

Sebastian Stefan Arrow  
Dr. med.

## **Charakterisierung Epstein-Barr-Virus-infizierter Zelllinien mit Keimzentrumsherkunft**

Einrichtung: DKFZ  
Doktorvater: Prof. Dr. Dr. Henri-Jacques Delecluse

Infektionen mit EBV sind mit einer Vielzahl verschiedener Lymphome assoziiert. Hierbei können EBV-assoziierte Lymphome Merkmale naiver B-Zellen, Keimzentrumszellen (germinal center cells) oder post-Keimzentrumszellen aufweisen.

Studien mit dem EBV-Prototyp B95-8 zeigten, dass eine Infektion mit diesem Stamm zu Veränderungen der Expression der B-Zell-Oberflächenantigene führt. Des Weiteren ist bereits bekannt, dass ein Ig-Klassenwechsel in Folge von Infektionen mit B95-8 nicht erfolgt und nur selten Mutationen der Immunoglobulingene beobachtet werden können.

Für den erst kürzlich beschriebenen EBV-Stamm M81, der ein zu B95-8 konträres Infektionsverhalten und eine spontane lytische Replikation zeigt, fehlen Untersuchungen dieser Art bislang. So ist bisher unklar, ob Infektionen mit M81 bzw. B95-8 zu voneinander abweichenden Phänotypen der infizierten B-Zellen führen. Insbesondere der Einfluss der Infektion mit M81 auf B-Zellen im Stadium des Klassenwechsels und/oder somatischer Hypermutation (GC-Zellen) ist unbekannt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden daher B-Zellen verschiedener Herkunft (GC/non-GC) mit unterschiedlichen EBV-Stämmen (B95-8, M81, M81  $\Delta$ ZR) infiziert und auf ihre Proteinexpression untersucht.

Mittels Westernblot-Analysen von sieben Zellreihen mit jeweils sechs Zelllinien konnte für die getesteten Differenzierungsmarker (CD10, MUM1, PAX5) in allen Fällen ein gemeinsames Differenzierungsmuster identifiziert werden: Der GC-Marker CD10 war durchgehend negativ, während MUM1 und PAX5 in allen Zelllinien nachgewiesen werden konnten. Demnach verlieren GC-Zellen in Folge der Infektion mit EBV, unabhängig von den drei untersuchten Stämmen, ihren typischen GC-Phänotyp.

Die Untersuchung von vier bzw. sieben Zellreihen mittels PCR- bzw. Westernblot-Analyse zeigte eine AID-Expression auf Transkriptions- sowie Proteinexpressionsebene in allen untersuchten Proben. Hierbei konnte außerdem anhand zweier Zellreihen gezeigt werden, dass

das AID-Protein vorrangig zytosolisch lokalisiert ist. Eine Dysregulation der AID-Expression kann über fehlerhafte somatische Hypermutation oder Ig-Klassenwechsel Translokationen hervorrufen, welche Lymphome begünstigen. Es ist bislang jedoch unbekannt in welcher Konzentration AID im Zellkern vorhanden sein muss, um die o.g. Prozesse effektiv zu katalysieren.

Um die eventuellen Auswirkungen der AID-Expression in den Zelllinien besser beurteilen zu können, wurden die Immunglobulinexpression der Zelllinien sowie die Mutationen der IgHv-Region analysiert. M81- und M81  $\Delta$ ZR-infizierte Zellen des CD10<sup>+</sup> Kompartiments zeigten hierbei eine Tendenz, IgM schwächer sowie gleichzeitig IgG stärker zu exprimieren als die jeweiligen CD10<sup>-</sup> Zelllinien. Für B95-8 konnte kein ähnliches Verhalten gezeigt werden.

Auch in den Mutationsanalysen zeigten die M81- und M81  $\Delta$ ZR-infizierte Zellen eine zwei- bis dreifach höhere Mutationsrate als die B95-8-infizierten. Dies spricht für einen EBV-stammspezifischen Effekt. Da jedoch nur eine komplette Zellreihe betrachtet wurde, bleibt dieses Ergebnis noch durch weitere Analysen zu verifizieren, zumal sich diese Tendenz in den untersuchten M81- und B95-8-infizierten CD19<sup>+</sup> Zelllinien nicht zeigte, wodurch die Heterogenität zwischen den Virusstämmen bestätigt wird.

Die durchgeführte Studie zeigt erstmals, dass eine Infektion von B-Zellen verschiedener Entwicklungsstadien *in vitro* zum Verlust typischer Entwicklungsmarker führt und dies unabhängig vom EBV-Stamm und seiner Herkunft ist. Die Studie erbrachte zudem den Nachweis der AID-Expression sowie fortlaufender Mutationen von Immunglobulinschwerketten. Die Untersuchungsergebnisse erweitern damit das Grundlagenwissen über die Auswirkungen einer EBV-Infektion mit einem spontan lytischen EBV-Stamm und geben neue Aspekte in Hinblick auf die Differenzierung und Pathogenese EBV-assoziiierter Lymphoproliferationen, die in weiterführenden Studien charakterisiert werden können.