Transkription der B-zellspezifischen Transkriptionsfaktoren EBF und Pax5, die durch LMP2A in Milz und Knochenmark herunterreguliert wurden, war reproduzierbar durch permanente Aktivität von NF- $\kappa$ B in der Milz verändert. Hier fand ebenfalls eine Hemmung der Expression bei permanenter Aktivität des Transkriptionsfaktors statt. Wie schon ausgeführt (vgl. Kapitel 5.4.1) ist es zusätzlich möglich, dass die verringerte Transkription von Pax5 mit der erhöhten Aktivität von Notch1 zusammenhängt.

Bei den analysierten Knochenmark-B-Zellen handelt es sich um ein Gemisch aus allen hier vorkommenden Entwicklungsstadien. Aus diesem Grund ist die Interpretation der Daten schwierig. Es ist nicht zu sagen, ob sich die Regulationen auf den gesamten Zellpool erstrecken oder ob nur einzelne B-Zell-Entwicklungsstadien betroffen sind. Die unterschiedlichen Ergebnisse können ihre Ursache in der unterschiedlichen Zusammensetzung der Knochenmark B-Zell-Populationen der verschiedenen, analysierten Mäuse haben.