

FUNKTIONELLE CHARAKTERISIERUNG DER EBV-NUKLEÄREN ANTIGENE 3A UND 3C (EBNA3A UND EBNA3C)

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von

SABINE PETERMANN

München, Dezember 2009

Helmholtz Zentrum München
Deutsches Forschungsinstitut für Gesundheit und Umwelt (GmbH)
Abteilung Genvektoren

Dissertation eingereicht am: 9. Dezember 2009

1. Gutachter: PD Dr. Bettina Kempkes

2. Gutachter: Prof. Dr. Angelika Böttger

Tag der mündlichen Prüfung: 14. Juli 2010

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG	1
1 EINLEITUNG	2
1.1 Das Epstein-Barr Virus	2
1.1.1 Der Lebenszyklus von EBV	2
1.1.2 Die Latenzgene von EBV	4
1.1.3 Virale Genexpression in EBV-assoziierten Tumorerkrankungen.....	5
1.2 Die Epstein-Barr Virus nukleären Antigene 3 (EBNA3)	6
1.2.1 Funktion und Proteinstruktur von EBNA3A und EBNA3C.....	6
1.2.1.1 Interaktion von EBNA3A und EBNA3C mit dem DNA-Adapterprotein CBF1	7
1.2.2 Transkriptionelle Aktivierung durch EBNA3A und EBNA3C	10
1.2.3 Transkriptionelle Repression durch EBNA3A und EBNA3C	11
1.2.4 Regulation des Zellzyklus durch die EBNA3-Proteine	13
1.3 Die Foxo-Transkriptionsfaktoren	14
1.3.1 Überblick.....	14
1.3.2 Foxo-assoziierte Tumorerkrankungen.....	15
1.3.3 Regulation der transkriptionellen Aktivität der Foxo-Transkriptionsfaktoren.....	16
1.3.3.1 Posttranslationale Regulation durch den PI3K/AKT-Signalweg	16
1.3.3.2 Weitere Arten der funktionellen Regulation der Foxo-Proteine	17
1.3.4 Funktion und Zielgene.....	18
1.3.5 Foxos in B-Lymphozyten und EBV-infizierten Zellen	20
1.4 Ziel des Projekts	21
2 MATERIAL	23
2.1 Kulturen	23
2.1.1 Hefestamm	23
2.1.2 Bakterienstämme.....	23
2.1.3 Zelllinien	23
2.2 Oligonukleotide/ Primer	24
2.3 Plasmide	26
2.4 Antikörper	28
2.5 Material für die Kultur von Bakterien, Hefen und Säugetierzellen	29
2.5.1 Material für die Kultur von Hefen und Bakterien	29
2.5.2 Material für die Kultur von Säugetierzellen	29
2.6 DNA- und Protein-Standards	30
2.7 Enzyme und Reaktionssysteme	30
2.8 Chemikalien und Reagenzien	30
2.9 Verbrauchsmaterial	31
2.10 Laborausstattung	31
2.11 Software und Datenbanken	32

3	METHODEN	33
3.1	Arbeiten mit Bakterien	33
3.1.1	Kultivierung und Aufbewahrung von Bakterien	33
3.1.2	Herstellung chemisch-kompetenter <i>E. coli</i> DH5 α nach der CaCl ₂ -Methode	33
3.1.3	Transformation chemisch-kompetenter Bakterien	33
3.2	Arbeiten mit eukaryotischen Zellen	34
3.2.1	Arbeiten mit Hefe	34
3.2.1.1	Prinzip des Yeast Two-Hybrid Systems	34
3.2.1.2	Kultivierung und Aufbewahrung von Hefe	34
3.2.1.3	Hefetransformation mit der LiAc-Methode	35
3.2.1.4	Test auf Aktivierung der Reportergene <i>HIS3</i> und <i>ADE2</i>	35
3.2.1.5	Präparation von Hefeproteinextrakten	36
3.2.2	Kultivierung von Suspensions- und adhärenenten Zellen	36
3.2.3	Aufbewahrung von Zellen	37
3.2.4	Bestimmung der Zellzahl	37
3.2.5	Transfektion von adhärenenten Zellen nach der PEI-Methode	37
3.2.6	Transfektion von Suspensionszellen durch Elektroporation	38
3.2.7	Promotor-Reportergen-Studie	38
3.2.8	Propidiumjodid-Färbung zur Zellzyklusanalyse	39
3.3	Herstellung lentiviraler Vektoren zum Knockdown von Genen durch shRNA	39
3.3.1	Einführung in das „BLOCK-iT™ Lentiviral RNAi Expression System“ von Invitrogen	40
3.3.2	Klonierung von Plasmidvektoren zur Expression von shRNAs	41
3.3.2.1	Klonierung des Entry-Vektors	41
3.3.2.2	Klonierung des Expressionsvektors	42
3.3.3	Produktion infektiöser Lentivirus-Überstände in HEK293FT-Zellen	42
3.3.4	Infektion von Suspensionszellen mit lentiviralen Vektoren	43
3.4	Arbeiten mit RNA	43
3.4.1	Isolierung von RNA aus eukaryotischen Zellen	43
3.4.2	Spektrometrische Bestimmung der RNA-Konzentration	43
3.4.3	Agarose-Gelelektrophorese von RNA	43
3.4.4	DNase-Verdau von RNA	44
3.4.5	Reverse Transkription	44
3.5	Arbeiten mit DNA	44
3.5.1	Schnelle Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i>	44
3.5.2	Präparative Plasmidisolierung	45
3.5.3	Spektrometrische Bestimmung der DNA-Konzentration	45
3.5.4	Agarose-Gelelektrophorese von DNA	45
3.5.5	Polymerasekettenreaktion (PCR)	45
3.5.6	Zielgerichtete in vitro Mutagenese	46
3.5.7	Aufreinigung von DNA-Fragmenten	47
3.5.8	Restriktionsverdau von DNA	48
3.5.9	Klonierung von Plasmidvektoren	48
3.5.9.1	Konventionelle Klonierung	48
3.5.9.2	Klonierung mit dem Gateway®-System	49
3.5.10	Real-Time RT-PCR	50
3.5.10.1	Prinzip der Real-Time RT-PCR	50
3.5.10.2	Quantifizierung	51
3.5.10.3	Schmelzkurvenanalyse	52
3.5.10.4	Durchführung	52
3.6	Proteinbiochemische Methoden	53
3.6.1	Herstellung von Proteinlysaten	53
3.6.2	Zellfraktionierung	53
3.6.3	Proteinbestimmung nach Bradford	54
3.6.4	Kopplung von Antikörpern an ProteinG-Sepharose-Beads	54
3.6.5	Co-Immunpräzipitation	54

3.6.5.1	Co-Immunpräzipitation von exogen in HEK293 exprimierten Proteinen	54
3.6.5.2	Co-Immunpräzipitation von endogen exprimierten Proteinen	55
3.6.6	Protein-Affinitätspräzipitation über biotinylierte DNA-Oligonukleotide	55
3.6.7	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	56
3.6.8	Proteintransfer	57
3.6.9	Immunodetektion von Proteinen durch Chemilumineszenz.....	57
3.6.10	Radioaktive in vitro Translation	58
3.6.11	Radioaktive Detektion eines Peptid-Arrays.....	58
4	ERGEBNISSE.....	59
4.1	Vorarbeiten der Arbeitsgruppe	59
4.2	Repression der zellulären Foxo-Transkriptionsfaktoren durch EBNA3A und EBNA3C 62	
4.2.1	Bestätigung der Repression von Foxo1a durch EBNA3A und von Foxo3a durch EBNA3A und EBNA3C	62
4.2.2	Wird Foxo3a zusätzlich posttranslational reguliert?.....	64
4.2.2.1	Die Proteinmenge von Foxo3a korreliert nicht mit der Transkriptmenge	64
4.2.2.2	Das Foxo3a-Protein kann in WT-LCLs nicht durch Inhibierung einer potentiellen posttranslationalen Regulation stabilisiert werden.....	67
4.2.3	Untersuchung der Aktivität von Foxo1a und Foxo3a	69
4.2.3.1	Analyse der Foxo-Zielgene im EBNA3A- und EBNA3C-Affymetrix-Array.....	70
4.2.3.2	Subzelluläre Lokalisierung von Foxo1a und Foxo3a.....	72
4.2.3.3	Untersuchung der DNA-Bindung durch Foxo3a	73
4.2.4	Kann die Expression von Foxo3a durch Stress-Stimuli induziert werden?.....	75
4.2.5	Knockdown von Foxo3a in EBNA3A-negativen LCLs durch shRNA mittels lentiviraler Transduktion	78
4.2.5.1	Etablierung von EBNA3A-negativen Foxo3a-Knockdown-LCLs	78
4.2.5.2	EBNA3A-negative Foxo3a-Knockdown-LCLs weisen ein verlangsamtes Wachstum auf.....	80
4.3	Die Interaktion von EBNA3C mit EBNA3A	83
4.3.1	EBNA3A und EBNA3C interagieren in LCLs	84
4.3.1.1	Die Interaktion von EBNA3A und EBNA3C kann nicht im Yeast Two-Hybrid System nachgewiesen werden	84
4.3.1.2	Interaktion von EBNA3A und EBNA3C in Säugetierzellen.....	86
4.3.2	Die Interaktion von EBNA3A und EBNA3C wird nicht über CBF1 vermittelt	87
4.3.3	Homodimerisierung von EBNA3A und EBNA3C.....	89
4.3.4	Eine Kooperation von EBNA3A und EBNA3C bei der Genrepression ist in Promotor-Reportergen-Studien nicht nachweisbar	90
4.3.5	Die Interaktion von EBNA3A und EBNA3C wird über deren N-Termini vermittelt.....	93
4.3.5.1	Die Bindestellen von EBNA3C und CBF1 liegen im Bereich der Aminosäuren 1-222 von EBNA3A.....	93
4.3.5.2	Die Interaktion von EBNA3A mit EBNA3C und CBF1 wird nicht über dieselben Aminosäuren vermittelt	96
4.3.5.3	Die Aminosäuren 100-250 von EBNA3A sind ausreichend für die Interaktion mit EBNA3C.....	97
4.3.5.4	Peptid-Array-Bindungsstudie zur Feinkartierung der EBNA3C- und CBF1- Bindestelle in EBNA3A	100
4.3.5.5	EBNA3A interagiert mit dem Bereich der Aminosäuren 1-300 von EBNA3C	102
5	DISKUSSION.....	106
5.1	Untersuchung der Repression des Transkriptionsfaktors Foxo3a durch EBNA3A und EBNA3C	106
5.1.1	Die Expression von Foxo3a wird in Anwesenheit von EBNA3A und EBNA3C auf dem mRNA-Level reprimiert.....	107
5.1.2	Obwohl Foxo3a in LCLs funktionell aktiv sein kann, werden die bekannten Foxo- Zielgene in LCLs nicht reguliert.....	108
5.1.3	Die Expression von Foxo3a vermittelt EBNA3A-negativen LCLs einen Wachstumsvorteil	109

5.2 Analyse der Interaktion von EBNA3A mit EBNA3C und CBF1	111
5.2.1 EBNA3A und EBNA3C können Hetero- und Homodimere ausbilden.....	111
5.2.2 In Promotor-Reporter-Gen-Studien ist keine Kooperation von EBNA3A und EBNA3C nachweisbar	112
5.2.3 Die Interaktion von EBNA3A und EBNA3C wird über deren N-Termini vermittelt und überlappt möglicherweise mit der CBF1-Bindestelle	114
5.2.3.1 Kartierung der EBNA3C- und CBF1-Bindestelle in EBNA3A	114
5.2.3.2 Kartierung der EBNA3A-Bindestelle in EBNA3C.....	117
5.3 Ausblick.....	119
6 ANHANG	120
6.1 Abkürzungen.....	120
6.2 Der EBNA3A-Peptid-Array	122
7 LITERATUR	125
DANKSAGUNG	137
EHRENWÖRTLICHE VERSICHERUNG	138
LEBENS LAUF	139

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1 Der Lebenszyklus von EBV	4
Abb. 1.2 Funktionelle Domänen und gemeinsame assoziierte Proteine von EBNA3A und EBNA3C	9
Abb. 1.3 Posttranslationale Regulation von Foxo durch den PI3K/AKT-Signalweg	17
Abb. 1.4 Wichtige Zielgene der Foxo-Transkriptionsfaktoren	19
Abb. 3.1 Das Yeast Two-Hybrid System	34
Abb. 3.2 Prozessierung und Funktionsweise von shRNAs	40
Abb. 3.3 Das BLOCK-iT™ Lentiviral RNAi Expression System.....	40
Abb. 3.4 Schematischer Aufbau der shRNA-Oligonukleotide	41
Abb. 3.5 Die Gateway®-Klonierungstechnologie	49
Abb. 4.1 Expression von EBNA3A und EBNA3C in den in dieser Arbeit verwendeten LCLs	60
Abb. 4.2 Repression von Foxo1a und Foxo3a durch EBNA3A und EBNA3C im Affymetrix-Array	61
Abb. 4.3 Analyse der relativen Transkriptmengen von Foxo1a und Foxo3a durch Real-Time RT-PCR	63
Abb. 4.4 Proteinexpression von Foxo1a und Foxo3a	64
Abb. 4.5 Quantifizierung der Transkript- und Proteinmengen von Foxo1a und Foxo3a.....	66
Abb. 4.6 Schematische Darstellung der posttranslationalen Regulation der Foxo-Transkriptions- faktoren und mögliche Angriffspunkte zur Inhibierung	67

Abb. 4.7 Die Inhibierung einer potentiellen posttranslationalen Regulation von Foxo3a führt nicht zur Stabilisierung des Foxo3a-Proteins in WT-LCLs.	69
Abb. 4.8 Subzelluläre Lokalisierung von Foxo1a und Foxo3a.....	72
Abb. 4.9 Foxo3a liegt nicht acetyliert vor	74
Abb. 4.10 Das in LCLs exprimierte Foxo3a kann <i>in vitro</i> an das Foxo Responsive Element (FRE) binden.	75
Abb. 4.11 Die Expression von Foxo3a wird nicht durch Zellstress induziert.	77
Abb. 4.12 Knockdown von Foxo3a in der EBNA3A-negativen LCL CP364-42 Δ E3A	79
Abb. 4.13 Die Expression von Foxo3a verleiht EBNA3A-negativen LCLs einen Wachstumsvorteil und eine höhere Toleranz gegenüber γ -Strahlung	80
Abb. 4.14 Die Expression von Foxo3a führt zur erhöhten Proliferation von EBNA3A-negativen LCLs.....	82
Abb. 4.15 Hypothetisches Modell zur Bildung eines Multiprotein-Repressorkomplexes durch die Homo- und Heterodimerisierung von EBNA3A und EBNA3C.....	84
Abb. 4.16 Die Interaktion von EBNA3A und EBNA3C kann nicht im Yeast Two-Hybrid System nachgewiesen werden.....	85
Abb. 4.17 Interaktion der exogen exprimierten Proteine EBNA3A und EBNA3C in HEK293.....	86
Abb. 4.18 Interaktion der endogen exprimierten Proteine EBNA3A und EBNA3C in LCLs	87
Abb. 4.19 Die Interaktion von EBNA3A und EBNA3C wird nicht über CBF1 vermittelt.....	88
Abb. 4.20 EBNA3A und EBNA3C bilden Homodimere aus.	89
Abb. 4.21 Eine Kooperation von EBNA3A und EBNA3C bei der Repression lässt sich in Promotor-Reporter-Gen-Studien nicht nachweisen.	91
Abb. 4.22 EBNA3A und EBNA3C haben einen additiven Effekt auf die Repression der CBF1-VP16- vermittelten Aktivierung eines CBF1-abhängigen Reporters.	92
Abb. 4.23 EBNA3C und CBF1 interagieren mit dem Bereich der N-terminalen 222 Aminosäuren von EBNA3A.....	95
Abb. 4.24 Die Interaktion von EBNA3A mit EBNA3C und CBF1 wird nicht durch dieselben Aminosäuren vermittelt	96
Abb. 4.25 Die AS 100-250 von EBNA3A sind ausreichend für die Interaktion mit EBNA3C.....	98
Abb. 4.26 Die AS 139-222 von EBNA3A sind essentiell für die Interaktion mit EBNA3C und CBF1. ...	99
Abb. 4.27 Die Aminosäuren von EBNA3A, welche die Interaktion mit EBNA3C und CBF1 vermitteln, sind im Peptid-Array nicht näher zu bestimmen.	101
Abb. 4.28 EBNA3A interagiert mit dem Bereich der AS 1-300 von EBNA3C.....	103
Abb. 4.29 Interaktion der N-Termini von EBNA3A und EBNA3C.....	104
Abb. 4.30 Die AS 1-300 von EBNA3C sind ausreichend für die Interaktion mit EBNA3A.....	105
Abb. 5.1 Schematische Darstellung der EBNA3C- und CBF1-Bindestellen in EBNA3A.....	116
Abb. 5.2 Schematische Darstellung der EBNA3A- und CBF1-Bindestellen in EBNA3C	118

Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1	Allgemeine Zelllinien	23
Tab. 2.2	In der AG Kempkes hergestellte Zelllinien	23
Tab. 2.3	In dieser Arbeit hergestellte Zelllinien	24
Tab. 2.4	Primer für die Klonierung mit dem Gateway®-System	24
Tab. 2.5	Primer für die zielgerichtete Mutagenese	24
Tab. 2.6	Primer für die Real-Time RT-PCR (in der AG Kempkes vorhanden)	25
Tab. 2.7	Oligonukleotide zur Expression von shRNAs	25
Tab. 2.8	Oligonukleotide für die Protein-Affinitätspräzipitation	25
Tab. 2.9	Leervektoren und in der Arbeitsgruppe Kempkes vorhandene Expressionsvektoren	26
Tab. 2.10	Durch Gateway®-BP-Reaktion hergestellte Entry-Vektoren in pDonor207	27
Tab. 2.11	Durch Gateway®-LR-Reaktion hergestellte Expressionsvektoren	27
Tab. 2.12	Durch sonstige Klonierung hergestellte Plasmide	28
Tab. 2.13	Primäre Antikörper	28
Tab. 2.14	Sekundäre Antikörper	29
Tab. 3.1	PCR-Ansatz für die Pwo DNA-Polymerase	46
Tab. 3.2	PCR-Programm für die Pwo DNA-Polymerase	46
Tab. 3.3	PCR-Ansatz für die zielgerichtete <i>in vitro</i> Mutagenese	47
Tab. 3.4	PCR-Programm für die zielgerichtete <i>in vitro</i> Mutagenese	47
Tab. 3.5	PCR-Programm für die Real-Time RT-PCR	53
Tab. 4.1	Foxo-Zielgene im EBNA3A- und EBNA3C-Affymetrix-Array	71

Zusammenfassung

Das Epstein-Barr Virus infiziert humane ruhende B-Lymphozyten und induziert *in vitro* deren kontinuierliche Proliferation und das Auswachsen von lymphoblastoiden Zelllinien (LCLs). Die Proliferation dieser Zellen wird durch die Expression von neun Latenzgenen, zu denen auch die EBV-nukleären Antigene 3A und 3C (EBNA3A, EBNA3C) gehören, aufrechterhalten. EBNA3A und EBNA3C interagieren mit dem DNA-Adapterprotein CBF1 und modulieren dadurch möglicherweise die Funktion des zentralen EBV-Transaktivators EBNA2. Um die Funktion von EBNA3A und EBNA3C weiter zu untersuchen, wurden in unserer Arbeitsgruppe EBNA3A-, bzw. EBNA3C-negative LCLs etabliert.

In einer vergleichenden Genexpressionsanalyse zellulärer Zielgene von EBNA3A und EBNA3C wurde gezeigt, dass der Transkriptionsfaktor Foxo3a in EBNA3A-, bzw. EBNA3C-negativen LCLs hochreguliert war. Foxo3a ist ein Tumorsuppressor und kann unter Zellstress die Apoptose von Zellen, aber auch deren Überleben durch die Induktion des Zellzyklusarrests, der DNA-Reparatur und der Detoxifizierung induzieren. In LCLs und aktivierten B-Zellen wird Foxo3a reprimiert, um die Proliferation dieser Zellen zu ermöglichen. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Foxo3a in WT-LCLs strikt auf mRNA-Level reprimiert ist, während es in EBNA3A-, bzw. EBNA3C-negativen LCLs exprimiert ist. EBNA3A-negative LCLs, in denen Foxo3a durch eine lentiviral transduzierte shRNA herunterreguliert worden war, waren verlangsamt in ihrem Wachstum. Dies deutet an, dass Foxo3a einen Wachstumsfaktor in EBNA3A-negativen LCLs darstellt. Bisher wurde in den EBNA3A-negativen LCLs jedoch keine Regulation der in der Literatur beschriebenen Foxo-Zielgene im Vergleich zu Wildtyp-LCLs beobachtet. Dies lässt eine Regulation von bisher unbekanntem Foxo3a-Zielgenen in LCLs vermuten.

Nachdem sowohl unsere eigenen Studien, wie auch die anderer Arbeitsgruppen zeigen, dass EBNA3A und EBNA3C funktionell in der Regulation von Zielgenen kooperieren, wurde im zweiten Teil dieser Arbeit auch die molekulare Interaktion dieser beiden Proteine untersucht. Die Heterodimerisierung von EBNA3A und EBNA3C wird über deren N-Terminus vermittelt und interferiert möglicherweise mit der Interaktion von CBF1 mit EBNA3A. Da auch eine Homodimerisierung von EBNA3A und EBNA3C in dieser Arbeit gezeigt wurde, ist es möglich, dass EBNA3A und EBNA3C Multiprotein-Repressorkomplexe auf Promotoren ausbilden und damit bei der Repression gemeinsamer Zielgene kooperieren. In transienten Promotor-Reporter-Gen-Studien konnte jedoch bisher keine Kooperation bei der Repression von EBNA3A und EBNA3C beobachtet werden. Diese Arbeit gibt Ansatzpunkte zur Konstruktion einer EBNA3A-Mutante, die die Interaktion mit EBNA3C nicht mehr vermittelt. Durch die Verwendung dieser Mutanten soll die Ausbildung des EBNA3A-EBNA3C-Komplexes und dessen Funktion bei der Genregulation endogen in LCLs untersucht werden.

1 Einleitung

1.1 Das Epstein-Barr Virus

Das Epstein-Barr Virus, auch humanes Herpesvirus 4 genannt, wurde 1964 von Epstein, Barr und Achon als das erste menschliche DNA-Tumorvirus entdeckt (Epstein et al., 1964). Es gehört zur Subfamilie der γ -Herpesviren und ist wie alle Herpesviren in der Lage, ein Leben lang im Wirt zu persistieren. Dieser Zustand wird Latenz genannt. Durch bisher unbekannte Mechanismen ist jedoch eine Reaktivierung des Virus und der Eintritt in den lytischen Zyklus möglich. EBV besitzt ein doppelsträngiges DNA-Genom mit einer Größe von 172 Kilobasen (kb), welches in der latent infizierten Wirtszelle als zirkuläres Episom vorliegt und mit Hilfe der zellulären Replikationsmaschinerie repliziert wird (Übersicht: Spear and Longnecker, 2003). Das Epstein-Barr Virus ist ubiquitär verbreitet und etwa 90% der Weltbevölkerung sind infiziert. Im Kindesalter verläuft die Infektion meist subklinisch, bei Jugendlichen und Erwachsenen kann sie jedoch zu einer infektiösen Mononukleose führen. Diese selbstlimitierende lymphoproliferative Erkrankung, auch als Pfeiffersches Drüsenfieber bekannt, äußert sich in Halsschmerzen, Fieber und geschwollenen Lymphknoten. Diese Symptome klingen nach einigen Wochen ab und werden durch eine erhöhte Produktion an T-Lymphozyten hervorgerufen, die eine verstärkte Immunantwort verursachen (Übersicht: Kieff and Rickinson, 2007).

Das Epstein-Barr Virus wird durch Speichel übertragen und infiziert ruhende menschliche B-Lymphozyten. Durch die Expression von elf viralen Genen, die Latenzgene genannt werden, bewirkt EBV zunächst die kontinuierliche Proliferation dieser Zellen. Anschließend persistiert das Virus in ruhenden B-Gedächtniszellen, die im peripheren Blut zirkulieren (Übersicht Rickinson and Kieff, 2007). *In vitro* führt die EBV-Infektion zur Immortalisierung und zum Auswachsen unbegrenzt proliferierender lymphoblastoider Zelllinien („Lymphoblastoide Cell Lines“; LCLs), welche als Modellsystem für einige EBV-assoziierte lymphoproliferative Krankheiten dienen. Aufgrund seiner Fähigkeit, Zellen zu transformieren, kann EBV auch an der Entstehung von Tumoren beteiligt sein.

1.1.1 Der Lebenszyklus von EBV

Wie bereits erwähnt, wird das Epstein-Barr Virus durch Speichel übertragen, infiziert ruhende B-Lymphozyten und persistiert anschließend in B-Gedächtniszellen. Wie das Virus zu den B-Zellen gelangt, ist bisher jedoch unklar. Wahrscheinlich überquert das Virus im Speichel die Epithelbarriere und infiziert die darunter liegenden B-Zellen. Auch über eine anfängliche Infektion von Epithelzellen wurde spekuliert, es gab jedoch keine direkten Beweise dafür (Übersicht Hutt-Fletcher, 2007). Die EBV-Infektion von B-Zellen erfolgt über die Bindung des

viralen Glykoproteins gp350/220 an den auf reifen B-Zellen exprimierten C3d-Komplementrezeptor CR2 (CD21) (Nemerow et al., 1985). Zusätzlich ist die Interaktion des Glykoproteins gp42 mit dem zellulären humanen Leukozyten-Antigen (HLA-DR) als Co-Rezeptor notwendig (Borza and Hutt-Fletcher, 2002). Anschließend wird das Viruspartikel über rezeptorvermittelte Endozytose in die Zelle aufgenommen, die doppelsträngige DNA wandert in den Zellkern, zirkularisiert und wird repliziert.

Eine Theorie, wie EBV in die B-Gedächtniszellen gelangt, wird von der Arbeitsgruppe von Thorley-Lawson vertreten. Sie besagt, dass EBV zur Infektion und zur Induktion der Proliferation von B-Zellen die Mechanismen der B-Zellaktivierung durch Antigenkontakt imitiert. So infiziert EBV *in vivo* naive B-Zellen und aktiviert sie, sodass sie zu proliferierenden B-Zellblasten werden, ins Keimzentrum wandern und schließlich zu B-Gedächtniszellen differenzieren (Babcock et al., 2000). Nach einer anderen Theorie der Arbeitsgruppe Küppers kann EBV nicht nur naive B-Zellen, sondern auch direkt B-Gedächtniszellen infizieren (Kurth et al., 2000).

Nach der Infektion der naiven B-Lymphozyten mit EBV werden diese aktiviert und differenzieren zu proliferierenden B-Zellblasten (Abb. 1.1). Während die Aktivierung der B-Zellen normalerweise durch T-Zellen erfolgt, stimuliert EBV diesen Prozess durch die Expression von elf Latenzgenen: die EBV-nukleären Antigene (EBNA) -1, -2, -3A, -3B, -3C und -LP, die latenten Membranproteine (LMP) -1, -2A, und -2B, und zwei kleine nicht polyadenylierte RNAs EBER1 und EBER2 (Übersicht: Kieff and Rickinson, 2007). Das Genexpressionsprogramm dieser Phase der Infektion wird Latenz III („Growth Program“) genannt und stellt ebenfalls das Expressionsmuster von *in vitro* EBV-immortalisierten B-Lymphozyten dar (LCLs). Anschließend wandern die aktivierten, EBV-infizierten B-Zellen ähnlich wie bei der Keimzentrumsreaktion in Follikel und differenzieren zu B-Gedächtnislymphozyten. In dieser Phase, welche Latenz II („Default Program“) genannt wird, werden nur noch die Gene EBNA1, LMP1 und LMP2A exprimiert. Es handelt sich dabei wahrscheinlich um eine Übergangsphase von der proliferierenden in die persistierende Phase. In der Latenz 0 („Latency Program“) werden keine viralen Gene exprimiert und das Virus persistiert in den B-Gedächtnislymphozyten. Dieser Zustand führt nicht mehr zur Eliminierung durch das Immunsystem. Wenn sich die B-Gedächtniszellen jedoch teilen, wird EBNA1 als einziges virales Gen exprimiert (Latenz I; „EBNA1 only Program“) (Thorley-Lawson, 2005). Dieses Programm wird in Burkitt-Lymphomzellen exprimiert (Übersicht Küppers, 2003). Durch bisher unbekannt Signale ist eine Reaktivierung der B-Gedächtnislymphozyten möglich. Dabei differenzieren die ruhenden EBV-infizierten B-Gedächtniszellen zu Plasmazellen aus und es kommt zur Produktion und Ausschüttung neuer Viruspartikel (Übersicht: Küppers, 2003). Diese Phase wird als lytischer Zyklus bezeichnet (Abb1.1).

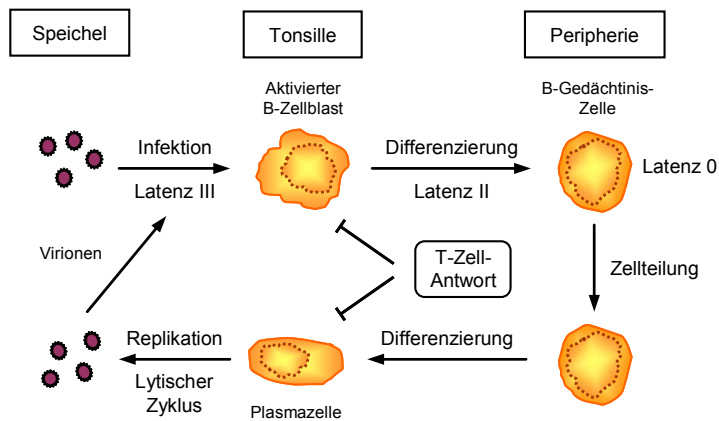


Abb. 1.1 Der Lebenszyklus von EBV
 EBV infiziert naive B-Zellen, die durch eine Keimzentrumsreaktion zu B-Gedächtniszellen differenzieren und in der Peripherie zirkulieren. Aufgrund unbekannter Signale kommt es in seltenen Fällen zu einer Reaktivierung der B-Gedächtniszellen, woraufhin diese zu Plasmazellen differenzieren und Virionen ausschütten, die zur erneuten Infektion naiver B-Zellen führen können. Infizierte B-Zellen werden in immunkompetenten Patienten durch T-Zellen erkannt und eliminiert.

1.1.2 Die Latenzgene von EBV

Die Phasen im Lebenszyklus von EBV, in denen es nicht zur Produktion und Ausschüttung von Viruspartikeln kommt, werden als Latenz bezeichnet. Die verschiedenen Latenzphasen sind durch spezifische Genexpressionsmuster gekennzeichnet (siehe vorheriger Abschnitt). In der Latenz III, in der die in dieser Arbeit untersuchten Proteine EBNA3A und EBNA3C exprimiert werden, werden insgesamt elf Latenzgene co-exprimiert, die im Folgenden näher beschrieben werden.

EBNA1 ist das einzige virale Protein, das direkt und sequenzspezifisch an DNA binden kann. Seine Bindung an den „Origin of Replication (*oriP*)“ ist sowohl zur Replikation, als auch zur Segregation des Episoms in Tochterzellen ausreichend (Übersicht: Lindner and Sugden, 2007).

EBNA2 ist zusammen mit EBNA-LP das erste virale Antigen, das nach der EBV-Infektion exprimiert wird und stellt den zentralen Transaktivator von EBV dar, der sowohl virale, als auch zelluläre Gene aktiviert. EBNA2 ist sowohl für die Initiation, als auch für die Aufrechterhaltung der Immortalisierung essentiell. Die Expression von EBNA2 und EBNA-LP wird zunächst vom W-Promotor kontrolliert. Anschließend bewirkt EBNA2 einen Wechsel vom W- zum C-Promotor, unter dessen Kontrolle die Expression von EBNA1 und der EBNA3-Proteine steht. Zusätzlich induziert EBNA2 die Expression von LMP1 und der LMP2-Proteine. Da EBNA2 nicht direkt an DNA binden kann, benutzt es das zelluläre DNA-Bindeprotein CBF1 als Adapter (Übersicht: Kempkes, 2005).

Die Proteine der EBNA3-Familie EBNA3A, -B und -C binden ebenfalls an das DNA-Adapterprotein CBF1 und wirken damit möglicherweise als Antagonisten der EBNA2-Funktion (Übersicht: Kieff and Rickinson, 2007). Da sie ein wichtiges Thema dieser Arbeit sind, werden sie später ausführlich besprochen.

LMP1, LMP2A und LMP2B sind integrale Membranproteine, die ligandunabhängig als Signalmoleküle fungieren und antiapoptotisch wirken. LMP1 ähnelt einem konstitutiv aktiven CD40-Rezeptor, einem Schlüsselprotein in der Aktivierung und Differenzierung von B-Zellen,

und stellt unabhängig von der Interaktion mit T-Zellen Überlebens- und Wachstumssignale bereit (Übersicht: Lam and Sugden, 2003). LMP2A imitiert den B-Zellrezeptor, der für das Überleben von B-Zellen in Abwesenheit eines Antigens notwendig ist und übermittelt Überlebenssignale an die Zelle (Übersicht: Thorley-Lawson, 2005). LMP2B dämpft durch Aggregatbildung mit LMP2A dessen Funktion (Rechsteiner et al., 2008).

EBER1 und EBER2 sind kleine nicht poly-adenylierte RNAs, deren Funktion nicht geklärt ist. Sie spielen keine essentielle Rolle in der Wachstumstransformation, haben jedoch möglicherweise antiapoptotische Funktionen (Übersicht: Clemens, 2006).

1.1.3 Virale Genexpression in EBV-assoziierten Tumorerkrankungen

Während es sich bei der in Kapitel 1.1 beschriebenen infektiösen Mononukleose um eine gutartig verlaufende Krankheit handelt, kann EBV durch seine Fähigkeit, Zellen zu transformieren auch zu Tumorerkrankungen führen. Neben der Entwicklung von B-Zelllymphomen ist EBV auch mit T-Zelllymphomen und epithelialen Karzinomen, wie dem Nasopharynx- und dem Magen-Karzinom assoziiert, auf welche hier jedoch nicht näher eingegangen wird (Übersicht: Middeldorp et al., 2003). Zu den EBV-assoziierten B-Zelllymphomen gehören das Burkitt-Lymphom und das Hodgkin-Lymphom, die bei immunkompetenten Personen auftreten, und immunoblastische B-Zelllymphome, die bei immunsupprimierten Personen vorkommen können. In Burkitt-Lymphomzellen ist das Genexpressionsmuster der Latenz I und in Hodgkin-Lymphomen das der Latenz II exprimiert. Im Folgenden wird nur auf B-Zelllymphome eingegangen, die das Genexpressionsmuster der Latenz III aufweisen, da nur in diesem Fall EBNA3A und EBNA3C co-exprimiert sind.

Während in gesunden Personen eine Balance zwischen EBV-infizierten B-Zellen und EBV-spezifischen zytotoxischen T-Zellen besteht, kann es in immunsupprimierten Personen zur Ausbildung von immunoblastischen Lymphomen kommen (Übersicht: Crawford, 2001; Küppers, 2003; Rickinson and Kieff, 2007; Thorley-Lawson, 2005). Diese sind zu 100% mit EBV assoziiert und exprimieren das Transkriptionsprogramm der Latenz III. Zu den immunoblastischen Lymphomen gehören das Posttransplant-Lymphom („Post transplant lymphoproliferative disease“; PTLD) und das Aids-assoziierte primäre ZNS-Lymphom („Primary central nervous system lymphoma“; PCNSL).

Bei der EBV-Infektion von naiven B-Zellen kommt es zur Expression des Wachstumsprogramms und schließlich zum Verlassen des Zellzyklus und zur Differenzierung in ruhende B-Gedächtniszellen. Diese Zellen können daher keine Lymphome bilden. Im Falle einer PTLD oder dem PCNSL kommt es zur Proliferation von B-Zellen, die den Zellzyklus nicht verlassen und zu ruhenden B-Zellen proliferieren können. Dies ist möglich, wenn eine nicht-naive B-Zelle aufgrund einer EBV-Infektion das Wachstumsprogramm exprimiert oder wenn es zur Aktivierung des Wachstumsprogramms in

einer EBV-infizierten B-Gedächtniszelle kommt. Aufgrund der Immunsuppression kann es anschließend zur unkontrollierten Proliferation dieser EBV-infizierten B-Zellen kommen, die nicht durch eine T-Zellantwort begrenzt werden kann. EBV-negative Transplantationspatienten haben zudem ein hohes Risiko, eine PTLD zu entwickeln, wenn sie ein Transplantat eines EBV-positiven Spenders erhalten. Neben der Reduktion der Immunsuppression wird zur Therapie der PTLD der B-Zell-spezifische Antikörper Rituximab (Wagner et al., 2004) eingesetzt. Eine weitere Therapiemöglichkeit ist die adoptive Immuntherapie, bei der EBV-spezifische zytotoxische T-Zellen (CTL) in Gegenwart von LCLs *in vitro* expandiert und anschließend reinfundiert werden (Hsieh et al., 1999). Da die EBNA3-Proteine auch in Tumorzellen exprimiert werden, stellen sie bei der adoptiven Immuntherapie wichtige Antigene für die Entwicklung EBV-spezifischer CTL dar.

Andere mit der Latenz III assoziierte B-Zelllymphome sind die lymphomatoide Granulomatose, das Phyothorax-assoziierte Lymphom und die Senile EBV-assoziierte Lymphoproliferation, der wahrscheinlich eine altersbedingte Immunschwäche zugrunde liegt (Übersicht: Rezk and Weiss, 2007).

1.2 Die Epstein-Barr Virus nukleären Antigene 3 (EBNA3)

1.2.1 Funktion und Proteinstruktur von EBNA3A und EBNA3C

Die EBNA3-Proteinfamilie besteht aus EBNA3A, EBNA3B und EBNA3C. Die Proteine des EBV Typ I haben eine Größe von 944 Aminosäuren (AS), 937 AS, bzw. 992 AS und ein apparentes Molekulargewicht von 145 Kilodalton (kDa), 165 kDa, bzw. 155 kDa (Hennessy et al., 1986; Petti and Kieff, 1988; Petti et al., 1988). Im N-Terminus besitzen alle Proteine eine stark konservierte Region, die sich bei EBNA3A zwischen AS 139-386, bei EBNA3B zwischen AS 145-404 und bei EBNA3C zwischen AS 146-410 befindet (Abb. 1.2). Die tandemartige Anordnung und die ähnliche Exon-Intron-Struktur der Gene lassen vermuten, dass sie durch Genduplikation entstanden sind (Dillner et al., 1986; Kallin et al., 1986). Die EBNA3-Proteine beeinflussen zahlreiche zelluläre Prozesse, wie die Aktivierung und Repression der Transkription und die Zellzyklusregulation, die im Folgenden näher ausgeführt werden.

Die B-Zellimmortalisierung durch EBV erfordert das Zusammenspiel von EBNA- und LMP-Latenzproteinen. Durch die Untersuchung von EBV-Mutanten wurden die Latenzproteine in die Gruppen unterteilt, die essentiell oder nicht essentiell für die Immortalisierung sind, abhängig davon, ob LCLs durch Infektion mit einem bestimmten defizienten Virus etabliert werden konnten, oder nicht. Die meisten bisherigen Publikationen haben gezeigt, dass EBNA3A und EBNA3C essentiell für die Immortalisierung von B-Zellen sind, während EBNA3B nicht-essentiell ist. In diesen Experimenten konnten durch die Infektion von B-Zellen mit einem EBNA3A-, bzw. EBNA3C-defizienten Virus nie LCLs etabliert werden

(Kempkes et al., 1995; Tomkinson et al., 1993), während dies mit einem EBNA3B-defizienten Virus möglich war (Tomkinson and Kieff, 1992). Weiterhin wurde in LCLs mit einem konditionalen EBNA3A, bzw. EBNA3C gezeigt, dass das Abschalten des jeweiligen Gens zum Wachstumsarrest der Zellen führte (Maruo et al., 2003; Maruo et al., 2006). Als besonders essentiell für die Transformation von B-Zellen wurde dabei die CBF1-Bindestelle von EBNA3A und EBNA3C identifiziert (Maruo et al., 2005; Maruo et al., 2009). Dennoch wurden in einzelnen Fällen EBNA3A-negative LCLs gefunden, die das Gen jedoch wahrscheinlich erst nach Etablierung der Latenz verloren hatten (Kempkes et al., 1995; Lee et al., 2001). Dies führte zu der Vermutung, dass EBNA3A möglicherweise nicht für die Aufrechterhaltung, wohl aber für die Initialisierung der Immortalisierung von B-Zellen notwendig ist.

In unserer Arbeitsgruppe konnten Marie Hertle und Claudia Popp jedoch vor kurzem zeigen, dass EBNA3A nicht essentiell für die Immortalisierung von B-Zellen ist. B-Zellen, die mit einem rekombinanten EBNA3A-defizienten EBV infiziert wurden, konnten etabliert und unbegrenzt expandiert werden. Diese Zelllinien wiesen jedoch eine verringerte Proliferationsrate und eine höhere Apoptoserate im Vergleich zu mit Wildtyp-EBV infizierten Zelllinien auf (Hertle et al., 2009). EBNA3A scheint damit nicht essentiell für die B-Zellimmortalisierung sein, trägt aber zur Viabilität von EBV-infizierten B-Zellen bei.

Zusätzlich war es Claudia Popp in unserer Arbeitsgruppe gelungen, EBNA3C-negative LCLs zu etablieren. Während die meisten EBNA3C-negativen LCLs ihr Wachstum nach 20-30 Tagen einstellten, konnten zwei LCLs unbegrenzt expandiert werden (Popp, 2006). Diese Beobachtung lässt auf eine essentielle Rolle von EBNA3C bei der Aufrechterhaltung, jedoch nicht bei der Initialisierung der Immortalisierung von B-Zellen schließen.

Da bisher wenige zelluläre Zielgene von EBNA3A und EBNA3C bekannt sind, wurden diese EBNA3A- und EBNA3C-negativen LCLs neben Wildtyp-LCLs in einem Affymetrix-Array zur genomweiten vergleichenden Genexpressionsanalyse zellulärer Zielgene eingesetzt (Hertle et al., 2009; Diplomarbeit Agnes Nowak). Die Identifizierung zellulärer Zielgene von EBNA3A und EBNA3C sollte deren Funktion bei der Transformation von B-Zellen weiter erhellen.

1.2.1.1 Interaktion von EBNA3A und EBNA3C mit dem DNA-Adapterprotein CBF1

Allen drei EBNA3-Proteinen ist die Bindung an das zelluläre DNA-Adapterprotein CBF1 gemeinsam, wodurch sie möglicherweise Antagonisten des viralen Transaktivators EBNA2 darstellen. CBF1, auch RBP-Jk genannt, ist ein zelluläres, ubiquitär exprimiertes Protein und gehört zur Familie der CSL-Proteine (CBF1 = C-Promoter-binding factor 1 beim Menschen; Su(H) in *Drosophila*; Lag1 in *C. elegans*; RBP-Jk bei der Maus). Es ist ein DNA-bindender Transkriptionsfaktor, der spezifisch die Konsensussequenz 5' CGTGGGAA 3' erkennt (Chung et al., 1994; Tun et al., 1994). Durch Assoziation mit einem Repressorkomplex, der aus verschiedenen Kombinationen der Proteine SMRT, NCoR, HDAC1/2, Sin3A, SAP30, CIR, SKIP und CtBP bestehen kann, ist CBF1 in der Lage, die Transkription zu reprimieren.

CBF1 ist ein Effektorprotein des Notch-Signalwegs, welcher die Proliferation und Differenzierung von Zellen beeinflusst. Notch ist ein Transmembranrezeptor, dessen intrazelluläre Domäne bei Ligandbindung abgespalten wird, in den Kern wandert und dort mit CBF1 interagiert. Dadurch wird der Repressorkomplex von CBF1 verdrängt und es kommt zur Aktivierung von CBF1-abhängigen Zielgenen (Übersicht: Borggrefe and Oswald, 2009). EBNA2 bildet das virale Funktionsäquivalent von Notch (Übersicht: Kempkes, 2005) und bindet ebenfalls an das DNA-Adaptermolekül CBF1 und verdrängt den Co-Repressorkomplex, wodurch es zur Derepression der Transkription kommt. EBNA2 aktiviert die Transkription zusätzlich, indem es die allgemeinen Transkriptionsfaktoren TFIID und TFIIB, die Histonacetyltransferasen p300/CBP, PCAF und den Chromatin-Remodelling-Komplex SWI/SNF rekrutiert.

Die EBNA3-Proteine können durch die Bindung an CBF1 mit der Transaktivierung von EBNA2-abhängigen Promotoren interferieren und so die Funktion von EBNA2 modulieren. So konnte in transienten Promotor-Reporter-Gen-Studien gezeigt werden, dass EBNA3A und EBNA3C mit der EBNA2-abhängigen Transaktivierung des viralen C-Promotors (Waltzer et al., 1996; Zhao et al., 1996), des LMP1-Promotors (Marshall and Sample, 1995; Robertson et al., 1995) und des LMP2A-Promotors interferieren (Le Roux et al., 1994). Die Repression der EBNA2-Transaktivierung war von einer intakten CBF1-Bindestelle der EBNA3-Proteine abhängig. Wie die EBNA3-Proteine die EBNA2-Funktion antagonisieren, ist umstritten. Diskutiert wird zum Einen, dass die Bindung der EBNA3-Proteine an CBF1 dessen Bindung an die DNA verhindert (Robertson et al., 1995; Robertson et al., 1996; Waltzer et al., 1996; Zhao et al., 1996). Zum Anderen wird eine direkte Konkurrenz zwischen den EBNA3-Proteinen und EBNA2 um die CBF1-Bindung und eine Rekrutierung der EBNA3-Proteine an die DNA durch CBF1 diskutiert (Cludts and Farrell, 1998; Johannsen et al., 1996; Krauer et al., 1996; Radkov et al., 1997).

Die Bindestelle von CBF1 liegt im N-Terminus der EBNA3-Proteine und wurde mit verschiedenen Methoden untersucht (Abb. 1.2). In GST-Affinitätsreinigungen von *in vitro* translatierten EBNA3A-Proteinfragmenten mit einem bakteriell exprimierten GST-CBF1-Fusionsprotein konnte die CBF1-Bindestelle auf die AS 1-224 von EBNA3A eingegrenzt werden (Cludts and Farrell, 1998; Zhao et al., 1996). Durch Expression von Fusionsproteinen aus EBNA3A und der GAL4-DNA-Bindedomäne (DBD) zusammen mit CBF1-GAL4-Aktivierungsdomäne (AD) in Säugerzellen (Mammalian Two-Hybrid) konnte die Bindedomäne weiter auf die AS 125-234, bzw. 222 von E3A eingegrenzt werden (Bourillot et al., 1998; Dalbies-Tran et al., 2001). Der Austausch der AS 199, 200 und 202, die in dem in den EBNA3-Proteinen konservierten Motiv ¹⁹⁸ATLGC²⁰² liegen, verhinderte die CBF1-Bindung des Proteinfragments AS 125-222. Im Gesamtprotein bewirkte der Austausch dieser Aminosäuren jedoch nur eine Reduktion der CBF1-Interaktion um ca. 50% (Dalbies-Tran et al., 2001; Maruo et al., 2005). Diese partielle Reduktion der CBF1-Interaktion lässt eine weitere CBF1-Bindestelle in EBNA3A vermuten. Tatsächlich gibt es Hinweise auf zusätzliche

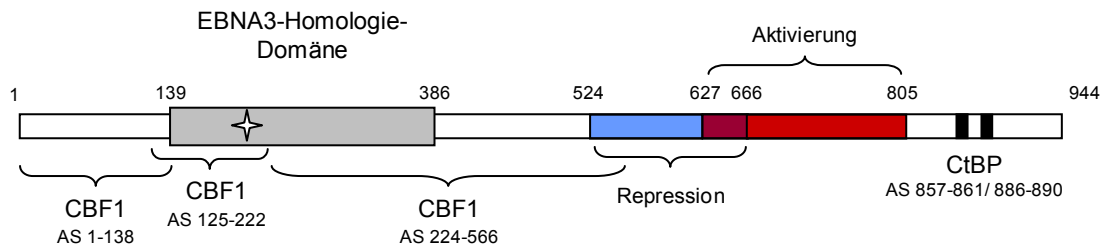
CBF1-Bindestellen im Bereich der AS 1-138 (Robertson et al., 1996) und der AS 224-566 von EBNA3A (Cludts and Farrell, 1998), die jedoch nicht bestätigt werden konnten.

Auch bei EBNA3C gibt es widersprüchliche Aussagen über die CBF1-Bindestelle. So wurden in einer Studie mittels GST-Affinitätsreinigung die AS 1-183 von EBNA3C als CBF1-Bindestelle identifiziert (Robertson et al., 1996). In einer anderen Studie war ein EBNA3C-Proteinfragment der AS 1-240 in der Lage, an CBF1 zu binden. Ein Proteinfragment von AS 1-183 vermittelte die Interaktion mit CBF1 jedoch nicht. Daher wurde die CBF1-Bindestelle in EBNA3C auf die AS 183-240 eingegrenzt (Zhao et al., 1996). Ein Austausch der AS 209-212, die innerhalb des konservierten Motivs ²⁰⁸ATFGC²¹² liegen (Zhao et al., 1996), führte zu einer Reduktion der CBF1-Bindung um ca. 70%, verhinderte sie aber nicht vollständig (West et al., 2004).

Trotz der gut untersuchten Interaktion von EBNA3A und EBNA3C mit CBF1 sind bisher keine Zielgene von EBNA3A und EBNA3C beschrieben, die CBF1-abhängig reguliert werden.

Außerdem wurde in einem genomweiten Yeast Two-Hybrid Screen zur Identifikation der Interaktionen der EBV-Proteine untereinander die Heterodimerisierung von EBNA3A und EBNA3C und die Homodimerisierung von EBNA3A gezeigt. Die Interaktion wurde durch den C-Terminus der beiden Proteine vermittelt, konnte jedoch nicht durch weitere biochemische Methoden bestätigt werden (Calderwood et al., 2007).

EBNA3A



EBNA3C

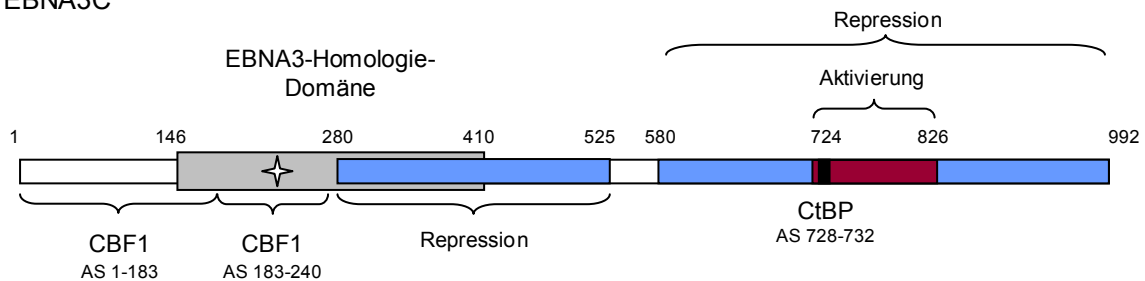


Abb. 1.2 Funktionelle Domänen und gemeinsame assoziierte Proteine von EBNA3A und EBNA3C

Die Homologie-Domäne der EBNA3-Proteine ist in grau dargestellt. In diesem Bereich von EBNA3A und EBNA3C liegt die CBF1-Bindestelle. Die weißen Sterne markieren die Region, in der ein Austausch von wenigen Aminosäuren zum partiellen Verlust der CBF1-Interaktion führte. Die Aktivierungsdomäne (rot) und die Repressionsdomänen (blau) überlappen zum Teil. Die Bindestelle von CtBP liegt im C-Terminus von EBNA3A und EBNA3C.

1.2.2 Transkriptionelle Aktivierung durch EBNA3A und EBNA3C

Obwohl EBNA3A und EBNA3C als Gesamtprotein die Transkription reprimieren, wurde auch die Aktivierung von Genen gezeigt. So konnten GAL4-DBD-Fusionsproteinfragmente von EBNA3A AS 627-805 (Dalbies-Tran et al., 2001) und EBNA3C AS 724-826 (Marshall and Sample, 1995) in Promotor-Reporter-Gen-Studien die Transkription von GAL4-abhängigen Promotoren aktivieren (Abb. 1.2).

Bisher sind sehr wenige Zielgene von EBNA3A identifiziert. Aufgrund der Induktion des Chaperons Hsp70 und der Co-Chaperone Hsp40 und Bag3 und der Interaktion mit diesen Proteinen, wurde eine Beteiligung von EBNA3A in der Stressantwort vermutet (Young et al., 2008). Die Induktion dieser Heatshock-Proteine konnte jedoch in einem in unserer Arbeitsgruppe durchgeführten Affymetrix-Array nicht bestätigt werden (Hertle et al., 2009). Zusätzlich interagiert EBNA3A mit der XAP-2 Untereinheit des Aryl-Hydrocarbon-Rezeptors (AhR) und mit AhR selbst und verstärkt die Aktivität dieses Transkriptionsfaktors (Kashuba et al., 2000; Kashuba et al., 2006). Zielgene, die durch diese Interaktion moduliert werden, wurden jedoch bisher nicht identifiziert.

Sehr früh wurde CD21 als ein durch EBNA3C induziertes Gen beschrieben (Wang et al., 1990). Es konnte jedoch kein direkter Effekt von EBNA3C auf den CD21-Promotor gezeigt werden (Radkov et al., 1997) und auch beim Abschalten eines konditionalen EBNA3C in LCLs konnte keine Abnahme von CD21 beobachtet werden (Maruo et al., 2006).

Gut untersucht ist die Aktivierung von LMP1 durch EBNA3C, welche zuerst in EBNA3C-exprimierenden Raji-Zellen beschrieben wurde (Allday et al., 1993; Allday and Farrell, 1994; Jimenez-Ramirez et al., 2006). In Promotor-Reporter-Gen-Studien konnte gezeigt werden, dass EBNA3C allein den LMP1-Promotor aktiviert und auch mit EBNA2 bei der Transaktivierung des LMP1-Promotors kooperiert. Diese Verstärkung der EBNA2-Transaktivierung war jedoch abhängig von der Zelllinie und der Zellzyklusphase der Zellen und wurde von mehreren Sequenzen des LMP1-Promotors vermittelt (Marshall and Sample, 1995). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Verstärkung der EBNA2-Transaktivierung des LMP1-Promotors durch EBNA3C nicht CBF1-abhängig war, sondern durch Mutation der Spi-1/Spi-B-Bindestelle im LMP1-Promotor inhibiert werden konnte (Lin et al., 2002; Zhao and Sample, 2000). Die anschließend gezeigte Interaktion von EBNA3C mit dem Transkriptionsfaktor Spi-1/Spi-B deutete darauf hin, dass EBNA3C und EBNA2 über Spi-1/Spi-B an die DNA binden und einen transkriptionell aktiven Komplex bilden können (Zhao and Sample, 2000).

Zusätzlich wurde in der EBNA3C-Region, die für die Transaktivierung des LMP1-Promotors notwendig ist, eine Bindestelle für die Proteine SUMO-1 und SUMO-3 („Small Ubiquitin-like Modifier“) identifiziert (Lin et al., 2002; Rosendorff et al., 2004), welche an der Proteindegradation beteiligt sind, jedoch auch transkriptionelle Effekte haben (Muller et al.,

2001). Durch Interaktion mit SUMO konnte EBNA3C die Transaktivierung durch p300 verstärken (Rosendorff et al., 2004).

Weiterhin hat die Arbeitsgruppe Robertson gezeigt, dass EBNA3C durch die Interaktion mit Nm23-H1 in der Lage ist, die Transkription zu aktivieren (Subramanian et al., 2001; Subramanian and Robertson, 2002). Durch die zusätzliche Komplexbildung mit den Transkriptionsfaktoren Sp1, AP1 und NF- κ B kann EBNA3C die Gene für MMP9 (Matrix-Metalloproteinase 9) (Kuppers et al., 2005), COX-2 (Cyclo-Oxygenase-2) (Kaul et al., 2006) und ITGA5 (Alpha V Integrin) (Choudhuri et al., 2006) induzieren. Nm23-H1 ist eine Nukleosid-Diphosphat-Kinase und ist mit der Metastasierung und Proliferation assoziiert (de la Rosa et al., 1995). Die Induktion der oben genannten Zielgene lässt eine Rolle von EBNA3C in der Metastasierung von EBV-positiven Tumoren vermuten. In einem in unserer Arbeitsgruppe durchgeführten Affymetrix-Array konnten MMP9, COX-2 und ITGA5 jedoch nicht als endogene EBNA3C-Zielgene bestätigt werden (Diplomarbeit Agnes Nowak).

1.2.3 Transkriptionelle Repression durch EBNA3A und EBNA3C

Obwohl die EBNA3-Proteine, wie eben gezeigt, auch Gene aktivieren können, fungieren EBNA3A und EBNA3C vor allem als Repressoren der Transkription. In Promotor-Reporter-Gen-Studien mit an die GAL4-DBD gekoppelten Fusionsproteinen reprimierten die Gesamtproteine von EBNA3A und EBNA3C einen GAL4-abhängigen Promotor (Bain et al., 1996; Bourillot et al., 1998). Dies lässt vermuten, dass die vorher beschriebenen Aktivierungsdomänen von EBNA3A und EBNA3C (Dalbies-Tran et al., 2001; Marshall and Sample, 1995) im Gesamtprotein maskiert sind. In weiteren Experimenten wurde eine Repressionsdomäne im Bereich der AS 524-666 von EBNA3A (Bourillot et al., 1998) und zwei Repressionsdomänen im Bereich der AS 280-525 und 580-992 von EBNA3C identifiziert (Bain et al., 1996) (Abb. 1.2).

Die anfangs erwähnte Repression des viralen C-Promotors durch EBNA3A und EBNA3C ist wahrscheinlich durch Konkurrenz mit EBNA2 um den DNA-Adapter CBF1 zu erklären. Daneben sind EBNA3A und EBNA3C auch allein in der Lage, den C-Promotor zu reprimieren. Da diese Repression von der intakten CBF1-Bindestelle in EBNA3A und EBNA3C abhängig ist, wird vermutet, dass CBF1 die EBNA3-Proteine an die DNA rekrutierte (Cludts and Farrell, 1998; Radkov et al., 1997).

Eine weitere Gemeinsamkeit von EBNA3A und EBNA3C ist die Bindung an den Co-Repressor CtBP über das Motiv ⁸⁵⁷VL⁸⁶¹LDLS⁸⁶¹/⁸⁸⁶ALDLS⁸⁹⁰ in EBNA3A, bzw. ⁷²⁸PLDLS⁷³² in EBNA3C (Abb. 1.2) (Hickabottom et al., 2002; Touitou et al., 2001). Während die Mutation der CtBP-Bindestelle in EBNA3A-GAL4-DBD in Promotor-Reporter-Gen-Studien zum Verlust der Repression eines GAL4-abhängigen Promotors führte (Hickabottom et al., 2002), war die Repression mittels CtBP im Gesamtprotein von EBNA3C weniger wichtig (Touitou et al., 2001). Die Interaktion von CtBP mit EBNA3A und EBNA3C ist bei der Transformation von

embryonalen Rattenfibroblasten (REFs) in Kooperation mit HA-*ras* essentiell (Hickabottom et al., 2002; Touitou et al., 2001), und trägt auch zur Transformation von B-Zellen durch EBV bei. Die Interaktion mit CtBP ist dabei jedoch nicht so wichtig, wie die Interaktion mit CBF1 (Maruo et al., 2005; Maruo et al., 2009).

Da die CtBP-Bindestelle im Gesamtprotein von EBNA3C keine entscheidende Rolle bei der EBNA3C-vermittelten Repression spielt, kann EBNA3C wahrscheinlich mit weiteren Co-Repressoren interagieren. So konnte gezeigt werden, dass EBNA3C mit der Histondeacetylase HDAC1 interagieren und dadurch den C-Promotor reprimieren kann (Radkov et al., 1999). Außerdem liegt EBNA3C in BJAB-Zellen in einem Komplex mit Prothymosin α (ProT α), HDAC1/2 und den Co-Repressoren mSin3A und NCoR vor. Durch die Assoziation von EBNA3C mit ProT α wurde dessen Deacetylase-Aktivität erhöht, was zur Repression der Transkription führte (Knight et al., 2003).

In einem anderen Komplex konnte EBNA3C mit ProT α und der Histonacetylase p300 interagieren (Cotter and Robertson, 2000; Subramanian et al., 2002). ProT α ist ein Kompetitor des Histon H1, welches die Chromatin-Kondensation fördert (Karetsou et al., 1998). Durch die Interaktion mit p300 ist ProT α an der Regulation der Histonacetylierung beteiligt (Cotter and Robertson, 2000). EBNA3C verhinderte die Interaktion von p300 und ProT α , wodurch es zur Kondensation und Deacetylierung der DNA und damit zur Repression der Transkription kam (Cotter and Robertson, 2000; Subramanian et al., 2002).

Wie bisher ausgeführt, haben EBNA3A und EBNA3C zum Teil gemeinsame Interaktionspartner, was auf ähnliche Funktionen hindeutet. So wurde in EBV-infizierten Burkitt-Lymphomzellen gezeigt, dass EBNA3A und EBNA3C kooperieren, um das proapoptische Gen Bim herunterzuregulieren und somit die Zellen vor Apoptose zu schützen (Anderton et al., 2008). Die Repression von Bim erfolgt wahrscheinlich durch die epigenetische Modifikation des Chromatins während der EBV-Infektion. So wurde gezeigt, dass der Bim-Promotor in frisch etablierten LCLs eine Trimethylierung des Histon H3 (H3K27-Me3) aufweist, während in länger etablierten LCLs und in EBV-infizierten Burkitt-Lymphomzellen eine DNA-Methylierung des Bim-Promotors nachzuweisen ist (Paschos et al., 2009). Beide Modifikationen sind mit der Repression oder dem Silencing von Genen assoziiert. Eine direkte Beteiligung von EBNA3A und EBNA3C bei der Chromatinmodifikation wurde jedoch nicht gezeigt.

Weitere potentielle Zielgene von EBNA3C sind ITGA4 (Integrin α 4) und TCL1A („T-cell leukemia/lymphoma 1 A“), welche durch EBNA3C aktiviert werden und JAG1 (Jagged1), NCALD (Neurocalcin D) und FLNA (Filamin A), die durch EBNA3C reprimiert werden (Chen et al., 2006a). In einem in unserer Arbeitsgruppe durchgeführten Affymetrix-Array wurden ACP5 („Gene Acid Phosphatase 5“) und FGR1 („Fibroblast Growth Factor Receptor 1“) als potentiell durch EBNA3C induzierte Gene und ADAM28 („A Disintegrin And Metalloproteinase Domain 28“) und JAK1 (Janus Kinase 1) als potentiell durch EBNA3C reprimierte Gene identifiziert (Diplomarbeit Agnes Nowak). Die Funktion dieser Gene wurde

jedoch noch nicht im Zusammenhang mit EBNA3C untersucht. Auch die Regulation von JAG1, NCALD, ITGA4 und TCL1A durch EBNA3C konnte in diesem Affymetrix-Array bestätigt werden.

Ein weiterer in unserer Arbeitsgruppe durchgeführter Affymetrix-Array führte zur Identifikation mehrerer potentieller EBNA3A-Zielgene, die entsprechend einer GO Term-Analyse zu einem Großteil mit der Funktion „Apoptose“ und „Zellzyklus“ assoziiert waren (Hertle et al., 2009). Die identifizierten potentiellen Zielgene von EBNA3A wurden zum Teil durch EBNA3C co-reguliert, wobei es auch entgegengesetzt regulierte Gene gab (Daten nicht veröffentlicht). Die Funktion eines durch EBNA3A und EBNA3C co-regulierten Gens soll in dieser Arbeit untersucht werden.

1.2.4 Regulation des Zellzyklus durch die EBNA3-Proteine

Die EBV-Infektion von B-Zellen führt zur kontinuierlichen Proliferation und Transformation dieser Zellen. Neben der Nachahmung der B-Zellaktivierung durch ein Antigen, ist EBV auch in der Lage, in die Regulation des Zellzyklus einzugreifen. Dies erfolgt zum Einen durch die Transkriptionskontrolle von Zellzykluskomponenten und zum Anderen durch die Interaktion mit Zellzyklus-relevanten Proteinen.

Das erste Mal wurde EBNA3C in Zusammenhang mit der Zellzyklusregulation gebracht, als gezeigt wurde, dass EBNA3C-exprimierende Raji-Zellen einen durch Serumentzug induzierten Wachstumsarrest in der G1-Phase überkommen konnten (Allday and Farrell, 1994). Weitere Untersuchungen zeigten, dass EBNA3C in Kooperation mit dem Protoonkogen Ha-ras REFs transformieren konnte und auch in diesen Zellen das Überschreiten eines durch Serumentzug induzierten G1-Arrests bewirkte. Zusätzlich konnte die exogene Expression von EBNA3C die durch den CDK-Inhibitor p16-induzierte Inhibierung der REF-Transformation verhindern (Parker et al., 1996). Eine mögliche Erklärung dafür ist die Anreicherung von p16 nach Abschaltung von EBNA3C in konditional EBNA3C-exprimierenden LCLs. Dies deutet darauf hin, dass p16 ein Zielgen von EBNA3C ist (Maruo et al., 2006). In einem in unserer Arbeitsgruppe durchgeführten Affymetrix-Array konnte auch die Repression von p16 durch EBNA3A nachgewiesen werden (Hertle et al., 2009). Außerdem wurde gezeigt, dass EBNA3C *in vitro* an pRb bindet, dessen Inaktivierung und damit das Fortschreiten des Zellzyklus indirekt durch p16 inhibiert werden, und EBNA3C somit möglicherweise die Funktion von pRb moduliert (Parker et al., 1996). Durch Rekrutierung des SCF^{SKP2}-Komplexes, einem E3-Ubiquitin-Ligase-Komplex, konnte EBNA3C außerdem die Ubiquitylierung und Degradation von pRb bewirken (Knight et al., 2005a). Dadurch wird der Transkriptionsfaktor E2F nicht mehr inhibiert und der Eintritt in die S-Phase ermöglicht. Eine weitere Möglichkeit für EBNA3C, den Eintritt in die S-Phase zu initiieren, ist die Interaktion mit c-Myc und die Stabilisierung dieses Onkoproteins, wodurch die c-Myc-regulierte Transkription erhöht wird (Bajaj et al., 2008).

Durch Interaktion mit Cyclin A ist EBNA3C in der Lage, den Übergang von der S- in die G2- und M-Phase zu regulieren. Zum Einen verhinderte EBNA3C die Interaktion von Cyclin A mit dem CDK-Inhibitor p27 und erhöhte so die Kinaseaktivität von Cyclin A/Cdk2 (Knight and Robertson, 2004; Knight et al., 2004). Zum Anderen rekrutierte EBNA3C den SCF^{SKP2}-Komplex über die Interaktion mit Cyclin A zu p27 und bewirkte so die Ubiquitylierung und Degradation von p27 (Knight et al., 2005b).

Neben dem G1/S-Checkpoint können die EBNA3-Proteine auch den G2/M-Checkpoint regulieren. So konnte EBNA3C das Überschreiten eines Nocodazol-induzierten mitotischen Spindel-Checkpoints bewirken, was zur Entstehung von multinukleären Zellen führte (Parker et al., 2000). Außerdem führte die Expression der einzelnen EBNA3-Proteine in DG75 zum Überschreiten eines Genotoxin-induzierten G2/M-Checkpoints (Krauer et al., 2004). Weitere Untersuchungen zeigten, dass sowohl EBNA3A, als auch EBNA3C mit der Checkpoint Kinase 2 (chk2) interagieren können und möglicherweise deren Funktion modulieren (Choudhuri et al., 2007; Krauer et al., 2004). Dadurch kann EBNA3C im Fall von DNA-Schäden die Inaktivierung des cdc2/Cyclin B-Komplexes und den G2/M-Arrest verhindern (Choudhuri et al., 2007).

Weiterhin wurde gezeigt, dass EBNA3C die De-Ubiquitylierung und damit Stabilisierung des Proteins Mdm2 ermöglichen kann. Mdm2 besitzt Ubiquitin-Ligaseaktivität und bewirkt die Degradation des Tumorsuppressor-Proteins p53. Durch Stabilisierung von Mdm2 fördert EBNA3C indirekt den Abbau von p53 (Saha et al., 2009).

Somit kann vor allem EBNA3C den Zellzyklus sowohl durch die positive Regulation von Onkoproteinen, wie pRb und c-Myc, als auch durch die negative Regulation von Tumorsuppressor-Proteinen wie p16, p27 und p53 regulieren.

1.3 Die Foxo-Transkriptionsfaktoren

1.3.1 Überblick

Im Folgenden wird die Funktion und Regulation einer Gruppe von Transkriptionsfaktoren, der Foxo-Proteine, erläutert, die im Verlauf der vorliegenden Arbeit eine wichtige Rolle spielen werden.

Die Foxo-Transkriptionsfaktoren gehören zur Gruppe der Forkhead-Proteine, die durch eine konservierte 110 Aminosäuren lange DNA-Bindedomäne gekennzeichnet ist. Diese DNA-Bindedomäne (Forkhead-Box; Fox) wird wegen ihrer Struktur auch als geflügelte Helix (Winged Helix) bezeichnet und wurde zuerst in einem Protein von *Drosophila melanogaster* identifiziert (Weigel et al., 1989). Mittlerweile wurden zahlreiche Proteine mit diesem Motiv identifiziert und in Untergruppen der Fox-Proteine eingeteilt (Kaestner et al., 2000). Im Menschen sind 39 Mitglieder der Forkhead-Familie bekannt, welche in 19 Untergruppen (A-

S) eingeteilt sind und verschiedene Aufgaben während der Entwicklung übernehmen (Lehmann et al., 2003).

Die O-Untergruppe der Forkhead-Familie in Säugern umfasst die Proteine Foxo1a, Foxo3a, Foxo4 und Foxo6, wobei Foxo1a, 3a und 4 in nahezu allen Geweben exprimiert werden (Anderson et al., 1998; Biggs et al., 2001; Furuyama et al., 2000), während Foxo6 überwiegend im sich entwickelnden Gehirn exprimiert ist (Jacobs et al., 2003).

Die Foxo-Proteine sind aus zwei Domänen aufgebaut: der N-terminalen DNA-bindenden Forkhead-Domäne und einer C-terminal gelegenen Transaktivierungsdomäne. Über die DNA-Bindedomäne erfolgt die Bindung an die Konsensus-Sequenz 5' TTGTTTAC 3', auch „Foxo Responsive Element“ (FRE) genannt (Furuyama et al., 2000).

Da die Foxo-Proteine Foxo1a, 3a und 4 ubiquitär exprimiert sind und auch die gleiche Konsensussequenz erkennen, besitzen sie im Organismus vermutlich redundante Funktionen. Dies konnte bereits im Mausmodell bestätigt werden, denn nur die Deletion aller drei Foxo-Gene führte zur Entwicklung von Lymphomen und Hämangiomen. Mäuse, in denen nur zwei Foxo-Proteine deletiert waren, wiesen nur einen schwachen Phänotyp auf. Dennoch besitzen die Foxo-Proteine wohl organspezifische Funktionen. Obwohl die Foxo-Proteine in sehr vielen Organen exprimiert sind, war die Tumorentwicklung bei Deletion der Foxo-Proteine im Mausmodell auf Thymozyten und bestimmte Endothelzellen beschränkt (Übersicht: Arden, 2007; Tothova and Gilliland, 2007)

Die Gruppe der Foxo-Proteine hat zwei Funktionen. Zum Einen können sie die Apoptose von Zellen induzieren. Zum Anderen können die Foxo-Proteine bei Zellstress aber auch den Zellzyklusarrest induzieren und die DNA-Reparatur begünstigen. Durch die Induktion von detoxifizierenden Proteinen können sie außerdem die Zellschädigung durch reaktive Sauerstoffspezies vermindern. Durch diese Eigenschaften können sie das Überleben von Zellen begünstigen. So konnte in *C. elegans* und *Drosophila* gezeigt werden, dass die Foxo-Transkriptionsfaktoren die Fähigkeit besitzen, die Lebensspanne des Gesamtorganismus zu verlängern (Übersicht: Kenyon, 2005). Da die Foxo-Transkriptionsfaktoren auch in Säugetierzellen eine Stressresistenz vermitteln und die gleichen Zielgene haben, wurde untersucht, ob die Foxo-Proteine auch in Säugern die Lebensspanne regulieren. Säuger exprimieren jedoch vier Isoformen der Foxo-Proteine, sodass die Deletion eines Proteins möglicherweise durch ein anderes funktionell kompensiert werden kann. Es konnte jedoch in zwei unabhängigen Studien an japanischen und deutschen Hundertjährigen gezeigt werden, dass drei SNPs („Single Nucleotide Polymorphisms“) des Foxo3a-Gens signifikant mit Langlebigkeit assoziiert sind (Flachsbart et al., 2009; Willcox et al., 2008).

1.3.2 Foxo-assoziierte Tumorerkrankungen

Da die Foxo-Transkriptionsfaktoren die Proliferation und auch die Apoptose von Zellen regulieren, wurde früh vermutet, dass sie Tumorsuppressor-Proteine darstellen. Tatsächlich

konnte der Verlust der Foxo-Funktion in einigen humanen Krebsarten beobachtet (Übersicht: Weidinger et al., 2008). Die Ursachen einer Foxo-Deregulation können entweder genetische Defekte oder eine veränderte posttranslationale Regulation sein. So konnte in Alveolaren Rhabdomyosarkomen und Akuten Myeloiden Leukämien die chromosomale Translokation des Foxo1a-Gens, bzw. der Gene für Foxo3a und Foxo4 gezeigt werden. Durch die Chromosomenbrüche wurde die DNA-Binderegion der Foxo-Proteine unterbrochen, wodurch es zum Verlust der tumorsuppressiven Funktion der Foxo-Proteine kam. Zusätzlich weisen einige Prostata-Krebsarten den heterozygoten Verlust des Foxo1a-Gens auf, wodurch es zur erhöhten Proliferation der Krebszellen kommt. Eine posttranslationale Suppression der Foxo-Proteine durch die Missregulation des PI3K-Signalwegs konnte bei Prostata-Krebs, Akuter Myeloider Leukämie und Colon-Krebs gezeigt werden. Weiterhin wurde in Brustkrebszellen die Repression der Foxo-Proteine durch die Überexpression der Kinase Ikk β beobachtet, welche ebenfalls zur posttranslationalen Regulation der Foxo-Proteine beiträgt.

1.3.3 Regulation der transkriptionellen Aktivität der Foxo-Transkriptionsfaktoren

1.3.3.1 Posttranslationale Regulation durch den PI3K/AKT-Signalweg

Bisher ist vor allem die posttranslationale Regulation der transkriptionellen Aktivität der Foxo-Proteine bekannt. Am besten ist dabei Regulation durch den PI3K/AKT-Signalweg untersucht (Abb. 1.3).

Binden Insulin oder Wachstumsfaktoren an ihre Rezeptoren, wird PI3K (Phosphoinositid-3-Kinase) intrazellulär zu den Rezeptoren rekrutiert (Übersicht: Datta et al., 1999) und phosphoryliert PIP₂ (Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat) zu PIP₃ (Phosphatidylinositol-1,4,5-triphosphat) (Toker and Cantley, 1997). Durch PIP₃ werden die Kinasen PDK1 („Phosphoinositide-dependent Kinase 1“) und AKT (auch PKB; Proteinkinase B) an die Membran rekrutiert, und AKT wird durch PDK1 phosphoryliert (Übersicht: Datta et al., 1999). Die Foxo-Proteine werden durch AKT an spezifischen konservierten Threonin- und Serinresten phosphoryliert (Abb.1.3) (Biggs et al., 1999; Brownawell et al., 2001; Brunet et al., 1999; Kops et al., 1999; Rena et al., 1999), anschließend durch 14-3-3-Proteine gebunden und aus dem Kern ins Zytoplasma exportiert (Biggs et al., 1999; Brunet et al., 1999; Brunet et al., 2002). Die Bindung der 14-3-3-Proteine bewirkt wahrscheinlich eine Konformationsänderung der Foxo-Proteine, wodurch die Kernexportsequenz exponiert wird und eine Interaktion mit Exportin α /CRM1 ermöglicht wird (Brunet et al., 2002). Außerdem verhindern die 14-3-3-Proteine möglicherweise einen Reimport der Foxo-Proteine, indem sie die Kernlokalisierungssequenz maskieren (Brownawell et al., 2001; Rena et al., 2001). Im Zytoplasma sind die Foxo-Proteine nicht stabil und werden über den Ubiquitin-Proteasom-Weg abgebaut (Aoki et al., 2004; Huang et al., 2005; Matsuzaki et al., 2003; Plas and Thompson, 2003).

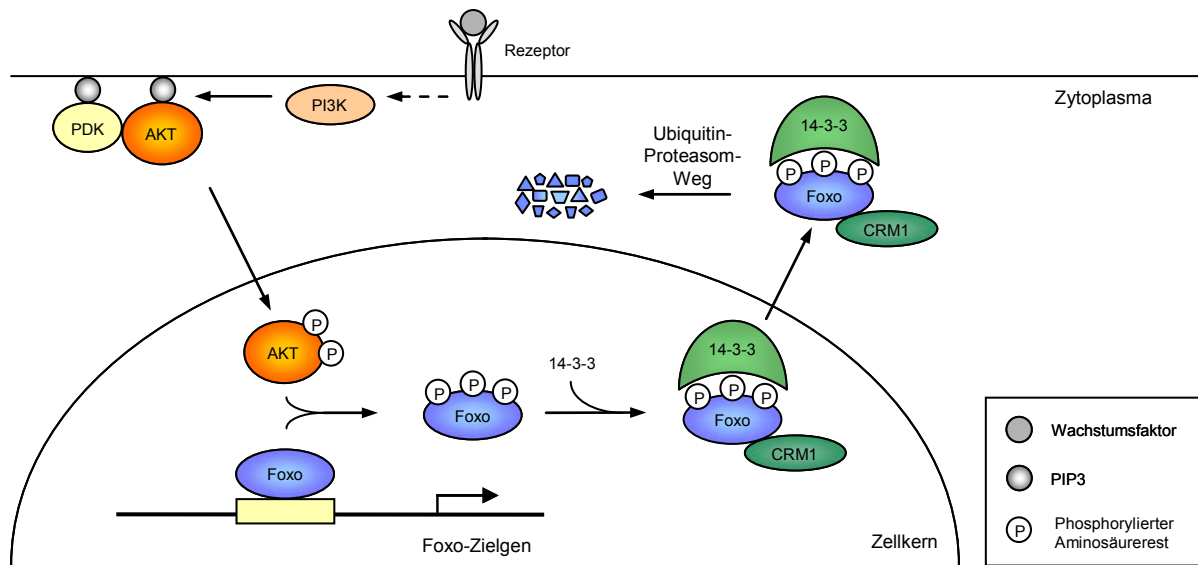


Abb. 1.3 Posttranslationale Regulation von Foxo durch den PI3K/AKT-Signalweg

In Anwesenheit von Wachstumsfaktoren wird AKT über PI3K und PDK phosphoryliert und gelangt in den Zellkern. Dort phosphoryliert AKT die an die DNA gebundenen Foxo-Transkriptionsfaktoren an drei spezifischen Stellen. Phosphorylierte Foxo-Proteine werden von 14-3-3-Proteinen gebunden und über CRM1 ins Zytoplasma transportiert. Dort werden sie über den Ubiquitin-Proteasom-Weg abgebaut.

1.3.3.2 Weitere Arten der funktionellen Regulation der Foxo-Proteine

Neben der Regulation durch den PI3K/AKT-Signalweg gibt es noch weitere Möglichkeiten, die transkriptionelle Aktivität der Foxo-Proteine zu regulieren.

So können die Foxo-Proteine auch durch die Kinase SGK (Serum/Glucocorticoid induzierte Kinase), welche ebenfalls durch PDK1 aktiviert wird, phosphoryliert werden (Brunet et al., 2001). Daneben kann Foxo3a durch die Kinase IKK β („Inhibitor-of NF- κ B Kinase β “) phosphoryliert werden, was zur Polyubiquitylierung und zum Abbau im Proteasom führt (Hu et al., 2004). Weitere Kinasen, die zur Inaktivierung der Foxo-Proteine führen, sind DYRK („Dual-Specificity Tyrosine Phosphorylation-regulated Kinase“) und CK1 (Casein-Kinase 1) (Rena et al., 2002).

Bei oxidativem Stress kann es jedoch zur Phosphorylierung durch JNK (Jun N-terminale Kinase) kommen, was eine Relokalisation der Foxo-Proteine in den Kern bewirkt. Dies wurde bisher für Foxo4 und das Foxo-Homolog daf-16 in *C. elegans* gezeigt (Essers et al., 2004; Oh et al., 2005). Foxo3a kann bei oxidativem Stress durch MST1 („Mammalian Ste20-like Kinase“) an der DNA-Bindedomäne phosphoryliert werden (Lehtinen et al., 2006). Dadurch wird die Interaktion mit den 14-3-3-Proteinen verhindert, was ebenfalls zu einer Relokalisation in den Kern führt.

Weiterhin kann das Transaktivierungspotential der Foxo-Proteine durch Acetylierung reguliert werden. Die Interaktion mit den Acetyltransferasen CBP und p300 (Fukuoka et al., 2003; Nasrin et al., 2000; van der Horst et al., 2004) erhöht das Transaktivierungspotential der Foxo-Proteine durch die Acetylierung von Histonen. Dagegen kann die Acetylierung der Foxo-Proteine ihre Aktivität reprimieren, da sich viele Acetylierungsstellen in der DNA-

Bindedomäne befinden und Acetylierung die DNA-Bindung inhibiert (Daitoku et al., 2004; Fukuoka et al., 2003). Die Deacetylierung der Foxo-Proteine kann durch die Deacetylase SIRT1 erfolgen, wobei die Auswirkung auf die transkriptionelle Aktivität der Foxo-Proteine genspezifisch ist (Brunet et al., 2004; Daitoku et al., 2004; Motta et al., 2004; van der Horst et al., 2004). So kann die Deacetylierung der Foxo-Proteine zum Einen die Induktion von Genen zur Stressresistenz bewirken (Brunet et al., 2004; van der Horst et al., 2004) und zum Anderen die Foxo-induzierte Apoptose verhindern (Brunet et al., 2004; Motta et al., 2004). Somit kann SIRT1 die Balance zwischen Apoptose und Stressresistenz beeinflussen.

Eine weitere Art der posttranslationalen Regulation ist die Ubiquitylierung. Dabei bewirkt die Polyubiquitylierung durch SKP2 die Degradation der Foxo-Proteine (Huang et al., 2005), während die Monoubiquitylierung durch einen bisher unbekanntem Faktor zum Kernimport der Foxo-Proteine führt (Arden, 2006; van der Horst et al., 2006).

Relativ neu ist die Beobachtung, dass die Expression der Foxo-Proteine auch durch microRNAs reguliert werden kann. So konnte in humanen Melanomzellen eine erhöhte Expression der miR-182 gezeigt werden. Diese verstärkte die Zellproliferation und –Migration durch die Repression von Foxo3a (Segura et al., 2009). Auch in Brustkrebszellen wurde die erhöhte Expression der miR-182 beobachtet. Die Überexpression von miR-182, miR-27a und miR-96 führten hier zur erhöhten Zellproliferation durch die Repression der Translation von Foxo1a (Guttilla and White, 2009).

Über die transkriptionelle Regulation der Foxo-Proteine ist nur wenig bekannt. Bisher konnte lediglich in Neuroblastomzellen die Induktion der Transkription von Foxo1a und Foxo3a durch Bindung des Transkriptionsfaktors E2F-1 an die Promotoren der Foxo-Proteine gezeigt werden (Nowak et al., 2007).

1.3.4 Funktion und Zielgene

Wie anfangs erwähnt, sind die Foxo-Transkriptionsfaktoren in der Lage, über ihre DNA-Bindedomäne direkt an die Promotoren von Zielgenen zu binden. Neben der Aktivierung der Transkription von Zielgenen wurde auch die Repression durch Foxo beobachtet (Ramaswamy et al., 2002), wobei für die Repression von Zielgenen keine DNA-Bindung durch Foxo notwendig ist (Bouchard et al., 2007; Ramaswamy et al., 2002). Die Foxo-Transkriptionsfaktoren haben zwei verschiedene Funktionen. Zum Einen können sie als Tumorsuppressor-Proteine die Apoptose und den Zellzyklusarrest im Fall einer DNA-Schädigung induzieren. Zum Anderen fördern sie die Langlebigkeit von Zellen durch die Induktion des Zellzyklusarrests, sowie die Förderung der DNA-Reparatur und den Schutz vor reaktiven Sauerstoffspezies (ROS).

In Abbildung 1.4 sind diese Funktionen mit ihren dazugehörigen Zielgenen dargestellt. Zusätzlich sind die Foxo-Transkriptionsfaktoren am Glukosemetabolismus und der Muskel-Atrophie beteiligt, auf welche hier jedoch nicht eingegangen wird.

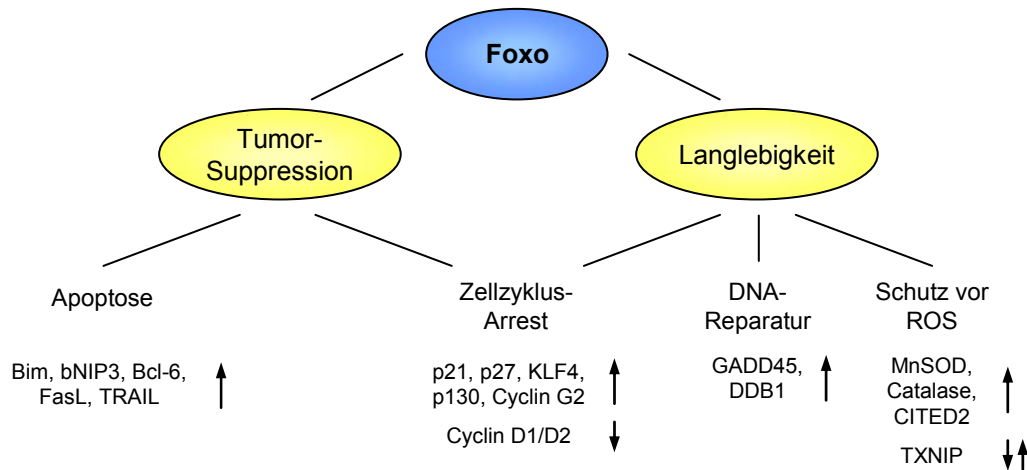


Abb. 1.4 Wichtige Zielgene der Foxo-Transkriptionsfaktoren

Die Zielgene der Foxo-Transkriptionsfaktoren sind beteiligt an der Induktion der Apoptose, der Regulation des Zellzyklus und der DNA-Reparatur und am Schutz vor reaktiven Sauerstoffspezies. Die Pfeile deuten an, ob die an diesen Funktionen beteiligten Zielgene durch Foxo induziert oder reprimiert werden.

Die Überexpression von konstitutiv aktiven Formen der Foxo-Proteine kann vor allem in Neuronen zur Apoptose führen (Brunet et al., 1999; Dijkers et al., 2002; Gilley et al., 2003; Zheng et al., 2000). Verantwortlich für die Aktivierung der Apoptose ist unter anderem die Induktion der proapoptotischen Mitglieder der Bcl-2-Familie Bim (Dijkers et al., 2000; Gilley et al., 2003) und bNIP3 (Real et al., 2005). Zusätzlich können die Foxo-Transkriptionsfaktoren indirekt das antiapoptotische Mitglied der Bcl-2-Familie Bcl-X_L durch die Induktion des transkriptionellen Repressors Bcl-6 reprimieren (Tang et al., 2002). Weitere für die Foxo-induzierte Apoptose wichtige Zielgene sind die Zytokine FasL (Brunet et al., 1999) und TRAIL (Modur et al., 2002).

Die Foxo-Proteine sind durch mehrere Mechanismen in der Lage, den Zellzyklus zu regulieren. So wird durch Überexpression der Foxo-Transkriptionsfaktoren der Übergang von der G1- in die S-Phase verhindert. Dafür ist unter anderem die Induktion des CDK-Inhibitors p27 verantwortlich (Medema et al., 2000). Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Foxo-Transkriptionsfaktoren in Anwesenheit von TGF- β und in Kooperation mit Smad-Proteinen p21 induzieren, wodurch es zum G1-Arrest kommen kann (Seoane, 2004). Neben der Induktion von Zellzyklus-Inhibitoren können die Foxo-Transkriptionsfaktoren den Zellzyklus auch durch die Repression von Zellzyklus-Aktivatoren regulieren. So können die Foxo-Proteine durch die Repression von Cyclin D1 und D2 den Übergang von der G1- in die S-Phase verhindern (Ramaswamy et al., 2002; Schmidt et al., 2002). Zusätzlich kann der G2/M-Übergang durch die Induktion des auch an der DNA-Reparatur beteiligten Proteins GADD45 („Growth arrest- and DNA damage-inducible Protein 45“) verzögert werden (Furukawa-Hibi et al., 2002; Tran et al., 2002).

Neben dem Zellzyklusarrest können die Foxo-Transkriptionsfaktoren den Austritt von Zellen aus dem Zellzyklus in den reversiblen Ruhezustand, die Quieszenz (G₀-Phase), bewirken. Dies erfolgt durch die Induktion des Pocketproteins p130 und von Cyclin G2 (Chen et al.,

2006b; Kops et al., 2002a; Martinez-Gac et al., 2004). Der Wiedereintritt in den Zellzyklus kann durch Inaktivierung der Foxo-Proteine über AKT induziert werden (Kops et al., 2002b). Zusätzlich regulieren die Foxo-Proteine die DNA-Reparatur durch die Induktion des an der Nukleotid-Exzissionsreparatur beteiligten Proteins DDB1 („DNA damage-binding Protein 1“) (Chen et al., 2008; Ramaswamy et al., 2002). Auch die Induktion von GADD45 (Furukawa-Hibi et al., 2002; Tran et al., 2002) kann zur DNA-Reparatur beitragen, da es den G2/M-Arrest induziert, während dem die DNA-Reparatur stattfinden kann und GADD45 auch durch die Interaktion mit PCNA die DNA-Reparatur begünstigen kann (Übersicht: Liebermann and Hoffman, 2008).

Eine weitere wichtige Funktion der Foxo-Transkriptionsfaktoren ist die Regulation von Enzymen, die ROS unschädlich machen können. So wurde bei Überexpression von Foxo-Proteinen eine Verringerung der durch ROS verursachten Schädigung von Zellen beobachtet. Dieser Effekt wird vermutlich durch die Foxo-Zielgene MnSOD (Mangan-Superoxiddismutase) (Kops et al., 2002b) und Catalase (Nemoto and Finkel, 2002) vermittelt. Das Foxo-Zielgen TXNIP ist in der Zellantwort bei oxidativem Stress involviert und wird durch Foxo reprimiert (de Candia et al., 2008), wodurch möglicherweise das Überleben der Zellen verbessert wird (Mitsui et al., 2002). Es gibt jedoch auch Hinweise auf eine Induktion von TXNIP durch Foxo (Li et al., 2009). CITED2 wird unter hypoxischen Bedingungen durch Foxo induziert und verhindert die durch das proapoptotische Gen HIF1 induzierte Apoptose (Bakker et al., 2007).

1.3.5 Foxos in B-Lymphozyten und EBV-infizierten Zellen

Für das Immunsystem ist die Aufrechterhaltung der Homöostase sehr wichtig. Um den Ruhezustand und die Kapazität zur Selbsterneuerung von hämatopoetischen Stammzellen zu erhalten, ist die Expression der Foxo-Proteine essentiell. Die Deletion aller drei Foxo-Proteine im hämatopoetischen System im Mausmodell führte zu einer Abnahme von hämatopoetischen Stammzellen, da diese vermehrt in den Zellzyklus eintraten und differenzierten und ein höheres Apoptoselevel aufwiesen. Zusätzlich war in Foxo-negativen hämatopoetischen Stammzellen das ROS-Level stark erhöht. Diese Beobachtungen zeigen, dass die Expression der Foxo-Proteine die Zellen des hämatopoetischen Systems schützt und deren Lebensdauer erhöht (Übersicht: Arden, 2007; Tothova and Gilliland, 2007).

Durch die Deletion der Foxo-Proteine im Mausmodell wurde gezeigt, dass Foxo1a spezifische Funktionen zu verschiedenen Zeitpunkten der B-Zellentwicklung übernimmt und kontextspezifische Zielgene reguliert. Die Deletion von Foxo3a hatte in diesem Modell jedoch keine Auswirkung auf den Phänotyp. Daher ist Foxo1a wohl besonders kritisch in der frühen B-Zellentwicklung (Dengler et al., 2008).

Auch für ruhende B-Zellen ist die Aufrechterhaltung der Quieszenz notwendig, bis sie durch ihr spezifisches Antigen aktiviert werden. Für die Proliferation von aktivierten B-Zellen ist

dabei die PI3K-abhängige Inaktivierung der Foxo-Transkriptionsfaktoren essentiell (Yusuf et al., 2004): in ruhenden B-Lymphozyten sind die Foxo-Proteine exprimiert, werden jedoch bei Ligandbindung des B-Zellrezeptors (BCR) oder bei BCR-Crosslinking PI3K-abhängig phosphoryliert und inaktiviert (Stahl et al., 2002; Yusuf et al., 2004). Zusätzlich kann es in murinen B-Zellen durch BCR-Crosslinking auch zur Repression der Foxo-mRNA kommen (Hinman et al., 2007). Die Überexpression der Foxo-Proteine führt jedoch zur Apoptose oder zum Zellzyklusarrest (Chen et al., 2006b; Dijkers et al., 2002; Yusuf et al., 2004). Die Aufrechterhaltung der Quieszenz von hämatopoetischen Stammzellen und ruhenden B-Zellen wird möglicherweise durch die Aktivierung der die G0-Phase induzierenden Foxo-Zielgene KLF4, Cyclin G2 und p130 vermittelt (Chen et al., 2006b; Yusuf et al., 2008).

Da EBV den Mechanismus der B-Zellaktivierung imitiert, müssen die Foxo-Transkriptionsfaktoren möglicherweise auch bei der Immortalisierung durch EBV reprimiert werden. Tatsächlich wurde in EBV-infizierten Burkitt-Lymphomzellen die Repression von Foxo1a durch die Expression der Latenzgene LMP1 und LMP2 gezeigt (Shore et al., 2006). Diese Repression wird wahrscheinlich über zwei Wege vermittelt. Zum Einen aktivieren LMP1 und LMP2A den PI3K-Signalweg (Übersicht: Young and Rickinson, 2004) und reprimieren Foxo1a indirekt über den PI3K-Signalweg. Zum Anderen konnte auch eine Repression der Transkription von Foxo1a in LCLs beobachtet werden (Shore et al., 2006). Eine Beteiligung von LMP1 an der Regulation von Foxo3a konnte in Nasopharynx-Karzinomzellen (NPC) gezeigt werden. Die Expression von LMP1 führte zur PI3K-abhängigen Phosphorylierung und zum Kernexport von Foxo3a. Außerdem konnte LMP1 die Foxo3a-induzierte DNA-Reparatur über DDB1 reduzieren (Chen et al., 2008).

1.4 Ziel des Projekts

Zu Beginn meiner Arbeit galten die EBV-Latenzproteine EBNA3A und EBNA3C als absolut essentiell in der B-Zelltransformation. Dennoch war es in unserer Arbeitsgruppe gelungen, EBNA3A-negative LCLs zu etablieren, deren Proliferation jedoch vermindert gegenüber WT-LCLs war. Auch EBNA3C-negative LCLs konnten in unserer Arbeitsgruppe etabliert werden. Bis auf zwei Ausnahmen stellten jedoch alle EBNA3C-negativen LCLs ihr Wachstum nach ca. 20-30 Tagen ein. Die EBNA3C-negativen Langzeit-LCLs, die etabliert werden konnten, wiesen ebenfalls eine reduzierte Proliferationsrate gegenüber Kontrollzellen auf. Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass EBNA3A nicht essentiell für das Auswachsen EBV-immortalisierter B-Zellen ist, jedoch zur Viabilität dieser Zellen beiträgt. EBNA3C ist offenbar für die Aufrechterhaltung, jedoch nicht für die Initialisierung der Immortalisierung notwendig. Die Proteine der EBNA3-Familie sind transkriptionelle Repressoren und können an den DNA-Adapter CBF1 binden. Dennoch waren zu Beginn meiner Arbeit nur sehr wenige Zielgene von EBNA3A und EBNA3C identifiziert. Um die Funktion der EBNA3-Proteine weiter zu erhellen, wurde in unserer Arbeitsgruppe eine genomweite vergleichende

Genexpressionsanalyse zellulärer Zielgene (Affymetrix-Array) mit den EBNA3A- und EBNA3C-negativen LCLs im Vergleich zu Wildtyp-LCLs durchgeführt.

Da EBNA3A und EBNA3C zum Teil gemeinsame Interaktionspartner und redundante Funktionen haben, wurde in dieser Arbeit das in den Affymetrix-Arrays sowohl durch EBNA3A, als auch durch EBNA3C reprimierte Gen Foxo3a untersucht. Die Tumorsuppressor-Proteine der Foxo-Familie besitzen zwei verschiedene Funktionen. Zum Einen kann Foxo die Apoptose induzieren. Zum Anderen kann die Expression der Foxo-Proteine Zellen schützen, indem sie bei Zellstress den Zellzyklus arretieren und die DNA-Reparatur fördern und durch die Induktion detoxifizierender Gene die Zellschädigung durch ROS reduzieren. In hämatopoetischen Stammzellen und ruhenden B-Zellen sind die Foxo-Proteine zusätzlich für die Aufrechterhaltung der Quieszenz notwendig.

Die EBV-Infektion von ruhenden B-Zellen führt zu deren kontinuierlicher Proliferation. Dafür ist möglicherweise die kooperative Repression von Foxo3a durch EBNA3A und EBNA3C notwendig, da Foxo3a andernfalls einen Zellzyklusarrest induzieren könnte. Die Expression von Foxo3a in den in unserer Arbeitsgruppe etablierten EBNA3A- und EBNA3C-negativen LCLs erklärt möglicherweise die erhöhte Apoptoserate dieser Zellen. Eine andere Hypothese ist, dass Foxo3a in EBNA3A- und EBNA3C-negativen LCLs einen Wachstumsfaktor darstellt und vielleicht erst deren Auswachsen ermöglicht, indem Foxo Zielgene induziert, welche die Zellen unter Stressbedingungen schützen. Die vorliegende Arbeit soll die Funktion von Foxo3a in den EBNA3A- und EBNA3C-negativen LCLs untersuchen.

EBNA3A und EBNA3C besitzen redundante Funktionen und können, wie für Foxo3a in dieser Arbeit und Bim von der Arbeitsgruppe Allday gezeigt (Anderton et al., 2008), auch bei der Repression von Genen kooperieren. Eine solche Kooperation kann auf zwei Wegen stattfinden. Entweder können EBNA3A und EBNA3C an zwei verschiedenen Stellen im Promotor von Zielgenen binden, oder sie können miteinander interagieren und dadurch mehrere Co-Repressoren rekrutieren. Die Interaktion von EBNA3A und EBNA3C wurde in einem genomweiten Yeast Two-Hybrid Screen zur Identifikation von EBV-Interaktionen erstmalig beschrieben (Calderwood et al., 2007). Daher soll im zweiten Teil meiner Arbeit die Interaktion von EBNA3A und EBNA3C genauer analysiert werden. Ziel dieser Untersuchung ist es, Hinweise zu erhalten, ob EBNA3A und EBNA3C bei der Repression der Transkription kooperieren und ob die Interaktion der beiden Proteine notwendig für die Kooperation ist. Durch die Bestimmung der minimalen Binderegion von EBNA3C in EBNA3A soll es außerdem möglich sein, EBV-Mutanten zu generieren, in denen die Interaktion von EBNA3A und EBNA3C nicht mehr stattfinden kann. Durch Immortalisierung von B-Zellen mit solchen Viruspartikeln soll die Funktion der Interaktion von EBNA3A und EBNA3C bei der Zielgenregulation *in vivo* untersucht werden.

2 Material

2.1 Kulturen

2.1.1 Hefestamm

Hefestamm	Beschreibung
AH109	<i>MATa</i> ; <i>trp1-901</i> ; <i>leu2-3, 112</i> ; <i>ura3-52</i> ; <i>his3-200</i> ; <i>gal4Δ</i> , <i>gal80Δ</i> ; <i>LYS2::GAL1UAS-GAL1TATA-HIS3</i> , <i>GAL2UAS-GAL2TATA-ADE2</i> ; <i>URA3::MEL1UAS-MEL1TATA-lacZ</i>

2.1.2 Bakterienstämme

Bakterienstamm	Beschreibung
<i>E. coli</i> DH5α	F ⁻ , <i>lacI</i> -, <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> , Δ(<i>lacZYA-argF</i>), U169, F80d <i>lacZ</i> ΔM15, <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> ; Invitrogen, UK
<i>E. coli</i> DH10B	F ⁻ , <i>mcrA</i> , Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>), φ80 <i>lacZ</i> ΔM15, Δ <i>lacX74</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>araD139</i> , Δ(<i>ara, leu</i>)7697, <i>galJ</i> , <i>galK</i> , λ-, <i>rpsL</i> , <i>nupG</i> , <i>tonA</i> ; Invitrogen, UK
<i>E. coli</i> Stbl3	F ⁻ , <i>mcrB</i> , <i>mrr</i> , <i>hsdS20</i> (<i>r_B</i> -, <i>m_B</i> -), <i>recA13</i> , <i>supE44</i> , <i>ara-14</i> , <i>galK2</i> , <i>lacY1</i> , <i>proA2</i> , <i>rpsL20</i> (Str ^R), <i>xyf-5</i> , λ-, <i>leu</i> , <i>mtl-1</i> ; Invitrogen, UK
<i>E. coli</i> DB3.1	F ⁻ , <i>gyrA462</i> , <i>endA1</i> , <i>glnV44</i> , Δ(<i>sr1-recA</i>), <i>mcrB</i> , <i>mrr</i> , <i>hsdS20</i> (<i>r_B</i> -, <i>m_B</i> -), <i>ara-14</i> , <i>galK2</i> , <i>lacY1</i> , <i>proA2</i> , <i>rpsL20</i> (Sm ^R), <i>xyf5</i> , Δ <i>leu</i> , <i>mtl-1</i> ; Invitrogen, UK

2.1.3 Zelllinien

Tab. 2.1 Allgemeine Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung
721	LCL, immortalisiert mit EBV-Stamm B95.8 (Sugden and Mark, 1977)
DG75	EBV-negative Burkitt-Lymphomzelllinie (Ben-Bassat et al., 1977)
HEK293	Humane, embryonale Epithelzelle aus einem Nierenkarzinom (Graham et al., 1977)
HEK293FT	Humane, embryonale Epithelzelle aus einem Nierenkarzinom, stabil transfiziert mit dem Plasmid pCMVSPORT6TA _g .neo zur Expression des SV40 Large T Antigens (Invitrogen, UK)

Tab. 2.2 In der AG Kempkes hergestellte Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung
CP364-1WT	LCL, immortalisiert mit dem Wildtyp Maxi-EBV (Plasmid 2089)
CP364-42ΔE3A	LCL, immortalisiert mit dem Maxi-EBV ΔEBNA3A (Plasmid Be715)
CP1060WT	LCL, immortalisiert mit dem Wildtyp Maxi-EBV (Plasmid 2089)
CP1063ΔE3A	LCL, immortalisiert mit dem Maxi-EBV ΔEBNA3A AS126-944 (Plasmid Be714)
CP541-1WT	LCL, immortalisiert mit dem Wildtyp Maxi-EBV (Plasmid 2089)
CP543-8ΔE3C	LCL, immortalisiert mit dem Maxi-EBV ΔEBNA3C
CP544-1WT	LCL, immortalisiert mit dem Wildtyp Maxi-EBV (Plasmid 2089)
CP546-3ΔE3C	LCL, immortalisiert mit dem Maxi-EBV ΔEBNA3C
SM224.9/ DG75 ^{CBF1-}	Humane EBV-negative Burkitt-Lymphomzelllinie DG75 mit vollständiger Deletion von CBF1 (Maier et al., 2005)

Tab. 2.3 In dieser Arbeit hergestellte Zelllinien

Zelllinie	Ursprungszelllinie	Beschreibung
SP1129.2.1shF3A	CP364-42ΔE3A	LCL, transduziert mit dem lentiviralen Vektor zur Expression einer shRNA gegen Foxo3a (Plasmid SP1043.1)
SP1253shF3A		
SP1129.2.3GFP		LCL, transduziert mit dem lentiviralen Vektor zur Expression von GFP (Plasmid pLenti-V5-GFP)
SP1308.1scrambled		LCL, transduziert mit dem lentiviralen Vektor zur Expression einer scrambled shRNA für Foxo3a (Plasmid SP1263)

2.2 Oligonukleotide/ Primer

Alle Oligonukleotide wurden bei Metabion GmbH, Deutschland synthetisiert.

Tab. 2.4 Primer für die Klonierung mit dem Gateway®-System

In fett sind die Sequenzen der zur Klonierung in den Vektor pDonor207 notwendigen *attB*-Sites dargestellt. Die forward Primer (fo) enthalten am 5'-Ende einen Teil der *attB*1-Site, während die reversen Primer (re) einen Teil der *attB*2-Site enthalten. Die Primer SP343.1 ex fo und SP343.2 ex re sind im 3' Bereich komplementär zu dem Teil der *attB*-Sites, der über die spezifischen Primer angehängt wurde und enthalten im 5'-Bereich den Rest der *attB*-Sites. „Nt“ bezeichnet das erste komplementäre Nukleotid des Primers bezogen auf die cDNA des Gens. Die Primer wurden so gewählt, dass sie „in frame“ mit dem Startcodon ATG der *attB*1-Site und dem Stopcodon UAG (CTA) der *attB*2-Site waren.

Bezeichnung	Genfragment	Sequenz 5' → 3'
SP343.1 ex fo	Universelle Primer zur Vervollständigung der <i>attB</i> -Sites	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT
SP343.2 ex re		GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT
SP352.1 fo	EBNA3A ab Nt 1	AAAAAGCAGGCTCCGCCATGGACAAGGACAGGCCGG
SP810.1 fo	EBNA3A ab Nt 208	AAAAAGCAGGCTCCGCCATGGATGCCGGTGGGTACAGCT
SP979.1 fo	EBNA3A ab Nt 298	AAAAAGCAGGCTCCGCCATGGATCTAAGAACTTCTTCAAG
SP352.2 fo	EBNA3A ab Nt 418	AAAAAGCAGGCTCCGCCATGGCCATTCGACAGGCCA
SP352.3 fo	EBNA3A ab Nt 673	AAAAAGCAGGCTCCGCCATGGGGATCGCCAGTGGTTGT
SP352.4 fo	EBNA3A ab Nt 1489	AAAAAGCAGGCTCCGCCATGGTGGCGTGTGCACCAAGTA
SP446 re	EBNA3A bis Nt 414	AGAAAGCTGGGTCTAGGCATACATTATGTACATCTCG
SP352.1 re	EBNA3A bis Nt 666	AGAAAGCTGGGTCTAACATCGCGGCAGCTTAAAGG
SP979.2 re	EBNA3A bis Nt 750	AGAAAGCTGGGTCTAGAAAATACTGTAGCGGGGATT
SP352.2 re	EBNA3A bis Nt 1158	AGAAAGCTGGGTCTAACGTCTTATAAATATAGGGGG
SP352.3 re	EBNA3A bis Nt 1698	AGAAAGCTGGGTCTAGGGGCCCTGCATAGCAATC
SP352.4 re	EBNA3A bis Nt 2835	AGAAAGCTGGGTCTAGGCCTCATCTGGAGGATCTT

Tab. 2.5 Primer für die zielgerichtete Mutagenese

Die Primer für die zielgerichtete Mutagenese enthielten am 5'-Ende eine Phosphatgruppe (P) und wurden über HPLC aufgereinigt. Die mutierten Nukleotide sind fett dargestellt. Der Primer, über den die Punktmutationen eingeführt werden sollten, wurde so gewählt, dass links und rechts der mutierten Nukleotide ein komplementärer Bereich von 10 Nukleotiden vorhanden war.

Bezeichnung	Funktion	Sequenz 5' → 3'
SP1284 fo	Mutation der AS 199, 200 und 202 von EBNA3A (cDNA: Nt 595-609)	P-ATCTCCAGGCGGCAGCTGGGGCCACAGGTGGC
SP1284 re		P-GTACGAATGTGGGAGTCGTCTGG

Tab. 2.6 Primer für die Real-Time RT-PCR (in der AG Kempkes vorhanden)

Die Oligonukleotide für die Real-Time RT-PCR wurden mit dem Programm Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>) entworfen. Die Primer wurden so gewählt, dass das Amplifikat Exon-Intron-Grenzen enthält und so bei einer eventuellen Kontamination zwischen cDNA-Produkt und genomischer DNA unterschieden werden konnte.

Bezeichnung	Produkt	Sequenz 5' → 3'
GS43.1 fo	18S rRNA	CGGCTACCACATCCAAGGAA
GS43.1 rev		GCTGGAATTACCGCGGCT
MH996fw	Foxo1a	ACGAGTGGATGGTCAAGAGC
MH996rev		GTTGTTGTCCATGGATGCAG
MH1028fw	Foxo3a	ATGGGAGCTTGGAAATGTGAC
MH1028rev		GAGAGCAGATTTGGCAAAGG

Tab. 2.7 Oligonukleotide zur Expression von shRNAs

Die shRNA-Sequenz gegen Foxo3a wurde mit dem Programm RNAi Designer von Invitrogen (<https://rnaidesigner.invitrogen.com/rnaiexpress/>) erstellt. Die Sequenz für die scrambled shRNA wurde aus der Sequenz von SP969.1 top mit dem Programm siRNA Wizard von Invivogen (<http://www.sirnawizard.com/scrambled.php>) erstellt und mit dem RNAi Designer in eine shRNA umgewandelt. In kursiv sind die Sequenzen für die Klonierung in den Vektor pENTR/U6 dargestellt. Die Sequenz in fett bildet bei der intramolekularen Paarung des Moleküls einen Loop aus. Die beiden Stränge der shRNA, wie auch die Sequenzen rechts und links von der Loop-Sequenz sind komplementär zueinander.

Bezeichnung	Ziel	Sequenz 5' → 3'
SP969.1 top	Foxo3a	CACCGTTACCATAGTGTGACATGGAAC CGAATT CCATGTCCACTATGGTAA
SP969.2 bot		AAAATTACCATAGTGTGACATGGAAT TCGTT CCATGTCCACTATGGTAAC
SP1206.1 top	Scrambled zu SP969	CACCGCATGTTAACGCGTAAGTAGTAC CGAATACTACTT ACGCGTTAACATGC
SP1206.2 bot		AAAAGCATGTTAACGCGTAAGTAGTAT TCGTA CTACTTACGCGTTAACATGC

Tab. 2.8 Oligonukleotide für die Protein-Affinitätspräzipitation

Zur Affinitätspräzipitation von Foxo3a mittels eines Oligonukleotids, das das Foxo Responsive Element (FRE; fett gedruckt) enthält, wurde ein Strang am 5'-Ende mit einem Biotin-Tag (bio) versehen. In dem Kontroll-Oligonukleotid (FRE_{mut}) wurden zwei Nukleotide in der Konsensussequenz durch ein G ersetzt. Die Sequenz des Oligonukleotids wurde übernommen von (Tsai et al., 2007).

Bezeichnung	Funktion	Sequenz 5' → 3'
SP1345.1	Foxo Responsive Element (FRE)	bio-CGCATCCTAT GTAACA ACTCGAGTC
SP1345.2		GACTCGAGTT GTTTAC ATAGGATGCG
SP1345.3	FRE _{mut}	bio-CGCATCCTATGTAGGCAACTCGAGTC
SP1345.4		GACTCGAGTTGCCTACATAGGATGCG

2.3 Plasmide

Die folgenden Tabellen beschreiben die in dieser Arbeit verwendeten oder hergestellten Plasmide. Bei Plasmiden, die zur Expression von Proteinfragmenten dienen, wurde der kodierte Aminosäurebereich durch die Abkürzung „AS“ angegeben.

Tab. 2.9 Leervektoren und in der Arbeitsgruppe Kempkes vorhandene Expressionsvektoren

Bezeichnung	Beschreibung	Herkunft
pMYCCR3-Dest	Säuger-Destination-Vektor zur Expression von N-MYC-Fusionsproteinen; Ursprungsvektor pCR3	AG Jürgen Haas, Pettenkofer Institut, München
pHACR3-Dest	Säuger-Destination-Vektor zur Expression von N-HA-Fusionsproteinen; Ursprungsvektor pCR3	
pGADT7-Dest	Hefe-Destination-Vektor zur Expression von HA-GAL4-AD-Fusionsproteinen für Yeast Two-Hybrid System; Ursprungsvektor pGADT7	
pGBKT7-Dest	Hefe-Destination-Vektor zur Expression von MYC-GAL4-DBD-Fusionsproteinen für Yeast Two-Hybrid System; Ursprungsvektor pGBKT7	
pLenti-V5-GFP	Expressionsvektor zur Produktion lentiviraler Vektoren zur Expression von GFP in Säugerzellen	
pDonor207	Donor-Vektor	
pENTR/U6	Entry-Vektor zur Konstruktion einer Kasette zur Expression von shRNAs unter dem U6-Promotor	
pLenti/BLOCK-iT-Dest	Destination-Vektor zur Produktion lentiviraler Vektoren zur Expression von shRNAs in Säugerzellen	
pLP1, pLP2, pLP/VSVG	Helferplasmide zur Produktion lentiviraler Vektoren	
VA59	HA-EBNA3A in pcDNA3	AG Martin Allday, Imperial College, London
VA60	HA-EBNA3A _{VLDAA/ALDAA} in pcDNA3; CtBP _{mut}	
SP430	(EBNA3C-CDS-pTrcHisB) EBNA3C ohne Intron in pTrcHisB	AG Josef Mautner; Helmholtz Zentrum München
GAL4-TK	GAL4-abhängiger Luziferase-Reporter unter der Kontrolle eines nicht-stringent regulierten Thymidin-Kinase-Promotors; (10 GAL4-Bindestellen)	AG Stefan Bohlander; Helmholtz Zentrum München
CBF1-VP16	Säugervektor zur Expression von CBF1-VP16 unter einem SV40-Promotor	AG Franz Oswald; Universitätsklinik Ulm
pMYCSS1	Säugervektor zur Expression von N-MYC-Fusionsproteinen; Ursprungsvektor pcDNA3	AG Bettina Kempkes; Helmholtz Zentrum München
pHACS1	Säugervektor zur Expression von N-HA-Fusionsproteinen; Ursprungsvektor pcDNA3	
CR3.8	EBNA3C mit Intron in pDonor207	
SP9	EBNA3A in pGBKT7	
BS20.1-Dest	Säuger-Destination-Vektor zur Expression von MYC-GAL4-DBD-Fusionsproteinen	
BS32	BS20.1 ohne att-Kasette	
SP30.3	CBF1 in pGADT7	
YK110.1	EBNA3C AS 1-300 in pDonor207	
YK6.1	EBNA3C AS 1-409 in pDonor207	
YK109.1	EBNA3C AS 335-667 in pDonor207	
YK6.3	EBNA3C AS 620-992 in pDonor207	

YK122.4.3	EBNA3C AS 1-300 in pMYCCR3-Dest	
YK118.1	EBNA3C AS 1-409 in pMYCCR3-Dest	
YK122.2.3	EBNA3C AS 335-667 in pMYCCR3-Dest	
YK118.3	EBNA3C AS 620-992 in pMYCCR3-Dest	
CMV- β -Gal	Säugervektor zur Expression der β -Galaktosidase unter der Kontrolle des CMV-Promotors	
GA981-6	CBF1-abhängiger Luziferase-Reporter unter der Kontrolle eines β -Globinpromotors; (12 CBF1-Bindestellen)	

Tab. 2.10 Durch Gateway[®]-BP-Reaktion hergestellte Entry-Vektoren in pDonor207

Zur Herstellung der Entry-Vektoren wurde das gewünschte Genfragment über eine PCR-Reaktion amplifiziert, in der zusätzlich die für die BP-Reaktion notwendigen *attB*-Sites angehängt wurden. Für die 1. PCR wurden die angegebenen spezifischen Primer verwendet. Für die 2. PCR wurden die für das Gateway[®]-System universellen Primer SP343.1 ex fo und SP343.2 ex re verwendet, welche die *attB*-Sites vervollständigen. Anschließend erfolgte die BP-Reaktion in den Donorvektor pDonor207.

Bezeichnung	Kodiertes Proteinfragment	Verwendete Primer	Template
SP389	EBNA3A	SP352.1 fo; SP352.4 re	VA59
SP460.1	EBNA3A AS 1-138	SP352.1 fo; SP446 re	VA59
SP992	EBNA3A AS 100-250	SP979.1 fo; SP979.2 re	VA59
SP365.1	EBNA3A AS 1-222	SP352.1 fo; SP352.1 re	VA59
SP746.1	EBNA3A AS 1-386	SP352.1 fo; SP352.2 re	VA59
SP746.2	EBNA3A AS 1-566	SP352.1 fo; SP352.3 re	VA59
SP836	EBNA3A AS 70-944	SP810.1 fo; SP352.4 re	VA59
SP824.1	EBNA3A AS 139-944	SP352.2 fo; SP352.4 re	VA59
SP824.2	EBNA3A AS 224-944	SP352.3 fo; SP352.4 re	VA59
SP365.4	EBNA3A AS 496-944	SP352.4 fo; SP352.4 re	VA59
SP915	EBNA3A AS 496-944 _{VLDAA/ALDAA} ; CtBP _{mut}	SP352.4 fo; SP352.4 re	VA60

Tab. 2.11 Durch Gateway[®]-LR-Reaktion hergestellte Expressionsvektoren

Die Expressionsvektoren wurden durch LR-Reaktion zwischen den angegeben Entry-Vektoren und den jeweiligen Destination-Vektoren hergestellt.

Bezeichnung	Beschreibung		Verwendete Entry-Vektoren
	Kodiertes Proteinfragment	Destination-Vektor	
SP548	EBNA3A	pMYCCR3-Dest	SP389
SP664.1	EBNA3A AS 1-222	pHACR3-Dest	SP365.1
SP751.1	EBNA3A AS 1-386	pHACR3-Dest	SP746.1
SP751.2	EBNA3A AS 1-566	pHACR3-Dest	SP746.2
SP854	EBNA3A AS 70-944	pHACR3-Dest	SP836
SP831.1	EBNA3A AS 139-944	pHACR3-Dest	SP824.1
SP932	EBNA3A AS 224-944	pHACR3-Dest	SP824.2
SP664.4	EBNA3A AS 496-944	pHACR3-Dest	SP365.4
SP664.5	EBNA3A AS 1-138	pHACR3-Dest	SP460.1
SP926	EBNA3A AS 496-944 _{VLDAA/ALDAA} ; CtBP _{mut}	pHACR3-Dest	SP915
SP770.1	GAL4-DBD-EBNA3A	BS20.1	SP389
SP1008	EBNA3A AS 100-250	pHACR3-Dest	SP992

SP1321	EBNA3A AS1-222 ^{AAAAGA} ; CBF1 ^{mut}	pHACR3-Dest	SP1303
SP518	EBNA3C	pGADT7-Dest	SP509
SP519	EBNA3C	pHACR3-Dest	
SP520	EBNA3C	pMYCCR3-Dest	
SP770.2	GAL4-DBD-EBNA3C	BS20.1	
SP1043.1	Foxo3a-shRNA	pLenti/BLOCK-iT-Dest	SP993.1
SP1263	Scrambled Foxo3a-shRNA	pLenti/BLOCK-iT-Dest	SP1244

Tab. 2.12 Durch sonstige Klonierung hergestellte Plasmide

Bezeichnung	Beschreibung	Klonierungsweg
SP509	EBNA3C in pDonor207	Verdau von CR3.8 und SP430 mit <i>Xba</i> I und <i>Acc</i> I; Ligation des 1097 bp-Fragments aus SP430 mit dem 5260 bp-Fragment aus CR3.8
SP993.1	Foxo3a-shRNA in pENTR/U6	Annealing der Oligonukleotide SP969.1 top und SP969.2 bot, bzw. SP1206.1 top und SP1206.2 bot; Ligation in den linearen Vektor pENTR/U6
SP1244	Scrambled Foxo3a-shRNA in pENTR/U6	
SP1250	EBNA3A ^{VLDAA/ALDAA} in pMYCCR3-Dest; Mutation in CtBP-Bindestelle	Verdau von SP548 und SP926 mit <i>Hpa</i> I und <i>Xho</i> I; Ligation des 407 bp-Fragments von SP926 mit dem 7554 bp-Fragment von SP548
SP1303	EBNA3A AS1-222 ^{AAAAGA} in pDonor207; Mutation in CBF1-Bindestelle	Zielgerichtete <i>in vitro</i> Mutagenese mit Phusion TM Site-Directed Mutagenesis Kit: PCR über das Template SP365.1 mit den Primern SP1284fo/re; Selbstligation des PCR-Produkts

2.4 Antikörper

Tab. 2.13 Primäre Antikörper

Nomenklatur	Spezies	Bezugsquelle
MYC DE 9E10	Maus	E. Kremmer Helmholtz-Zentrum München, Deutschland
HA „R1“ 3F10	Ratte	Roche Diagnostic GmbH, Deutschland
E3AN4A5	Ratte	E. Kremmer Helmholtz-Zentrum München, Deutschland
EBNA3C	Schaf	Zytomed GmbH, Deutschland
A10-E3C	Maus	Martin Rowe
RBP-J 7A11 161	Ratte	E. Kremmer Helmholtz-Zentrum München, Deutschland
Foxo1a	Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology, USA
Foxo3a (75D8)	Kaninchen	Cell Signalling Technology, USA
Ac-K-103	Maus	Cell Signalling Technology, USA
GAPDH	Maus	Chemicon, USA

Tab. 2.14 Sekundäre Antikörper

Nomenklatur	Spezies	Bezugsquelle
α -Maus-IgG-HRP	Schaf	Amersham Biosciences
α -Ratte-IgG-HRP	Ziege	Santa Cruz Biotechnology, USA
α -Kaninchen-IgG-HRP	Ziege	Chemicon, USA
α -Schaf-IgG-HRP	Kaninchen	Jackson Immuno Research Laboratories Inc., USA

2.5 Material für die Kultur von Bakterien, Hefen und Säugetierzellen

2.5.1 Material für die Kultur von Hefen und Bakterien

Adenin-Hemisulfat	Sigma-Aldrich, USA
Aminosäuren	Sigma-Aldrich, USA
Bacto-Agar	Becton, Dickinson
Difco Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acids and Ammonium Sulfate	Becton, Dickinson
Select Peptone 140	GIBCO, UK
Select Yeast extract	Invitrogen, UK
Bacto-trypton	Invitrogen, UK
Bacto-yeast extract	Invitrogen, UK
Select-Agar	Invitrogen, UK
Ampicillin	Sigma-Aldrich, USA
Kanamycin	Sigma-Aldrich, USA
Gentamycin	Sigma-Aldrich, USA

2.5.2 Material für die Kultur von Säugetierzellen

Blasticidin	Invitrogen, UK
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Deutschland
Fötale Kälberserum	Biochrom AG, Deutschland
„Gene Pulser“-Küvetten	Biorad, Deutschland
Geneticin	GIBCO, UK
L-Glutamin	GIBCO, UK
OptiMEM Medium	GIBCO, UK
Penicillin/Streptomycin	GIBCO, UK
RPMI 1640-Medium	GIBCO, UK
Trypanblau	GIBCO, UK

2.6 DNA- und Protein-Standards

1 kb DNA Ladder	Invitrogen, UK
λ DNA/HindIII Fragments	GIBCO, UK
Prestained Protein Ladder	MBI Fermentas, Deutschland

2.7 Enzyme und Reaktionssysteme

1st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV)	Roche Diagnostics GmbH, Deutschland
BLOCK-iT™ U6 RNAi Entry Vector Kit	Invitrogen, UK
BP Clonase™ II Enzyme Mix	Invitrogen, UK
ECL™	GE Healthcare, Deutschland
Jet Star 2.0	Genomed, Deutschland
LightCycler Fast Start DNA MasterPLUS SYBR Green I	Roche Diagnostics GmbH, Deutschland
LR Clonase™ II Enzyme Mix	Invitrogen, UK
NucleoSpin Plasmid	Macherey-Nagel, Deutschland
NucleoSpin Extract II	Macherey-Nagel, Deutschland
peqGold Trifast	PeqLab, Deutschland
Phusion™ Site-Directed Mutagenesis Kit	Finnzymes, Finnland
pLenti6/BLOCK-iT™-DEST Gateway® Vector Kit	Invitrogen, UK
Pwo-Polymerase und Puffer	Roche Diagnostics GmbH, Deutschland
Restriktionsenzyme und Puffer	New England Biolabs, USA; MBI Fermentas, Deutschland, Roche Diagnostics GmbH, Deutschland
RNase A	Sigma-Aldrich, USA
RQ1 RNase-Free DNase	Promega, USA
T4 DNA Ligase und Puffer	New England Biolabs, USA
TNT® T7 Coupled Reticulocyte Lysate System	Promega GmbH, Deutschland

2.8 Chemikalien und Reagenzien

Acrylamid 30%	Roth, Deutschland
Agarose	Cambrex Bio Science Rockland, USA
APS	MP Biomedicals GmbH, Deutschland
Complete Protease Inhibitor	Roche Diagnostics GmbH, Deutschland
dNTPs	Roche Diagnostics GmbH, Deutschland
Ethidiumbromid	Merck, Deutschland
FuGENE® Transfection Reagent	Roche Diagnostics GmbH, Deutschland

Leptomycin B	Sigma-Aldrich, USA
Lipofectamin™ 2000	Invitrogen, UK
LY294002	Cell Signalling Technology, USA
MG132	Sigma-Aldrich, USA
MS2 RNA	Roche Diagnostics GmbH, Deutschland
Polyethylenimin	Sigma-Aldrich, USA
Protein A-Sepharose	GE Healthcare, Deutschland
Protein G-Sepharose	GE Healthcare, Deutschland
RNasin	Promega GmbH, Deutschland
Salmon Testis Carrier DNA	Sigma-Aldrich, USA
Streptavidin-Agarose	Invitrogen, UK
TEMED	Amersham Bioscience, Schweden

Alle hier nicht aufgeführten Chemikalien wurden von MP Biomedicals, Merck und Sigma bezogen.

2.9 Verbrauchsmaterial

3 MM Papier	Whatman Ltd., USA
Immobilion PVDF Membran	Millipore, USA
LightCycler Capillaries (20 µl)	Roche Diagnostics GmbH, Deutschland
Hyperfilm ECL™	Amersham Bioscience, Schweden

Plastikwaren wurden von Becton-Dickinson GmbH, Eppendorf, Greiner GmbH und NUNC GmbH, Deutschland, bezogen.

2.10 Laborausstattung

3.2RS Varifuge	Heraeus Instruments, Deutschland
415D Zentrifuge	Eppendorf, Deutschland
6K10 und 2K15 Zentrifuge	SIGMA Centrifuges GmbH, Deutschland
Bakterienschüttler	New Brunswick Scientific, USA
Bakterien-Inkubator	Heraeus Instruments, Deutschland
Elektroporationsgerät	Biorad, USA
Gamma cell 40	Atomic Energy Of Canada Limited, Canada
Geldokumentsystem	Ltf Labortechnik, Deutschland
Gelelektrophoresekammer (DNA)	PeqLab, Deutschland
Gelelektrophoresekammer (Protein)	Amersham Bioscience, Schweden
LightCycler 2.0	Roche Diagnostics GmbH, Deutschland
Mikroskop Axiovert 25	Carl Zeiss AG, Deutschland
Neubauer Zählkammer	Menzel-Gläser, Deutschland
Orion Microplate Luminometer	Berthold Detection Systems
PCR-System 9600	Perkin Elmer, Deutschland
Quarzküvette	Biometra GmbH, Deutschland

RC5C Zentrifuge	DuPont, USA
Spannungsquellen	Biorad, USA
Spektralphotometer	Biometra GmbH, Deutschland
Thermomixer 5436	Eppendorf, Deutschland

2.11 Software und Datenbanken

Clone Manager 8, Version 8.0	Scientific & Educational Software, USA
LightCycler Software 4.05	Roche Diagnostics GmbH, Deutschland
ClustalW (Alignments)	http://www.ebi.ac.uk/clustalw/index.html
Ensembl Genome Browser	http://www.ensembl.org
NCBI Homepage	http://www.ncbi.nlm.nih.gov
Primer3	http://frodo.wi.mit.edu/
RNAi Designer	https://rnaidesigner.invitrogen.com/rnaiexpress/
siRNA Wizard	http://www.sirnazizard.com/scrambled.php

3 Methoden

3.1 Arbeiten mit Bakterien

3.1.1 Kultivierung und Aufbewahrung von Bakterien

Bakterien wurden auf LB-Agar-Platten oder in flüssigem LB-Medium über Nacht bei 37°C kultiviert. Für Flüssigkulturen wurden 200-400 ml LB-Medium mit einer einzelnen Bakterienkolonie angeimpft. Transformierte Bakterien wurden durch Zugabe der entsprechenden Antibiotika auf Resistenzgene enthaltende Vektoren selektiert. Zur Langzeitaufbewahrung wurden 900 µl einer dichten Suspensionskultur mit 100 µl DMSO gemischt und bei -80°C eingefroren.

LB-Medium (-Agar): 1% Bacto-Trypton; 0,5% Yeast-Extract; 1% NaCl; (1,5% Agar); pH 7,4

Antibiotika: 50 µg/ml Ampicillin; 50 µg/ml Kanamycin; 15 µg/ml Gentamycin

3.1.2 Herstellung chemisch-kompetenter *E. coli* DH5α nach der CaCl₂-Methode

5 ml einer Übernachtskultur von *E. coli* DH5α wurden in 500 ml LB-Medium verdünnt und bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,375 geschüttelt. Anschließend wurde die Kultur in eiskalte 50 ml-Röhrchen gefüllt und 5-10 min auf Eis inkubiert. Nach einer Zentrifugation bei 1600 g für 7 min bei 4°C wurde jedes Zellpellet vorsichtig in 10 ml eiskalter CaCl₂-Lösung resuspendiert und anschließend 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen bei 1100 g für 5 min bei 4°C abzentrifugiert, wiederum vorsichtig in 10 ml eiskalter CaCl₂-Lösung resuspendiert und anschließend 30 min auf Eis inkubiert. Nach einer weiteren Zentrifugation wurden die Zellpellets in 2 ml eiskalter CaCl₂-Lösung resuspendiert, zu 300 µl-Aliquots in eiskalte 1,5 ml-Reaktionsgefäße gefüllt, in einem Eis-Ethanol-Gemisch schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt. Um die Transformationseffizienz der kompetenten *E. coli* zu bestimmen, wurden 100 ng pUC19-DNA transformiert. Nach dem Hitzeschock wurden 900 µl LB-Medium zugegeben und es wurden 100 µl der Verdünnungen 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵ und 10⁻⁶ auf LB/Amp-Platten ausplattiert. Angestrebt wurde eine Transformationseffizienz von 10⁵-10⁷ cfu/µg DNA.

CaCl₂-Lösung: 60 mM CaCl₂; 10 mM PIPES; 15% Glycerol

3.1.3 Transformation chemisch-kompetenter Bakterien

100 µl kompetente Bakterien (Transformationseffizienz 10⁵ cfu/µg DNA) wurden auf Eis aufgetaut, mit dem Ligationsansatz vermischt und 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock für 50 sec bei 42°C wurden 300 µl LB-Medium dazugegeben und der Ansatz 1 h bei 37°C geschüttelt. Anschließend wurde der Transformationsansatz bei 11.000 g für 30 sec

abzentrifugiert, das Pellet in dem restlichen Medium resuspendiert, auf Selektivplatten ausplattiert und bei 37°C inkubiert. Auf den Selektivplatten konnten nur die Zellen wachsen, die den Vektor aufgenommen hatten.

3.2 Arbeiten mit eukaryotischen Zellen

3.2.1 Arbeiten mit Hefe

3.2.1.1 Prinzip des Yeast Two-Hybrid Systems

Im Yeast Two-Hybrid System werden Fusionsproteine aus der DNA-Bindedomäne (DBD) des Transkriptionsfaktors GAL4 und einem Protein X („Bait“) und aus der Aktivierungsdomäne (AD) von GAL4 und einem Protein Y („Prey“) in Hefe co-exprimiert. Findet eine Interaktion zwischen den Proteinen X und Y statt, so wird der Transkriptionsfaktor GAL4 rekonstituiert und es kommt zur Aktivierung der Transkription. Zum Nachweis der Transkription werden meist die Reportergene *HIS3* und *ADE2* eingesetzt, die unter der Kontrolle von GAL4-abhängigen Promotoren stehen (Abb. 3.1). Diese Reportergene ermöglichen einer auxotrophen Mutante das Wachstum auf Minimalmedien.

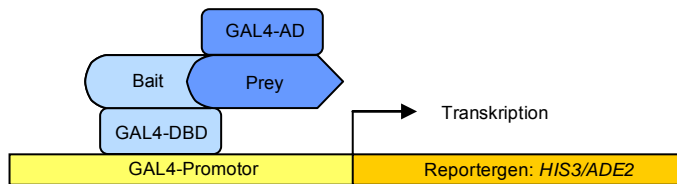


Abb. 3.1 Das Yeast Two-Hybrid System
Die Interaktion von zwei Proteinen gekoppelt an die DBD, bzw. an die AD von GAL4 rekonstituiert den Transkriptionsfaktor. Durch die Bindung der beiden Fusionsproteine an einen GAL4-abhängigen Promotor wird die Transkription der Reportergene *HIS3* und *ADE2* aktiviert.

3.2.1.2 Kultivierung und Aufbewahrung von Hefe

Hefezellen wurden auf Vollmediumsplatten (YPDA) oder geeigneten Selektivplatten (SD) über Nacht bei 30°C kultiviert und konnten anschließend bis zu einem Monat im Kühlschrank aufbewahrt werden. Zur Langzeitaufbewahrung von Hefestämmen wurden Glycerin-Stocks angelegt. Dazu wurde eine einzelne Kolonie auf einer YPDA- oder einer geeigneten SD-Platte (Durchmesser 10 cm) dünn ausgestrichen und über Nacht bei 30°C inkubiert. Dann wurden die Zellen mit 1 ml YPDA-Medium abgeschwemmt, mit 50% Glycerin zu einer Endkonzentration von 25% gemischt und bei -80°C eingefroren.

YPDA-Medium, (-Agar):	20 g/l Select Peptone; 10 g/l Yeast Extract; 0,2% Adenin-Hemisulfat; (20 g/l Agar); nach dem Autoklavieren Zugabe von 2% Glucose
SD-Medium (-Agar):	1,7 g/l „Yeast Nitrogen Base ohne AS“ und (NH ₄) ₂ SO ₄ ; 5 g/l (NH ₄) ₂ SO ₄ ; 10% 10x Dropout Lösung; (20 g/l Agar); pH5,8; nach dem Autoklavieren Zugabe von 2% Glucose und bei Bedarf von 3-AT

10x Dropout-Lösung (DO): 200 mg/l L-Adenin-Hemisulfat; 200 mg/l L-Arginin-HCl; 200 mg/l L-Histidin HCl Monohydrat; 300 mg/l L-Isoleucin; 1000 mg/l L-Leucin; 300 mg/l L-Lysin HCl; 200 mg/l L-Methionin; 500 mg/l L-Phenylalanin; 2000 mg/l L-Threonin; 200 mg/l L-Tryptophan; 300 mg/l L-Tyrosin; 200 mg/l L-Uracil; 1500 mg/l L-Valin

Um ein bestimmtes Selektivmedium herzustellen, wurden eine oder mehrere Aminosäuren weggelassen.

3.2.1.3 Hefetransformation mit der LiAc-Methode

Um eine möglichst hohe Transformationseffizienz zu erreichen, ist es wichtig, dass sich die Hefezellen in der logarithmischen Phase befinden. Die Hefezellen sind dabei in der Lage, mehrere Plasmide aufzunehmen. Auch die Qualität der Carrier DNA spielt eine entscheidende Rolle, denn sie muss ein hohes Molekulargewicht haben und komplett denaturiert sein. Die Kompetenz, DNA aufzunehmen wird sowohl durch Lithiumionen, als auch durch PEG induziert.

Eine oder mehrere Hefekolonien wurden dünn auf einer YPDA-Platte ausgestrichen und über Nacht bei 30°C inkubiert. Dann wurden ca. 50 µl Zellen mit einem Zahnstocher abgeschabt und in 500 µl sterilem H₂O resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen bei 13.000 upm für 30 sec abzentrifugiert und das Pellet in 1 ml sterilem TE/LiAc gewaschen. Dieser Ansatz wurde erneut abzentrifugiert und das Pellet in 750 µl TE/LiAc resuspendiert. In ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß wurden nacheinander 1 µg DNA und 47,5 µg Salmon-Testes Carrier-DNA (95°C 5 min) vorgelegt. Anschließend wurden 50 µl kompetente Hefezellen und 300 µl PEG/LiAc zugegeben und der Ansatz wurde sehr gut resuspendiert. Nach einer Inkubation unter Schütteln bei 30°C für 30 min folgte ein Hitzeschock bei 42°C für 15 min. Danach wurden die Zellen abzentrifugiert, in 50 µl H₂O resuspendiert und der gesamte Ansatz auf eine Selektivplatte (-Trp, -Leu) ausplattiert, auf der nur Zellen wachsen konnten, die das Plasmid aufgenommen hatten. Die Inkubation erfolgte 3-4 Tage bei 30°C.

3.2.1.4 Test auf Aktivierung der Reportergene HIS3 und ADE2

Zunächst wurden die zu untersuchenden Klone auf eine permissive Platte (-Trp, -Leu) ausgestrichen. Diese Platte wurde bei 30°C über Nacht inkubiert und anschließend replikaplattiert auf -Trp, -Leu, -Ade-Platten, bzw. -Trp, -Leu, -His-Platten mit unterschiedlichen Mengen des Hemmstoffs 3-Amino-1, 2, 4-triazol (3-AT). 3-AT ist ein Kompetitor des HIS3-Genprodukts und verhindert unspezifisches Wachstum von Hefezellen auf histidinfreien Platten. Nach der Replikaplattierung wurden die Platten mit frischen Samttüchern so lange gesäubert bis keine Zellen mehr auf den Platten zu sehen waren. Diese Platten wurden dann 4-5 Tage bei 30°C inkubiert. Die Ergebnisse wurden durch Fotos dokumentiert.

3.2.1.5 Präparation von Hefeproteinextrakten

Um Proteine aus Hefe zu isolieren, muss die starke Zellwand mit physikalischen und chemischen Mitteln aufgeschlossen werden.

Zunächst wurden 5 ml SD-Medium mit einer Kolonie eines transformierten Stammes angeimpft und über Nacht bei 30°C geschüttelt. Dann wurde die gesamte Übernachtskultur in 50 ml YPDA-Medium überführt und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4-0,6 geschüttelt. Anschließend wurde die Kultur in einem halb mit Eis gefüllten Gefäß bei 1000 g für 5 min bei 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen und das Pellet in 25 ml eiskaltem H₂O gewaschen, sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

Die Zellpellets wurden in 100 µl Aufschlusspuffer (60°C) pro 7,5 OD₆₀₀ Zelleinheiten aufgetaut und resuspendiert. Die Anzahl der OD₆₀₀ Zelleinheiten ergab sich aus der OD₆₀₀ multipliziert mit dem Kulturvolumen. Die Zellsuspension wurde in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß mit 80 µl Glasperlen (425-600 µm) pro 7,5 OD₆₀₀ Zelleinheiten gegeben, 10 min bei 70°C inkubiert und anschließend 1 min gemischt. Zur Abtrennung von Zelltrümmern wurden die Proben bei 14.000 upm für 5 min bei 4°C abzentrifugiert, der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und auf Eis aufbewahrt. Die Pellets wurden zusammen mit den Glasperlen 3–5 min bei 100°C gekocht und 1 min gemischt. Nach einer weiteren Zentrifugation wurde der Überstand mit dem ersten Überstand vereinigt. Anschließend wurden die Proben 10 min bei 95°C aufgekocht und 15 µl wurden sofort aufs Gel geladen. Alternativ konnten die Proben auch bei -80°C aufbewahrt werden.

Indem die Puffermengen entsprechend der Zelldichte gewählt wurden, wurde gewährleistet, dass sich in den einzelnen Proben die gleiche Proteinkonzentration befand. Dies war notwendig, da aufgrund der Pufferzusammensetzung die Proteinkonzentration nicht durch die Bradford-Methode bestimmt werden konnte.

Aufschlusspuffer: 1 ml Aufschlusspuffer-Stocklösung; 10 µl 2-Mercaptoethanol;
Proteinase-Inhibitor

Aufschlusspuffer-Stocklösung: 8 M Harnstoff; 5% SDS; 40 mM Tris-HCl pH 6,8; 0,1 mM EDTA; 0,4 mg/ml Bromphenolblau

3.2.2 Kultivierung von Suspensions- und adhären Zellen

Alle Zellen wurden bei Standardbedingungen von 37°C und 6% CO₂ kultiviert. Dem Medium wurde standardmäßig 2 mM Glutamin und 100U/ml Penicillin/Streptomycin zugesetzt. Für die Zelllinien 721, DG75, SM224.9 und die adhären Zellelinie HEK293 wurde RPMI 1640 mit 10% FCS (fötale Kälberserum) als Kulturmedium verwendet. Die in diesem Labor etablierten lymphoblastoiden Zelllinien wurden in RPMI 1640 kultiviert, dem 20% FCS zugesetzt worden war. Die adhären Zellelinie HEK293FT wurde in DMEM mit 10% FCS kultiviert. Zur Aufrechterhaltung des Plasmids pCMVSPORT6TA_g.neo zur Expression des SV40 Large T Antigens wurde 500 µg/ml Geneticin zugegeben.

Zum Ablösen der adhärennten Zellen wurde die Zelllinie HEK293FT zunächst mit 2 ml Trypsin gewaschen und schließlich in 1 ml Trypsin für 5 min inkubiert. Die Zelllinie HEK293 konnte ohne vorheriges Waschen mit Trypsin inkubiert werden. Nach dem Ablösen wurden die Zellen in frischem Kulturmedium resuspendiert und verdünnt.

3.2.3 Aufbewahrung von Zellen

Um Zellen für längere Zeit aufzubewahren, wurden sie mit DMSO in flüssigem Stickstoff eingefroren. Dazu wurden ca. 1×10^7 Zellen bei 300 g für 10 min abzentrifugiert, in 1,5 ml Einfriermedium resuspendiert und in 1,8 ml Gefäße (NUNC Cryotube™) überführt. Zum schonenden Einfrieren wurden sie zunächst für ca. 1 Woche bei -80°C eingefroren und anschließend in flüssigen Stickstoff überführt.

Um eingefrorene Zellen wieder in Kultur zu nehmen, wurden diese schnell aufgetaut und mit warmem Medium gewaschen, um DMSO-Reste zu entfernen und anschließend in frischem Kulturmedium aufgenommen.

Einfriermedium: 40% Kulturmedium, 50% FCS, 10% DMSO

3.2.4 Bestimmung der Zellzahl

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte in einer Neubauer-Zählkammer. Um lebende von toten Zellen unterscheiden zu können, wurden die Zellen 1:2 mit Trypanblau gemischt, wobei tote Zellen den Farbstoff aufnehmen und sich durch Blaufärbung kennzeichnen.

Berechnung der Zellzahl pro ml: $c_z = \mu_z \cdot v_z \cdot 10^4$

c_z = Anzahl der Zellen/ml

μ_z = Mittelwert der Zellzahl pro Großquadrat

v_z = Verdünnungsfaktor

3.2.5 Transfektion von adhärennten Zellen nach der PEI-Methode

Zur transienten Transfektion von HEK293-Zellen wurde Polyethylenimin (PEI) verwendet. Dazu wurden die Zellen am Vortag 1:2 verdünnt und in Zellkulturschalen (Durchmesser 10 cm) ausgesät, sodass sie eine Dichte von ca. 70% erreichten. In einem ersten Ansatz wurden 6 bis 12 μg der zu transfizierenden DNA mit 300 μl serumfreiem, antibiotikafreiem Medium (OptiMEM I) gemischt. Im zweiten Ansatz wurden 12 μg PEI mit 300 μl OptiMEM I gemischt. Anschließend wurden beide Ansätze gemischt und inkubierten für 20 min bei RT. Währenddessen wurde das RPMI 1640-Medium von den Zellen entfernt und vorsichtig durch 3 ml OptiMEM I ersetzt. Nach der Inkubation wurde die DNA-PEI-Mischung vorsichtig auf die Zellen getropft und durch Schwenken der Platte verteilt. Der Transfektionsansatz wurde nach

einer Inkubation von 4 h bei 37°C und 6% CO₂ durch RPMI 1640-Medium ersetzt. Die Zellernte erfolgte nach einer weiteren Inkubation von 2 Tagen.

3.2.6 Transfektion von Suspensionszellen durch Elektroporation

Suspensionszellen, wie DG75 wurden durch Elektroporation transient transfiziert. Pro Transfektionsansatz wurden 1×10^7 Zellen bei 300 g für 10 min abzentrifugiert und in 250 µl RPMI 1640-Medium aufgenommen, sodass sich eine Dichte von 4×10^7 Zellen/ml ergab. Anschließend wurden die Zellen mit 10 µg der zu transfizierenden DNA gemischt und in eine „Gene Pulser“-Küvette (Biorad) mit einem Elektrodenabstand von 4 mm überführt. Die Elektroporation erfolgte bei 950 µF und 220 V. Anschließend wurden die Zellen sofort in warmes RPMI 1640-Medium überführt. Die Inkubation erfolgte für 2 Tage bei 37°C und 6% CO₂.

3.2.7 Promotor-Reporter-gen-Studie

Zunächst wurden 1×10^7 Suspensionszellen (DG75 oder SM224.9), bzw. 5×10^5 adhärenente Zellen (HEK293) in einer Sechs-Lochplatte mit den Luziferase-Reporterplasmiden und Expressionskonstrukten transient transfiziert. Zur Normalisierung der Luziferase-Aktivität wurde zusätzlich ein Expressionsvektor für die β-Galaktosidase transfiziert. Die Gesamt-DNA-Menge wurde in allen Ansätzen durch den Leervektor angeglichen. Alle Ansätze wurden in Triplikaten durchgeführt.

48 h nach der Transfektion wurden die Zellen bei 300 g für 10 min abzentrifugiert, einmal in 500 µl PBS gewaschen und in 100 µl 1x Luc-Extraktionspuffer lysiert. Anschließend wurden unlösliche Membranbestandteile durch eine Zentrifugation bei 16.000 g für 15 min bei 4°C abgetrennt. Der Überstand konnte bei -80°C aufbewahrt werden oder sofort gemessen werden.

Zur Bestimmung der Luziferase-Aktivität wurden von jeder Probe 2x10 µl in einer Mikrotiterplatte vorgelegt. Im Messgerät (Orion Microplate Luminometer, Berthold Detection Systems) wurde nach Zugabe von 50 µl Luc-Messpuffer die Biolumineszenz in „relativen Lichteinheiten“ (RLE) gemessen. Um mögliche Schwankungen durch die eingesetzte Zellzahl oder die Transfektionseffizienz innerhalb einer Versuchsreihe auszugleichen, wurde als Kontrolle das Plasmid CMV-β-Gal co-transfiziert und die β-Galaktosidase-Aktivität in jedem Ansatz gemessen. Dazu wurden von jeder Probe 2x10 µl in einer Mikrotiterplatte vorgelegt und mit je 100 µl Gal-Reaktionspuffer für 15-20 min inkubiert. Anschließend erfolgte die Messung der Biolumineszenz nach Zugabe von 50 µl Gal-Messpuffer im Messgerät.

Zur Normierung der Luziferase-Aktivität wurde der Quotient aus der relativen Luziferase-Aktivität und der relativen β-Galaktosidase-Aktivität gebildet. Die Werte wurden mit dem Faktor 10⁴ oder 10⁵ multipliziert, um besser handhabbare Zahlen zu erhalten.

5x Luc-Extraktionspuffer:	50% Glycerin; 5% Triton X-100; 10 mM EDTA; 125 mM Tris-HCl pH 7,8; im 1x Puffer 2 mM DTT
Luc-Messpuffer:	20 mM Tricin, 1,07 mM (MgCO ₃)·Mg(OH) ₂ ·5(H ₂ O); 2,67 mM MgSO ₄ ; 0,1 mM EDTA; 33,3 mM DTT; 270 μM Acetyl-Coenzym A; 470 μM Luciferin; 530 μM ATP; Lagerung dunkel bei -20 °C
Gal-Reaktionspuffer:	100 mM NaP pH 8,0; 1 mM MgCl ₂ ; 1% Galacton-Plus; frisch ansetzen
Gal-Messpuffer:	0,2 M NaOH; 10% Emerald-Enhancer

3.2.8 Propidiumjodid-Färbung zur Zellzyklusanalyse

2x10⁶ Zellen wurden bei 300 g für 10 min abzentrifugiert, in 10 ml PBS/1% FCS gewaschen und schließlich in 500 μl PBS aufgenommen. Die Fixierung der Zellen erfolgte durch langsame Zugabe von 9 ml Ethanol unter konstantem Mixen. Anschließend wurden die Zellen 15 min auf Eis inkubiert oder bei 4°C bis zu eine Woche aufbewahrt. Für die Färbung wurden die Zellen bei 500 g 5 min abzentrifugiert, in 10 ml PBS/1% FCS gewaschen und in 1 ml Propidiumjodid-Lösung resuspendiert. Nach einer Inkubation von 15 min bei 37°C, konnten die Zellen im FACS bei Fluoreszenz 3 analysiert werden.

Propidiumjodid-Lösung: PBS; 175 μg/ml RNase A; 10 μg/ml Propidiumjodid

3.3 Herstellung lentiviraler Vektoren zum Knockdown von Genen durch shRNA

Zum Knockdown von Foxo3a wurde das „BLOCK-iT™ Lentiviral RNAi Expression System“ von Invitrogen verwendet. Mit diesem System erfolgt die Transduktion von shRNAs in Säugerzellen über replikationsinkompetente Lentiviren, welche sowohl ruhende als auch proliferierende Zellen infizieren können. Abbildung 3.2 zeigt die Prozessierung und Wirkungsweise von shRNAs. Die shRNA wird von der RNA-Polymerase III transkribiert, bildet eine Haarnadelstruktur aus und wird ins Zytoplasma exportiert. Durch Dicer erfolgt die Prozessierung zu einer 21 Nukleotide langen Duplex. Ein Strang der shRNA wird anschließend auf den „RNA-induced Silencing Complex“ (RISC) geladen, während der andere Strang abgebaut wird. Bei Bindung der shRNA an die Ziel-mRNA bewirkt RISC, abhängig vom Grad der Komplementarität, den Abbau der mRNA oder die Inhibierung der Translation. Durch die Integration der shRNA in das Genom der Wirtszelle ist es möglich, stabile Zelllinien zu etablieren, in denen das Zielgen herunterreguliert ist.

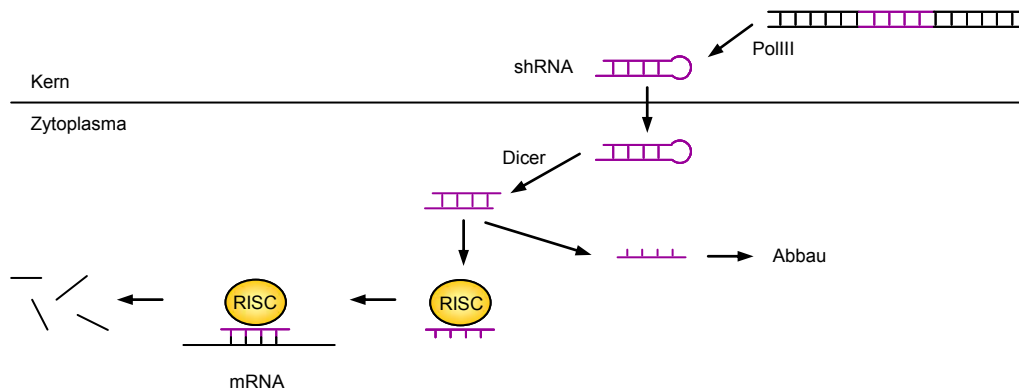


Abb. 3.2 Prozessierung und Funktionsweise von shRNAs
Erklärung siehe Text

3.3.1 Einführung in das „BLOCK-iT™ Lentiviral RNAi Expression System“ von Invitrogen

Die Klonierung der lentiviralen Vektoren basiert auf dem Gateway® System von Invitrogen, das heißt es wird zunächst ein Entry-Vektor hergestellt, dessen Insert anschließend durch Rekombination in einen Destinationsvektor überführt wird. Die Produktion von Viruspartikeln erfolgt durch Transfektion dieses Expressionsvektors zusammen mit Helferplasmiden in die Zelllinie HEK293FT. Mit diesen Viruspartikeln können anschließend sowohl adhärenente Zellen, als auch Suspensionszellen infiziert werden (Abb. 3.3).

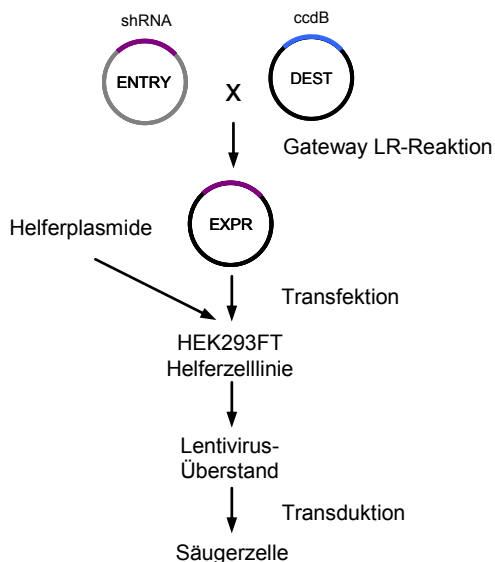


Abb. 3.3 Das BLOCK-iT™ Lentiviral RNAi Expression System

Durch die LR-Reaktion des Entry-Vektors (ENTRY), der die shRNA enthält, und des Destinationsvektors (DEST) entsteht der Expressionsvektor (EXPR) zur Expression der shRNA. Zur Produktion des Lentivirus-Überstands wird der Expressionsvektor zusammen mit Helferplasmiden in die Helferzelllinie HEK293FT transfiziert. Mit diesem Virusüberstand können anschließend Säugerzellen transduziert werden.

Der Entry-Vektor pENTR™/U6 enthält eine U6-RNAi-Kassette flankiert von attL-Sites zur Rekombination in den Destinationsvektor. Die U6-RNAi-Kassette besteht aus dem U6-Promotor, der die Expression durch die RNA-Polymerase III erlaubt, der doppelsträngigen shRNA und einem Polymerase III-Terminator. Die Sequenz der shRNA wurde mit dem Programm RNAi Designer von Invitrogen erstellt. Der obere Strang der shRNA enthielt 21

Nukleotide, die komplementär zur cDNA des Zielgens waren, und deren Komplementärsequenz. Die beiden Sequenzen wurden getrennt von vier Nukleotiden, die bei der Bildung des intramolekularen Hairpins einen Loop bilden. Der untere Strang der shRNA war komplementär zum oberen Strang. Die 5' Enden der beiden Stränge enthielten Sequenzen zur Klonierung in den Entry-Vektor pENTRTM/U6 (Abb. 3.4).

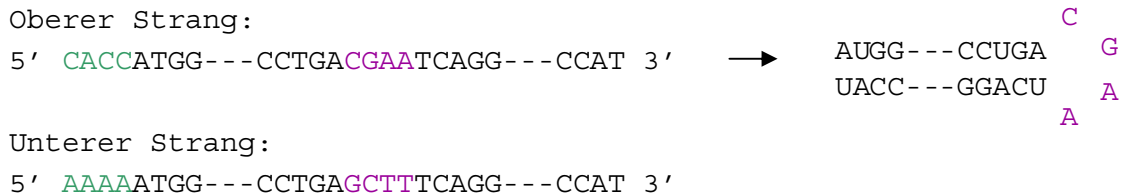


Abb. 3.4 Schematischer Aufbau der shRNA-Oligonukleotide

In grün sind die zur Klonierung in den Vektor pENTR/U6 notwendigen Nukleotide dargestellt. Die Nukleotide im 5'-Bereich des oberen Stranges sind komplementär zur Zielsequenz, während die Nukleotide im 3'-Bereich komplementär zu denen im 5'-Bereich sind. Beide Sequenzen werden getrennt von vier Nukleotiden (violett), welche bei der intramolekularen Paarung der shRNA einen Loop bilden. Der untere Strang der shRNA ist komplementär zum oberen.

Mittels der Gateway[®]-LR-Rekombination wurde die U6-RNAi-Kassette in den Destinationsvektor pLenti6/BLOCK-iTTM-DEST kloniert, wodurch der Expressionsvektor entstand. Neben Signalen zur Verpackung des Vektors in Virionen (Ψ -Verpackungssignal und 5' und 3' LTR von HIV-1) und zur reversen Transkription der viralen mRNA (5' und 3' LTR von HIV-1) enthält der Destinationsvektor ein Resistenzgen für Blasticidin zur Selektion auf stabil transduzierte Zellen. Der Expressionsvektor wurde zusammen mit den Helferplasmiden pLP1, pLP2 und pLP/VSVG in die Helferzelllinie HEK293FT transfiziert. Diese Helferplasmide stellen Struktur- und Replikationsproteine *in trans* zur Verfügung, die zur Produktion von Lentiviren notwendig sind. Durch die Verwendung des VSV-G Glykoproteins wird ein hohes Wirtsspektrum der Lentiviren erreicht. Der Virusüberstand wurde zur Infektion von LCLs verwendet.

3.3.2 Klonierung von Plasmidvektoren zur Expression von shRNAs

3.3.2.1 Klonierung des Entry-Vektors

Die Klonierung des Entry-Vektors erfolgte mit dem BLOCK-iTTM U6 RNAi Entry Vector Kit von Invitrogen. Dazu mussten zunächst die beiden komplementären Oligonukleotide der shRNA aneinandergelagert werden. Nach der Ligation des doppelsträngigen Oligonukleotids in den bereits linear vorliegenden Entry-Vektor pENTRTM/U6 wurde der Ansatz in chemisch-kompetente *E. coli* TOP10 transformiert, welche anschließend auf Kanamycin-haltigen LB-Platten ausgestrichen wurden. Die Richtigkeit der Konstrukte wurde durch Sequenzierung überprüft.

3.3.2.2 Klonierung des Expressionsvektors

Zur Klonierung des Expressionsvektors wurde eine LR-Reaktion zwischen dem die shRNA enthaltenden Entry-Vektor und dem Destinationsvektor pLenti6/BLOCK-iT™-DEST durchgeführt. Der Ansatz wurde in chemisch-kompetente *E. coli* Stbl3 transformiert. Die Verwendung dieses Bakterienstammes verringert das Auftreten ungewollter homologer Rekombinationen der Long Terminal Repeats (LTR). Der Transformationsansatz wurde auf LB-Platten ausgestrichen, welche sowohl Ampicillin, als auch Blasticidin enthielten. Da der *E. coli* Stbl3-Stamm Endonuklease1-positiv ist (*endA1+*), wurden die Plasmide mit dem NucleoSpin® Plasmid-Kit von Macherey-Nagel und mit dem zusätzlichen Waschpuffer AW aufgereinigt. Um die Richtigkeit des Expressionsvektors zu überprüfen und Rekombinationen der LTRs auszuschließen, wurde der Expressionsvektor mit den Enzymen *AflI*, das in beiden LTRs schneidet, und *XhoI*, das nach der *attR*-Kassette schneidet, verdaut.

3.3.3 **Produktion infektiöser Lentivirus-Überstände in HEK293FT-Zellen**

Die Produktion von Lentivirus-Überständen erfolgte in HEK293FT-Zellen mit Hilfe von Lipofectamin™ 2000 oder FuGENE®. Pro Virusüberstand wurden 6×10^6 Zellen benötigt. Die HEK293FT-Zellen wurden am Vortag in antibiotikafreiem Medium 1:2 verdünnt und in Zellkulturschalen (Durchmesser 10 cm) ausgesät, sodass sie eine Dichte von ca. 90% erreichten. Im ersten Ansatz wurden 3 µg des Expressionsvektors und 9 µg des ViraPower™ Packaging Mix (bestehend aus jeweils 3 µg der Plasmide pLP1, pLP2 und pLP/VSVG) mit 1,5 ml serumfreiem Medium (OptiMEM I) gemischt. Der zweite Ansatz bestand aus 1,5 ml OptiMEM I gemischt mit 36 µl Lipofectamin™ 2000 oder FuGENE®. Diese beiden Ansätze wurden gemischt und inkubierten 20 min bei RT. Während der DNA-Lipid-Komplexbildung wurden die HEK293FT-Zellen trypsiniert, gezählt und mit Wachstumsmedium auf eine Dichte von $1,2 \times 10^6$ Zellen/ml eingestellt. Nach der Inkubation wurden die DNA-Lipid-Komplexe in eine Zellkulturschale (Durchmesser 10 cm) mit 5 ml Wachstumsmedium gegeben. Anschließend wurden 5 ml der HEK293FT-Zellsuspension zugegeben und durch Schwenken der Platte gemischt. Nach einer Inkubation über Nacht bei 37°C und 6% CO₂, während der die Zellen auf der Platte adhärten, wurde das Medium mit den DNA-Lipid-Komplexen durch Wachstumsmedium ersetzt. Nach einer weiteren Inkubation von 48 h, während der es zur Produktion von Viruspartikeln kommt, wurde der Virusüberstand geerntet und die verbliebenen Zellreste durch eine Zentrifugation bei 300 g für 10 min abgetrennt. Anschließend wurde der Virusüberstand durch Filter mit einer Porengröße von 0,45 µm sterilfiltriert und in 1 ml-Aliquots bei -80°C eingefroren.

3.3.4 Infektion von Suspensionszellen mit lentiviralen Vektoren

Zur Infektion von LCLs mit lentiviralen Vektoren wurden pro Infektion 4×10^5 Zellen abzentrifugiert, in 1 ml Virusüberstand resuspendiert und in ein Loch einer 24-Loch-Platte pipettiert. Zur Kontrolle wurden die Zellen in Wachstumsmedium resuspendiert. Zur effektiveren Infektion der Zellen wurden die Platten 1 h bei 300 g und 30°C zentrifugiert. Nach einer Inkubation über Nacht bei 37°C und 6% CO₂ wurde der Virusüberstand durch Wachstumsmedium ersetzt, welches wiederum nach 24 h durch Selektivmedium mit 3 µg/ml Blastidicin ersetzt wurde. Anschließend wurde das Selektivmedium nach Bedarf gewechselt bis nach ca. zwei Wochen alle Kontrollzellen tot waren, während die infizierten Zellen weiter in Selektivmedium expandiert werden konnten.

3.4 Arbeiten mit RNA

3.4.1 Isolierung von RNA aus eukaryotischen Zellen

Die Isolierung von RNA erfolgte aus 1×10^7 Zellen mit peqGOLD TriFast™ von Peqlab nach Angaben des Herstellerprotokolls. Die RNA wurde in 50 µl sterilem H₂O aufgenommen und die Konzentration spektrometrisch bestimmt. Die Qualität der RNA wurde durch elektrophoretische Auftrennung überprüft.

3.4.2 Spektrometrische Bestimmung der RNA-Konzentration

Zur Bestimmung der RNA-Konzentration wurde die Absorption einer verdünnten RNA-Probe (meist 1:100) in einer Quarzküvette im Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Die Verunreinigung durch Proteine wurde gleichzeitig bei 280 nm und die durch Salze bei 230 nm überprüft. Ein Absorptionswert von 1 entspricht einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml. Die Quotienten OD₂₆₀/OD₂₈₀ und OD₂₆₀/OD₂₃₀ sind ein Maß für die Reinheit der RNA und sollten 1,8-2 bzw. mehr als 1,8 betragen.

Berechnung der RNA-Konzentration: $c \text{ (}\mu\text{g}/\mu\text{l)} = \text{OD}_{260} \times 40 \times \text{Verdünnungsfaktor}$

3.4.3 Agarose-Gelelektrophorese von RNA

Die RNA wurde im 1,2%igen Agarosegel aufgetrennt, welches 1x MOPS-Laufpuffer und 2,2 M Formaldehyd (37%) zur Denaturierung von RNA-Sekundärstrukturen enthielt. Zu 5 µg RNA wurden 2 µl 5x MOPS, 3,5 µl Formaldehyd (37%) und 10 µl Formamid und 0,08 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) zugegeben und 15 min bei 56°C denaturiert. Anschließend wurden die Proben 5 min auf Eis inkubiert, mit 2 µl RNA-Ladepuffer versetzt und auf das Gel aufgetragen. Der Gellauf erfolgte bei 1-2 V/cm.

Im Gel sind nach der Elektrophorese Banden der 18S und der 28S rRNA erkennbar. Nach unten scharf begrenzte Banden sind Zeichen intakter RNA, während degradierte RNA im Gel einen Schmier erzeugt.

MOPS-Laufpuffer: 40 mM MOPS pH 7; 10 mM Na-Acetat; 1 mM EDTA

RNA-Ladepuffer: 50% Glycerol; 1 mM EDTA; 0,4% Bromphenolblau

3.4.4 DNase-Verdau von RNA

Um eventuelle Kontaminationen der RNA mit genomischer DNA zu entfernen, wurden 20 µg RNA mit 2 U RQ1 RNase-Free DNase (Promega) in einem Volumen von 20 µl behandelt. Außerdem wurden 40 U RNasin (Promega) zugesetzt. Des Weiteren erfolgte der DNase-Verdau nach den Angaben des Herstellers. Anschließend wurde die RNA-Konzentration erneut spektrometrisch bestimmt.

3.4.5 Reverse Transkription

Zur reversen Transkription von 1 µg RNA in cDNA wurde das 1st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV) von Roche Diagnostics GmbH gemäß des Herstellerprotokolls unter Benutzung der Zufalls-p(dN)₆-Primer verwendet. Als Negativkontrolle wurde parallel ein Ansatz hergestellt, in dem die reverse Transkriptase durch Wasser ersetzt wurde. Jeweils 1/20 des Reaktionsvolumens der reversen Transkription wurde für die Real-Time RT-PCR eingesetzt.

3.5 Arbeiten mit DNA

3.5.1 Schnelle Plasmidisolierung aus *E. coli*

Von einer 3 ml-*E. coli*-Übernachtskultur wurde 1 ml bei 11.000 g für 30 sec abzentrifugiert und das Pellet in 300 µl TENS-Puffer resuspendiert. Durch Inkubation bei RT für 5 min wurden die Bakterien lysiert. Anschließend wurden 150 µl 3 M NaAc (pH 5,2) zugegeben und gemischt. Dieser Ansatz wurde 5 min auf Eis inkubiert und bei 16.000 g für 10 min bei 4°C abzentrifugiert. Aus 400 µl des Überstandes wurde die DNA durch Zugabe von 900 µl 100% Ethanol gefällt. Der Ansatz wurde gründlich gemischt und dann bei 16.000 g für 10 min bei 4°C abzentrifugiert. Dann wurde das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in 30 µl TER-Puffer gelöst. Für einen Restriktionsverdau wurden 2 µl eingesetzt.

TENS: 10 mM Tris-HCl pH 7,5; 1 mM EDTA; 0,1 M NaOH; 0,5% SDS

TER: 10 mM Tris-HCl pH 7,5; 1 mM EDTA; 100 µg/ml RNase A

3.5.2 Präparative Plasmidisolierung

Die Maxi-Aufreinigung von Plasmid-DNA wurde aus einer 400 ml-Übernachtskultur durchgeführt. Die Aufarbeitung erfolgte mit Hilfe des Plasmid-Maxipräparationskits Jetstar Genomed 2.0 nach dem Herstellerprotokoll. Das Pellet wurde in TE-Puffer aufgenommen.

TE-Puffer: 10 mM Tris-HCl pH7,5; 1 mM EDTA; pH 7,5

3.5.3 Spektrometrische Bestimmung der DNA-Konzentration

Zur Bestimmung der DNA-Konzentration wurde die Absorption einer verdünnten DNA-Probe (meist 1:100) in einer Quarzküvette im Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Ein Absorptionswert von 1 entsprach einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA.

Berechnung der DNA-Konzentration: $c \text{ (}\mu\text{g}/\mu\text{l)} = \text{OD}_{260} \times 50 \times \text{Verdünnungsfaktor}$

3.5.4 Agarose-Gelelektrophorese von DNA

Die Charakterisierung von DNA-Fragmenten durch Auftrennung entsprechend ihrer Größe erfolgte durch Agarose-Gelelektrophorese. Die Migrationsgeschwindigkeit der Fragmente war dabei umgekehrt proportional zum Logarithmus ihrer Größe.

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte je nach Größe der Fragmente in 0,8-1,5%igen Agarosegelen, die in TAE-Laufpuffer angesetzt waren. Vor Beladung des Gels wurden die Proben mit 1x DNA-Ladepuffer versetzt. Die Detektion der Fragmente im Gel erfolgte durch Zugabe von 10 mg/ml Ethidiumbromid. Das ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der in die DNA interkaliert und nach Absorption von ultraviolettem Licht bei 254 nm, sichtbares Licht emittiert. Die Fragmentgröße und die DNA-Menge wurden anhand eines DNA-Größenstandards bestimmt.

TAE-Laufpuffer : 40 mM Tris-Acetat ; 1 mM EDTA

DNA-Ladepuffer: 10% Bromphenolblau; 30% Glycerin; 60% H₂O

DNA-Größenstandard: 1 kb-Leiter; λ-HindIII Marker

3.5.5 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist eine *in vitro* Methode zur Amplifikation eines bestimmten DNA-Abschnitts. Dazu werden Oligonukleotide (Primer) verwendet, die sequenzspezifisch an die Komplementärsequenz binden, die den zu amplifizierenden Bereich flankiert. Die Elongation der Primer wird durch das Enzym DNA-Polymerase katalysiert, welches freie Nukleotide an die 3'OH-Enden der Primer komplementär zum gewünschten DNA-Abschnitt anfügt. Durch mehrere Zyklen von Denaturierung des

Produktes, Hybridisierung der Primer und Elongation kann ein DNA-Abschnitt spezifisch vermehrt werden.

Um eine fehlerhafte Amplifikation zu vermeiden, wurde die Pwo DNA-Polymerase verwendet, die Korrekturlese-Aktivität besitzt. Durch ihre 3'→5' Exonuklease-Aktivität kann sie in Abwesenheit von Nukleotiden jedoch auch die Template-DNA und die Primer abbauen. Daher wurden zwei getrennte Ansätze auf Eis vorbereitet werden, die erst zum Schluss gemischt wurden (Tab. 3.1). Die PCR wurde in zwei Schritten durchgeführt. Die Annealing-Temperatur der ersten 5 Zyklen entsprach der Schmelztemperatur des zur Template-DNA komplementären Primerbereichs. Für die restlichen 20 Zyklen wurde eine Annealing-Temperatur verwendet, die der Schmelztemperatur des gesamten Primers (inklusive Restriktionsschnittstellen oder Rekombinationsregionen) entsprach. Die Reaktion wurde in dem PCR-System 9600 durchgeführt. Tabelle 3.2 zeigt das verwendete PCR-Programm.

Tab. 3.1 PCR-Ansatz für die Pwo DNA-Polymerase

	Reagenzien	Volumen (100 µl)	Endkonzentration
Mix 1	dNTP-Mix (2mM)	10 µl	200 µM
	Primer forward (3 mM)	10 µl	300 nM
	Primer reverse (3 mM)	10 µl	300 nM
	Template DNA (100 ng/µl)	1 µl	
	H ₂ O	19 µl	
Mix 2	PCR-Puffer mit MgSO ₄ (10x)	10 µl	1x
	Pwo DNA-Polymerase (5 U/µl)	0,5 µl	2,5 U
	H ₂ O	39,5 µl	

Tab. 3.2 PCR-Programm für die Pwo DNA-Polymerase

Zyklen	Programm	Temperatur	Zeit
1	Denaturierung	96°C	5 min
5	Denaturierung	94°C	30 sec
	Primerhybridisierung	59°C	30 sec
	Elongation	72°C	30 sec
20	Denaturierung	94°C	30 sec
	Primerhybridisierung	70°C	30 sec
	Elongation	72°C	30 sec
1	Elongation	72°C	7 min

3.5.6 Zielgerichtete *in vitro* Mutagenese

Um in eine Zielsequenz Punktmutationen einzuführen, wurde das Phusion™ Site-Directed Mutagenesis Kit von Finnzymes verwendet. Dabei wird über ein die Target-DNA enthaltendes Plasmid eine PCR mit Primern durchgeführt, welche die gewünschten Mutationen enthalten. Rechts und links des mutierten Bereichs sollte der Primer 10

komplementäre Nukleotide enthalten. Beide Primer müssen am 5'-Ende phosphoryliert sein und dürfen sich nicht überlappen. Durch die Phosphatgruppen am 5'-Ende der Primer ist eine Selbstligation des PCR-Produkts nach der PCR-Reaktion möglich.

Tab. 3.3 PCR-Ansatz für die zielgerichtete *in vitro* Mutagenese

Reagenzien	Volumen (50 µl)	Endkonzentration
5x Phusion HF Buffer	10 µl	1x
dNTP-Mix 10 mM	1 µl	200 µM
Primer forward 5 µM	5 µl	500 nM
Primer reverse 5 µM	5 µl	500 nM
Template DNA 10 pg/µl	1 µl	10 pg
Hot Start DNA-Pol 2 U/µl	0,5 µl	0,02 U/µl
H ₂ O	27,5 µl	

Tab. 3.4 PCR-Programm für die zielgerichtete *in vitro* Mutagenese

Zyklen	Programm	Temperatur	Zeit
1	Denaturierung	98°C	30 sec
20	Denaturierung	98°C	10 sec
	Primerhybridisierung	70°C	30 sec
	Elongation	72°C	20 sec/1 kb
1	Elongation	72°C	7 min

Das PCR-Produkt wurde mit dem NucleoSpin[®] Extract Kit von Macherey-Nagel aufgereinigt und in 30 µl Wasser eluiert. Anschließend erfolgte die Selbstligation des PCR-Produkts. Dazu wurden 5 µl PCR-Produkt mit 5 µl 2x Ligationspuffer und 0,5 µl Quick T4-Ligase 1 h bei Raumtemperatur inkubiert und in *E. coli* DH5α transformiert.

3.5.7 Aufreinigung von DNA-Fragmenten

Ein PCR-Produkt wurde mit dem NucleoSpin[®] Extract Kit von Macherey-Nagel aufgereinigt. Dabei wurden die Primer, Nukleotide und die Polymerase aus dem Ansatz entfernt. Das PCR-Produkt wurde 50 µl Puffer eluiert.

Um nach einem Restriktionsverdau das gewünschte DNA-Fragment aufzureinigen, wurde der gesamte Restriktionsansatz auf einem Agarosegel aufgetrennt. Anschließend wurde die gewünschte Bande aus dem Gel ausgeschnitten und mit Hilfe des NucleoSpin[®] Extract Kit von Macherey-Nagel aus dem Gel eluiert. Die Fragmente wurden je nach Größe in 30-50 µl Puffer eluiert.

3.5.8 Restriktionsverdau von DNA

Für die Restriktion von DNA wurden die von den Herstellern empfohlenen Reaktionspuffer verwendet. Im Falle eines Doppelverdaus wurde der Puffer verwendet, in dem beide Restriktionsenzyme die höchste Aktivität zeigten. Das Volumen des Reaktionsansatzes wurde jeweils so gewählt, dass eine DNA-Konzentration von 200 µg/µl nicht überschritten wurde und das eingesetzte Volumen des Enzyms maximal 1/10 des Reaktionsvolumens betrug. 1 U Restriktionsenzym soll 1 µg DNA pro Stunde verdauen. Die Vollständigkeit des Verdau wurde mittels Gelelektrophorese überprüft.

3.5.9 Klonierung von Plasmidvektoren

3.5.9.1 Konventionelle Klonierung

Sowohl die Vektor-DNA, als auch das Insert wurden mit den gleichen Restriktionsenzymen geschnitten. Um eine Selbstligation zu vermeiden, wurde eine forcierte Klonierung durchgeführt, bei der für die beiden Enden zwei unterschiedliche Restriktionsenzyme verwendet wurden. Die Inserts wurden entweder durch Restriktion aus einem anderen Vektor gewonnen, oder sie wurden durch PCR hergestellt, bei der an das 5'-Ende der Primer Restriktionsschnittstellen angefügt wurden. Sollten durch die Klonierung Fusionsproteine konstruiert werden, musste darauf geachtet werden, dass sich das Genfragment im gleichen Leserahmen wie der Fusionspartner im Vektor befand. Nach dem Restriktionsverdau wurden sowohl der linearisierte Vektor, als auch das DNA-Fragment durch Agarose-Gelelektrophorese aufgereinigt. Um die DNA-Konzentration der Fragmente zu bestimmen, wurden jeweils 10% der eluierten Fragmente auf ein Gel aufgetragen und die Intensität der Banden mit einem ebenfalls aufgetragenen λ -HindIII-Marker verglichen.

Der Ligationsansatz wurde in einem Volumen von 10 µl angesetzt, zu dem 40 U T4 Ligase dazugegeben wurden. Das molare Verhältnis von Vektor zu Insert war 1:3. Um zu überprüfen, ob der Vektor vollständig von beiden Enzymen geschnitten worden war, wurde ein Ansatz mit Vektor, ohne Insert und ohne Ligase vorbereitet. Als Kontrolle auf Selbstligation des Vektors wurde ein Ansatz ohne Insert mit Ligase vorbereitet. Die Ligation erfolgte über Nacht bei 16°C oder für 4 h bei RT. Anschließend wurde der gesamte Ligationsansatz in *E. coli* DH5α transformiert. Zum Test auf korrekte Klone wurden von drei bis sechs Kolonien Plasmide isoliert, deren Richtigkeit durch einen Restriktionsverdau überprüft wurde. Anschließend wurde von einem Klon eine Maxi-plasmid-Präparation durchgeführt.

3.5.9.2 Klonierung mit dem Gateway®-System

3.5.9.2.1 Prinzip

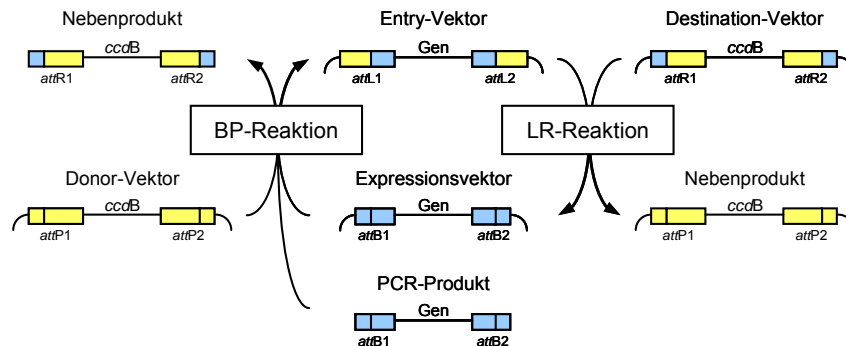


Abb. 3.5 Die Gateway®-Klonierungstechnologie

Durch die BP-Reaktion eines PCR-Produkts (oder eines Expressionsvektors) mit einem Donor-Vektor entsteht ein Entry-Vektor. Ein Expressionsvektor entsteht durch die anschließende LR-Reaktion des Entry-Vektors mit einem Destination-Vektor.

Die Gateway®-Klonierungstechnologie von Invitrogen ist eine neue Methode zur schnellen Klonierung von Expressionsplasmiden, bei der die Restriktion durch Endonukleasen und die anschließende Ligation durch spezifische Rekombination ersetzt werden (Abb. 3.5). Die Erkennungsstellen werden *attB* (engl. Attachment-sites), *attP*, *attL* und *attR* genannt und sind Rekombinationsstellen des Bakteriophagen lambda (λ) in *E. coli*. Zur leichteren Selektion auf positive Klone enthalten die Vektoren das *ccdB*-Gen flankiert von *att*-Sites, welches für *E. coli* letal ist, durch die Rekombination mit dem gewünschten Genfragment jedoch verloren geht. Dadurch sollten nur solche Bakterienzellen wachsen, in denen eine Rekombination stattgefunden hat.

Das Gateway®-System unterscheidet zwei Reaktionen. Die BP-Reaktion beruht auf der Rekombination von Genfragmenten, zum Beispiel PCR-Produkten, die von *attB*-Sites flankiert sind und einem *Donor-Vektor*, der das *ccdB*-Gen flankiert von *attP*-Sites enthält. Dadurch entstehen ein *Entry-Vektor*, der das PCR-Produkt flankiert von *attL*-Sites enthält und ein Nebenprodukt mit dem *ccdB*-Gen. In der LR-Reaktion kommt es zur Rekombination zwischen dem von *attL*-Sites flankierten Genfragment im Entry-Vektor, und einem *Destination-Vektor*, der *attR*-Sites enthält. Der entstandene *Expressionsvektor* enthält das Genfragment flankiert von *attB*-Sites. Außerdem entsteht ebenfalls ein Nebenprodukt, das das *ccdB*-Gen enthält

3.5.9.2.2 Durchführung

Zur Klonierung von Genfragmenten in einen Donor-Vektor wurden die zu klonierenden Genfragmente in zwei PCR-Schritten amplifiziert. Bei der ersten PCR wurden genspezifische Primer verwendet, die am 5'-Ende einen Teil der *attB1*-, bzw. *attB2*-Site enthielten. Die *attB*-

Sites wurden in der zweiten PCR mittels Primer, die nur die *attB*-Sites enthielten, vervollständigt. Die BP- und die LR-Reaktion wurden mit dem Gateway® BP, bzw. LR Clonase™ II Enzyme-Mix nach dem Hersteller-Protokoll durchgeführt. Anschließend erfolgte die Transformation in *E. coli* DH5 α . Die Amplifikation der Donor- und Destinationsvektoren erfolgte in den *ccdB*-resistenten *E. coli* DB3.1, die eine Mutation im Gyrase-Gen haben und daher die Expression des *ccdB*-Gens tolerieren.

3.5.10 Real-Time RT-PCR

3.5.10.1 Prinzip der Real-Time RT-PCR

Die Real-Time RT-PCR ist ein hochempfindliches Verfahren zur Quantifizierung von DNA, im Gegensatz zur konventionellen PCR, die nur semiquantitative Ergebnisse liefert.

Eine PCR gliedert sich in drei Phasen. In der exponentiellen Phase 1) zu Beginn der Reaktion stehen ausreichend Reagenzien zur Verfügung, sodass pro Zyklus eine Verdopplung des PCR-Produkts stattfindet, sofern die Amplifikationseffizienz 100% beträgt. Die Reaktionskinetik ist in jeder Probe gleich. In der anschließenden linearen Phase 2) stehen weniger Reagenzien zur Verfügung, sodass sich die Reaktion auf weniger als eine Verdopplung pro Zyklus verlangsamt. Außerdem beginnen die Reaktionsprodukte zu degradieren, wodurch die Reaktionskinetik der einzelnen Proben unterschiedlich sein kann. In der abschließenden Plateau-Phase 3) sind alle Reagenzien verbraucht und es findet keine Amplifikation mehr statt.

Bei der konventionellen PCR kann nur das Endprodukt der Reaktion betrachtet werden, was jedoch nur eine ungenaue Aussage über die Menge an Template-DNA zu Beginn der Reaktion zulässt. Bei der Real-Time RT-PCR ist es dagegen möglich, die Amplifikation während der gesamten Reaktion aufzuzeichnen, also auch in der exponentiellen Phase, in der die Menge des PCR-Produkts noch repräsentativ für die eingesetzte DNA-Menge ist.

Die Amplifikation kann mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes SYBR Green, der unspezifisch in die kleine Furche doppelsträngiger DNA bindet, verfolgt werden. Gebundenes SYBR Green kann mit blauem Licht (530 nm) zur Fluoreszenz angeregt werden, wohingegen der freie Farbstoff kaum fluoresziert. Zu Beginn der Reaktion entsteht ein schwaches Hintergrund-Fluoreszenzsignal, da Primer und Template-DNA denaturiert sind und der Farbstoff in Lösung vorliegt. Im Laufe der Amplifikationsreaktion nimmt das Fluoreszenzsignal zu, da immer mehr doppelsträngige DNA-Fragmente entstehen, an die SYBR Green binden kann. Die Fluoreszenz-Emission wird am Ende jedes Zyklus nach der Elongationsphase gemessen.

3.5.10.2 Quantifizierung

3.5.10.2.1 *Kreuzungspunkt*

Zur Quantifizierung der PCR-Produkte wird bestimmt, nach wieviel Zyklen das Fluoreszenzsignal aus dem Hintergrund tritt. Dabei ist die Zyklenzahl indirekt proportional zur Menge der Template-DNA. Der Fluoreszenzverlauf wird graphisch dargestellt, wobei die Zyklenzahl auf der x-Achse und die Fluoreszenzintensität auf der y-Achse aufgetragen wird. Anschließend wird eine Kreuzungslinie parallel zur x-Achse in der log-linearen Region jeder Kurve definiert, die signifikant über der Hintergrund-Fluoreszenz liegt. Diese Kreuzungslinie ist für alle in einem Lauf analysierten Proben gleich. Über den Schnittpunkt, genannt „Kreuzungspunkt (C_P)“, der Fluoreszenzkurve einer Probe mit der Kreuzungslinie kann die Konzentration des PCR-Produkts berechnet werden. Die Berechnung erfolgt durch die Software nach der „Second Derivative Maximum“-Methode, die das Maximum der zweiten Ableitung einer Kurve bestimmt, an dem sich die Probenfluoreszenz am deutlichsten von der Hintergrund-Fluoreszenz absetzt.

3.5.10.2.2 *Effizienzkorrektur durch die Standardkurve*

Wie anfangs ausgeführt, findet bei der Amplifikationsreaktion im Idealfall eine Verdopplung des PCR-Produkts pro Zyklus statt. Die Amplifikationseffizienz ist jedoch abhängig von mehreren Faktoren, wie der Sequenz, der Fragmentlänge und der Reinheit der Nukleinsäure und kann daher für jedes Gen unterschiedlich sein. Um die Effizienz der Amplifikation zu ermitteln, wurde für jedes Gen eine Standardkurve erstellt.

Zur Generierung der Standardkurve wurde zunächst ein PCR-Produkt des jeweiligen Gens generiert und eine Verdünnungsreihe mit den Stufen 10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6} , 10^{-8} und 10^{-10} hergestellt. Dabei wurden die ersten drei Stufen in $10 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ MS2 RNA (Roche Diagnostics GmbH) und die letzten beiden Stufen in Wasser verdünnt. Die Phagen-RNA hat die Funktion eines Carriers und erlaubt mehrfaches Einfrieren und Auftauen der Probe. Nach Amplifikation der Verdünnungen wurde die Standardkurve durch Auftragen der Kreuzungspunkte gegen den dekadischen Logarithmus der relativen Konzentration erstellt. Aus der Steigung der Standardkurve wurde die Amplifikationseffizienz berechnet.

Berechnung der Template-Menge: $N_n = N_0 \times E^{C_P}$

N_n Anzahl der Moleküle im PCR-Zyklus n

N_0 Anzahl der Moleküle zu Beginn der Reaktion

E Amplifikationseffizienz

C_P Kreuzungspunkt

3.5.10.2.3 *Kalibrator: Fixpunkt für die relative Quantifizierung*

Bei der relativen Quantifizierung wird die Menge an Template-DNA nicht absolut bestimmt, sondern im Verhältnis zu einer Standardprobe, die Kalibrator genannt wird. Dieser Kalibrator stellte meist die Verdünnungsstufe 10^{-6} zur Erstellung der Standardkurve dar und wurde im Duplikat in jedem Lauf parallel zu den zu untersuchenden Proben amplifiziert.

3.5.10.2.4 *Normalisierung*

Um Unterschiede in der Menge der eingesetzten cDNA auszugleichen, wurde aus jeder cDNA-Probe ein Referenzgen amplifiziert. Zur Normalisierung eignet sich prinzipiell jedes Gen, das unter den Versuchsbedingungen nicht reguliert ist. In diesem Fall wurde die 18S rRNA als Referenzgen verwendet. Für jede cDNA wurden die relativen Mengen des Referenzgens und der einzelnen Zielgen bestimmt.

Berechnung der relativen Transkriptmenge: $(M_{ZP}/M_{RP}) / (M_{ZK}/M_{RK}) \times 10^6$

M_{ZP} Menge des Zielgens in der Probe

M_{RP} Menge des Referenzgens in der Probe

M_{ZK} Menge des Zielgen-Kalibrators

M_{RK} Menge des Referenzgen-Kalibrators

3.5.10.3 Schmelzkurvenanalyse

Um die Qualität der PCR-Produkte und die Spezifität der Reaktion zu überprüfen, wurde nach jeder PCR eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Doppelsträngige DNA weist in Abhängigkeit ihrer Sequenz, ihres GC-Gehalts und ihrer Länge eine charakteristische Schmelztemperatur T_m auf. Das spezifische PCR-Produkt hat somit eine andere Schmelztemperatur, als eventuell entstandene Primer-Dimere. Die Schmelztemperatur ist charakterisiert als die Temperatur, bei der nur noch die Hälfte der ursprünglichen Fluoreszenz vorhanden ist. Durch kontinuierliches Erhitzen des PCR-Produkts in der Kapillare wird die doppelsträngige DNA denaturiert und die Fluoreszenz sinkt. Als zusätzliche Kontrolle wurden die PCR-Produkte auf einem 1,5%igen Agarosegel analysiert.

3.5.10.4 Durchführung

Für die Real-Time RT-PCR wurde der LightCycler 2.0 und der Kit LightCycler Fast Start DNA Master^{PLUS} SYBR Green I (Roche Diagnostics GmbH) gemäß des Herstellerprotokolls verwendet. Als Template wurde 1 μ l der aus 1 μ g RNA synthetisierten cDNA mit 0,5 μ M genspezifischer Primer amplifiziert. Die Reaktion erfolgte in speziellen Glaskapillaren (LightCycler Capillaries (20 μ l), Roche Diagnostics GmbH) in einem Volumen von 10 μ l. Als Kontaminationskontrolle wurde in einem Ansatz pro Lauf und Zielgen Wasser statt cDNA

eingesetzt. Als Kalibrator für die relative Quantifizierung wurde außerdem 1 µl der Verdünnungsstufe 10^{-6} aus der Standardkurve des jeweiligen Gens im Duplikat amplifiziert. Das Standardprogramm für die Real-Time RT-PCR ist in Tabelle 3.5 dargestellt.

Tab. 3.5 PCR-Programm für die Real-Time RT-PCR

Zyklen	Programm	Analysis mode	Temperatur	Zeit	Acquisition mode
1	Denaturierung	none	95°C	10 min	none
38	Amplifikation	Quantification	95°C	0-2 sec	none
			60-63°C	10 sec	none
			72°C	20 sec	single
1	Schmelzkurve	Melting curve	95°C	0 sec	none
			65°C	10 sec	none
			99°C	0 sec	Cont. (slope 0,2°C/sec)
1	Kühlen	none	40°C	30 sec	none

3.6 Proteinbiochemische Methoden

3.6.1 Herstellung von Proteinlysaten

Zur Extraktion von Proteinen wurden 1×10^7 Zellen bei 300 g abzentrifugiert, in 500 µl PBS gewaschen und in 100-200 µl Ripa-Puffer resuspendiert. Nach einer Inkubation von 1 h auf Eis wurde das Lysat im Branson Digital Sonifier W-250 D für 20 sec mit einer Amplitude von 10% beschallt. Dafür wurde eine 3 mm konische Mikrospritze benutzt. Anschließend wurden unlösliche Membranbestandteile durch eine Zentrifugation bei 16.000 g für 15 min abgetrennt. Das Lysat wurde bei -80°C aufbewahrt. Nach der Bestimmung der Proteinkonzentration wurden standardmäßig 30 µg Gesamtprotein im Polyacrylamidgel aufgetrennt.

PBS: 137 M NaCl; 2,7 M KCl; 7,3 M Na_2HPO_4 ; 1,5 M KH_2PO_4 ; pH 7,4

Ripa-Puffer: 50 mM Tris-HCl pH 7,5; 150 mM NaCl; 1% IGEPAL; 0,5% DOC; 0,1% SDS; Proteinase-Inhibitor

3.6.2 Zellfraktionierung

Zur Fraktionierung von Zellen in Zytoplasma- und Kernfraktion wurden 2×10^7 Zellen bei 300 g abzentrifugiert, in 500 µl PBS gewaschen und in 100 µl Puffer A resuspendiert. Nach einer Inkubation von 10 min auf Eis wurde das Lysat bei 16.000 g 1 min abzentrifugiert. Der Überstand enthielt die Zytoplasmafraktion. Das Pellet wurde vorsichtig mit 500 µl PBS gewaschen, in 100 µl Puffer B resuspendiert und 15 min auf Eis inkubiert. Die Ultraschallbehandlung erfolgte wie in 3.6.1 beschrieben. Durch eine Zentrifugation bei 16.000 g für 15 min wurden Membranbestandteile abgetrennt. Der Überstand enthielt die

Kernfraktion. Der Nachweis von Tubulin α , das im Zytoplasma lokalisiert ist und von PARP, das im Kern lokalisiert ist, diente zur Bestimmung der Sauberkeit der Proteinfraktionen.

Puffer A: 10 mM Hepes pH 7,9; 10 mM KCl; 0,1 mM EDTA; 0,1 mM EGTA; 0,15% Igepal; 1 mM DTT; Proteinase-Inhibitor

Puffer B: 20 mM Hepes pH 7,9; 400 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1 mM EGTA; 0,5% Igepal; 1 mM DTT; Proteinase-Inhibitor

3.6.3 Proteinbestimmung nach Bradford

Der Proteingehalt von Zelllysaten wurde mit der Bradford-Lösung bestimmt. Der Nachweis beruht auf der Beobachtung von Bradford (1976), dass das Absorptionsmaximum einer sauren Lösung von Coomassie Brilliant Blue durch Ausbildung von Proteinkomplexen von 495 nm nach 595 nm verschoben wird.

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration einer unbekanntem Lösung wurden 2 μ l des Lysats in einer Küvette mit 1 ml 1:5 mit H₂O verdünnter Bradford-Lösung gemischt. Die Extinktion wurde bei 595 nm gegen den Leerwert gemessen. Zur Berechnung der Proteinkonzentration wurde eine Eichkurve mit 1 μ g bis 10 μ g Rinder-Serumalbumin erstellt.

Bradford-Lösung: 0,01% Coomassie Brilliant Blue G-250; 4,7% Ethanol; 8,5% Phosphorsäure

3.6.4 Kopplung von Antikörpern an ProteinG-Sepharose-Beads

Um Antikörper irreversibel an ProteinG-Sepharose-Beads zu koppeln, wurden 1 ml Beads mit 2 mg gereinigtem Antikörper oder 2 ml Antikörperüberstand 1 h unter Rollen bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Beads bei 300 g für 2 min abzentrifugiert und 2x 10 min mit 10 ml 0,2 M Na-Borat (pH 9) gewaschen. Zur kovalenten Kopplung der Antikörper an die Beads wurden diese in 10 ml Na-Borat aufgenommen und mit 20 mM Dimethylpimelimidat 30 min bei RT unter Rollen inkubiert. Die Reaktion wurde gestoppt durch 10 minütiges Waschen mit 0,2 M Ethanolamin (pH 8) und eine anschließende Inkubation in Ethanolamin für 2 h. Anschließend wurden die Beads in PBS aufgenommen, sodass sich eine 50% Suspension ergab.

3.6.5 Co-Immunpräzipitation

3.6.5.1 Co-Immunpräzipitation von exogen in HEK293 exprimierten Proteinen

Zum Nachweis der Interaktion von EBNA3A und EBNA3C, bzw. deren Proteinfragmenten wurde EBNA3A mit einem HA-Tag und EBNA3C mit einem MYC-Tag in HEK293-Zellen exprimiert. Die Co-Immunpräzipitation erfolgte über an ProteinG-Sepharose-Beads gekoppelte Antikörper. Als Kontrolle auf unspezifische Bindung des potentiellen

Interaktionspartners an die Beads diene ein Ansatz, in dem kein zu präzipitierendes Protein exprimiert wurde.

Pro Präzipitationsansatz wurde eine 10 cm-Schale HEK293-Zellen 48 h nach Transfektion geerntet, in 500 µl PBS gewaschen und in 500 µl Igepal-Lysepuffer (140 mM NaCl) resuspendiert. Nach einer Inkubation von 1 h auf Eis erfolgte eine Zentrifugation bei 16.000 g für 15 min. Vom entstandenen Lysat wurden 20 µl abgenommen, mit 20 µl 2x Lämmli-Puffer gemischt und als Kontrolle aufbewahrt. Das restliche Lysat wurde mit 20 µl einer 50% mit Antikörper gekoppelten ProteinG-Sepharose-Bead-Suspension gemischt und 1 h unter Rollen bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Beads 3x mit 500 µl Igepal-Puffer (140 mM NaCl) und 1x mit 500 µl Igepal-Puffer (500 mM NaCl) gewaschen, um unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen. Schließlich wurden die Beads in 60 µl 2x Lämmli-Puffer aufgenommen. Von der Lysatkontrolle wurden 5 µl auf ein Coomassie-Gel aufgetragen, von der Präzipitationsprobe 15 µl, das heißt die 50-fache Menge.

Igepal-Lysepuffer: 1% IGEPAL; 140 mM, bzw. 500 mM NaCl; 5 mM MgCl₂; 20 mM Tris pH 7,6;
1 mM PMSF
2x Lämmli-Puffer: 2% SDS; 10% Glycerin; 10% β-Mercaptoethanol; 50 mM Tris-HCl pH 6,8;
1 Spatelspitze Bromphenolblau

3.6.5.2 Co-Immunpräzipitation von endogen exprimierten Proteinen

Der Nachweis der Interaktion der endogen exprimierten Proteine EBNA3A und EBNA3C erfolgte in WT-LCLs. Als Kontrolle auf unspezifische Bindung des potentiellen Interaktionspartners an die Beads dienten die jeweiligen Knockout-Zellen.

Pro Ansatz wurden 6×10^7 Zellen geerntet, in 500 µl PBS gewaschen und in 1 ml Igepal-Lysepuffer (140 mM NaCl) resuspendiert. Nach einer Inkubation von 1 h auf Eis erfolgte eine Zentrifugation bei 16.000 g für 15 min. Vom Lysat wurden 20 µl abgenommen, mit 20 µl 2x Lämmli-Puffer gemischt und als Kontrolle aufbewahrt. Das restliche Lysat wurde mit 40 µl Antikörperüberstand gemischt und 1 h auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 30 µl einer 50% ProteinG-Sepharose-Bead-Suspension zugegeben, welche vorher 2x mit Igepal-Puffer gewaschen worden war. Das weitere Vorgehen erfolgte wie in 3.6.5.1 beschrieben.

Zur Immunpräzipitation von Foxo3a wurden ProteinA-Sepharose-Beads und 5 µl gereinigter Antikörper verwendet.

3.6.6 Protein-Affinitätspräzipitation über biotinylierte DNA-Oligonukleotide

Um die DNA-Bindekapazität eines Proteins zu untersuchen, wurde eine Affinitätspräzipitation über ein biotinyliertes doppelsträngiges Oligonukleotid durchgeführt, welches das DNA-Bindemotiv des zu präzipitierenden Proteins enthielt. Ein Oligonukleotid mit mutiertem DNA-Bindemotiv wurde als Kontrolle auf spezifische DNA-Bindung verwendet. Die Präzipitation

des Oligonukleotids erfolgte mittels Streptavidin-gekoppelter Agarose-Beads. Der Nachweis der Proteinbindung an das Oligonukleotid erfolgte im Western Blot. Das Protokoll wurde modifiziert nach (Maira et al., 2003).

Die für die Affinitätspräzipitation verwendeten Oligonukleotide sollten eine Länge von 20-40 Nukleotiden haben. Um zu gewährleisten, dass vor allem doppelsträngige Oligonukleotide an die Streptavidin-gekoppelten Beads binden, wurde nur ein am 5'-Ende biotinyliertes Oligonukleotid verwendet. Zum Annealing der Oligonukleotide wurden jeweils 25 µl der beiden Oligonukleotide (100 pmol/µl) mit 150 µl Annealing-Puffer gemischt und 3 min bei 80°C erhitzt. Der Ansatz kühlte anschließend 2-3 h im ausgeschalteten Heizblock auf Raumtemperatur ab und wurde dann auf Eis gestellt. Das Annealing wurde für jedes Experiment wiederholt.

Für die Proteinpräzipitation wurden frische in Ripa-Puffer hergestellte Zellysate verwendet. 500 µg des Gesamtzellysats wurden in 1 ml Gelshift-Puffer mit 20 µg poly-(dIdC) (1 mg/ml in TE/ 100 mM NaCl) gemischt und 10 min auf Eis inkubiert. Auch alle weiteren Schritte wurden bei 4°C, bzw. auf Eis durchgeführt. Um unspezifisch bindende Proteine zu entfernen, erfolgte ein Preclearing. Dabei wurde das Gesamtzellysat mit 50 µl 50% Streptavidin-gekoppelter Agarose-Beads, welche zuvor zweimal mit PBS äquilibriert worden waren, unter Rollen für 2 h inkubiert. Anschließend wurden die Beads bei 600 g für 2 min abzentrifugiert und aufbewahrt. Der Protein-Überstand wurde mit 12,5 µl des annealten Oligonukleotids gemischt und inkubiert über Nacht unter Rollen. Die Präzipitation erfolgte durch eine erneute Inkubation des Ansatzes mit 50 µl 50% Streptavidin-gekoppelter Agarose-Beads für 2 h unter Rollen. Anschließend wurden die Beads, wie auch die nach dem Preclearing aufgehobenen Beads zweimal mit Tris/EDTA, zweimal mit Gelshift-Bindepuffer und zweimal mit PBS gewaschen und in 50 µl 2x-Lämmli-Puffer aufgenommen. Sowohl von der Probe nach dem Preclearing, als auch von der Probe nach der Affinitätspräzipitation wurden 15 µl im Western Blot aufgetragen. Zum Nachweis der Proteinexpression wurden 20 µg des Gesamtzellysats aufgetragen.

Annealing-Puffer: 10 mM Tris-HCl pH 7,4; 10 mM MgCl₂; 50 mM NaCl

Gelshift-Bindepuffer: 10 mM Tris-HCl pH 8; 40 mM KCl; 6% Glycerol; 0,05% Igepal; 1 mM DTT

Tris/EDTA: 10 mM Tris-HCl pH 8; 1 mM EDTA pH 8; 100 mM NaCl

3.6.7 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung von Proteinen nach ihrer Größe wurde eine denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese durchgeführt. SDS wirkt als denaturierendes anionisches Detergens, das an Proteine proportional zu deren Molekulargewicht bindet. Durch seine negative Partialladung wird der gerichtete Lauf der Proteine im elektrischen Feld ermöglicht. Das SDS-Gel ist unterteilt in ein Trenngel, in dem die Auftrennung der Proteine nach ihrer

Größe stattfindet und ein Sammelgel, in dem die Proben konzentriert werden, was im Trenngel zu einer schärferen Bandenaufftrennung führt.

Für Proteine von 40–120 kDa wurde ein 8% Trenngel gegossen, für Proteine unter 40 kDa ein 12% Trenngel. Anschließend wurde das Gel mit 0,1% SDS überschichtet. Nachdem das Gel nach 30–40 min polymerisiert war, wurde das SDS abgegossen und das Sammelgel darauf gegossen.

Durch 5 minütiges Aufkochen der Proben mit einem SDS- und 2-Mercaptoethanol-haltigen Probenpuffer wurde die Tertiär- und Quartärstruktur der Proteine zerstört. Die Auftrennung erfolgte pro Gel bei 25 mA für 1 h. Die Bestimmung des Molekulargewichts des Proteins erfolgte durch gleichzeitige Auftrennung eines Größenstandards.

Elektrophoresepuffer: 25 mM Tris Base; 200 mM Glycin; 0,1% SDS

3.6.8 Proteintransfer

Um die Proteine durch Antikörper nachzuweisen, wurden die Proteine nach der Auftrennung durch SDS-PAGE auf eine PVDF-Membran übertragen. Für den Transfer wurden zunächst das 3MM-Papier und das Gel in Transferpuffer und die Membran in 100% Methanol äquilibriert. Anschließend wurden auf der Kathodenseite beginnend zwei Lagen des 3MM-Papiers, das Gel, die PVDF-Membran und wiederum zwei Lagen 3MM-Papier aufeinandergelegt. Dadurch wurden die negativ geladenen Proteine auf die dem Pluspol zugewandte Membran übertragen. Der Transfer erfolgte in Transferpuffer für 1 h bei 400 mA.

Transferpuffer: 25 mM Tris Base; 192 mM Glycin; 0,1% SDS; 20% Methanol

3.6.9 Immunodetektion von Proteinen durch Chemilumineszenz

Der Nachweis von Proteinen auf einer PVDF-Membran erfolgte mit spezifischen Antikörpern, welche durch eine Chemilumineszenzreaktion detektiert wurden.

Zunächst wurde die Membran aktiviert, indem sie 5 min in 100% Methanol geschwenkt wurde und anschließend 10 min in PBS gewaschen wurde. Um auf der Membran unspezifische Bindestellen zu blockieren, wurde sie 1 h in Blockpuffer inkubiert. Dann wurde die Membran über Nacht bei RT mit dem primären Antikörper inkubiert, der in Blockpuffer verdünnt eingesetzt wurde (für den Foxo3a-Antikörper wurde BSA statt Milchpulver im Blockpuffer verwendet). Zur Entfernung ungebundener Antikörper von der Membran wurde diese 3x 10 min mit PBS/Tween gewaschen. Anschließend erfolgte der Nachweis des Primärantikörpers durch 1 h Inkubation mit dem Sekundärantikörper. Der Überschuss wurde durch 3x 10 min Waschen mit PBS/Tween und 1x 10 min Waschen mit PBS entfernt.

Die Detektion des Sekundärantikörpers erfolgte mit dem ECLTM Reaktionssystem. Das darin enthaltene Luminol reagiert mit Wasserstoffperoxid zu seiner oxidierten Form unter Freisetzung von Stickstoff und Licht. Diese auf Chemilumineszenz basierende Reaktion wird

durch die an den Sekundärantikörper gekoppelte Meerrettich-Peroxidase katalysiert. Die Proteine wurden durch Exposition eines Hyperfilm ECL™ detektiert. Die Expositionsdauer des Films variierte je nach Signalstärke.

Blockpuffer:	5% Milchpulver oder BSA; 50 mM Tris-HCl pH 7,5; 150 mM NaCl; 0,05% Tween 20
PBS:	137 M NaCl; 2,7 M KCl; 7,3 M Na ₂ HPO ₄ ; 1,5 M KH ₂ PO ₄ ; pH 7,4
PBS/Tween:	0,05% Tween 20 in PBS

3.6.10 Radioaktive *in vitro* Translation

Für die radioaktive *in vitro* Translation mit [³⁵S]-Methionin wurde das „TNT® T7 Coupled Reticulocyte Lysate System“ von Promega verwendet und die Reaktion in einem Volumen von 50 µl nach Angaben des Herstellerprotokolls durchgeführt. Es wurden 2-10 µg Plasmid-DNA eingesetzt. Um die Expression des Proteins zu überprüfen, wurden 5 µl des Reaktionsansatzes mit 5 µl 2x Lämmli-Puffer gemischt und auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Das Gel wurde getrocknet und mit einem Röntgenfilm detektiert.

3.6.11 Radioaktive Detektion eines Peptid-Arrays

Die Cellulose-Membran, auf die Peptide eines Proteins aufgespottet worden waren, wurde mit einigen Tropfen 100% Ethanol benetzt und 3x 10 min mit 10 ml TBS gewaschen. Anschließend wurde die Membran über Nacht bei 4°C in 20 ml Blockpuffer inkubiert. Nach einem Waschschrift für 10 min mit 20 ml TBST, wurden unspezifische Bindungen durch die Inkubation der Membran mit 100 mM Cystein in 20 ml Blockpuffer für 30 min abgesättigt. Schließlich wurde die Membran 3 h bei RT mit 50 µl des zu untersuchenden radioaktiv *in vitro* translatierten Proteins inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit 20 ml TBST wurde die Membran luftdicht in Frischhaltefolie verpackt und die Signale mit einem Röntgenfilm bei -80°C für mindestens 24 h detektiert.

TBS:	137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 50 mM Tris-HCl pH7
TBST:	0.05% Tween 20 in TBS
Blockpuffer:	2,5% Milchpulver; 75 mM NaCl; 2,5 mM Tris pH 7; 0,05% Tween

4 Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war es, die Funktion der EBV-nukleären Antigene EBNA3A und EBNA3C bei der B-Zellimmortalisierung durch EBV weiter zu erhellen.

Da es Hinweise auf redundante Funktionen und auch auf eine Kooperation von EBNA3A und EBNA3C in der Repression von Zielgenen gibt, wird im ersten Teil der Arbeit die Funktion des Transkriptionsfaktors Foxo3a untersucht. Foxo3a ist in WT-LCLs reprimiert, während es in EBNA3A-, bzw. EBNA3C-negativen LCLs exprimiert wird. Dies lässt vermuten, dass EBNA3A und EBNA3C gemeinsam notwendig sind, um die Expression von Foxo3a zu verhindern. Im Folgenden wird Foxo3a daher als ein durch EBNA3A und EBNA3C gemeinsam reprimiertes Gen bezeichnet. Foxo3a wurde in in dieser Arbeitsgruppe durchgeführten Affymetrix-Arrays als potentiell Zielgen von EBNA3A und EBNA3C identifiziert und ist an der Regulation der Apoptose und des Zellzyklus beteiligt. Zunächst wird die transkriptionelle Repression von Foxo3a durch EBNA3A und EBNA3C in mehreren LCLs bestätigt und anschließend die transkriptionelle Aktivität und Funktion von Foxo3a in EBNA3A- und EBNA3C-negativen LCLs analysiert.

Der erste Teil der Arbeit gibt Hinweise auf eine Kooperation von EBNA3A und EBNA3C bei der Regulation der Transkription. Daher wird im zweiten Teil der Arbeit die Interaktion von EBNA3A und EBNA3C analysiert und *in vitro* eine mögliche Kooperation bei der Repression der Transkription untersucht. Die Kartierung der EBNA3C-Bindestelle in EBNA3A soll es ermöglichen, EBNA3A-Mutanten herzustellen, in denen diese Interaktion verhindert wird. Dadurch kann untersucht werden, ob die Interaktion der beiden Proteine eine kooperative Repression von Zielgenen vermittelt. Durch die Herstellung von Virusmutanten, in denen keine Interaktion von EBNA3A und EBNA3C möglich ist, soll die Bedeutung dieser Interaktion bei der Zielgenregulation untersucht werden.

4.1 Vorarbeiten der Arbeitsgruppe

Während EBNA3A und EBNA3C in der Literatur als essentiell für die Immortalisierung von B-Zellen beschrieben wurden, war es Claudia Popp und Marie Hertle in unserer Arbeitsgruppe gelungen, EBNA3A-, bzw. EBNA3C-negative LCLs zu etablieren (Hertle et al., 2009; Popp, 2006). Dazu wurden aus Adenoiden isolierte B-Zellen mit rekombinanten EBNA3A-, bzw. EBNA3C-defizienten Viren des EBV-Stamms B95.8 infiziert. In diesen Viren war der Leserahmen von EBNA3A, bzw. EBNA3C durch eine Kanamycin-Kassette ersetzt und dadurch komplett deletiert worden ($\Delta E3A$ bzw. $\Delta E3C$). Während es möglich war, EBNA3A-negative Langzeitkulturen aus allen B-Zellspendern zu etablieren (Hertle et al., 2009), stellten EBNA3C-negative LCLs ihr Wachstum nach 20-30 Tagen ein. Aus B-Zellen eines Spenders war es jedoch möglich, zwei EBNA3C-negative Langzeitkulturen zu etablieren

(Popp, 2006). Diese Zelllinien sind jedoch höchst instabil und akkumulieren chromosomale Aberrationen mit zunehmender Kulturdauer. Sowohl bei EBNA3A-, als auch EBNA3C-negativen LCLs ist eine verlangsamte Expansion der Kultur gegenüber WT-LCLs wegen einer erhöhten Apoptoserate zu beobachten (Hertle et al., 2009; Popp, 2006). Abbildung 4.1A zeigt die Proteinexpression von EBNA3A in den in dieser Arbeit verwendeten EBNA3A-negativen LCLs CP364-42 Δ E3A und CP1063 Δ E3A im Vergleich zu den mit Wildtyp-Virus (WT) infizierten LCLs CP364-1WT und CP1060WT von zwei verschiedenen B-Zellspendern (Abb. 4.1A; vgl. Spur 4, 6 mit 3, 5). In Abbildung 4.1B ist die Proteinexpression von EBNA3C in den EBNA3C-negativen LCLs CP543-8 Δ E3C und CP546-3 Δ E3C im Vergleich zu den WT-LCLs CP541-1WT und CP544-1WT dargestellt (Abb. 4.1B; vgl. Spur 4, 6 mit 3, 5). Als Kontrollen dienten die EBV-positive Zelllinie 721 und die EBV-negative Zelllinie DG75 (Abb. 4.1A, B; Spur 1, 2).

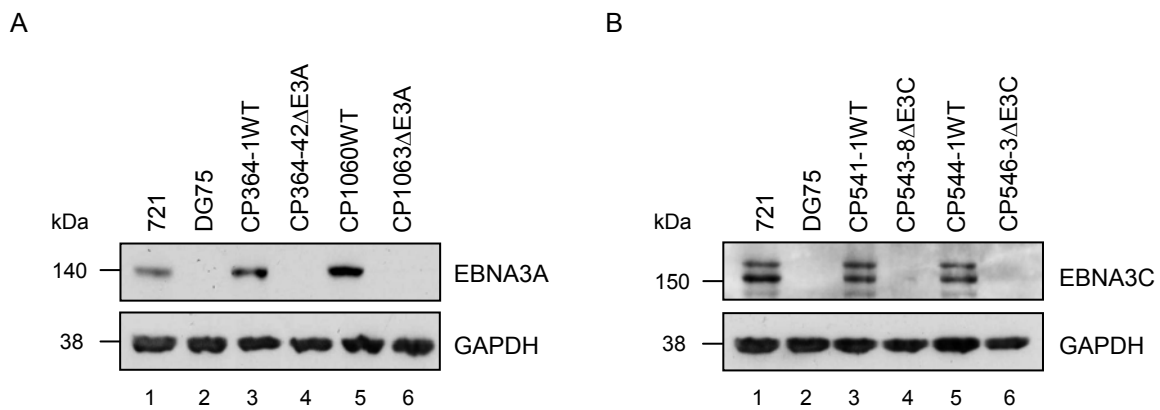


Abb. 4.1 Expression von EBNA3A und EBNA3C in den in dieser Arbeit verwendeten LCLs

B-Zellen von unabhängigen Spendern wurden entweder mit Wildtyp-EBV (WT) oder mit EBV, in dem EBNA3A, bzw. EBNA3C deletiert worden war (Δ E3A bzw. Δ E3C), infiziert und daraus lymphoblastoide Zelllinien (LCLs) etabliert. In (A) wurde die Expression von EBNA3A, in (B) von EBNA3C in den in dieser Arbeit verwendeten EBNA3A- (A), bzw. EBNA3C-negativen LCLs (B) (Spur 4, 6) und in den WT-LCLs der gleichen Spender (Spur 3, 5) untersucht. Dazu wurden 30 μ g Gesamtproteinextrakt auf ein 8% Polyacrylamidgel aufgetragen und in (A) mit dem monoklonalen Antikörper für EBNA3A (E3AN4A5), bzw. in (B) mit dem monoklonalen Antikörper für EBNA3C (A10) im Western Blot detektiert. Proteinextrakte aus den EBV-positiven Zellen 721 und den EBV-negativen Zellen DG75 wurden als Positiv- und Negativkontrolle aufgetragen (Spur 1, 2). GAPDH wurde als Ladekontrolle für äquivalente Proteinmengen detektiert.

Um durch EBNA3A und EBNA3C regulierte zelluläre Zielgene zu identifizieren, wurden von Dr. Sabine Maier und Agnes Nowak in unserer Arbeitsgruppe zwei Affymetrix-Arrays mit EBNA3A- und EBNA3C-negativen LCLs im Vergleich zu WT-LCLs durchgeführt. Die Affymetrix-Arrays wurden in Kooperation mit Dr. Jörg Mages von Marie Hertle in unserer Arbeitsgruppe ausgewertet. Zur Identifizierung von EBNA3A-Zielgenen wurden fünf WT-LCLs und neun EBNA3A-negative LCLs von drei verschiedenen Spendern verwendet. Zur Identifizierung von EBNA3C-Zielgenen wurden die oben beschriebenen zwei WT-LCLs und zwei EBNA3C-negativen LCLs des gleichen Spenders im Triplikat untersucht. Diese Affymetrix-Arrays werden im Weiteren EBNA3A-Array und EBNA3C-Array genannt.

Für den Affymetrix-Array wurde Gesamt-RNA mittels Oligo-(dT)₆-Primer zu cDNA revers transkribiert, anschließend durch *in vitro* Transkription in cRNA transkribiert und dabei mit biotinyliertem UTP markiert. Die markierte cRNA wurde auf das Affymetrix-Array U133A 2.0 hybridisiert und mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern detektiert. Das Array enthält 22.277 Probe Sets, die 18.400 Transkripte repräsentieren, darunter 14.500 gut charakterisierte humane Gene. Ein Probe Set besteht aus 11 Oligonukleotiden mit einer Länge von 25 bp und bindet jeweils ein spezifisches Transkript. Ein Transkript ist oft durch mehrere Probe Sets repräsentiert, welche überlappen oder über das Transkript verteilt sein können. Je stärker ein bestimmtes Transkript in einer Probe repräsentiert ist, desto stärker ist das Fluoreszenzsignal. Durch Vergleich des Transkriptoms verschiedener Zelllinien kann untersucht werden, welche Gene induziert und reprimiert werden.

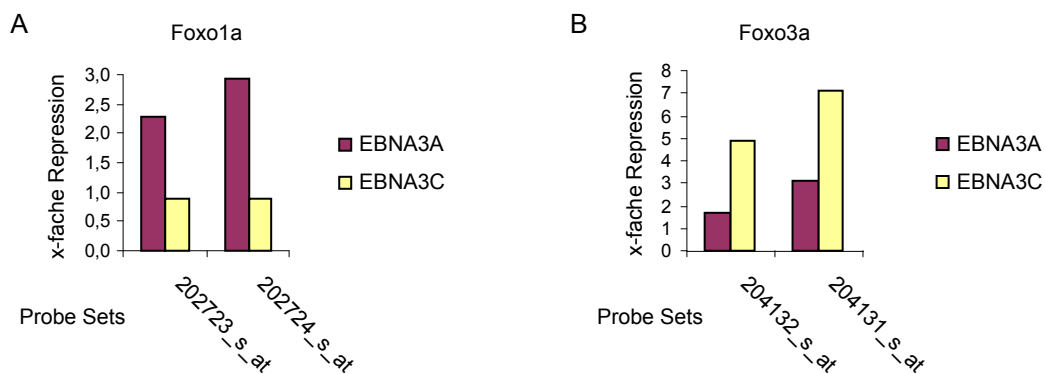


Abb. 4.2 Repression von Foxo1a und Foxo3a durch EBNA3A und EBNA3C im Affymetrix-Array

Zur Identifizierung EBNA3A-regulierter zellulärer Gene wurden fünf WT-LCLs und neun EBNA3A-negative LCLs von drei unabhängigen Spendern im Affymetrix-Array untersucht. Um zelluläre Zielgene von EBNA3C zu identifizieren, wurden zwei WT-LCLs und zwei EBNA3C-negative LCLs des gleichen Spenders jeweils im Triplikate untersucht. Aus den LCLs wurde RNA isoliert und mittels oligo-d(T)-Primer in cDNA revers transkribiert. Diese cDNA wurde anschließend in cRNA transkribiert, markiert und auf das Affymetrix-Array U133A 2.0 hybridisiert. Die Abbildung zeigt die x-fache Repression durch EBNA3A (violett) und EBNA3C (gelb) von zwei für das Gen Foxo1a (A), bzw. für das Gen Foxo3a spezifischen Probe Sets (B). Die x-fache Repression entspricht dem Quotient der Mittelwerte des Fluoreszenzsignals der EBNA3A-, bzw. EBNA3C-negativen LCLs und der WT-LCLs.

Die Auswertung der beiden Affymetrix-Arrays zeigte, dass das Gen für den Transkriptionsfaktor Foxo3a in EBNA3A-negativen LCLs dreifach und in EBNA3C-negativen LCLs sechsfach hochreguliert war im Vergleich zu WT-LCLs. Das Gen für das verwandte Protein Foxo1a war nur in EBNA3A-negativen LCLs dreifach hochreguliert. Im Folgenden wird daher Foxo3a als durch EBNA3A und EBNA3C reprimiert bezeichnet. Foxo1a wird nur durch EBNA3A reprimiert. Abbildung 4.2 zeigt die x-fache Repression von Foxo1a und Foxo3a durch EBNA3A und EBNA3C (Abb. 4.2A, B). Die x-fache Repression entspricht dem Quotient der Mittelwerte des Fluoreszenzsignals der EBNA3A-, bzw. EBNA3C-negativen LCLs und der WT-LCLs. Die unterschiedliche Repression der Probe Sets ist technischen Ursprungs. Da bei der reversen Transkription der Gesamt-RNA in cDNA Oligo-(dT)-Primer verwendet werden, die im 3'-UTR des Transkripts binden, ist es möglich, dass der 5'-Bereich

des Transkripts nicht effizient transkribiert wird. Deshalb erhält man für Probe Sets, die zum 5'-Bereich des Transkripts komplementär sind, geringere Fluoreszenzsignale.

Da das Expressionslevel von Foxo3a sowohl in EBNA3A-, als auch in EBNA3C-negativen LCLs erhöht ist, ist für die Repression der Transkription von Foxo3a möglicherweise die gemeinsame Aktivität von EBNA3A und EBNA3C notwendig.

4.2 Repression der zellulären Foxo-Transkriptionsfaktoren durch EBNA3A und EBNA3C

Die Auswertung von zwei Affymetrix-Arrays zur Identifikation zellulärer Zielgene hat gezeigt, dass der Transkriptionsfaktor Foxo3a in EBNA3A- und EBNA3C-negativen LCLs im Vergleich zu WT-LCLs hochreguliert war. Das verwandte Gen Foxo1a war nur in EBNA3A-negativen LCLs hochreguliert. Da EBNA3A und EBNA3C in WT-LCLs exprimiert sind, wird Foxo3a und vermutlich durch EBNA3A und EBNA3C gemeinsam reprimiert. Für die Repression von Foxo1a genügt offenbar die Expression von EBNA3A allein. Wie oben beschrieben wurde, weisen EBNA3A- und EBNA3C-negative LCLs ein verlangsamtes Wachstum aufgrund einer geringeren Proliferationsrate und einer erhöhten Apoptoserate auf. Die Transkriptionsfaktoren Foxo1a und Foxo3a, die in EBNA3A- und EBNA3C-negativen LCLs exprimiert sind, sind an der Induktion des Zellzyklusarrests und der Apoptose beteiligt. Sie stellen deshalb Kandidaten-Zielgene dar, die in WT-LCLs durch EBNA3A und EBNA3C reprimiert werden, um eine effiziente B-Zellimmortalisierung zu ermöglichen. Die Expression dieser Foxo-Proteine in EBNA3A- und EBNA3C-negativen LCLs erklärt möglicherweise deren Beeinträchtigung im Wachstum. Andererseits können die Foxo-Proteine auch das Überleben von Zellen unter Zellstress verlängern. Daher stellen die Foxo-Proteine in den EBNA3A- und EBNA3C-negativen LCLs möglicherweise einen Wachstumsfaktor dar, der das Auswachsen dieser Zellen erst ermöglichte. Die vorliegende Arbeit soll diese beiden Hypothesen überprüfen und die Funktion der Foxo-Proteine in LCLs untersuchen.

4.2.1 Bestätigung der Repression von Foxo1a durch EBNA3A und von Foxo3a durch EBNA3A und EBNA3C

Um die Repression von Foxo1a und Foxo3a in WT-LCLs zu bestätigen, wurde eine Real-Time RT-PCR durchgeführt, welche eine sensitive Methode zur relativen und absoluten Quantifizierung von Nukleinsäuren ist. Für die Analyse der Repression von Foxo1a und Foxo3a durch EBNA3A wurden EBNA3A-negative LCLs und WT-LCLs von sieben verschiedenen B-Zellspendern untersucht, die von Claudia Popp und Marie Hertle etabliert worden waren. Die LCLs der Spender 1-3 stellten dabei Langzeit-LCLs dar, die bereits im

Affymetrix-Array verwendet worden waren, während es sich bei den LCLs der Spender 4-7 um LCLs zwei bis drei Monate nach Infektion handelte. Zur Untersuchung der Repression von Foxo1a und Foxo3a durch EBNA3C wurden die beiden EBNA3C-negativen LCLs und WT-LCLs untersucht, die bereits im Affymetrix-Array verwendet worden waren (Spender 8) und der Mittelwert berechnet.

Für die Real-Time RT-PCR wurde Gesamt-RNA isoliert, eine eventuelle DNA-Kontamination durch einen DNase-Verdau entfernt und die Gesamt-RNA durch reverse Transkription mit random-Primern in cDNA transkribiert. Die cDNA wurde anschließend in der Real-Time RT-PCR eingesetzt und die Transkriptmenge mit Foxo1a-, bzw. Foxo3a-spezifischen Primern relativ zu einer Kalibrator-Probe quantifiziert und zur 18S rRNA normalisiert.

Die Ergebnisse bestätigten die Daten der Affymetrix-Arrays und zeigten, dass Foxo1a nur durch EBNA3A, nicht jedoch durch EBNA3C reprimiert wird (Abb. 4.3A, B), während Foxo3a durch EBNA3A und EBNA3C gemeinsam reprimiert wird (Abb. 4.3C, D). Foxo1a und Foxo3a werden durch EBNA3A ca. zwei- bis dreifach reprimiert (Abb. 4.3A, C), während EBNA3C Foxo3a drei- bis vierfach reprimiert (Abb. 4.3D).

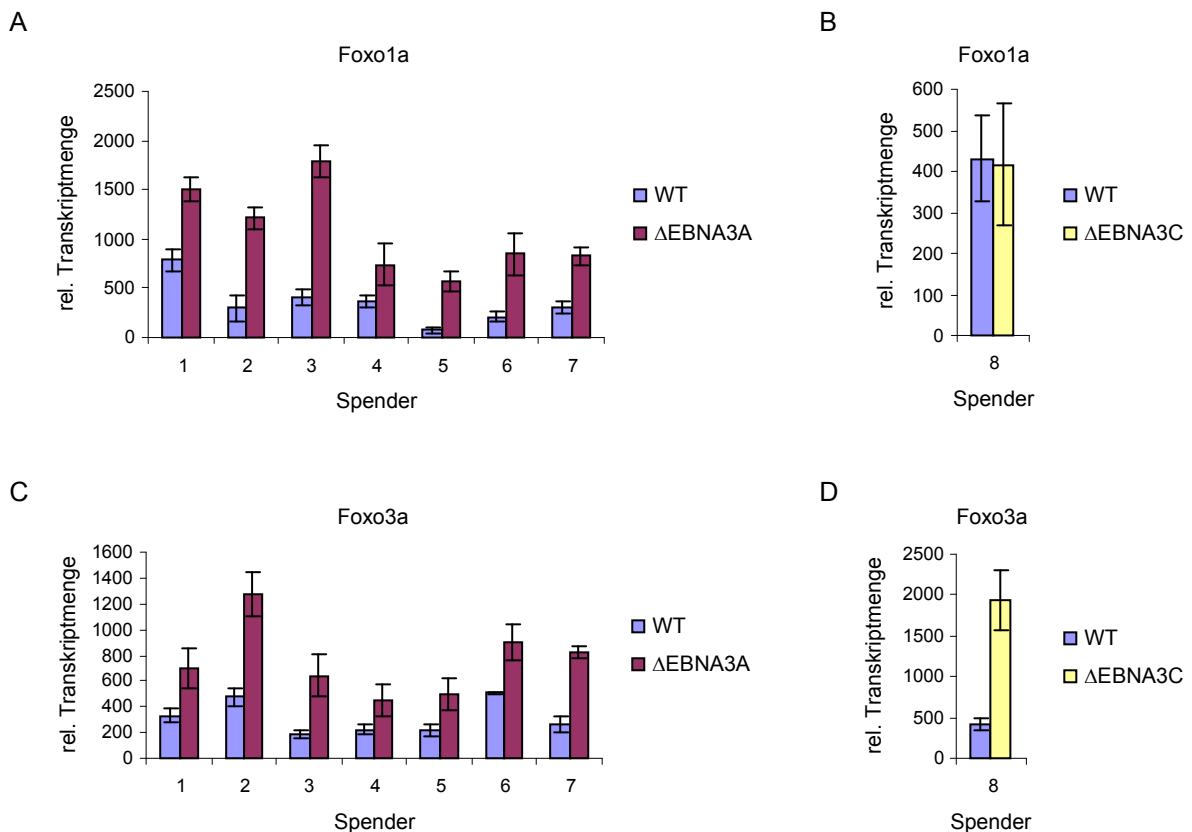


Abb. 4.3 Analyse der relativen Transkriptmengen von Foxo1a und Foxo3a durch Real-Time RT-PCR

Von WT-LCLs (blau) und EBNA3A- (A, C; violett), bzw. EBNA3C-negativen LCLs (B, D; gelb) von acht unabhängigen Spendern wurde RNA isoliert und mit DNase behandelt und mit Hilfe von random-Primern in cDNA revers transkribiert. Für die Quantifizierung der Transkripte wurde eine Real-Time RT-PCR mit Foxo1a-spezifischen (A, B), bzw. Foxo3a-spezifischen (C, D) Primern durchgeführt. Die Transkriptmenge wurde relativ zu einer Kalibrator-Probe bestimmt und gegen die 18S rRNA als Haushaltsgen normalisiert. Die Abbildung zeigt den Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten.

Um zu untersuchen, ob die Regulation von Foxo1a und Foxo3a in WT-LCLs und EBNA3A-, bzw. EBNA3C-negativen LCLs auch auf dem Proteinlevel sichtbar war, wurde ein Western Blot mit Proteinextrakten aus den in Kapitel 4.1 beschriebenen LCLs CP364-1WT und CP364-42 Δ E3A (Spender 2), CP1060WT und CP1063 Δ E3A (Spender 7), CP541-1WT, CP544-1WT, CP543-8 Δ E3C und CP546-3 Δ E3C (Spender 8) durchgeführt. Abbildung 4.4A zeigt, dass die Expression von Foxo1a in den EBNA3A-negativen Zelllinien CP364-42 Δ E3A und CP1063 Δ E3A gegenüber den WT-LCLs der gleichen Spender CP364-1WT und CP1060WT (Abb. 4.4A; vgl. Spur 2, 4 mit 1, 3) erhöht ist. Beim Vergleich der EBNA3C-negativen Zelllinien CP543-8 Δ E3C und CP546-3 Δ E3C mit den WT-LCLs CP541-1WT und CP544-1WT (Abb. 4.4A; vgl. Spur 6, 8 mit 5, 7) lässt sich jedoch, wie schon auf Transkriptebeine (Abb. 4.3B), keine konsistente differentielle Expression von Foxo1a beobachten.

Die Expression von Foxo3a ist sowohl in den EBNA3A-negativen LCLs CP364-42 Δ E3A und CP1063 Δ E3A (Abb. 4.4B; Spur 4, 6), als auch in den EBNA3C-negativen LCLs CP543-8 Δ E3C und CP546-3 Δ E3C (Abb. 4.4B; Spur 8, 10) gegenüber den WT-LCLs CP364-1WT, CP1060WT, CP541-1WT und CP544-1WT (Abb. 4.4B; Spur 3, 5, 7, 9) erhöht und bestätigt somit die Ergebnisse der Real-Time RT-PCR.

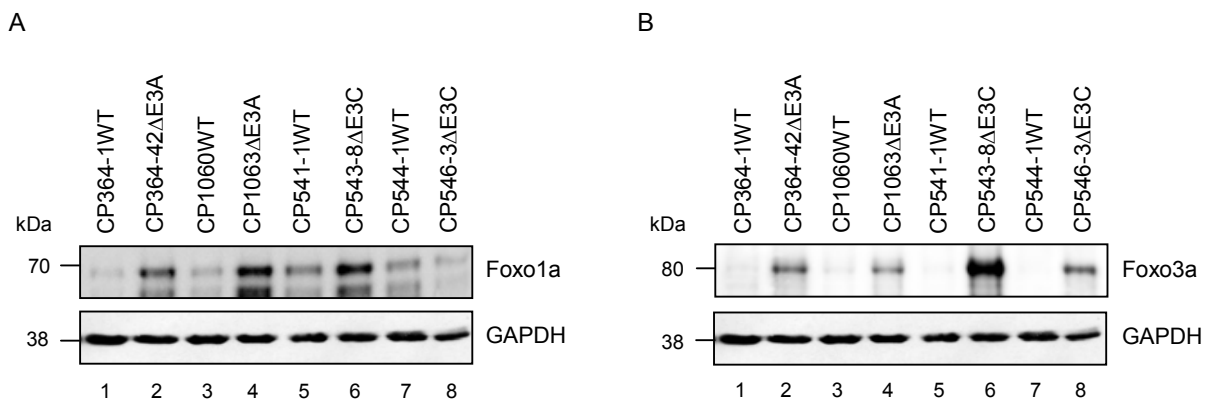


Abb. 4.4 Proteinexpression von Foxo1a und Foxo3a

30 μ g Gesamtproteinextrakt von WT-LCLs (Spur 1, 3, 5, 7) und EBNA3A- (Spur 2, 4), bzw. EBNA3C-negativen LCLs (Spur 6, 8) wurden auf einem 8% Polyacrylamidgel aufgetragen und im Western Blot mit einem Foxo1a-Antikörper (A), bzw. einem Foxo3a-Antikörper (B) detektiert. GAPDH wurde als Ladekontrolle aufgetragen.

4.2.2 Wird Foxo3a zusätzlich posttranslational reguliert?

4.2.2.1 Die Proteinmenge von Foxo3a korreliert nicht mit der Transkriptmenge

Der Western Blot in Abbildung 4.4B zeigt eine starke Expression von Foxo3a in der Zelllinie CP546-3 Δ E3C (Abb. 4.4B; Spur 8) gegenüber den Wildtypzelllinien CP541-1WT und CP544-1WT (Abb. 4.4B; Spur 7, 9). Die Analyse der relativen Transkriptmengen von Foxo3a hatte jedoch nur einen ca. vierfachen Unterschied zwischen diesen Zelllinien ergeben (Abb. 4.3D). Um diesen Unterschied zu bestätigen, wurden die in Abbildung 4.4 gezeigten Western Blots

von Foxo1a und Foxo3a quantitativ ausgewertet. Dazu wurden die Membranen nach der Inkubation mit dem Sekundärantikörper in Chemilumineszenz-Substrat inkubiert, die Chemilumineszenz-Signale mit dem System Fusion FX7 von Peqlab detektiert (Abb. 4.5A, B) und die Intensität der Banden mit der Software AIDA ausgewertet. Die Proteinmenge wurde relativ zur Fläche des Signals angegeben (Abb. 4.5C, D). Zusätzlich wurde in drei unabhängigen Experimenten die Transkriptmenge von Foxo1a und Foxo3a in den Zelllinien CP364-1WT, CP364-42 Δ E3A, CP1060WT, CP1063 Δ E3A, CP541-1WT, CP543-8 Δ E3C, CP544-1WT und CP546-3 Δ E3C durch Real-Time RT-PCR aus neu isolierter RNA ermittelt (Abb. 4.5E, F). Der Unterschied der relativen Protein-, bzw. Transkriptmenge zwischen Wildtyp-LCL und EBNA3A-, bzw. EBNA3C-negativer LCL ist durch eine geschweifte Klammer dargestellt.

Die Proteinmenge von Foxo1a (Abb. 4.5 links) ist in den EBNA3A-negativen Zelllinien CP364-42 Δ E3A und CP1063 Δ E3A ca. zweifach höher als in den WT-LCLs CP364-1WT und CP1060WT (Abb. 4.5C; Spur 1-4), während die Transkriptmenge von Foxo1a ca. dreifach erhöht ist (Abb. 4.4E; Spur 1-4). In den EBNA3C-negativen LCLs CP543-8 Δ E3C und CP546-3 Δ E3C ist Foxo1a nicht einheitlich reguliert im Vergleich zu den WT-LCLs CP541-1WT und CP544-1WT. Die Unterschiede in der Proteinmenge entsprechen jedoch denen der Transkriptmenge von Foxo1a (Abb. 4.5 C, E; Spur 5-8).

Die relative Proteinmenge von Foxo3a (Abb. 4.5 rechts) ist in den EBNA3A-negativen Zelllinien CP364-42 Δ E3A und CP1063 Δ E3A ca. vierfach erhöht gegenüber den WT-LCLs CP364-1WT und CP1060WT (Abb. 4.5D; Spur 1-4). Die relative Transkriptmenge von Foxo3a zeigt jedoch nur einen ca. dreifachen Unterschied (Abb. 4.5F; Spur 1-4). In den EBNA3C-negativen LCLs CP543-8 Δ E3C und CP546-3 Δ E3C ist die Proteinmenge von Foxo3a 35-fach, bzw. 11-fach höher im Vergleich zu den WT-LCLs CP541-1WT und CP544-1WT (Abb. 4.5D; Spur 5-8). Im Gegensatz dazu weist die Analyse der Transkriptlevel nur einen fünf-, bzw. vierfachen Unterschied zwischen den EBNA3C-negativen Zelllinien und den Wildtyp-LCLs auf (Abb. 4.5F; Spur 5-8).

Die quantitative Auswertung hat gezeigt, dass die Proteinexpression von Foxo3a vor allem in den EBNA3C-negativen LCLs nicht mit Transkriptmenge korreliert. Während Foxo3a in den WT-LCLs im Western Blot kaum detektierbar ist, liegt die Transkriptmenge deutlich über der Detektionsgrenze. Dies deutet möglicherweise auf eine zusätzliche posttranslationale Regulation von Foxo3a durch EBNA3A und EBNA3C.

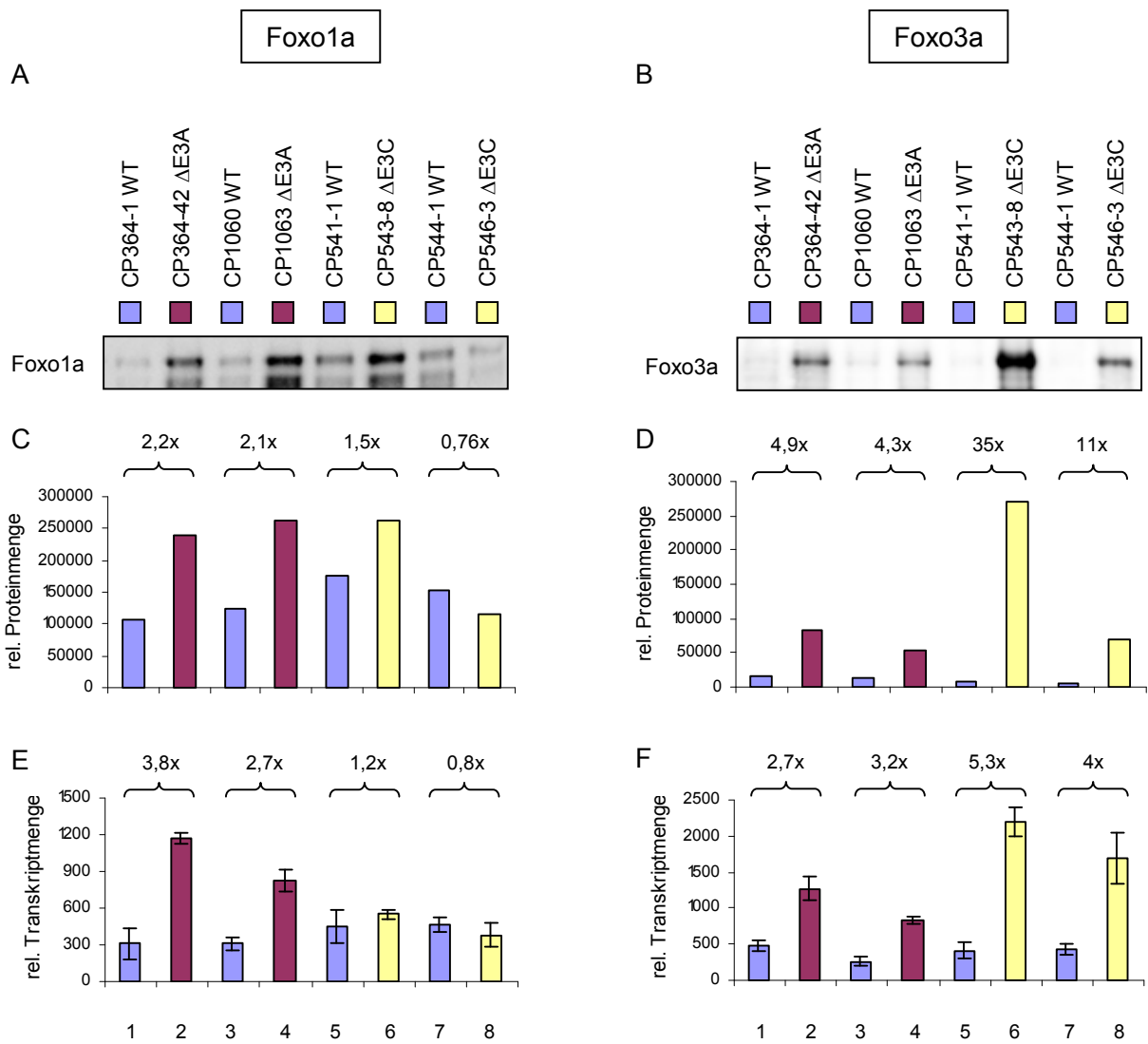


Abb. 4.5 Quantifizierung der Transkript- und Proteinmengen von Foxo1a und Foxo3a

Zur Quantifizierung der Proteinmengen von Foxo1a (links) und Foxo3a (rechts) in WT-LCLs (Spur 1, 3, 5, 7; blau) und EBNA3A- (Spur 2, 4; violett), bzw. EBNA3C-negativen LCLs (Spur 6, 8; gelb) wurden 30 µg Gesamtproteinlysate auf einem 8% Polyacrylamidgel aufgetragen und im Western Blot mit einem Foxo1a- (A), bzw. einem Foxo3a-Antikörper (B) inkubiert. Nach der Inkubation mit Chemilumineszenz-Substrat erfolgte die Detektion der Chemilumineszenz-Signale mit dem System Fusion FX7 von Peqlab. Die Intensität der Banden wurde mit dem Programm AIDA bestimmt und die Proteinmenge relativ zur Fläche des Signals (Integral/Fläche [QL/mm²]) graphisch dargestellt (C, D). Zum Vergleich wurden die durch Real-Time RT-PCR ermittelten relativen Transkriptmengen von Foxo1a (E) und Foxo3a (F) der gleichen Zelllinien abgebildet, welche wie in Abbildung 4.3 bestimmt wurden.

4.2.2.2 Das Foxo3a-Protein kann in WT-LCLs nicht durch Inhibierung einer potentiellen posttranslationalen Regulation stabilisiert werden

Der vorherige Abschnitt hat eine nicht-lineare Korrelation zwischen der Transkript- und der Proteinmenge von Foxo3a in den EBNA3A- und EBNA3C-negativen LCLs im Vergleich zu WT-LCLs gezeigt. Daher sollte im Folgenden untersucht werden, ob Foxo3a zusätzlich posttranslational durch EBNA3A und EBNA3C reguliert wird. In der Einleitung wurde die negative Regulation der Foxo-Transkriptionsfaktoren durch AKT erläutert (siehe auch Abb. 4.6). In Anwesenheit von Wachstumsfaktoren wird Foxo durch AKT, welche vorher durch PI3K aktiviert wurde, phosphoryliert. Daraufhin wird Foxo über CRM1 und 14-3-3-Proteine aus dem Kern ins Zytoplasma transportiert und dort über den Ubiquitin-Proteasom-Weg abgebaut. Dieser Regulationsweg kann durch verschiedene Chemikalien inhibiert werden (Abb. 4.6). In den folgenden Experimenten wurde untersucht, ob das Foxo3a-Protein durch Inhibierung der AKT-Phosphorylierung, des Kernexports oder des Abbaus im Proteasom stabilisiert werden kann. Dies wurde exemplarisch an zwei WT-LCLs und je einer EBNA3A-, bzw. einer EBNA3C-negativen LCL untersucht.

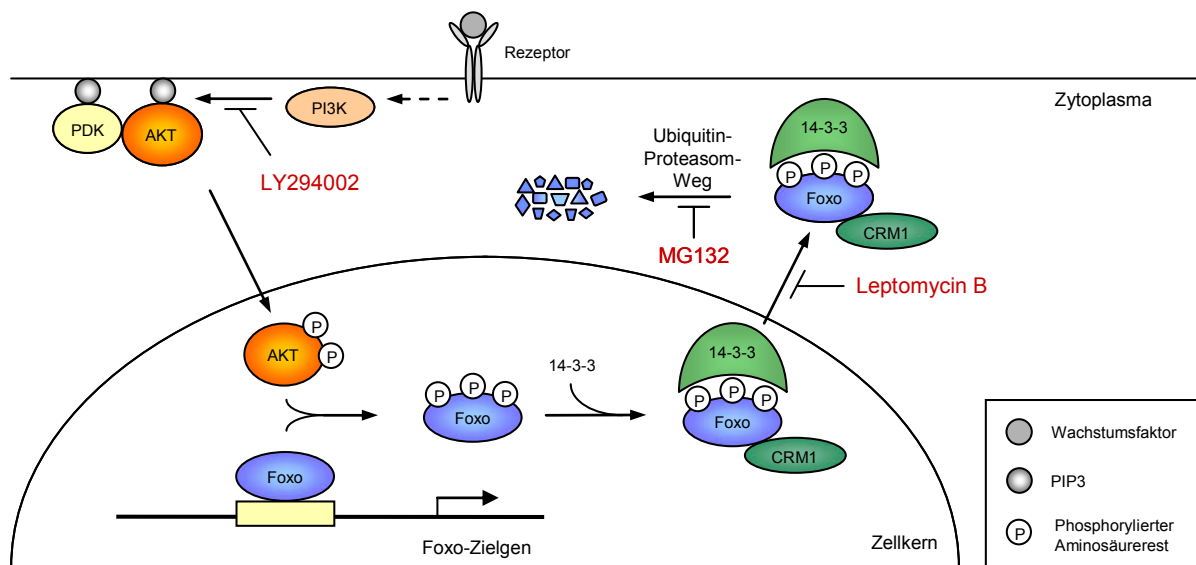


Abb. 4.6 Schematische Darstellung der posttranslationalen Regulation der Foxo-Transkriptionsfaktoren und mögliche Angriffspunkte zur Inhibierung

In Anwesenheit von Wachstumsfaktoren werden die an die DNA gebundenen Foxo-Transkriptionsfaktoren durch AKT phosphoryliert, über CRM1 ins Zytoplasma transportiert und dort über den Ubiquitin-Proteasom-Weg abgebaut. Die Abbildung zeigt Möglichkeiten, die posttranslationale Regulation von Foxo durch Chemikalien zu inhibieren. LY294002 verhindert die Phosphorylierung von AKT durch PI3K, Leptomycin B inhibiert den Kernexport über CRM1 und MG132 verhindert die Proteindegradation durch den Ubiquitin-Proteasom-Weg.

In Anwesenheit von Wachstumsfaktoren wird PI3K aktiviert und phosphoryliert AKT, wodurch AKT aktiviert wird und die Foxo-Transkriptionsfaktoren durch Phosphorylierung inaktiviert. Durch Inhibierung der ATP-Bindung von PI3K stellt LY294002 einen potenten PI3K-Inhibitor dar, der die Phosphorylierung und Aktivierung von AKT verhindert (Vlahos et al., 1994).

Sollte die geringe Proteinexpression von Foxo3a in WT-LCLs auf die Aktivität von AKT zurückzuführen sein, würde man einen Anstieg der Proteinmenge von Foxo3a bei Behandlung der Zellen mit LY294002 erwarten. Um diese Hypothese zu testen, wurden die Zellen CP364-1WT, CP364-42 Δ E3A, CP541-1WT und CP543-8 Δ E3C für 4 h und 8 h mit 5 μ M LY294002 behandelt und anschließend Proteinextrakte hergestellt. Die Proteinexpression von Foxo3a wurde im Western Blot untersucht. Abbildung 4.7A zeigt keinen Anstieg des Foxo3a-Proteins in WT-LCLs bei LY294002-Behandlung (Abb. 4.7A; Spur 1-3 und 7-9) und auch in den EBNA3A- und EBNA3C-negativen LCLs ist keine deutliche Stabilisierung des Proteins zu beobachten (Abb. 4.7A; Spur 4-6 und 10-12). Die geringe Proteinexpression von Foxo3a in WT-LCLs ist daher nicht auf eine kontinuierliche Inaktivierung durch AKT zurückzuführen.

Nach der Phosphorylierung durch AKT sind die Foxo-Proteine nicht mehr in der Lage, an DNA zu binden und werden über CRM1, welches spezifisch an Kernexportsignale bindet, aus dem Kern ins Zytoplasma exportiert. Leptomycin B (LMB) ist ein Inhibitor des CRM1-vermittelten Kernexports, indem es direkt an CRM1 bindet und so möglicherweise die Interaktion mit dem Kernexportsignal verhindert (Kudo et al., 1999). Durch Behandlung der Zellen mit LMB sollte die Proteinmenge Foxo3a ansteigen, wenn Foxo3a in WT-LCLs posttranslational durch erhöhten Kernexport negativ reguliert würde. Um eine potentielle Regulation von Foxo3a durch Kernexport zu untersuchen, wurden die Zelllinien CP364-1WT, CP364-42 Δ E3A, CP541-1WT und CP543-8 Δ E3C 14 h mit 5 nM LMB behandelt und die Proteinexpression von Foxo3a im Western Blot untersucht. Wie in Abbildung 4.7B zu sehen, führt die Behandlung mit LMB jedoch weder in WT-LCLs (Abb. 4.7B; Spur 1, 2 und 5, 6), noch in den EBNA3A-, bzw. EBNA3C-negativen LCLs (Abb. 4.7B; Spur 3, 4 und 7, 8) zu einer Stabilisierung des Foxo3a-Proteins. Die Proteinmenge von Foxo3a wird in WT-LCLs daher nicht durch Kernexport reguliert.

Nach dem Kernexport ins Zytoplasma werden die Foxo-Proteine über den Ubiquitin-Proteasom-Weg abgebaut. Um die Degradation von Proteinen im Proteasom zu verhindern, kann der Inhibitor MG132 eingesetzt werden. MG132 bindet an das katalytische Zentrum der 20S-Untereinheit des Proteasoms und verhindert die Spaltung des Substrats (Rock et al., 1994). Um zu untersuchen, ob die geringe Proteinmenge von Foxo3a in WT-Zellen auf einen erhöhten proteasomalen Abbau zurückzuführen ist, wurden die Zelllinien CP364-1WT, CP364-42 Δ E3A, CP541-1WT und CP543-8 Δ E3C für 8 h und 14 h mit 10 μ M MG132 behandelt. Die Proteinexpression von Foxo3a wurde im Western Blot untersucht, doch die Inhibierung des proteasomalen Abbaus durch MG132 konnte die Expression von Foxo3a in WT-LCLs nicht stabilisieren (Abb. 4.7C; Spur 1-3 und 7-9).

Die bisherigen Versuche haben gezeigt, dass die geringe Foxo3a-Expression in WT-LCLs nicht auf eine posttranslationale Regulation durch Inaktivierung durch AKT, erhöhten Kernexport oder verstärkte Degradation im Proteasom zurückzuführen ist. Daher wird Foxo3a durch EBNA3A und EBNA3C vermutlich transkriptionell reprimiert.

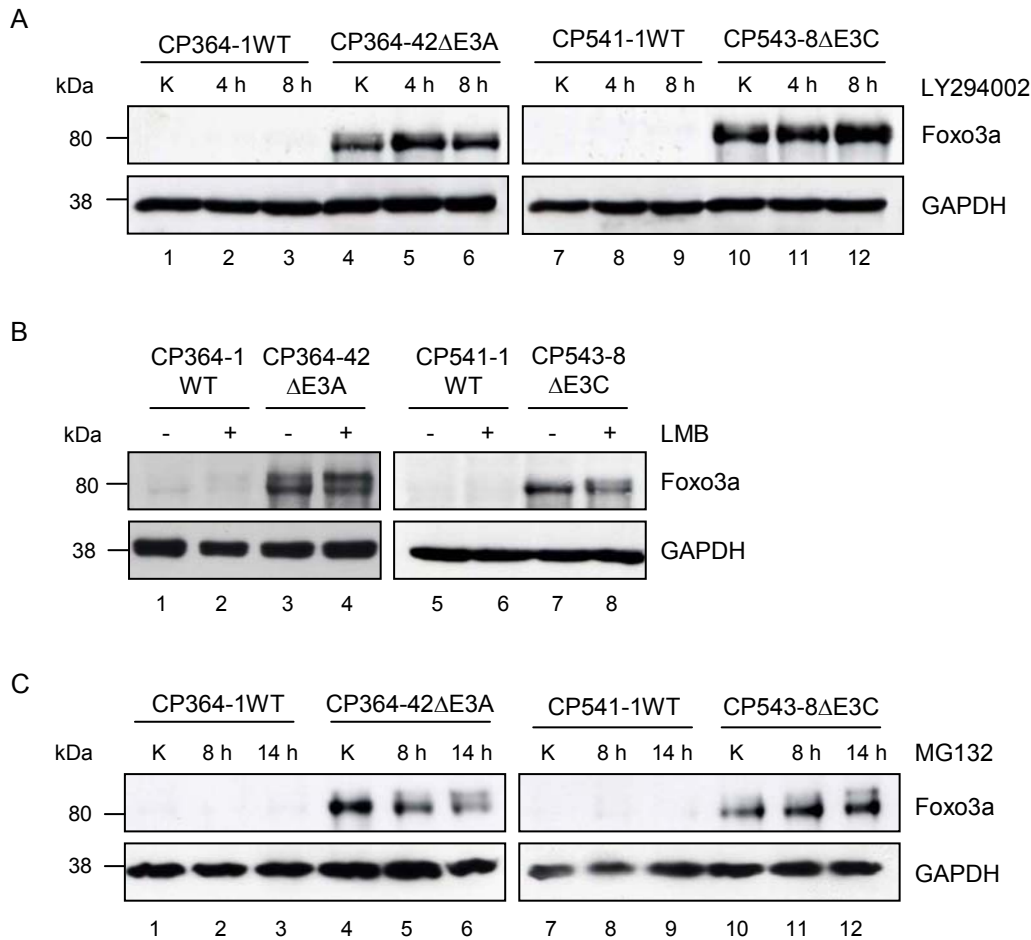


Abb. 4.7 Die Inhibierung einer potentiellen posttranslationalen Regulation von Foxo3a führt nicht zur Stabilisierung des Foxo3a-Proteins in WT-LCLs.

Zwei WT-LCLs CP364-1WT und CP541-1WT, eine EBNA3A-negative LCL CP364-42ΔE3A und eine EBNA3C-negative LCL CP543-8ΔE3C wurden mit einer Dichte von 5×10^5 /ml ausgesät. In (A) wurden die Zellen für 4 h und 8 h mit 5 μM LY294002, in (B) für 14 h mit 5 nM Leptomycin B (LMB) und in (C) für 8 h und 14 h mit 10 μM MG132 behandelt. Anschließend wurden Gesamtproteinextrakte hergestellt, 30 μg davon auf ein 8% Polyacrylamidgel aufgetragen und mit einem Foxo3a-Antikörper im Western Blot detektiert. GAPDH wurde als Ladekontrolle aufgetragen.

4.2.3 Untersuchung der Aktivität von Foxo1a und Foxo3a

Bisher konnte die Repression von Foxo3a durch EBNA3A und EBNA3C in mehreren WT-LCLs im Vergleich zu EBNA3A-, bzw. EBNA3C-negativen LCLs durch Real-Time RT-PCR bestätigt werden. Auf Proteinebene wurde festgestellt, dass Foxo3a in WT-LCLs nahezu nicht exprimiert ist. Foxo1a wurde lediglich durch EBNA3A reprimiert und war in WT-LCLs zwar schwach, aber deutlich detektierbar. Die Aktivität der Foxo-Transkriptionsfaktoren in Anwesenheit von Wachstumsfaktoren wird vor allem posttranslational durch Proteinexport und Degradation reguliert. Daher ist anzunehmen, dass Foxo1a und Foxo3a in den EBNA3A-, bzw. EBNA3C-negativen LCLs transkriptionell aktiv sind.

4.2.3.1 Analyse der Foxo-Zielgene im EBNA3A- und EBNA3C-Affymetrix-Array

Um zu untersuchen, ob die Foxo-Transkriptionsfaktoren in den EBNA3A-, bzw. EBNA3C-negativen LCLs transkriptionell aktiv sind, wurden die eingangs beschriebenen Affymetrix-Arrays zur Identifikation zellulärer EBNA3A- und EBNA3C-Zielgene in Bezug auf die Regulation der Foxo-Zielgene analysiert. Die Untersuchung beschränkte sich dabei auf die mit Apoptose, Zellzyklusregulation, DNA-Reparatur, ROS-Detoxifizierung und B-Zellregulation assoziierten Foxo-Zielgene. Tabelle 4.1 zeigt die Induktion und Repression von Probe Sets ausgewählter Foxo-Zielgene durch EBNA3A und EBNA3C. Im EBNA3A-Array wurden 15 Zelllinien untersucht, daher wurden nur Gene in die Tabelle aufgenommen, die in mindestens fünf Zelllinien ein Signal ergeben hatten („Sum of Calls“). Da im EBNA3C-Array nur vier Zelllinien in Triplikaten analysiert wurden, wurden nur Gene aufgenommen, deren Sum of Calls größer-gleich vier war. Zur Berechnung der Induktion wurde der Quotient aus dem Mittelwert der WT-LCLs und dem Mittelwert der EBNA3A-, bzw. EBNA3C-negativen LCLs gebildet. Gene, die signifikant differentiell mit einem p-Wert von weniger als 0,05 reguliert waren, sind gelb hinterlegt dargestellt.

Die Tabelle zeigt, dass lediglich die Gene für Cyclin D2 (CCND2) und TXNIP sowohl in EBNA3A-, als auch in EBNA3C-negativen Zellen signifikant differentiell reguliert sind. Cyclin D2 wird durch Foxo reprimiert (Ramaswamy et al., 2002) und ist auch in EBNA3A- und EBNA3C-negativen LCLs, in denen Foxo3a exprimiert ist, reprimiert. Cyclin D2 wird in den Affymetrix-Arrays jedoch lediglich zweifach reprimiert und diese Repression konnte nicht in allen untersuchten Zelllinien durch Real-Time RT-PCR bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). TXNIP ist in EBNA3A- und EBNA3C-negativen Zellen, in denen Foxo3a exprimiert wird, zwei- bis dreifach induziert. Doch auch diese Regulation konnte nicht in allen untersuchten Zelllinien durch Real-Time RT-PCR bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Außerdem ist in der Literatur sowohl die Repression, als auch die Induktion von TXNIP durch Foxo beschrieben (Li et al., 2009; Mitsui et al., 2002).

Die Foxo-Zielgene für TRAIL, GADD45B, p27 (CDKN1B) und CITED2 werden nur in EBNA3A-negativen, nicht jedoch in EBNA3C-negativen LCLs differentiell zu WT-LCLs reguliert. Da Foxo3a jedoch sowohl in EBNA3A-, als auch in EBNA3C-negativen Zelllinien exprimiert wird, werden die genannten Zielgene in diesen Zelllinien offensichtlich nicht durch Foxo3a reguliert. Zudem werden TRAIL und GADD45 normalerweise durch Foxo induziert (Modur et al., 2002; Tran et al., 2002), während sie in diesen Arrays in WT-LCLs, die kein Foxo3a exprimieren, induziert sind. Auch das laut Literatur durch EBNA3A und EBNA3C gemeinsam reprimierte Foxo-Zielgen Bim (Anderton et al., 2008) wird in diesen Affymetrix-Arrays nur durch EBNA3C reprimiert. Die Repression von Bim erfolgt hier daher wahrscheinlich nicht durch Foxo3a. Die übrigen Foxo-Zielgene SOD2, Cyclin D1, GADD45A, p21, Cyclin G2, KLF4, CAT und DDB1 werden in EBNA3A- und EBNA3C-negativen LCLs nicht differentiell im Vergleich zu WT-LCLs reguliert.

Tab. 4.1 Foxo-Zielgene im EBNA3A- und EBNA3C-Affymetrix-Array

Die Tabelle zeigt die Induktion (wt/mt) von in der Literatur beschriebenen Foxo-Zielgenen durch EBNA3A (links EBNA3A-Array) und EBNA3C (rechts EBNA3C-Array). Die Affymetrix-Arrays zur Identifikation von zellulären Zielgenen von EBNA3A und EBNA3C wurden durchgeführt wie in Abbildung 4.2 beschrieben. Zur Berechnung der Induktion von Genen, wurde der Quotient aus den Mittelwerten der WT-LCLs und den Mittelwerten der EBNA3A-, bzw. der EBNA3C-negativen LCLs ermittelt. Für den EBNA3A-Array sind nur Probe Sets gezeigt, deren „Sum of Calls“ größer-gleich fünf war. Für den EBNA3C-Array sind nur Probe Sets gezeigt, deren „Sum of Calls“ größer-gleich vier war. Die Gene, deren Probe Sets mehrheitlich einen p-Wert von weniger als 0,05 hatten, sind gelb hinterlegt.

EBNA3A-Array				EBNA3C-Array			
Probe Set Sum of Calls \geq 5	Genname	wt/mt	p-Wert	Probe Set Sum of Calls \geq 4	Genname	wt/mt	p-Wert
202688_at	TNFSF10/ TRAIL [1]	3,56	0,013	200951_s_at	CCND2/ Cyclin D2 [2]	1,66	0,021
202687_s_at		2,56	0,0022	200953_s_at		1,42	0,049
200951_s_at		2,05	0,018	200952_s_at		1,39	0,14
200953_s_at	CCND2/ Cyclin D2 [2]	2,02	0,0041	202284_s_at	CDKN1A/ p21 [8]	1,52	0,15
200952_s_at		1,75	0,038	221841_s_at	KLF4 [10]	1,19	0,46
209305_s_at		1,82	0,034	208712_at	CCND1/ Cyclin D1 [6]	0,79	0,89
207574_s_at	GADD45B [3]	1,63	0,021	208619_at	DDB1 [12]	1,03	0,84
209304_x_at		1,46	0,051	202687_s_at	TNFSF10/ TRAIL [1]	1,03	0,98
215223_s_at	SOD2 [4]	1,79	0,00047	202688_at		0,99	0,99
216841_s_at		1,13	0,41	201432_at	CAT [11]	0,93	0,39
222343_at	BCL2L11/ BIM [5]	1,39	0,18	211922_s_at		0,88	0,17
208536_s_at		1,33	0,33	209304_x_at	GADD45B [3]	0,95	0,89
208711_s_at		1,37	0,38	207574_s_at		0,92	0,84
208712_at	CCND1/ Cyclin D1 [6]	1,33	0,27	209305_s_at		0,91	0,77
214019_at		1,33	0,046	215223_s_at	SOD2 [4]	0,90	0,43
203725_at	GADD45A [7]	1,32	0,053	216841_s_at		0,88	0,29
202284_s_at	CDKN1A/ p21 [8]	1,22	0,12	209112_at	CDKN1B/ p27 [13]	0,67	0,38
202769_at		1,12	0,46	211559_s_at		0,64	0,38
202770_s_at	CCNG2/ Cyclin G2 [9]	1,05	0,78	202770_s_at	CCNG2/ Cyclin G2 [9]	0,62	0,33
211559_s_at		0,99	0,96	202769_at		0,61	0,37
221841_s_at	KLF4 [10]	1,10	0,24	203725_at	GADD45A [7]	0,53	0,67
211922_s_at		1,06	0,74	208536_s_at	BCL2L11/ BIM [5]	0,43	0,0053
201432_at	CAT [11]	1,02	0,88	222343_at		0,37	0,00019
208619_at	DDB1 [12]	0,95	0,77	201009_s_at	TXNIP [14]	0,40	0,011
209112_at	CDKN1B/ p27 [13]	0,68	0,026	201008_s_at		0,38	0,031
201009_s_at		0,43	0,048	201010_s_at		0,32	0,0041
201010_s_at	TXNIP [14]	0,37	0,022	207960_s_at	CITED2 [15]	0,24	0,15
201008_s_at		0,35	0,049	209357_at		0,22	0,17
207960_s_at	CITED2 [15]	0,35	0,023				
209357_at		0,27	0,0086				

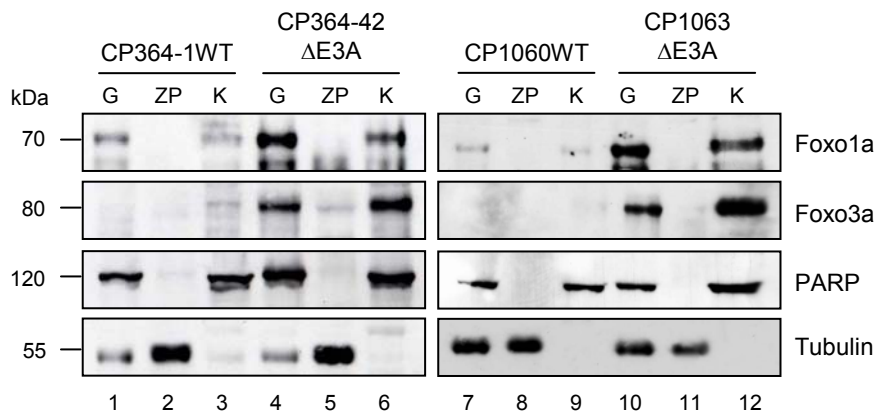
[1] (Modur et al., 2002); [2]; 6; 12] (Ramaswamy et al., 2002); [3]; 7] (Tran et al., 2002); [4] (Kops et al., 2002a); [5] (Dijkers et al., 2000); [8] (Seoane et al., 2004); [9; 12] (Martinez-Gac et al., 2004); [10] (Yusuf et al., 2008); [11] (Nemoto and Finkel, 2002); [13] (Medema et al., 2000); [14] (de Candia et al., 2008); [15] (Bakker et al., 2007)

Die Analyse der Affymetrix-Arrays von EBNA3A- und EBNA3C-negativen LCLs, in denen Foxo3a exprimiert ist, im Vergleich zu WT-LCLs, in denen Foxo3a reprimiert ist, hat keine differentielle Regulation der in der Literatur beschriebenen Foxo-Zielgene gezeigt.

4.2.3.2 Subzelluläre Lokalisierung von Foxo1a und Foxo3a

Die Analyse der Affymetrix-Arrays hat gezeigt, dass die in Apoptose, Zellzyklusregulation, DNA-Reparatur und ROS-Detoxifizierung involvierten Foxo-Zielgene nicht in den EBNA3A- und EBNA3C-negativen LCLs reguliert sind. Daher sollte als Nächstes untersucht werden, ob Foxo1a und Foxo3a möglicherweise im Zytoplasma lokalisiert sind und daher nicht transkriptionell aktiv sind.

A



B

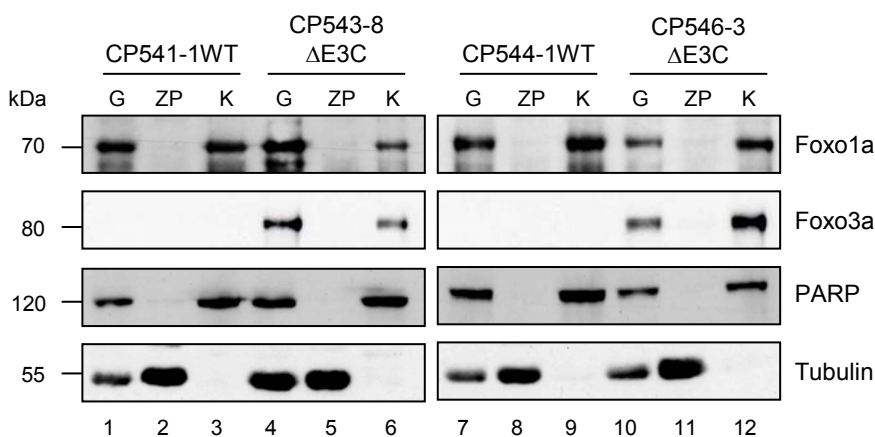


Abb. 4.8 Subzelluläre Lokalisierung von Foxo1a und Foxo3a

WT-LCLs (A, B; Spur 1-3 und 7-9), EBNA3A-negative LCLs (A; Spur 4-6 und 10-12) und EBNA3C-negative LCLs (B; Spur 4-6 und 10-12) wurden in eine Zytoplasmafraktion (ZP) und eine Kernfraktion (K) fraktioniert. 30 μ g der jeweiligen Proteinfraction wurden auf ein 8% Polyacrylamidgel aufgetragen und Foxo1a und Foxo3a im Western Blot detektiert. Zur Kontrolle wurden 30 μ g des Gesamtzell-extrakts (G) aufgetragen. PARP diente zum Nachweis der Kernfraktion, Tubulin zum Nachweis der Zytoplasmafraktion.

Dazu wurde eine Zellfraktionierung der Zelllinien CP364-1WT, CP364-42 Δ E3A, CP1060WT, CP1063 Δ E3A, CP541-1WT, CP543-8 Δ E3C, CP544-1WT und CP546-3 Δ E3C in Zytoplasmafraktion (ZP) und Kernfraktion (K) durchgeführt. Die Expression von Foxo1a und Foxo3a wurde im Western Blot nachgewiesen und das Gesamtproteinlysate (G) als Kontrolle aufgetragen. Als Kontrolle auf eine saubere Zytoplasmafraktion wurde PARP detektiert, was nur im Kern exprimiert ist. Um eine saubere Kernfraktion nachzuweisen, wurde Tubulin detektiert, das nur im Zytoplasma exprimiert ist.

Abbildung 4.8 zeigt, dass Foxo1a und Foxo3a, wenn sie exprimiert sind, fast ausschließlich im Kern (Abb. 4.8A, B; Spur 3, 6, 9, 12) und nicht im Zytoplasma lokalisiert sind. Die Expression von Foxo1a in den WT-LCLs CP541-1WT und CP544-1WT scheint höher, als in den WT-LCLs CP364-1WT und CP1060WT (Abb. 4.8; Spur 1, 7; vgl. A und B). Dies ist jedoch auf eine längere Exposition des Western Blots zurückzuführen, da Foxo1a in den EBNA3C-negativen LCLs schwächer exprimiert ist, als in den EBNA3A-negativen LCLs. Die einzelnen Fraktionen zeigen keine Verunreinigung im Western Blot mit PARP und Tubulin.

4.2.3.3 Untersuchung der DNA-Bindung durch Foxo3a

Die Untersuchung der Lokalisierung der Foxo-Proteine hat gezeigt, dass sie im Kern lokalisiert sind und damit transkriptionell aktiv sein können. Es ist jedoch möglich, dass eine posttranslationale Modifikation von Foxo3a die DNA-Bindung verhindert und daher die Foxo-Zielgene nicht reguliert sind. Da eine Acetylierung der Foxo-Proteine deren DNA-Bindung inhibieren und somit die transkriptionelle Aktivität verhindern kann (Fukuoka et al., 2003; Matsuzaki et al., 2005), wurde eine mögliche Acetylierung von Foxo3a untersucht. Weil Foxo3a gemeinsam durch EBNA3A und EBNA3C reprimiert wird und diese Arbeit die kooperative Funktion von EBNA3A und EBNA3C untersuchen soll, wird im Folgenden der Schwerpunkt auf Foxo3a gelegt.

Die Untersuchung einer möglichen Acetylierung von Foxo3a wurde beispielhaft in der EBNA3A-negativen Zelllinie CP364-42 Δ E3A durchgeführt. Dazu wurde zunächst eine Immunpräzipitation von Foxo3a durchgeführt und sowohl das Gesamtzelllysate (L), als auch die Probe der Immunpräzipitation (IP) im Western Blot aufgetragen. Um eine mögliche Deacetylierung während der Durchführung zu verhindern, wurde ein Teil der Zellen vor der Immunpräzipitation 18 h mit 0,4 μ M TSA (Trichostatin A; Inhibitor von Histondeacetylasen) behandelt. Abbildung 4.9 zeigt, dass Foxo3a in Anwesenheit und Abwesenheit von TSA exprimiert und präzipitiert wird. Mit einem acetylierungsspezifischen Antikörper (Ac-K-103) kann Foxo3a jedoch nicht detektiert werden (Abb. 4.9). Die Bande im Lysat bei ca. 50 kDa unter TSA-Behandlung (Abb. 4.9; Spur 3) zeigt acetyliertes p53. Foxo3a liegt daher in der EBNA3A-negativen Zelllinie CP364-42 Δ E3A nicht acetyliert vor.

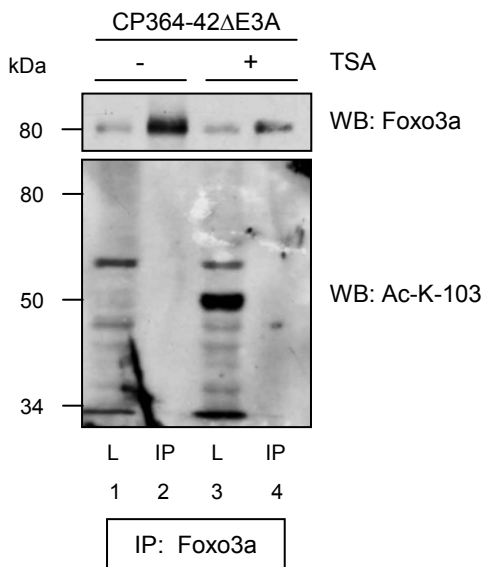


Abb. 4.9 Foxo3a liegt nicht acetyliert vor

Aus 2×10^7 Zellen der Zelllinie CP364-42ΔE3A (Spur 1, 2) und aus 2×10^7 Zellen der Zelllinie CP364-42ΔE3A, die zuvor 18 h mit 0,4 μM TSA behandelt worden war (Spur 3, 4), wurde eine Immunpräzipitation mit dem Foxo3a-Antikörper durchgeführt. Zur Detektion von Foxo3a wurden die Proben der Immunpräzipitation (IP) und 20 μg des Zelllysats (L) auf ein 8% Polyacrylamidgel aufgetragen und im Western Blot detektiert. Zur Detektion möglicher an Lysin acetylierter Proteine wurden die Proben auf ein 10% Polyacrylamidgel aufgetragen und im Western Blot mit einem Antikörpern gegen acetyliertes Lysin (Ac-K-103) detektiert.

Der eben gezeigte Versuch hat dargestellt, dass Foxo3a vermutlich nicht acetyliert ist, was eine mögliche Erklärung für die fehlende Regulation der Foxo-Zielgene in Foxo3a-exprimierenden Zellen gewesen wäre. Es gibt jedoch noch weitere Modifikationen, die die DNA-Bindung und damit die Aktivität von Foxo3a verhindern können. Daher sollte als Nächstes untersucht werden, ob das in den EBNA3A- und EBNA3C-negativen LCLs CP364-42ΔE3A, CP1063ΔE3A, CP543-8ΔE3C und CP546-3ΔE3C exprimierte Foxo3a in der Lage ist, an das Foxo Responsive Element (FRE) zu binden. Auch die WT-LCLs CP364-1WT, CP1060WT, CP541-1WT und CP544-1WT wurden untersucht. Um die DNA-Bindung zu überprüfen, wurde eine Affinitätspräzipitation von Foxo3a aus Gesamtzelllysaten (L) über ein biotinyliertes Oligonukleotid, welches das FRE enthält, durchgeführt. Als Kontrolle auf spezifische DNA-Bindung von Foxo3a wurde zusätzlich ein Oligonukleotid verwendet, in dem zwei Nukleotide der Konsensussequenz mutiert waren (FRE_{mut}). Abbildung 4.10A zeigt die Sequenzen der Oligonukleotide, die nach Furuyama et al. (2000) und Tsai et al. (2007) modifiziert wurden.

Die Affinitätspräzipitation (AP) der Oligonukleotide erfolgte über Streptavidin-gekoppelte Agarose-Beads. Um eine unspezifische Bindung von Foxo3a an die Beads auszuschließen, wurde vor der Affinitätspräzipitation ein Preclear durchgeführt (PC). Die Expression von Foxo3a und die Präzipitation über das das FRE enthaltende Oligonukleotid wurden im Western Blot nachgewiesen. Abbildung 4.10B zeigt die Präzipitation von Foxo3a über ein das FRE enthaltende Oligonukleotid in den EBNA3A-negativen Zelllinien CP364-42ΔE3A und CP1063ΔE3A und in den EBNA3C-negativen Zelllinien CP543-8ΔE3C und CP546-3ΔE3C (Abb. 4.10B; Spur 7, 15). Wie in den Preclear-Proben (Abb. 4.10B; Spur 6, 14) und in den Proben, in denen das FRE mutiert ist (Abb. 4.10B; Spur 8, 16) zu sehen ist, bindet Foxo3a weder unspezifisch an die Streptavidin-gekoppelten Agarose-Beads, noch unspezifisch an DNA. In der WT-LCL CP1060WT (Abb. 4.10B; Spur 9-12) ist hier eine

schwache Expression von Foxo3a zu sehen und auch in dieser Zelllinie wird Foxo3a durch ein das FRE enthaltende Oligonukleotid präzipitiert (Abb. 4.10B; Spur 11).

Dieser Versuch hat gezeigt, dass in LCLs exprimiertes Foxo3a *in vitro* an die Foxo-Konsensussequenz binden kann und dadurch transkriptionell aktiv sein kann.

A

FRE: 5' Biotin-CGCATCCTATGTAACAACCTCGAGTC 3'
 FRE_{mut}: 5' Biotin-CGCATCCTATGTAGGCAACTCGAGTC 3'

B

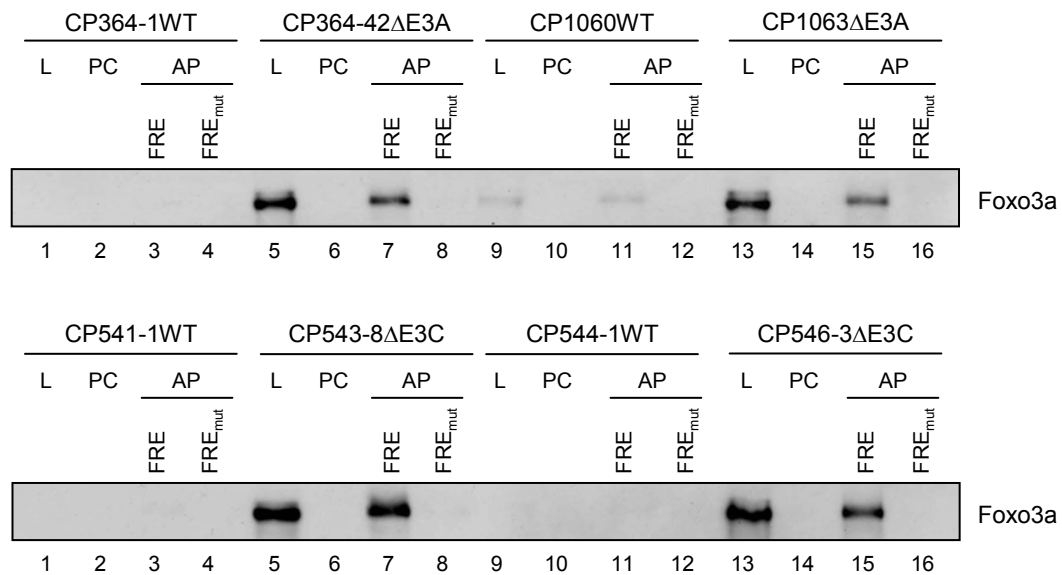


Abb. 4.10 Das in LCLs exprimierte Foxo3a kann *in vitro* an das Foxo Responsive Element (FRE) binden.

(A) Darstellung der in der DNA-Affinitätspräzipitation verwendeten Oligonukleotide. FRE enthält die Foxo-Konsensussequenz (rot), während in FRE_{mut} zwei Nukleotide der Konsensussequenz mutiert sind, um die Bindung von Foxo3a zu verhindern. Beide Oligonukleotide enthalten einen Biotin-Tag am 5'-Ende. (B) DNA-Affinitätspräzipitation von Foxo3a über das FRE. Für die Affinitätspräzipitation wurden 500 µg Gesamtproteinextrakt von WT-LCLs (Spur 1-4 und 9-12), von EBNA3A-negativen LCLs (oben; Spur 5-8 und 13-16) und von EBNA3C-negativen LCL (unten; Spur 5-8 und 13-16) zunächst einem Preclear mit Streptavidin-gekoppelten Agarose-Beads unterzogen. Anschließend wurden die Proteinextrakte mit den in (A) abgebildeten Oligonukleotiden (FRE, FRE_{mut}) inkubiert. Die DNA-Affinitätspräzipitation erfolgte über Streptavidin-gekoppelte Agarose-Beads. Zur Detektion von Foxo3a wurde das Gesamtzelllysat (L), die Beads nach dem Preclear (PC) und die Proben der beiden Affinitätspräzipitationen (AP) auf einem 8% Polyacrylamidgel aufgetragen und ein Western Blot durchgeführt. Die Proteinmenge im Lysat entspricht 13% der AP-Probe.

4.2.4 Kann die Expression von Foxo3a durch Stress-Stimuli induziert werden?

Die vorhergehenden Experimente haben gezeigt, dass Foxo3a in EBNA3A- und EBNA3C-negativen LCLs exprimiert und im Kern lokalisiert ist und an die Foxo-Konsensussequenz binden kann. Dennoch konnte in Affymetrix-Arrays keine Regulation der Foxo-Zielgene beobachtet werden. Dies ist insofern verwunderlich, weil davon ausgegangen wird, dass die Foxo-Transkriptionsfaktoren aus dem Kern exportiert und degradiert werden müssen, um

inaktiviert zu werden. Daher wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Expression von Foxo3a in den EBNA3A- und EBNA3C-negativen LCLs möglicherweise unter einem Schwellenwert liegt, der für die transkriptionelle Aktivität erforderlich ist. Dieser Schwellenwert könnte jedoch möglicherweise durch Stress-Stimuli überschritten werden.

Untersuchungen in verschiedenen Zelllinien haben gezeigt, dass die Expression von Foxo durch Bestrahlung (Yang et al., 2006), H₂O₂-Behandlung (Nakamura and Sakamoto, 2008) und Serumentzug (Liu et al., 2005) ansteigt. Dies ist zu erwarten, da AKT bei Zellstress inaktiv ist und Foxo nicht inaktivieren kann und es daher zu einer Akkumulation von Foxo im Kern kommt. Es wurde jedoch auch ein Anstieg der Foxo-mRNA durch H₂O₂-Behandlung (Nakamura and Sakamoto, 2008) und Serumentzug (Liu et al., 2005) beobachtet, was auf eine zusätzliche transkriptionelle Regulation deutet. Eine solche Induktion der Foxo-Expression durch Zellstress wurde jedoch noch nicht bei Zellen des Immunsystems beobachtet.

Um zu untersuchen, ob die Foxo3a-Expression durch unterschiedliche Stress-Stimuli induziert werden kann, wurden die Zelllinien CP364-1WT, CP364-42ΔE3A, CP541-1WT und CP543-8ΔE3C ionisierender Strahlung, H₂O₂ und Serumentzug ausgesetzt. Die Expression von Foxo3a wurde im Western Blot nachgewiesen. Die Abbildung 4.11 zeigt, dass die Foxo3a-Expression nach 24 h weder durch ionisierende Bestrahlung mit 850 R (Abb. 4.11A), noch durch oxidativen Stress durch 10 μM H₂O₂ (Abb. 4.11B) induziert werden kann. Bei der Zelllinie CP354-42ΔE3A ist bei Bestrahlung mit 850 R möglicherweise eine leichte Zunahme des Foxo3a-Proteins zu beobachten (Abb. 4.11A Spur 3, 4). Diese Zunahme konnte jedoch in weiteren Versuchen und anderen EBNA3A-negativen LCLs nicht bestätigt werden. Um auszuschließen, dass die Foxo3a-Expression nach 24 h möglicherweise schon wieder auf den Normalwert zurückgegangen war, wurden auch Proteinextrakte 8 h nach dem Stress-Stimulus analysiert, die jedoch das gleiche Ergebnis zeigten (Daten nicht gezeigt). Auch die Kultivierung in serumfreiem Medium für fünf Tage führte nicht zur Induktion der Foxo3a-Expression (Abb. 4.11C). In der Zelllinie CP364-42ΔE3A (Abb. 4.11C oben; Spur 7-12) ist zwar eine schwache Zunahme des Foxo3a-Proteins zu sehen, diese Beobachtung konnte jedoch nicht reproduziert werden und war auch nicht in anderen EBNA3A-negativen LCLs zu sehen (Daten nicht gezeigt).

Diese Versuche haben zum Einen gezeigt, dass die bereits starke Expression von Foxo3a in EBNA3A- und EBNA3C-negativen LCLs nicht weiter durch Zellstress, wie Bestrahlung, H₂O₂-Behandlung oder Serumentzug induziert werden kann. Andererseits wurde gezeigt, dass die strikte Repression von Foxo3a in WT-LCLs auch bei zellulärem Stress nicht überkommen werden kann.

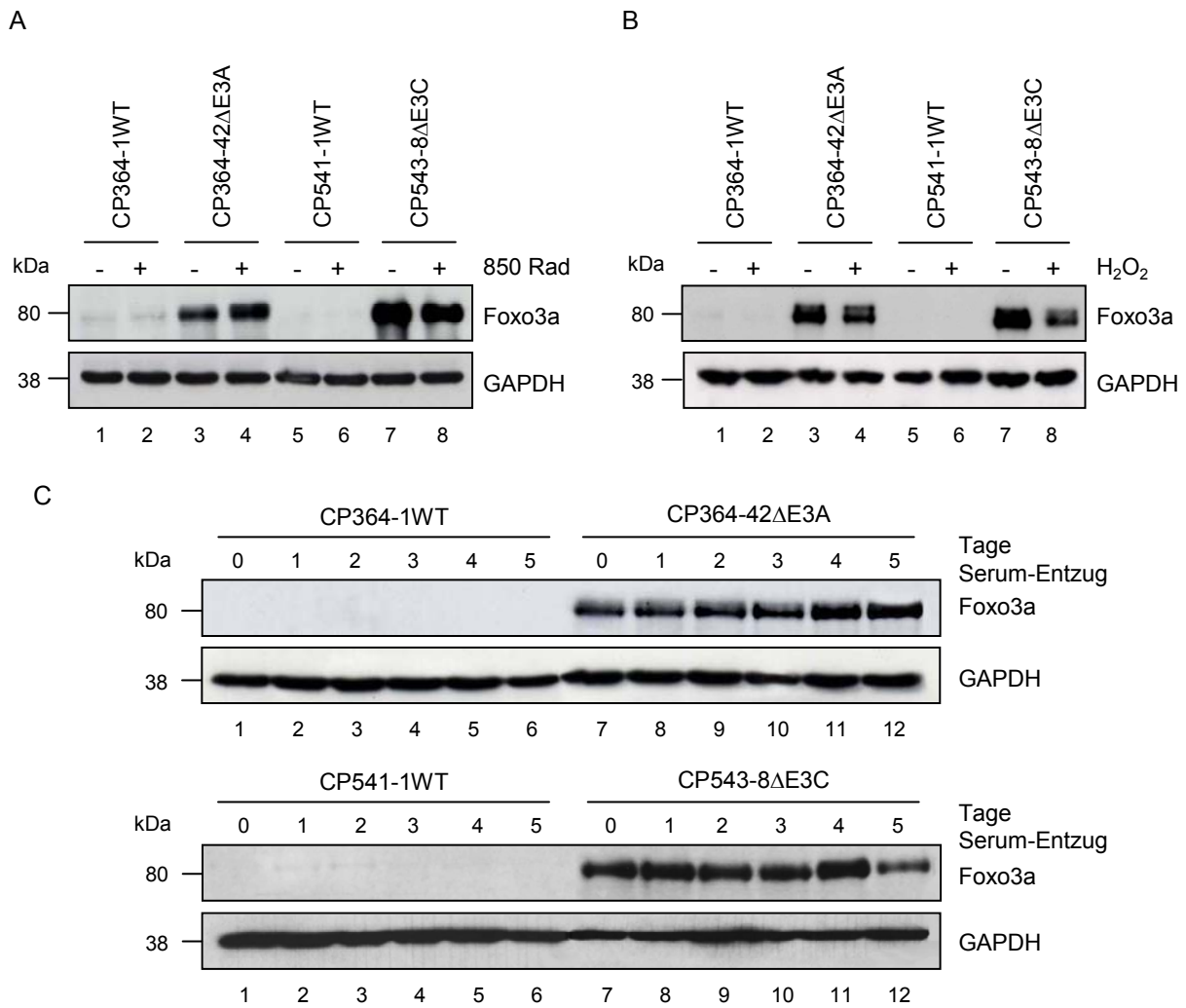


Abb. 4.11 Die Expression von Foxo3a wird nicht durch Zellstress induziert.

(A, B) Um eine mögliche Induktion von Foxo3a durch ionisierende Strahlung oder oxidativen Stress zu untersuchen, wurden zwei WT-LCLs (A, B; Spur 1, 2 und 5, 6), eine EBNA3A-negative LCL (A, B; Spur 3, 4) und eine EBNA3C-negative LCL (A, B; Spur 7, 8) mit einer Dichte von 5×10^5 /ml ausgesät. In (A) wurden die Zellen in einer Gamma Cell 40 mit einer Dosis von 850 Rad bestrahlt. In (B) wurden die Zellen mit $10 \mu\text{M}$ H₂O₂ behandelt. Nach 24 h wurden Proteinextrakte hergestellt. (C) Um eine mögliche Induktion der Foxo3a-Expression durch Serumentzug zu untersuchen, wurden zwei WT-LCLs (C; Spur 1-6), eine EBNA3A-negative LCL (C; oben Spur 7-12) und eine EBNA3C-negative LCL (C; unten Spur 7-12) dreimal mit 0,5% FCS-haltigem Medium gewaschen und in 0,5% FCS-haltigem Medium auf eine Dichte von $3,5 \times 10^5$ /ml eingestellt. Anschließend wurden fünf Tage lang jeden Tag Proteinextrakte hergestellt. 30 μg Gesamtprotein aus A, B, und C wurden auf ein 8% Polyacrylamidgel aufgetragen und im Western Blot gegen Foxo3a detektiert. GAPDH wurde als Ladekontrolle detektiert.

4.2.5 Knockdown von Foxo3a in EBNA3A-negativen LCLs durch shRNA mittels lentiviraler Transduktion

Bisher wurde gezeigt, dass Foxo3a in EBNA3A- und EBNA3C-negativen LCLs maximal exprimiert ist und wahrscheinlich konstitutiv aktiv ist, jedoch keine in der Literatur beschriebenen Zielgene reguliert werden. Außerdem konnte die Foxo3a-Expression nicht durch Zellstress induziert werden, was in anderen zellulären Systemen zu einer anschließenden Induktion der Zielgene führte.

Um die Funktion von Foxo3a in EBNA3A- und EBNA3C-negativen LCLs weiter zu untersuchen, sollte Foxo3a stabil herunterreguliert werden (Knockdown) und die Langzeitauswirkung auf die Zellen untersucht werden. Da die EBNA3C-negativen LCLs sehr instabil in Bezug auf ihren Chromosomensatz und das Wachstum in der Zellkultur waren, wurde der Knockdown von Foxo3a nur in einer EBNA3A-negativen LCL untersucht.

Wie in der Einleitung ausgeführt, besitzen die Foxo-Proteine zwei scheinbar widersprüchliche Funktionen: bei Zellstress können sie entweder die Apoptose von Zellen induzieren, oder sie ermöglichen deren Überleben durch die Induktion des Zellzyklusarrests, der DNA-Reparatur und der Detoxifizierung. Der Knockdown von Foxo3a kann daher zwei Auswirkungen haben. Entweder erhöht er die Proliferation der EBNA3A-negativen LCLs, da Foxo3a das höhere Apoptoselevel dieser Zellen bedingte. Oder der Knockdown von Foxo3a führt zu einem schlechteren Wachstum der EBNA3A-negativen LCLs, da Foxo3a das Überleben dieser Zellen unter Stressbedingungen verbesserte und dadurch das Auswachsen dieser EBNA3A-negativen LCLs ermöglichte.

4.2.5.1 Etablierung von EBNA3A-negativen Foxo3a-Knockdown-LCLs

Der stabile Knockdown von Foxo3a erfolgte mit Hilfe des „BLOCK-iT™ Lentiviral RNAi Expression System“ von Invitrogen. In diesem System werden zunächst lentivirale Expressionsvektoren, die für die shRNA kodieren, mittels Gateway®-Rekombination kloniert. Die Produktion des Lentivirus-Überstands erfolgt durch Transfektion des Expressionsvektors zusammen mit Helferplasmiden in HEK293FT-Zellen. Mit dem Lentivirus-Überstand können anschließend sowohl adhärente Zellen, als auch Suspensionszellen transduziert werden. Da die shRNA zusammen mit einem Resistenzmarker in das Genom der Wirtszelle integriert wird, ist es möglich, stabile Zelllinien zu etablieren, in denen ein bestimmtes Gen ausgeknockt ist. Dies ermöglicht die Langzeituntersuchung von Zellen.

Zum Knockdown von Foxo3a wurde die EBNA3A-negative LCL CP364-42ΔE3A mit lentiviralen Vektoren transduziert, die eine shRNA gegen Foxo3a exprimieren. Aus CP364-42ΔE3A wurden dadurch die beiden Zelllinien SP1129.2.1shF3A und SP1253shF3A etabliert. Um unspezifische Effekte durch die Transduktion der LCLs mit lentiviralen Vektoren auszuschließen, wurde die EBNA3A-negative LCL CP364-42ΔE3A zusätzlich mit einem

GFP-exprimierenden Lentivirus transduziert und dadurch die Zelllinie SP1129.2.3GFP etabliert. Als Kontrolle auf eine unspezifische Wirkung durch die Sequenz der Foxo3a-shRNA wurde ein Vektor zur Expression einer „scrambled“ shRNA kloniert, welche die Nukleotide der Foxo3a-shRNA in zufälliger Reihenfolge enthält. Durch Transduktion der LCL CP364-42ΔE3A mit einem die scrambled shRNA exprimierenden lentiviralen Vektor wurde die Zelllinie SP1308.1scrambled etabliert. Anschließend wurde der Erfolg des Knockdowns im Western Blot und durch Real-Time RT-PCR überprüft.

Abbildung 4.12 zeigt die Proteinexpression und die Transkriptmenge von Foxo3a in den eben beschriebenen Zelllinien. Gegenüber der Ursprungszelllinie CP364-42ΔE3A ist die Proteinexpression von Foxo3a in den Foxo3a-Knockdown-Zellen SP1129.2.1shF3A und SP1253shF3A (Abb. 4.12A; vgl. Spur 1 mit 2, 3) deutlich reduziert. Die durch Real-Time RT-PCR ermittelten Transkriptmengen (Abb. 4.12B) von Foxo3a in diesen Zelllinien zeigt eine Reduktion von ca. 50% im Vergleich zu der Ausgangszelllinie (Abb. 4.12B; vgl. Spur 1 mit 2, 3). In den EBNA3A-negativen Kontroll-Zelllinien SP1129.2.3GFP und SP1308.1scrambled ist keine Reduktion im Protein- oder Transkriptlevel von Foxo3a zu beobachten (Abb. 4.12A, B; Spur 4, 5).

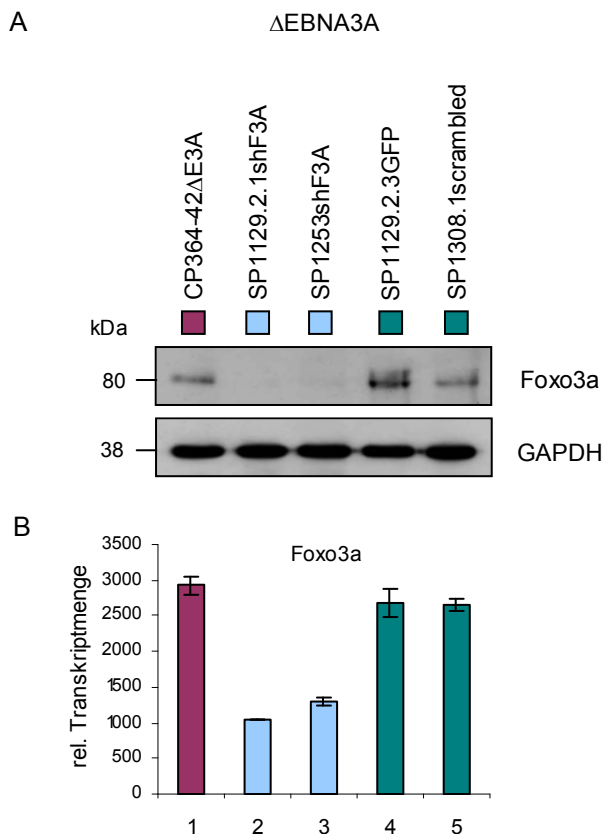


Abb. 4.12 Knockdown von Foxo3a in der EBNA3A-negativen LCL CP364-42ΔE3A

Die EBNA3A-negative LCL CP364-42ΔE3A (Spur 1; violett) wurde mit in HEK293FT-Zellen produzierten lentiviralen Vektoren transduziert und in Blasticidin-haltigem Medium (3 µg/ml) auf stabil transduzierte Zellen selektiert. Neben lentiviralen Vektoren, die eine shRNA gegen Foxo3a exprimieren (shF3A; Spur 2, 3; hellblau), wurden die Zellen zur Kontrolle mit GFP-exprimierenden Vektoren (Spur 4; türkis) und Vektoren, die eine shRNA aus willkürlich kombinierten Nukleotiden der Foxo3a-shRNA (scrambled; Spur 5; türkis) exprimieren transduziert. Zum Nachweis der Proteinexpression (A) wurden 30 µg Gesamtprotein auf ein 8% Polyacrylamidgel aufgetragen und im Western Blot mit einem Foxo3a-Antikörper detektiert. GAPDH diente als Ladekontrolle. Die relativen Transkriptmengen (B) von Foxo3a wurden ermittelt wie in Abbildung 4.3 beschrieben.

4.2.5.2 EBNA3A-negative Foxo3a-Knockdown-LCLs weisen ein verlangsamtes Wachstum auf

Wie bereits anfangs beschrieben, weisen EBNA3A-negative LCLs eine erhöhte Apoptoserate und eine verringerte Proliferationsrate auf. Wenn dieser Phänotyp durch die Expression von Foxo3a bewirkt wird, müsste der Knockdown von Foxo3a zu einer Reversion dieses Phänotyps führen. Andererseits ermöglichte die Expression von Foxo3a vielleicht erst das Auswachsen der EBNA3A-negativen LCLs durch den durch Foxo3a vermittelten Schutz vor Zellstress. Um diese beiden Hypothese zu testen, wurden Wachstumskurven von WT-LCLs und EBNA3A-negativen LCLs im Vergleich zu EBNA3A-negativen Foxo3a-Knockdown-LCLs und der GFP- und scrambled-Kontrolle angefertigt.

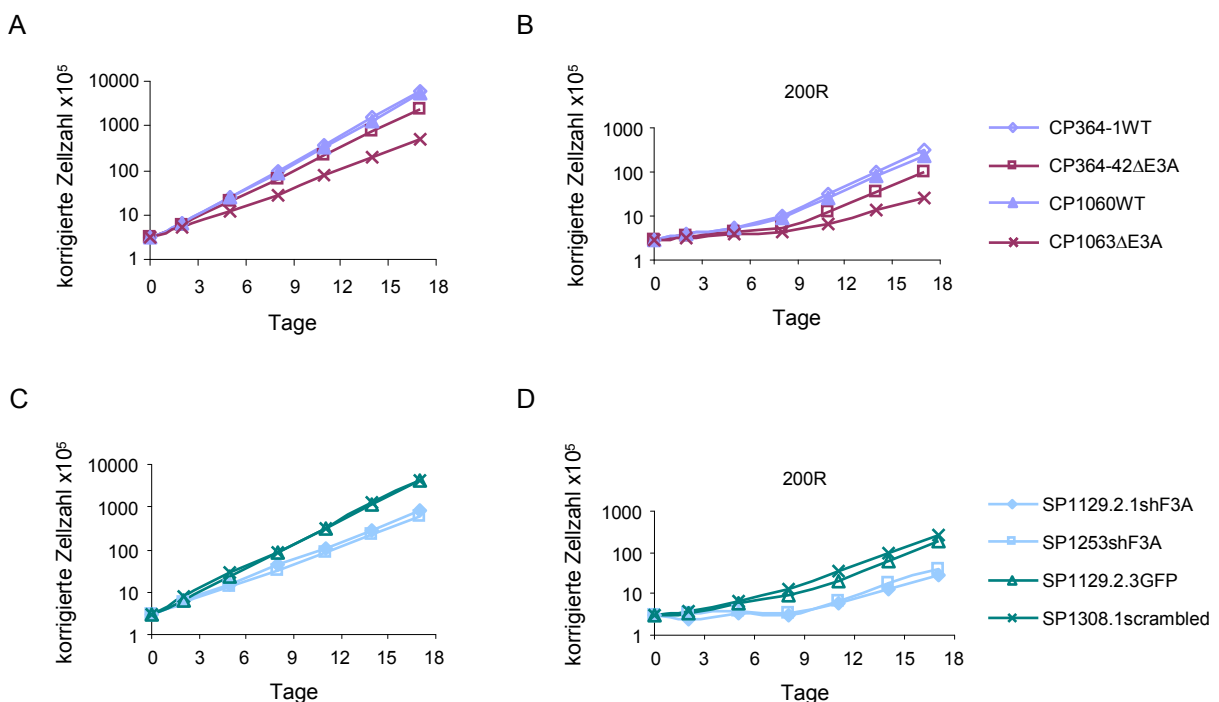


Abb. 4.13 Die Expression von Foxo3a verleiht EBNA3A-negativen LCLs einen Wachstumsvorteil und eine höhere Toleranz gegenüber γ -Strahlung

(A, B) Wachstumskurven der EBNA3A-negativen LCLs ($\Delta E3A$; violett) im Vergleich zu WT-LCLs (blau). (C, D) Wachstumskurven der EBNA3A-negativen Foxo3a-Knockdown-LCLs (shF3A; hellblau) im Vergleich zu den Kontroll-transduzierten LCLs (GFP, scrambled; türkis). 3×10^5 Zellen/ml wurden an Tag 0 in einer 12-Lochplatte ausgesät und an Tag 1 mit einer Dosis von 200 Rad bestrahlt (B, D) oder nicht bestrahlt (A, C). An Tag 2 und anschließend jeden dritten Tag wurden die Zellen gezählt und auf 2×10^5 Zellen/ml zurückgestellt. Die Abbildung gibt die Gesamtzellzahl korrigiert um die Expansion der Kultur $\times 10^5$ wieder und zeigt ein repräsentatives von zwei unabhängig durchgeführten Experimenten.

Wie bereits in Hertle et al. (2009) gezeigt, weisen die EBNA3A-negativen LCLs (violett) CP364-42 $\Delta E3A$ und CP1063 $\Delta E3A$ ein verlangsamtes Wachstum gegenüber den WT-LCLs (blau) CP364-1WT und CP1060WT auf (Abb. 4.13A). Die Zelllinie CP364-42 $\Delta E3A$ befindet sich schon länger in Kultur, als die Zelllinie CP1063 $\Delta E3A$ und hat daher schon nahezu einen WT-Phänotyp angenommen. Die Wachstumskurve der lentiviral transduzierten LCLs zeigt,

dass die EBNA3A-negativen Foxo3a-Knockdown-LCLs (hellblau) SP1129.2.1shF3A und SP1253shF3A verlangsamt im Wachstum gegenüber den Kontroll-transduzierten LCLs (türkis) SP1129.2.3GFP und SP1308.1scrambled sind (Abb. 4.13C). Ein ähnliches Bild lässt sich bei γ -Bestrahlung mit 200 R derselben Zelllinien beobachten. Während die EBNA3A-negativen LCLs verzögert proliferieren gegenüber WT-LCLs (Abb. 4.13B), sind wiederum EBNA3A-negative LCLs, in denen Foxo3a herunterreguliert wurde, verlangsamt im Wachstum gegenüber den Kontroll-transduzierten LCLs (Abb. 4.13D). Weiterhin zeigen die Wachstumskurven, dass die lentiviral transduzierten LCLs eine schnellere Proliferation der Kultur aufweisen, als nicht-transduzierte Zellen (Abb. 4.13A, C vgl. CP364-42 Δ E3A mit SP1129.2.3GFP, SP1308.1scrambled). Der Grund dafür ist möglicherweise, dass die Zellen nach der lentiviralen Transduktion einen harten Selektionsprozess durchlaufen, und daher nur die am stärksten proliferierenden Zellen überleben.

Um zu untersuchen, was die Ursachen des langsameren Wachstums der EBNA3A-negativen LCLs und der EBNA3A-negativen Foxo3a-Knockdown-LCLs war, wurde die Zellzyklusverteilung durch Propidiumjodid-Färbung im FACS analysiert. Abbildung 4.14 zeigt, dass die EBNA3A-negativen LCLs CP364-42 Δ E3A und CP1063 Δ E3A eine um nahezu 50% reduzierte Anzahl von Zellen in der S-Phase gegenüber den WT-LCLs CP364-1WT und CP1060WT aufweisen (Abb. 4.14A). Auch die Apoptoserate dieser Zellen, dargestellt durch die Zellen in der SubG1-Phase, ist um ca. 25% erhöht (Abb. 4.14B), was die langsamere Expansion dieser Zellen gegenüber den WT-LCLs möglicherweise erklärt. Auch bei den Foxo3a-Knockdown-LCLs SP1129.2.1shF3A und SP1253shF3A befinden sich weniger Zellen in der S-Phase, als bei den Kontroll-transduzierten LCLs SP1129.2.3GFP und SP1308.1scrambled. Hier beträgt der Unterschied jedoch nur ca. 25% (Abb. 4.14C). Die Apoptoserate unterscheidet sich nicht zwischen den Foxo3a-Knockdown-LCLs und den Kontroll-transduzierten LCLs (Abb. 4.14D).

Auch bei diesem Versuch kann man sehen, dass sich bei den lentiviral transduzierten LCLs mehr Zellen in der S-Phase befinden, als bei den nicht-transduzierten LCLs. Die Apoptoserate unterscheidet sich jedoch nicht von der Ursprungszelllinie CP364-42 Δ E3A (Abb. 4.14; vgl. A mit C und B mit D). Auch dies lässt sich mit dem Selektionsprozess nach der lentiviralen Transduktion erklären.

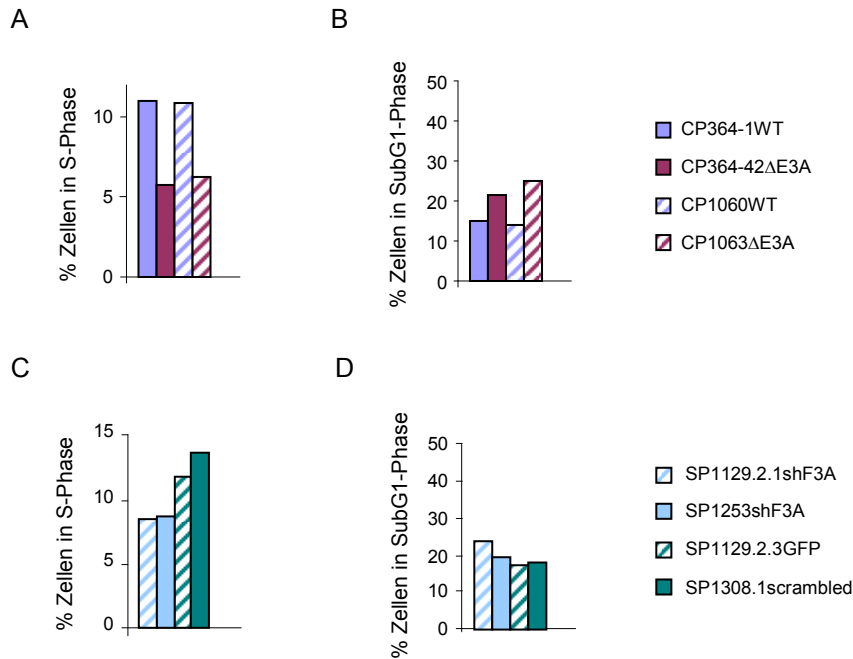


Abb. 4.14 Die Expression von Foxo3a führt zur erhöhten Proliferation von EBNA3A-negativen LCLs (A, B) Zellzyklusverteilung der EBNA3A-negativen LCLs ($\Delta E3A$; violett) im Vergleich zu WT-LCLs (blau). (C, D) Zellzyklusverteilung der EBNA3A-negativen Foxo3a-Knockdown-LCLs (shF3A; hellblau) im Vergleich zu den Kontroll-LCLs (GFP, scrambled; türkis). 2×10^6 Zellen wurden geerntet, mit Ethanol fixiert und die Zellzyklusverteilung mittels Propidiumjodid-Färbung im FACS bestimmt. Die Abbildung zeigt % Zellen in der S-Phase (A, C) und in der SubG1-Phase (B, D).

Die Ergebnisse zeigen, dass die Expression von Foxo3a in EBNA3A-negativen LCLs einen Wachstumsvorteil bewirkt und die Toleranz gegen γ -Strahlung erhöht. Das Wachstum von EBNA3A-negativen LCLs, die Foxo3a exprimieren, ist zwar verlangsamt gegenüber WT-LCLs, jedoch erhöht gegenüber EBNA3A-negativen Foxo3a-Knockdown-LCLs. Die Ursache dafür ist möglicherweise eine erhöhte Proliferation von EBNA3A-negativen LCLs bei Expression von Foxo3a. Die Apoptoserate scheint von der Expression von Foxo3a nicht betroffen zu sein. Diese Beobachtungen zeigen, dass die Foxo3a-Expression in diesem zellulären System nicht zur Apoptose der Zellen führt. Vielmehr kompensiert Foxo3a möglicherweise den Verlust von EBNA3A und beeinflusst das Wachstum von EBNA3A-negativen LCLs positiv.

4.3 Die Interaktion von EBNA3C mit EBNA3A

Im ersten Teil der Arbeit wurde gezeigt, dass EBNA3A und EBNA3C funktionell kooperieren, um die Expression des Transkriptionsfaktors Foxo3a zu reprimieren. Weiterhin zeigte die Auswertung der in unserer Arbeitsgruppe durchgeführten Affymetrix-Arrays zur Identifikation von EBNA3A-, bzw. EBNA3C-Zielgenen eine Co-Regulation von 12% der Gene durch EBNA3A und EBNA3C (unveröffentlichte Daten). Auch aus der Literatur gibt es Hinweise auf eine Kooperation von EBNA3A und EBNA3C. So wurde gezeigt, dass mit rekombinantem EBNA3A- oder EBNA3C-negativem EBV infizierte Burkitt-Lymphomzellen (BL) eine erhöhte Apoptoserate bei der Behandlung mit Genotoxinen aufwiesen, als mit WT-EBV infizierte BL-Zellen. Diese Resistenz gegenüber der Genotoxin-induzierten Apoptose wurde offenbar durch die Repression des proapoptotischen Gens Bim durch EBNA3A und EBNA3C vermittelt: in EBNA3A- und EBNA3C-Knockout-BL-Zellen war die Transkript- und Proteinmenge von Bim im Vergleich zu mit WT-EBV infizierten BL-Zellen hochreguliert (Anderton et al., 2008). Später wurde vorgeschlagen, dass EBV-kodierte Proteine die Repression von Bim durch Histon-Deacetylierung und DNA-Methylierung bewirken können. Die direkte Beteiligung von EBNA3A und EBNA3C bei dieser epigenetischen Repression konnte bisher jedoch nicht gezeigt werden (Paschos et al., 2009).

Weiterhin wurde in einem Yeast Two-Hybrid Screen die Homodimerisierung von EBNA3A und auch die Heterodimerisierung von EBNA3A und EBNA3C gezeigt (Calderwood et al., 2007). In diesem Experiment wurde die Interaktion von EBNA3A und EBNA3C über deren C-Termini vermittelt, sie konnte jedoch nicht durch weitere biochemische Experimente bestätigt werden (Calderwood et al., 2007).

Da EBNA3A und EBNA3C funktionell und molekular kooperieren, wird die kooperative Genrepression durch EBNA3A und EBNA3C möglicherweise durch die Interaktion der beiden Proteine vermittelt. Daher soll im zweiten Teil der Arbeit die Interaktion von EBNA3A und EBNA3C überprüft und genauer analysiert werden. Ziel ist es zunächst, eine mögliche Kooperation von EBNA3A und EBNA3C in der transienten Genregulation zu untersuchen. Möglicherweise bilden EBNA3A und EBNA3C durch Homo- und Heterodimerisierung Multiprotein-Repressorkomplexe auf den Promotoren von Zielgenen aus. Solche Multiprotein-Komplexe können eventuell auch durch CBF1 oder CtBP vermittelt werden (Abb. 4.15). Weiterhin soll die Identifizierung der minimalen Binderegion von EBNA3C in EBNA3A die Herstellung von EBNA3A-Virusmutanten ermöglichen, in denen die Interaktion von EBNA3A und EBNA3C inhibiert ist. Durch die Infektion von B-Zellen mit solchen EBV-Partikeln kann die Funktion der Interaktion von EBNA3A und EBNA3C bei der endogenen Zielgenregulation von LCLs bestimmt werden.

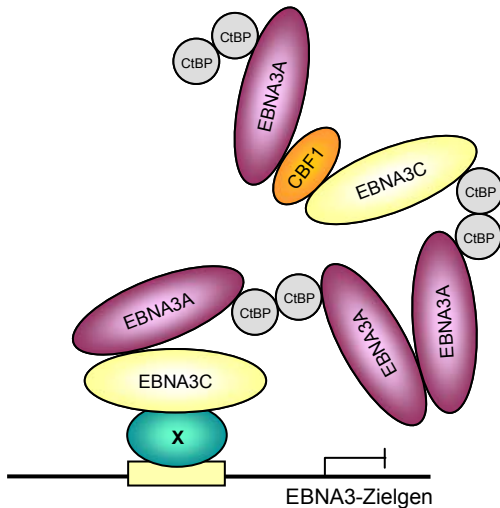


Abb. 4.15 Hypothetisches Modell zur Bildung eines Multiprotein-Repressorkomplexes durch die Homo- und Heterodimerisierung von EBNA3A und EBNA3C.

Über die Bindung an einen DNA-Adapter (x) können Multiprotein-Komplexe aus EBNA3A und EBNA3C an die Promotoren von Zielgenen binden. Dies wird durch die Homodimerisierung von EBNA3A und die Heterodimerisierung von EBNA3A und EBNA3C ermöglicht. Zusätzlich können EBNA3A und EBNA3C möglicherweise über CtBP oder CBF1 heterodimerisieren und somit zusätzlich Co-Repressoren zu den Promotoren rekrutieren.

4.3.1 EBNA3A und EBNA3C interagieren in LCLs

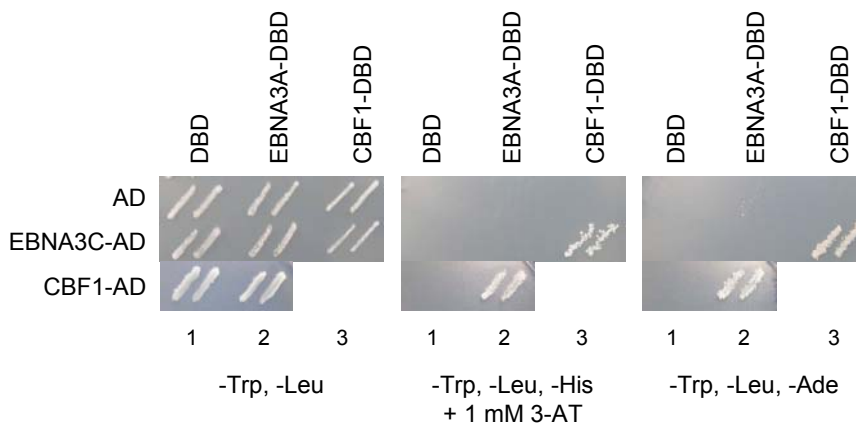
4.3.1.1 Die Interaktion von EBNA3A und EBNA3C kann nicht im Yeast Two-Hybrid System nachgewiesen werden

Da die Interaktion von EBNA3A und EBNA3C erstmalig in einem Yeast Two-Hybrid Screen gezeigt worden war, sollte sie zunächst im gleichen System bestätigt werden. Im Yeast Two-Hybrid System werden Fusionsproteine aus zwei zu untersuchenden Proteinen und der DNA-Bindedomäne (DBD), bzw. der Aktivierungsdomäne (AD) des Transkriptionsfaktors GAL4 in Hefe co-exprimiert. Findet eine Interaktion zwischen den beiden Proteinen statt, wird GAL4 rekonstituiert und es kommt zur Aktivierung der Reportergene HIS3 und ADE2, die einer auxotrophen Mutante das Wachstum auf Minimalmedien ermöglichen.

Zunächst wurden Hefe-Vektoren zur Expression eines EBNA3A-DBD-Fusionsproteins und eines EBNA3C-AD-Fusionsproteins in den Hefestamm AH109 co-transformiert. Durch die Co-Expression von EBNA3A-DBD zusammen mit CBF1-AD und EBNA3C-AD zusammen mit CBF1-DBD wurde die korrekte Konformation der Fusionsproteine EBNA3A-DBD und EBNA3C-AD überprüft. Um eine mögliche unspezifische Aktivierung der Reportergene durch EBNA3A-DBD, CBF1-DBD, EBNA3C-AD, oder CBF1-AD allein zu überprüfen, wurden diese Konstrukte zusammen mit dem AD-Leervektor, bzw. dem DBD-Leervektor co-transformiert. Jeweils zwei Klone wurden auf einer tryptophan- und leucinfreien (-Trp, -Leu) Platte ausgestrichen, auf der alle Zellen wachsen konnten, die beide Plasmide aufgenommen hatten. Diese Platte wurde auf je eine histidin- (-His) und eine adeninfreie (-Ade) Platte replikaplatziert, auf der nur Zellen wachsen konnten, in denen der Transkriptionsfaktor GAL4 durch Interaktion der zu untersuchenden Proteine rekonstituiert wurde. Da der HIS3-Reporter im Hefestamm AH109 nicht stringent reguliert ist und es dadurch zu unspezifischem Wachstum der Hefezellen kommen kann, wurde der histidinfreien Platte der Hemmstoff des Histidingenprodukts 3-Amino-1, 2, 4-triazol (3-AT) zugesetzt.

Wie in Abbildung 4.16A zu sehen, kommt es bei Co-Transformation von EBNA3A-DBD und EBNA3C-AD nicht zum Wachstum auf histidin- und adeninfreien Platten (Abb. 4.16A; Spalte 2 mitte). Das Wachstum durch die Interaktion von EBNA3A-DBD und CBF1-AD, bzw. von EBNA3C-AD mit CBF1-DBD auf histidin- und adeninfreien Platten (Abb. 4.16A; Spalte 2 unten, 3 mitte) zeigt jedoch, dass die EBNA3-Fusionsproteine richtig gefaltet sind und funktionell sein können. Da der GAL4-DBD-Expressionsvektor einen MYC-Tag und der GAL4-AD-Expressionsvektor einen HA-Tag enthält, konnte die korrekte Expression der GAL4-Fusionsproteine von EBNA3A und EBNA3C in Hefe auch im Western Blot mit dem MYC-, bzw. HA-Antikörper überprüft werden. Als Kontrolle auf unspezifische Bindung der Antikörper wurde das Proteinlysate des untransformierten Hefestamms aufgetragen (Abb. 4.16B; Spur 1, 3). Abbildung 4.16B zeigt, dass EBNA3A-DBD-MYC und EBNA3C-AD-HA exprimiert werden und das erwartete Molekulargewicht von ca. 150 kDa, bzw. 160 kDa aufweisen (Abb. 4.16B; Spur 2, 4). Damit konnte die Interaktion von EBNA3A und EBNA3C im Yeast Two-Hybrid System nicht bestätigt werden.

A



B

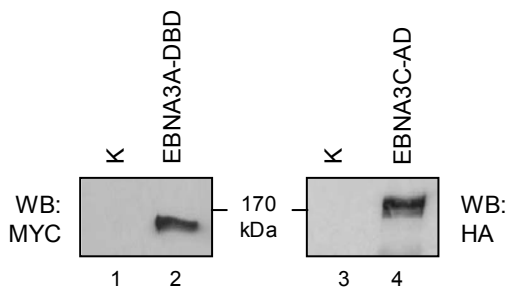


Abb. 4.16 Die Interaktion von EBNA3A und EBNA3C kann nicht im Yeast Two-Hybrid System nachgewiesen werden.

(A) EBNA3A und EBNA3C interagieren nicht im Yeast Two-Hybrid System. Die Plasmide zur Expression der AD- und DBD-Fusionsproteine wurden in den Hefestamm AH109 co-transformiert. Anschließend wurden jeweils zwei Klone auf eine permissive Platte (-Trp, -Leu) ausgestrichen. Um die Aktivierung der Reportergene *HIS3* und *ADE2* nachzuweisen, wurde die permissive Platte auf histidin-, bzw. adeninfreie Platten

(-Trp, -Leu, -His, bzw. -Ade) replikaplatziert. Der histidinfreien Platte wurde 1 mM des Hemmstoffes 3-AT zugesetzt. Das Ergebnis wurde nach vier Tagen Wachstum dokumentiert. (B) Expression der Fusionsproteine EBNA3A-DBD und EBNA3C-AD. 50 ml der mit dem Expressionsvektor für EBNA3A-DBD-MYC (Spur 2), bzw. EBNA3C-AD-HA (Spur 4) transformierten Hefezellen wurden bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 kultiviert, geerntet und in Aufschlusspuffer unter Mixen mit Glas-Beads lysiert. Als Kontrolle (K) diente der untransformierte Hefestamm AH109 (Spur 1, 3). Äquivalente Proteinmengen wurden auf ein 8% Polyacrylamidgel aufgetragen und im Western Blot mit dem MYC- bzw. HA-Antikörper detektiert.

4.3.1.2 Interaktion von EBNA3A und EBNA3C in Säugetierzellen

Obwohl die Interaktion von EBNA3A und EBNA3C nicht im Yeast Two-Hybrid System bestätigt werden konnte, wurde die Interaktion der exogen in HEK293-Zellen exprimierten Proteine durch Co-Immunpräzipitation untersucht. Für die Co-Immunpräzipitation wurden Expressionsvektoren hergestellt, durch die EBNA3A und EBNA3C an einen HA- (Hämagglutinin), bzw. MYC-Tag fusioniert exprimiert werden können. Diese Tags werden durch HA-, bzw. MYC-spezifische Antikörper erkannt und ermöglichen auch die Detektion von Proteinfragmenten, die durch monoklonale Antikörper möglicherweise nicht erkannt werden. Die Immunpräzipitation von HA-EBNA3A und MYC-EBNA3C erfolgte über an ProteinG-Sepharose-Beads gekoppelte HA-, bzw. MYC-spezifische Antikörper. Im Western Blot wurden die Immunpräzipitation der Proteine und die Co-Präzipitation von Interaktionspartnern überprüft. Die chemische Kopplung der Antikörper an die ProteinG-Sepharose-Beads verhinderte eine mögliche Interferenz der schweren und leichten Kette (Ig_H 55 kDa, Ig_L 25 kDa) der Antikörper bei der Detektion der Proteine im Western Blot.

Um die Interaktion von EBNA3A und EBNA3C in Säugetierzellen zu untersuchen, wurden Expressionsvektoren für HA-EBNA3A und MYC-EBNA3C in HEK293 co-transfiziert. Anschließend wurde eine Co-Immunpräzipitation mit einem HA-spezifischen (Abb. 4.17A), bzw. einem MYC-spezifischen Antikörper (Abb. 4.17B) durchgeführt. Als Kontrolle auf unspezifische Bindung der Proteine an die ProteinG-Beads, wurde in einem Ansatz das zu co-präzipitierende Protein mit dem Leervektor des Interaktionspartners transfiziert. Der Nachweis der Immunpräzipitation (IP) erfolgte im Western Blot. Um die Proteinexpression in den Gesamtzelllysaten (L) zu zeigen, sind diese ebenfalls im Western Blot aufgetragen. Abbildung 4.17 zeigt, dass MYC-EBNA3C nur in Anwesenheit von HA-EBNA3A co-präzipitiert wird (Abb. 4.17A; vgl. Spur 2 mit 4), bzw. dass HA-EBNA3A nur in Anwesenheit von MYC-EBNA3C co-präzipitiert wird (Abb. 4.17B; vgl. Spur 2 mit 4).

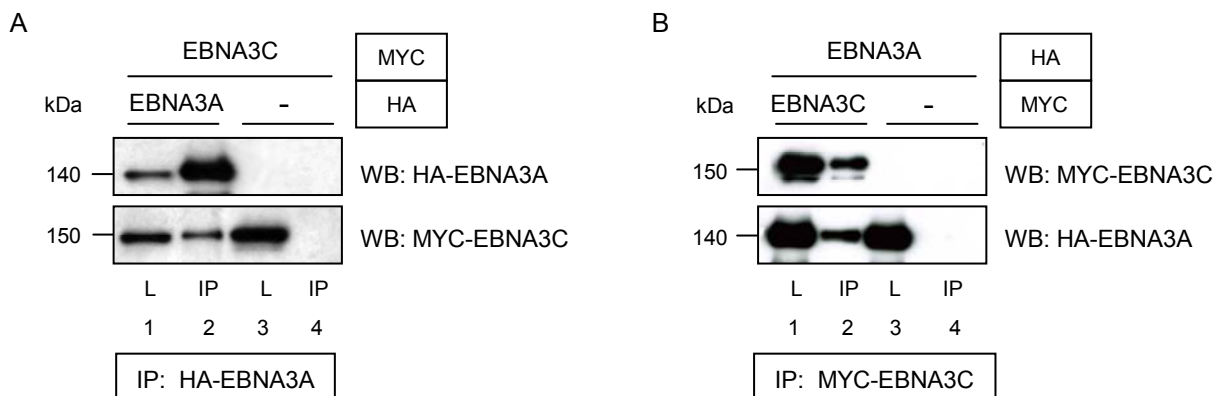


Abb. 4.17 Interaktion der exogen exprimierten Proteine EBNA3A und EBNA3C in HEK293

70% konfluente HEK293 wurden mit Expressionsplasmiden für HA-EBNA3A (0,5 µg) und MYC-EBNA3C (2 µg) co-transfiziert. Nach 48 h wurde eine Co-Immunpräzipitation mit einem HA-Antikörper (A), bzw. mit einem MYC-Antikörper (B) durchgeführt. Die Proben (IP) wurden auf ein 8% Polyacrylamidgel aufgetragen und im Western Blot mit dem HA- und dem MYC-Antikörper detektiert. Zum Nachweis der Proteinexpression sind die Gesamtzelllysate (L) gezeigt. Die Proteinmenge des Lysats entspricht 2% der IP-Probe.

Anschließend sollte untersucht werden, ob auch die endogen in LCLs exprimierten Proteine EBNA3A und EBNA3C miteinander interagieren. Dazu wurde aus Gesamtzellextrakt der WT-LCL CP541-1WT eine Co-Immunpräzipitation mit dem monoklonalen EBNA3C-spezifischen Antikörper (A10) durchgeführt. Um eine unspezifische Bindung von EBNA3A an die ProteinG-Beads auszuschließen und die Spezifität des EBNA3C-Antikörpers zu überprüfen, wurde ebenfalls eine Co-Immunpräzipitation aus Zellextrakt der EBNA3C-negativen LCL CP543-8ΔE3C durchgeführt. Dabei handelt es sich um eine LCL, die durch Infektion von primären B-Zellen mit einem EBNA3C-Knockout-Virus etabliert wurde. Die Immunpräzipitation und die Proteinexpression im Gesamtzelllysate wurden im Western Blot nachgewiesen. Abbildung 4.18 zeigt die Co-Präzipitation von EBNA3A durch EBNA3C in der WT-LCL CP541-1WT (Abb. 4.18; Spur 2), aber nicht in der EBNA3C-negativen LCL CP543-8ΔE3C (Abb. 4.18; Spur 4).

Mit diesen Experimenten konnte die Interaktion sowohl der exogen, als auch der endogen in LCLs exprimierten Proteine EBNA3A und EBNA3C bestätigt werden. Der Nachweis im Yeast Two-Hybrid System war jedoch nicht möglich.

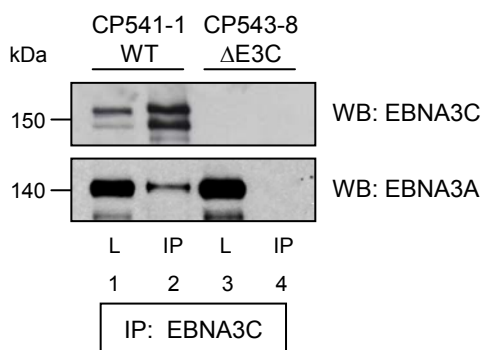


Abb. 4.18 Interaktion der endogen exprimierten Proteine EBNA3A und EBNA3C in LCLs

Aus je 6×10^7 Zellen der WT-LCL CP541-1WT und der EBNA3C-negativen LCL CP543-8ΔE3C wurde eine Co-Immunpräzipitation mit dem monoklonalen EBNA3C-Antikörper (A10) durchgeführt. Die Proben (IP) und die Gesamtzelllysate (L) wurden auf einem 8% Polyacrylamidgel aufgetrennt und im Western Blot mit dem EBNA3C-Antikörper (A10) und dem EBNA3A-Antikörper (E3AN4A5) detektiert. Die Proteinmenge des Lysats entspricht 2% der IP-Probe.

4.3.2 Die Interaktion von EBNA3A und EBNA3C wird nicht über CBF1 vermittelt

In einem Yeast Two-Hybrid Experiment werden vor allem direkte binäre Interaktionen untersucht, da die Hefepoteine, die eine Interaktion möglicherweise vermitteln, im Überschuss gegenüber den exogen exprimierten Proteinen vorliegen. Da die Interaktion von EBNA3A und EBNA3C im Yeast Two-Hybrid System nicht gezeigt werden konnte, lag die Vermutung nahe, dass die Interaktion der beiden Proteine durch ein Adapterprotein vermittelt wird. Ein mögliches Adapterprotein für die Interaktion von EBNA3A und EBNA3C ist das DNA-bindende Protein CBF1, mit dem alle EBNA3-Proteine interagieren. CBF1 besitzt in Hefe kein Homolog und könnte daher die Interaktion zwischen EBNA3A und EBNA3C dort nicht vermitteln. Eine indirekte Interaktion über CBF1 wäre daher eine mögliche Erklärung, dass die Interaktion von EBNA3A und EBNA3C in Hefe nicht gezeigt werden konnte.

Um zu überprüfen, ob die Interaktion von EBNA3A und EBNA3C durch CBF1 vermittelt wird, wurden Co-Immünpräzipitationen in einer CBF1-negativen Zelllinie durchgeführt. Dazu wurden die EBV-negative Burkitt-Lymphomzelllinie DG75 (DG75^{CBF1+}) und die von ihr abstammende CBF1-negative Zelllinie SM224.9 (DG75^{CBF1-}) mit Expressionsvektoren für HA-EBNA3A und MYC-EBNA3C, bzw. deren Leervektoren co-transfiziert. Anschließend wurde eine Co-Immünpräzipitation mit einem HA- (Abb. 4.19A), bzw. einem MYC-spezifischen Antikörper (Abb. 4.19B) durchgeführt. Die Proben der Immünpräzipitation und die Gesamtzelllysate wurden im Western Blot aufgetragen. Dieser Versuch zeigt, dass MYC-EBNA3C sowohl in DG75^{CBF1+}, als auch in DG75^{CBF1-} durch HA-EBNA3A co-präzipitiert wird (Abb. 4.19A; Spur 2, 6). In Abwesenheit von HA-EBNA3A erfolgt keine Co-Präzipitation von MYC-EBNA3C (Abb. 4.19A; Spur 4, 8). Die untere Bande im EBNA3C-Western Blot ist auf eine unspezifische Bindung des polyklonalen EBNA3C-Antikörpers an EBNA3A zu erklären (Abb. 4.19A; Spur 2, 6). Auch bei der Immünpräzipitation von MYC-EBNA3C wird HA-EBNA3A sowohl in DG75^{CBF1+}, als auch in DG75^{CBF1-} co-präzipitiert (Abb. 4.19B; Spur 2, 6). In der Kontrolle, in der kein MYC-EBNA3C exprimiert ist, wird HA-EBNA3A nicht co-präzipitiert (Abb. 4.19B; Spur 4, 8).

Diese Experimente haben gezeigt, dass die Interaktion von EBNA3A und EBNA3C auch in Abwesenheit von CBF1 möglich ist und somit nicht durch CBF1 vermittelt wird.

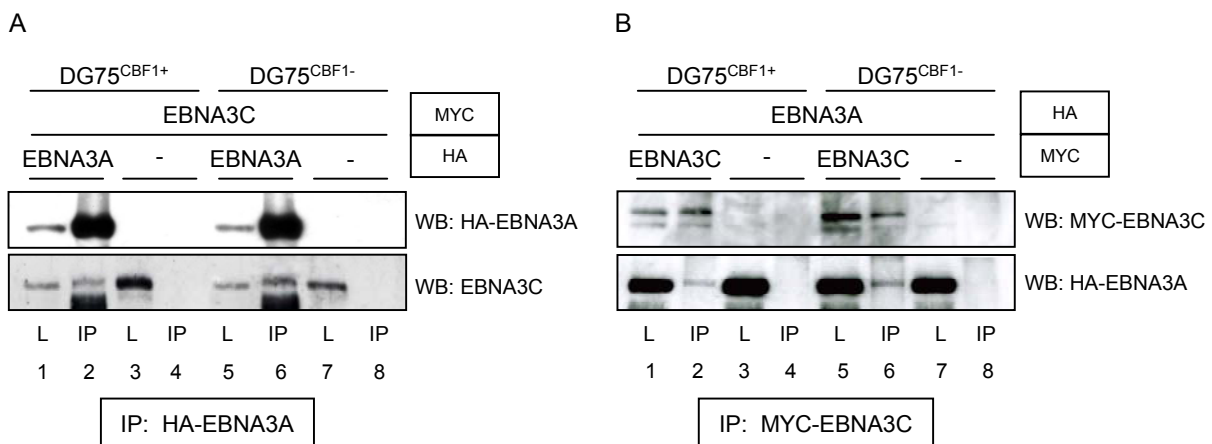


Abb. 4.19 Die Interaktion von EBNA3A und EBNA3C wird nicht über CBF1 vermittelt.

Je 3×10^7 Zellen DG75^{CBF1+} und DG75^{CBF1-} wurden mit Expressionsplasmiden für HA-EBNA3A (5 µg) und MYC-EBNA3C (15 µg), bzw. deren Leervektoren co-transfiziert. In (A) wurde nach 48 h eine Co-Immünpräzipitation mit dem HA-Antikörper durchgeführt, die Proben (IP) auf einem 8% Polyacrylamidgel aufgetragen und mit dem HA- und dem polyklonalen EBNA3C-Antikörper (Zytomed) im Western Blot detektiert. In (B) wurde nach 48 h eine Co-Immünpräzipitation mit dem MYC-Antikörper durchgeführt, die Proben (IP) auf einem 8% Polyacrylamidgel aufgetragen und mit dem HA- und dem MYC-Antikörper im Western Blot detektiert. Zum Nachweis der Proteinexpression wurden die Gesamtzelllysate (L) aufgetragen. Die Proteinmenge des Lysats entspricht 2% der IP-Probe.

4.3.3 Homodimerisierung von EBNA3A und EBNA3C

Die EBNA3-Proteine sind zu 30% homolog zueinander und wahrscheinlich durch Genduplikation entstanden. Da im vorigen Abschnitt die Heterodimerisierung von EBNA3A und EBNA3C gezeigt wurde, sollte auch eine mögliche Homodimerisierung von EBNA3A und EBNA3C untersucht werden. Im Yeast Two-Hybrid Experiment wurde bereits die Homodimerisierung von EBNA3A über den C-Terminus gezeigt (Calderwood et al., 2007). Eine mögliche Homodimerisierung von EBNA3C wurde bisher nicht untersucht.

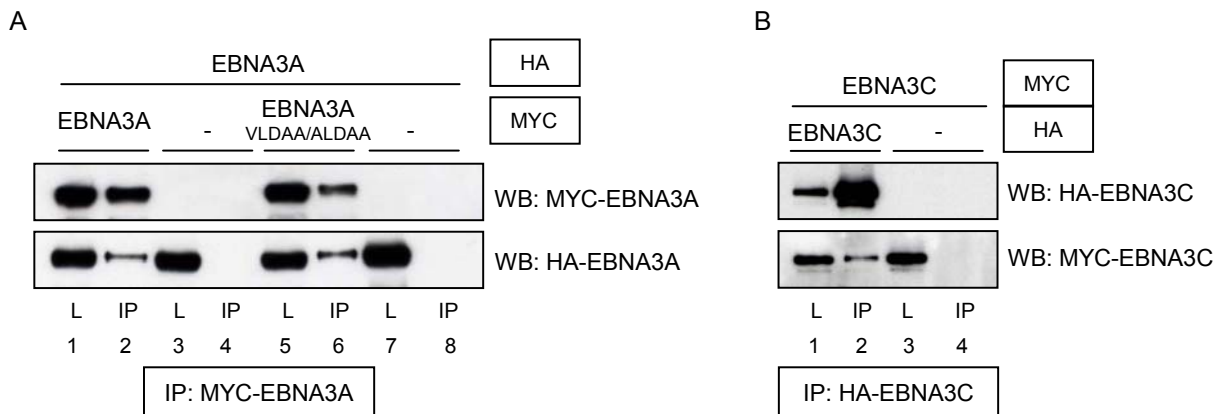


Abb. 4.20 EBNA3A und EBNA3C bilden Homodimere aus.

(A) Expressionsplasmide von HA-EBNA3A (0,5 µg) und MYC-EBNA3A (2 µg), bzw. MYC-EBNA3A_{VLDAA/ALDAA} (2 µg), dessen CtBP-Bindestelle mutiert ist, wurden in 70% konfluente HEK293 co-transfiziert. Nach 48 h wurde eine Co-Immunpräzipitation mit einem MYC-Antikörper durchgeführt. (B) Plasmide zur Expression von HA- und MYC-EBNA3C (je 2 µg) wurden in 70% konfluente HEK293 co-transfiziert. Nach 48 h wurde eine Co-Immunpräzipitation mit einem HA-Antikörper durchgeführt. Die Proben (IP) und die Gesamtzelllysate (L) wurden auf einem 8% Polyacrylamidgel aufgetragen und im Western Blot mit dem HA- und dem MYC-Antikörper detektiert. Die Proteinmenge des Lysats entspricht 2% der IP-Probe.

Um die Homodimerisierung von EBNA3A und EBNA3C zu untersuchen, wurde eine Co-Immunpräzipitation der exogen mit zwei unterschiedlichen Tags exprimierten Proteine durchgeführt. Dazu wurden Expressionsplasmide für MYC-EBNA3A und HA-EBNA3A, bzw. MYC-EBNA3C und HA-EBNA3C und deren Leervektoren in HEK293 co-transfiziert. Sowohl EBNA3A, als auch EBNA3C interagieren mit dem Co-Repressor CtBP (Hickabottom et al., 2002; Touitou et al., 2001), welcher in der Lage ist, zu dimerisieren. CtBP bindet über ein konserviertes Motiv im C-Terminus von EBNA3A (⁸⁵⁷VLDLS^{861/886}ALDLS⁸⁹⁰) und EBNA3C (⁷²⁸PLDLS⁷³²). Um zu prüfen, ob die Homodimerisierung über CtBP vermittelt wird, wurde HA-EBNA3A zusammen mit MYC-EBNA3A_{VLDAA/ALDAA} transfiziert, in dem das Motiv für die CtBP-Bindung von VLDLS/ALDLS zu VLDAA/ALDAA mutiert worden war (Hickabottom et al., 2002). Die Ergebnisse der Co-Immunpräzipitation zeigen, dass HA-EBNA3A sowohl durch MYC-EBNA3A, als auch durch MYC-EBNA3A_{VLDAA/ALDAA} co-präzipitiert wird (Abb. 4.20A; Spur 2, 6). In Abwesenheit von MYC-EBNA3A wurde HA-EBNA3A nicht co-präzipitiert (Abb. 4.20A; Spur 4, 8). Die Homodimerisierung von EBNA3A wird also nicht durch CtBP vermittelt. Auch MYC-EBNA3C wird in nur Anwesenheit von HA-EBNA3C co-

präzipitiert (Abb. 4.20B; Spur 2) und ist damit auch in der Lage, zu homodimerisieren. Da in diesem Fall jedoch keine Mutante zur Verfügung stand, in der die CtBP-Bindestelle mutiert war, kann hier eine Dimerisierung über CtBP nicht ausgeschlossen werden.

Diese Versuche haben die Homodimerisierung von EBNA3A bestätigt und haben zum ersten Mal auch eine Homodimerisierung von EBNA3C gezeigt.

4.3.4 Eine Kooperation von EBNA3A und EBNA3C bei der Genrepression ist in Promotor-Reporterstudien nicht nachweisbar

Die vorhergehenden Experimente haben gezeigt, dass EBNA3A und EBNA3C Heterodimere und auch Homodimere ausbilden können. Dadurch ist es möglich, dass EBNA3A und EBNA3C durch die Bindung an einen DNA-Adapter und die Rekrutierung von Co-Repressoren einen Multiprotein-Repressorkomplex auf den Promotoren von Zielgenen ausbilden (Abb. 4.15). Um diese Hypothese zu testen und zu untersuchen, ob die Heterodimerisierung von EBNA3A und EBNA3C zu einer verstärkten Genrepression führt, wurden Promotor-Reporterstudien durchgeführt.

Es ist bekannt, dass GAL4-DBD-Fusionsproteine von EBNA3A und EBNA3C einen artifiziellen GAL4-abhängigen Promotor reprimieren können (Bain et al., 1996; Bourillot et al., 1998). Daher wurde zunächst ein potentieller kooperativer Effekt von EBNA3C auf die EBNA3A-GAL4-DBD-vermittelte Repression, bzw. von EBNA3A auf die EBNA3C-GAL4-DBD-vermittelte Repression eines GAL4-abhängigen Reporters untersucht. Als Reporter wurde ein Konstrukt verwendet, in dem das Luziferase-Reportergen unter der Kontrolle eines nicht aktiven Thymidin-Kinase-Rumpfpromotors steht, der 10 GAL4-Bindestellen enthält (GAL4-TK). Der Thymidin-Kinase-Rumpfpromotor ist nicht stringent reguliert und weist eine Hintergrundexpression des Luziferase-Reportergens, wodurch die Repression der Transkription gut beobachtet werden kann.

Für die Promotor-Reporterstudie wurden Expressionsvektoren für EBNA3A-GAL4-DBD, bzw. EBNA3C-GAL4-DBD mit dem GAL4-TK-Reporter in HEK293 co-transfiziert. Durch Co-Expression von EBNA3A-GAL4-DBD und ansteigenden Mengen von EBNA3C, bzw. von EBNA3C-GAL4-DBD und ansteigenden Mengen von EBNA3A wurde untersucht, ob die Repression des GAL4-TK-Reporters synergistisch verstärkt werden konnte. Um die Auswirkung von EBNA3A und EBNA3C allein auf den Reporter zu untersuchen, wurden diese Plasmide zusammen dem GAL4-DBD-Leervektor in HEK293 co-transfiziert. Da die Stärke der Expression von EBNA3A und EBNA3C in HEK293 unterschiedlich war, wurde die transfizierte DNA-Menge der Expressionsvektoren von EBNA3A und EBNA3C so angepasst, dass eine ähnlich starke Proteinexpression erreicht wurde (nicht gezeigt). Um mögliche Schwankungen durch die eingesetzte Zellzahl oder die Transfektionseffizienz innerhalb einer Versuchsreihe auszugleichen, wurde ein Expressionsvektor für β -Galaktosidase co-transfiziert und die Luziferase-Aktivität gegen die β -Galaktosidase-Aktivität normalisiert.

Abbildung 4.21 zeigt, dass die Hintergrundaktivität des GAL4-TK-Reporters (blau) durch Expression von EBNA3A-GAL4-DBD (violett), bzw. EBNA3C-GAL4-DBD (gelb) um ca. 50% reprimiert wird (Abb. 4.21A, B; vgl. Spur 1 mit 5). Co-Expression von EBNA3C mit EBNA3A-GAL4-DBD (violett/gelb) führt zu einer leichten Verstärkung der Repression des Reporters. Diese Repression nimmt jedoch nicht mit ansteigenden Mengen EBNA3C zu (Abb. 4.21A; Spur 5-8). Die Expression von EBNA3C allein hat kaum Auswirkung auf die Aktivität des GAL4-TK-Reporters (Abb. 4.21A; Spur 2-4).

Die Co-Expression von EBNA3A mit EBNA3C-GAL4-DBD (gelb/violett) führt zur Verstärkung der Transkriptionsrepression durch EBNA3C-GAL4-DBD um 50%, doch auch hier erfolgt keine Zunahme der Repression bei ansteigenden Mengen EBNA3A (Abb. 4.21B; Spur 5-8). Außerdem reprimiert EBNA3A allein den GAL4-TK-Reporter bereits um ca. 40% (Abb. 4.21B; Spur 2-4).

Um auszuschließen, dass CBF1 in diesem System die Interaktion von EBNA3A und EBNA3C inhibierte, wurde der gleiche Versuch auch in der CBF1-negativen Zelllinie DG75^{CBF1-} durchgeführt. Doch auch in diesen Zellen konnte keine Kooperation von EBNA3A und EBNA3C bei der Repression eines GAL4-abhängigen Reporters beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

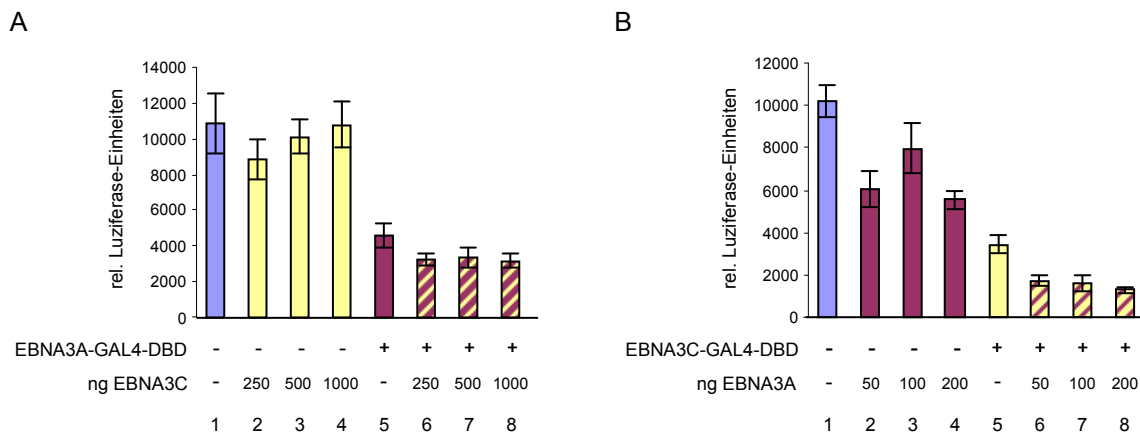


Abb. 4.21 Eine Kooperation von EBNA3A und EBNA3C bei der Repression lässt sich in Promotor-Reporter-gen-Studien nicht nachweisen.

5x10⁵ 70% konfluente HEK293-Zellen wurden in einer Sechs-Lochplatte transfiziert mit einem GAL4-abhängigen TK-Luziferase-Reporter (0,5 µg) und den Expressionsplasmiden für EBNA3A-GAL4-DBD (125 ng) und EBNA3C (250, 500, 1000 ng) (A), bzw. EBNA3C-GAL4-DBD (125 ng) und EBNA3A (50, 100, 200 ng) (B). Zur Normalisierung der Luziferase-Aktivität wurde parallel ein β-Galaktosidase-Expressionsvektor (50 ng) transfiziert. Nach 48 h wurde die Luziferase-Aktivität gemessen, gegen die β-Galaktosidase-Aktivität normalisiert und die relativen Luciferase-Einheiten auf der y-Achse aufgetragen. Alle Ansätze wurden im Triplikat durchgeführt. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives von drei unabhängig durchgeführten Experimenten.

Nachdem keine Kooperation von EBNA3A und EBNA3C bei der Repression eines GAL4-abhängigen Reporters beobachtet werden konnte, sollte als Nächstes eine mögliche Kooperation bei der Repression eines CBF1-abhängigen Reporters untersucht werden. Da EBNA3A und EBNA3C einen CBF1-abhängigen Reporter jedoch nicht effizient reprimierten (Daten nicht gezeigt), wurde der Reporter zunächst durch die Expression eines Fusionsproteins aus CBF1 und der Aktivierungsdomäne des Herpes-Simplex Virus-Proteins

VP16 aktiviert (CBF1-VP16). In dem verwendeten Reporter stand das Luziferase-Reportergen unter der Kontrolle eines inaktiven β -Globin-Rumpfpromotors, der 12 CBF1-Bindestellen enthielt (GA981-6). Diese Promotor-Reporter-Gen-Studie wurde in der CBF1-negativen Zelllinie DG75^{CBF1-} durchgeführt.

Durch Expression von EBNA3A in ansteigenden Mengen wird die CBF1-VP16-vermittelte Aktivierung des Reporters um 50% bis 75% reprimiert (Abb. 4.22; vgl. Spur 1 mit 3-5; violett). Diese Repression kann durch Co-Expression einer konstanten Menge an EBNA3C verdoppelt werden (Abb. 4.22; Spur 3-5; gelb/violett). Da EBNA3C allein jedoch die CBF1-VP16-vermittelte Aktivierung des Reporters um ca. 60% reprimiert (Abb. 4.22; Spur 2; gelb), ist diese Verdopplung der Repression durch EBNA3A zu erwarten. Es konnte also nur ein additiver, kein synergistischer Effekt durch Co-Expression von EBNA3A und EBNA3C auf die Repression eines durch CBF1-VP16-aktivierten Reporters beobachtet werden.

In Promotor-Reporter-Gen-Studien ließ sich daher kein kooperativer Effekt auf die Repression eines Reporters durch die Co-Expression von EBNA3A und EBNA3C nachweisen. Die Funktion der Interaktion von EBNA3A und EBNA3C muss daher endogen in LCLs untersucht werden.

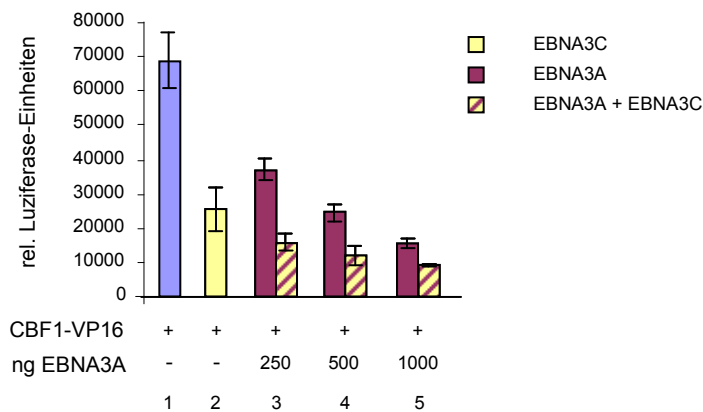


Abb. 4.22 EBNA3A und EBNA3C haben einen additiven Effekt auf die Repression der CBF1-VP16-vermittelten Aktivierung eines CBF1-abhängigen Reporters.

1x10⁷ DG75^{CBF1-}-Zellen wurden transfiziert mit dem CBF1-abhängigen Luziferase-Reporter GA981-6 (3 µg), einem Expressionsvektor für CBF1-VP16 (5 µg) und den Expressionsplasmiden für EBNA3A (250, 500, 1000 ng) und EBNA3C (1,5 µg). Zur Normalisierung der Luziferase-Aktivität wurde parallel ein β -Galaktosidase-Expressionsvektor (1 µg) transfiziert. Nach 48 h wurde die Luziferase-Aktivität gemessen, gegen die β -Galaktosidase-Aktivität normalisiert und die relativen Luziferase-Einheiten auf der y-Achse aufgetragen. Alle Ansätze wurden im Triplikate durchgeführt. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives von drei unabhängig durchgeführten Experimenten.

4.3.5 Die Interaktion von EBNA3A und EBNA3C wird über deren N-Termini vermittelt

Da in Promotor-Reporter-Gen-Studien keine Kooperation von EBNA3A und EBNA3C bei der Genrepression nachgewiesen werden konnte, soll die Funktion der Interaktion dieser beiden Proteine bei der endogenen Zielgenregulation und auf Chromatinebene in LCLs untersucht werden. Dazu müssen EBV-Genome generiert werden, die eine EBNA3A-Mutante exprimieren, in der die Interaktion mit EBNA3C nicht mehr stattfinden kann. Um eine solche EBNA3A-Mutante herstellen zu können, musste zunächst die minimale Binderegion von EBNA3C in EBNA3A bestimmt werden, um später gezielt Mutationen einführen zu können.

4.3.5.1 Die Bindestellen von EBNA3C und CBF1 liegen im Bereich der Aminosäuren 1-222 von EBNA3A

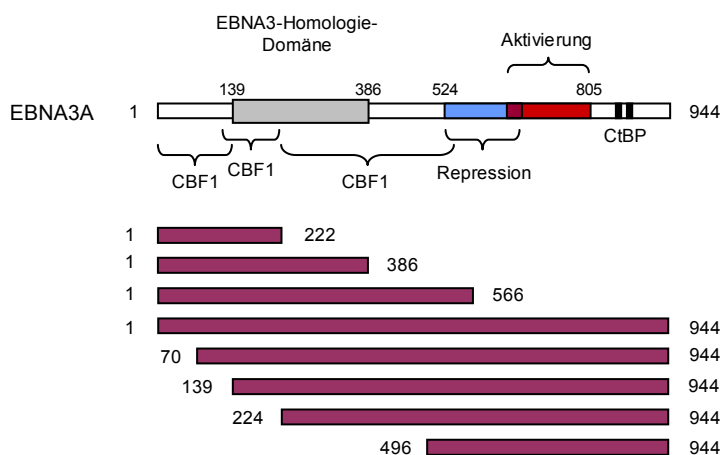
Um die minimale Binderegion von EBNA3C in EBNA3A zu kartieren, wurden Vektoren zur Expression verschiedener HA-EBNA3A-Proteinfragmente mittels PCR kloniert (Abb. 4.23A). Die Proteinfragmente sind nach dem Aminosäurebereich (AS), den sie umfassen, benannt. EBNA3A AS 1-222 beinhaltet zwei potentielle CBF1-Bindestellen, die im Bereich der AS 1-138 und 1-222, bzw. 125-222 liegen sollen (Cludts and Farrell, 1998; Dalbies-Tran et al., 2001; Robertson et al., 1996; Zhao et al., 1996). EBNA3A AS 1-386 umfasst die gesamte EBNA3-Homologiedomäne (AS 139-386) und in EBNA3A AS 1-566 ist zusätzlich eine dritte potentielle CBF1-Bindestelle enthalten, die im Bereich der AS 224-566 liegen soll (Cludts and Farrell, 1998). In den Proteinfragmenten EBNA3A AS 70 bzw. 139-944 ist der Bereich N-terminal der EBNA3-Homologiedomäne deletiert. Das Proteinfragment EBNA3A AS 224-944 enthält nur noch die dritte potentielle CBF1-Bindestelle und nicht mehr die im N-Terminus gelegenen CBF1-Bindestellen. Das C-terminale Proteinfragment von EBNA3A umfasst die AS 496-944 und enthält die Aktivierungs- und Repressionsdomäne von EBNA3A (Bourillot et al., 1998; Dalbies-Tran et al., 2001). Außerdem befinden sich in diesem Bereich die Bindestellen für den Co-Repressor CtBP (Hickabottom et al., 2002).

Die Kartierung der minimalen Bindestelle von EBNA3C in EBNA3A erfolgte durch Co-Immunpräzipitation der exogen exprimierten Proteine in HEK293. Die Stabilität der HA-EBNA3A-Proteinfragmente in HEK293 war jedoch sehr unterschiedlich. Daher musste zunächst die jeweilige für die Transfektion geeignete DNA-Menge der Expressionsvektoren ausgetestet werden, sodass sich eine gut sichtbare Bande im Western Blot ergab. Anschließend wurden die Expressionsvektoren für die HA-EBNA3A-Proteinfragmente, bzw. deren Leervektor mit einem Expressionsplasmid für MYC-EBNA3C in HEK293 co-transfiziert und eine Co-Immunpräzipitation gegen HA-EBNA3A durchgeführt. Die Expression und Immunpräzipitation der HA-EBNA3A-Proteinfragmente und die Co-Präzipitation von MYC-EBNA3C wurden im Western Blot nachgewiesen. Zum Vergleich wurde auch die Co-

Präzipitation des endogen exprimierten CBF1 durch die HA-EBNA3A-Proteinfragmente untersucht. Wie Abbildung 4.23B zeigt, ist das Proteinfragment EBNA3A AS 1-222 ausreichend für die Co-Präzipitation sowohl von MYC-EBNA3C, als auch von CBF1 und bindet beide Proteine eben so stark, wie das Gesamtprotein EBNA3A AS 1-944 (Abb. 4.23B; vgl. Spur 2 mit 10). Ein Proteinfragment, in dem die N-terminalen 70 oder 138 Aminosäuren von EBNA3A deletiert sind, ist ebenfalls noch in der Lage, EBNA3C und CBF1 zu co-präzipitieren (Abb. 4.23B; Spur 12, 14). Die Co-Präzipitation von CBF1 durch EBNA3A AS 70 bzw. 139-944 ist jedoch reduziert gegenüber der Co-Präzipitation durch EBNA3A AS 1-222 (Abb. 4.23B; vgl. Spur 12, 14 mit 2). Bei Deletion der N-terminalen AS 1-224 oder 496 von EBNA3A findet keine Interaktion mit EBNA3C oder CBF1 mehr statt (Abb. 4.23B; Spur 16, 18).

Diese Kartierung lässt darauf schließen, dass die Binderegion von EBNA3C und CBF1 in EBNA3A überlappt, und dass der für die Interaktion essentielle Bereich zwischen den AS 139-222 von EBNA3A liegt. Im C-Terminus von EBNA3A konnte keine weitere Bindestelle für CBF1 oder EBNA3C identifiziert werden. Außerdem hat das Experiment gezeigt, dass die Interaktion von EBNA3A mit CBF1 weitaus stärker ist, als die Interaktion von EBNA3A mit EBNA3C: beim Vergleich der Proteinmengen im Lysat und in der Probe der Co-Immünpräzipitation ist zu erkennen, dass CBF1 viel stärker als EBNA3C durch EBNA3A präzipitiert wird (Abb. 4.23B; vgl. Spur 9 mit 10).

A



B

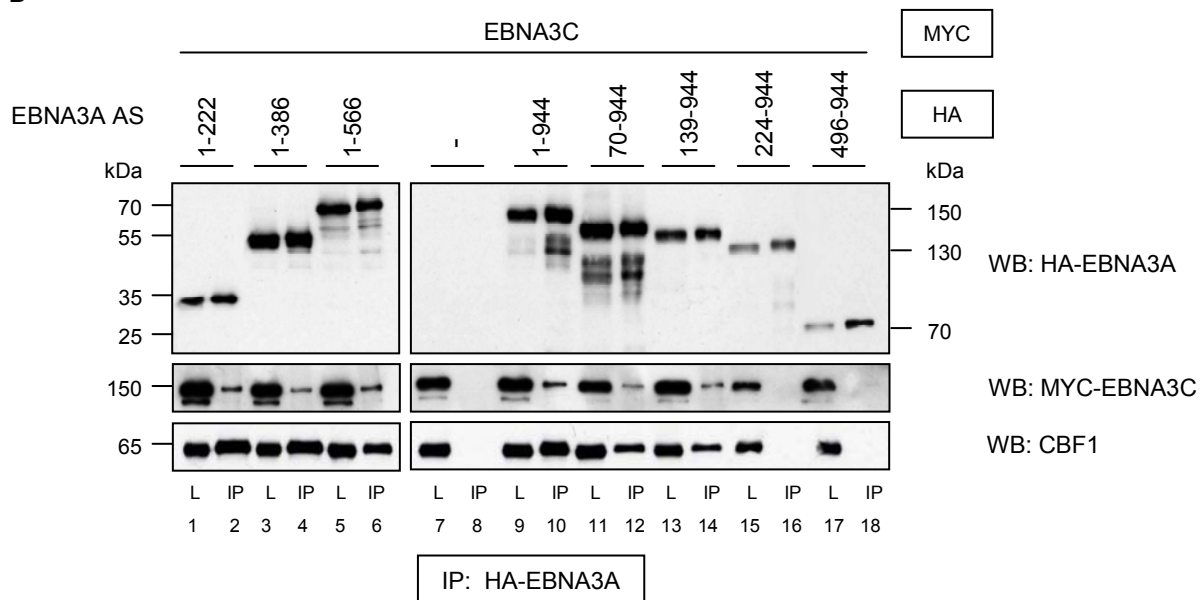


Abb. 4.23 EBNA3C und CBF1 interagieren mit dem Bereich der N-terminalen 222 Aminosäuren von EBNA3A.

(A) EBNA3A-Proteinfragmente. Die Genfragmente zur Expression der dargestellten EBNA3A-Proteinfragmente wurden in einen Vektor zur Expression der dargestellten EBNA3A-Proteinfragmente kloniert. Die Abbildung zeigt die in der Literatur beschriebenen Binstellen von CBF1 und CtBP (oben) und gibt den Aminosäurebereich (AS) der hergestellten EBNA3A-Proteinfragmente an. (B) EBNA3C und CBF1 interagieren mit dem Bereich der AS 1-222 von EBNA3A. 70% konfluente HEK293 wurden mit Expressionsplasmiden der HA-EBNA3A-Proteinfragmente AS 1-222 (0,5 µg), 1-386 (0,5 µg), 1-566 (0,5 µg), 1-944 (0,2 µg), 70-944 (6 µg), 139-944 (6 µg), 224-944 (6 µg), 496-944 (14 µg) und von MYC-EBNA3C (2 µg) co-transfiziert. Nach 48 h wurde eine Co-Immünpräzipitation mit dem HA-Antikörper durchgeführt und die Proben (IP) und die Gesamtzellsate (L) im Western Blot mit dem HA- und dem MYC-Antikörper detektiert. Zusätzlich wurde die Co-Präzipitation des endogen exprimierten CBF1 mit dem monoklonalen CBF1-Antikörper (RBP-J 7A11) nachgewiesen. Der Nachweis der EBNA3A-Fragmente AS 1-222, 1-386 und 1-566 (WB: HA-EBNA3A; Spur 1-6) erfolgte auf einem 12% Polyacrylamidgel. Die Proben der EBNA3A-Fragmente AS 1-944, 70-944, 139-944, 224-944, 496-944 (WB: EBNA3A; Spur 7-18) und von MYC-EBNA3C wurden auf ein 8% Polyacrylamidgel aufgetragen und die von CBF1 auf ein 10% Polyacrylamidgel. Die Proteinmenge des Lysats entspricht 2% der IP-Probe.

4.3.5.2 Die Interaktion von EBNA3A mit EBNA3C und CBF1 wird nicht über dieselben Aminosäuren vermittelt

Die Kartierung der Bindestelle von EBNA3C im N-Terminus von EBNA3A deutete auf eine mögliche Überlappung mit der Bindestelle von CBF1 in EBNA3A. Daher sollte als Nächstes untersucht werden, ob die Interaktion von EBNA3C und CBF1 durch dieselben Aminosäuren von EBNA3A vermittelt wird. Dazu wurde durch zielgerichtete *in vitro* Mutagenese ein Proteinfragment von EBNA3A AS 1-222 hergestellt, dessen AS 199, 200 und 202 durch Alanin ersetzt wurden (EBNA3A AS 1-222_{AAAGA}). Dadurch wurde das in den EBNA3-Proteinen konservierte Motiv ¹⁹⁸ATLGC²⁰² zu ¹⁹⁸AAAGA²⁰² mutiert. Im Mammalian Two-Hybrid System verhinderte der Austausch der AS 199, 200 und 202 zu Alanin in einem Proteinfragment von EBNA3A AS 125-222 die Interaktion mit CBF1 vollständig. Im Gesamtprotein bewirkten diese Punktmutationen lediglich eine Reduktion der CBF1-Interaktion um ca. 50%, sie verhinderten jedoch vollständig die Repression der EBNA2-vermittelten Aktivierung eines CBF1-abhängigen Reporters (Dalbics-Tran et al., 2001; Maruo et al., 2005).

Um zu untersuchen, ob die AS 199, 200 und 202 von EBNA3A auch die Interaktion mit EBNA3C vermitteln, wurden Plasmide zur Expression von MYC-EBNA3C und HA-EBNA3A AS 1-222, bzw. HA-EBNA3A AS 1-222_{AAAGA}, bzw. deren Leervektor in HEK293 co-transfiziert und eine Co-Immunpräzipitation gegen HA-EBNA3A durchgeführt. Anschließend wurde die Co-Präzipitation von MYC-EBNA3C und des endogen exprimierten CBF1 im Western Blot untersucht. Das Ergebnis zeigt, dass CBF1 wie erwartet nur durch HA-EBNA3A AS 1-222 co-präzipitiert wird, jedoch nicht durch HA-EBNA3A AS 1-222_{AAAGA}. MYC-EBNA3C wird jedoch sowohl durch HA-EBNA3A AS 1-222, als auch durch HA-EBNA3A AS 1-222_{AAAGA} co-präzipitiert (Abb. 4.24; vgl. Spur 2 mit 6).

Die Interaktion von EBNA3A mit EBNA3C und CBF1 wird daher nicht durch dieselben Aminosäuren vermittelt.

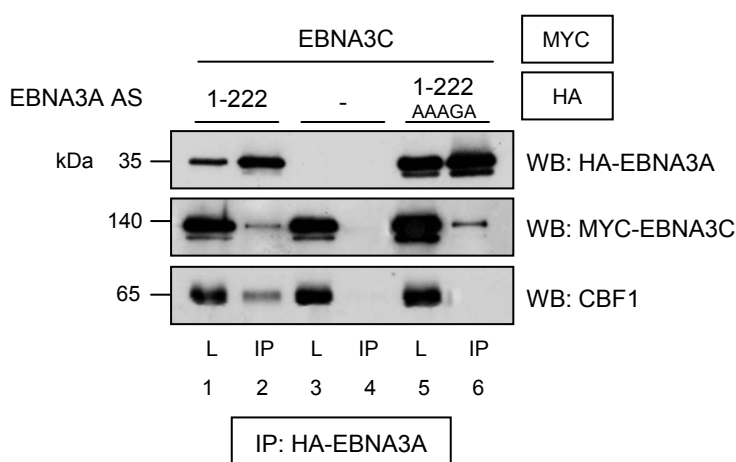


Abb. 4.24 Die Interaktion von EBNA3A mit EBNA3C und CBF1 wird nicht durch dieselben Aminosäuren vermittelt.

70% konfluente HEK293 wurden mit Expressionsplasmiden für MYC-EBNA3C (2 µg) und HA-EBNA3A AS 1-222 (0,5 µg), bzw. EBNA3A AS 1-222_{AAAGA} (1,5 µg) transfiziert. In EBNA3A AS 1-222_{AAAGA} waren die Aminosäuren 199, 200 und 202 zu Alanin mutiert worden. Nach 48 h wurde eine Co-Immunpräzipitation mit dem HA-Antikörper durchgeführt und die Proben (IP) und die Gesamtzelllysate (L) im Western Blot mit dem HA-Antikörper, dem MYC-Antikörper und dem monoklonalen

CBF1-Antikörper (RBP-J7A11) detektiert. Die Proben zum Nachweis der EBNA3A-Immünpräzipitation (WB: HA-EBNA3A) wurden auf einem 10% Polyacrylamidgel aufgetragen. Der Nachweis von CBF1 und EBNA3C erfolgte auf einem 8% Polyacrylamidgel. Die Proteinmenge des Lysats entspricht 2% der IP-Probe.

4.3.5.3 Die Aminosäuren 100-250 von EBNA3A sind ausreichend für die Interaktion mit EBNA3C

Die Kartierung der Bindestelle von EBNA3C und CBF1 in EBNA3A hatte die AS 139-222 von EBNA3A als essentiell identifiziert. Um diese Interaktion zu bestätigen, sollte das Proteinfragment EBNA3A AS 1-222 weiter in die Fragmente AS 1-138 und AS 139-222 unterteilt werden. Das Proteinfragment EBNA3A AS 139-222 war jedoch sehr instabil und konnte nicht in HEK293 exprimiert werden. Um das Proteinfragment EBNA3A AS 139-222 zu stabilisieren und das Molekulargewicht zur besseren Detektion im Western Blot zu erhöhen, sollte das Proteinfragment als Fusionsprotein mit der GAL4-DBD exprimiert werden und eine Co-Immunpräzipitation durchgeführt werden. Dazu wurden Säugetiervektoren zur Expression der GAL4-DBD-Fusionsproteine von EBNA3A AS 1-138, 139-222, 1-222 und 1-944 hergestellt. Die Expressionsvektoren für die EBNA3A-DBD-Fusionsproteine wurden zusammen mit einem EBNA3C-Expressionsvektor in HEK293 co-transfiziert und eine Immunpräzipitation der EBNA3A-Proteinfragmente durchgeführt. EBNA3C konnte jedoch durch keines der EBNA3A-DBD-Proteinfragmente co-präzipitiert werden und auch WT-EBNA3A-DBD war nicht in der Lage, an EBNA3C zu binden. Da auch CBF1 durch keines der EBNA3A-DBD-Fusionsproteine co-präzipitiert werden konnte, wirkte die GAL4-DBD möglicherweise inhibierend auf die Interaktion mit anderen Proteinen (Daten nicht gezeigt).

Um die Bindestelle von EBNA3C und CBF1 in EBNA3A dennoch weiter einzugrenzen, wurde ein größeres Proteinfragment von EBNA3A kloniert, das die Aminosäuren 100-250 umfasste. Auch dieses Proteinfragment war instabil, konnte aber bei der Transfektion einer größeren Zellzahl von HEK293 in ausreichenden Mengen exprimiert werden. Für die weitere Kartierung wurden Plasmide zur Expression der HA-EBNA3A-Proteinfragmente AS 1-138, 100-250 und 1-222 und von MYC-EBNA3C, bzw. MYC-CBF1 in HEK293 co-transfiziert und eine Co-Immunpräzipitation mit dem MYC-Antikörper durchgeführt. Zum Nachweis, dass die HA-EBNA3A-Proteinfragmente nicht unspezifisch an die ProteinG-Beads binden, wurden die Expressionskonstrukte zusammen mit dem Leervektor in HEK293 transfiziert (Abb. 4.25C). Abbildung 4.25A, B zeigt, dass HA-EBNA3A AS 1-138 weder durch MYC-EBNA3C, noch durch MYC-CBF1 co-präzipitiert wird (Abb. 4.25A, B; Spur 2). HA-EBNA3A AS 100-250 und AS 1-222 werden durch MYC-EBNA3C etwa in gleichem Maße co-präzipitiert (Abb. 4.25A; vgl. Spur 4 mit 6). Im Gegensatz dazu interagiert CBF1 nur mit dem Proteinfragment EBNA3A AS 1-222 effizient, während die Interaktion mit dem Proteinfragment EBNA3A AS 100-250 sehr schwach ist (Abb. 4.25B; vgl. Spur 4 mit 6). Abbildung 4.25C zeigt, dass keines der EBNA3A-Proteinfragmente in Abwesenheit von EBNA3C oder CBF1 co-präzipitiert wird, das heißt, dass keines der Proteine unspezifisch an die ProteinG-Beads bindet.

Die weitere Kartierung der EBNA3C- und CBF1-Bindestelle in EBNA3A hat gezeigt, dass die AS 100-250 von EBNA3A ausreichend für die Interaktion mit EBNA3C, jedoch nicht mit CBF1 sind. CBF1 konnte lediglich mit einem EBNA3A-Proteinfragment von AS 1-222

effizient interagieren. Dennoch konnte im N-Terminus von EBNA3A keine weitere Bindestelle von EBNA3C und CBF1 identifiziert werden.

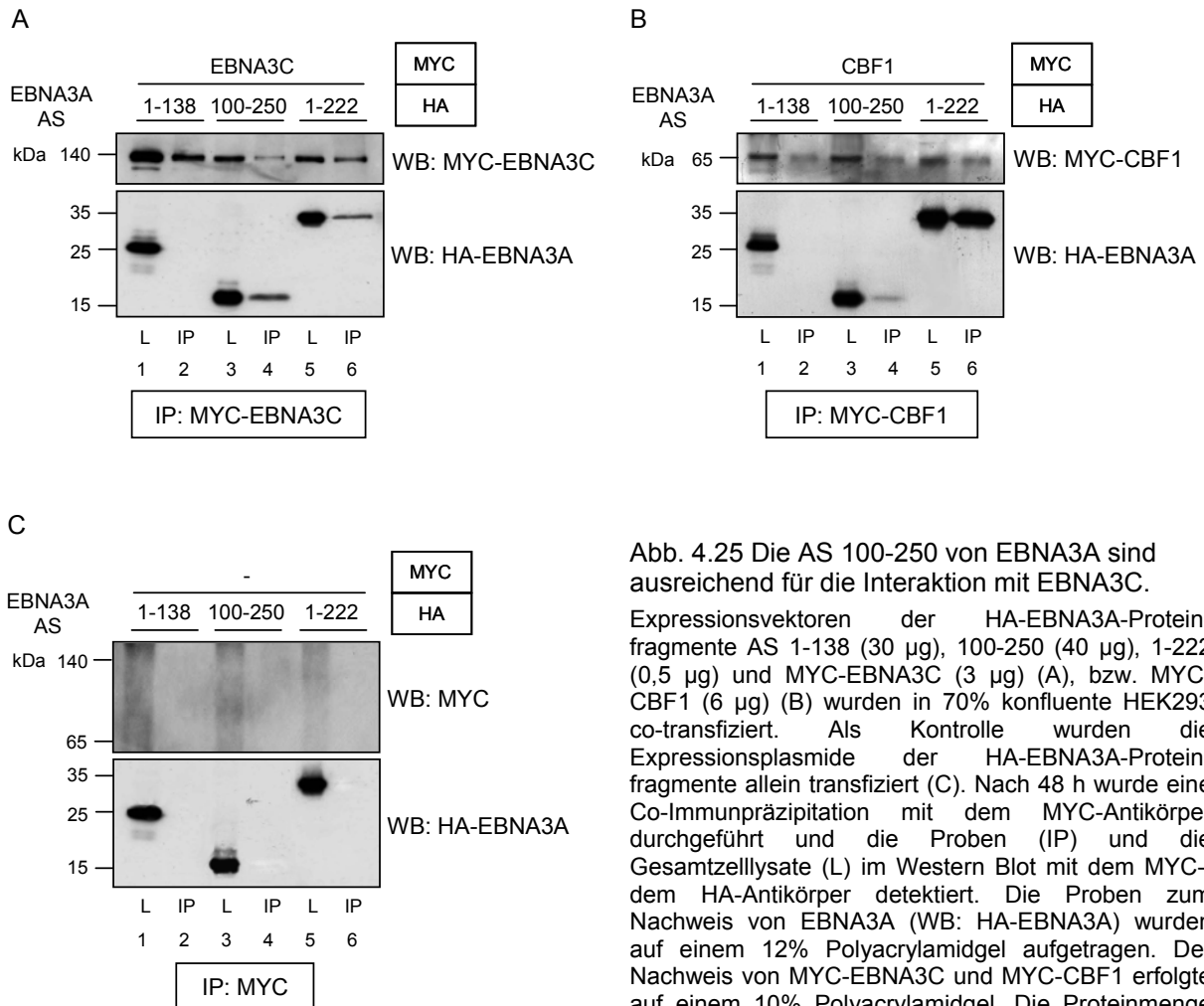


Abb. 4.25 Die AS 100-250 von EBNA3A sind ausreichend für die Interaktion mit EBNA3C.

Expressionsvektoren der HA-EBNA3A-Proteinfragmente AS 1-138 (30 µg), 100-250 (40 µg), 1-222 (0,5 µg) und MYC-EBNA3C (3 µg) (A), bzw. MYC-CBF1 (6 µg) (B) wurden in 70% konfluente HEK293 co-transfiziert. Als Kontrolle wurden die Expressionsplasmide der HA-EBNA3A-Proteinfragmente allein transfiziert (C). Nach 48 h wurde eine Co-Immunpräzipitation mit dem MYC-Antikörper durchgeführt und die Proben (IP) und die Gesamtzelllysate (L) im Western Blot mit dem MYC-, dem HA-Antikörper detektiert. Die Proben zum Nachweis von EBNA3A (WB: HA-EBNA3A) wurden auf einem 12% Polyacrylamidgel aufgetragen. Der Nachweis von MYC-EBNA3C und MYC-CBF1 erfolgte auf einem 10% Polyacrylamidgel. Die Proteinmenge des Lysats entspricht 2% der IP-Probe.

In Abbildung 4.26 sind die Ergebnisse der eben gezeigten Co-Immunpräzipitationen zur Identifikation der EBNA3C- und CBF1-Bindestelle in EBNA3A noch einmal zusammengefasst. + und – geben die Stärke der Interaktion semiquantitativ wider. Diese Darstellung zeigt, dass CBF1 stärker als EBNA3C durch WT-EBNA3A co-präzipitiert wird. Weiterhin wird deutlich, dass alle EBNA3A-Fragmente, die die AS 139-222 enthalten, in der Lage sind, an EBNA3C und CBF1 zu binden. Die CBF1-Interaktion mit dem Proteinfragment EBNA3A AS 100-250 ist jedoch sehr schwach, obwohl in diesem Versuch keine weitere im N- oder C-Terminus von EBNA3A gelegene CBF1-Bindestelle identifiziert werden konnte: die Proteinfragmente EBNA3A AS 1-138 und AS 224-944 interagieren nicht mit CBF1, während die Interaktion von CBF1 mit dem Proteinfragment EBNA3A AS 139-944 ähnlich effizient ist, wie die Interaktion mit WT-EBNA3A. Daher tragen die N-terminalen 100 Aminosäuren von EBNA3A möglicherweise zur korrekten Konformation der CBF1-Binderegion bei.

EBNA3C bindet an das Proteinfragment EBNA3A AS 100-250 ebenso stark wie an EBNA3A AS 1-222. Mit dem Proteinfragment EBNA3A AS 1-138 und 224-944 kommt es nicht zur Interaktion. Dies spricht dafür, dass der essentielle Bereich für die EBNA3C-Bindung durch EBNA3A zwischen den AS 139-222 liegt.

Der Austausch der AS 199, 200 und 202 zu Alanin in EBNA3A AS 1-222 verhindert die Interaktion mit CBF1 und deutet somit ebenfalls auf eine wichtige Funktion der EBNA3A-Region von AS 139-222 bei der CBF1-Bindung hin. Die Interaktion von EBNA3C mit EBNA3A AS 1-222 wird durch die Mutation der AS 199, 200 und 202 von EBNA3A nicht verhindert. Dies zeigt, dass die Interaktion von EBNA3C mit EBNA3A nicht über die gleichen Aminosäuren von EBNA3A vermittelt wird, wie die Interaktion mit CBF1. Dennoch ist es möglich, dass die Binderegionen in EBNA3A überlappen oder eng benachbart sind, sodass sich EBNA3C und CBF1 bei der Bindung an EBNA3A sterisch inhibieren.

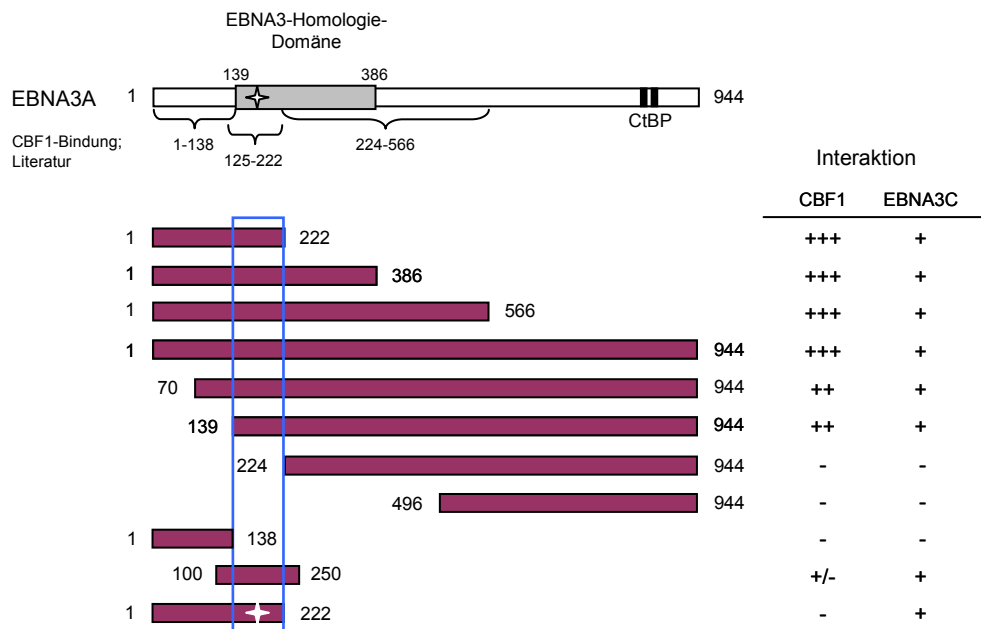


Abb. 4.26 Die AS 139-222 von EBNA3A sind essentiell für die Interaktion mit EBNA3C und CBF1.

Die Abbildung fasst die Ergebnisse der Co-Immunpräzipitationen zur Kartierung der EBNA3C- und CBF1-Bindestelle in EBNA3A zusammen. Oben sind die in der Literatur beschriebenen CBF1- und CtBP-Bindestellen in EBNA3A dargestellt. Der weiße Stern bezeichnet die Position der AS 199, 200 und 202, deren Austausch zu Alanin in einem EBNA3A-Proteinfragment der AS 125-222 zum Verlust der CBF1-Bindung führten (Dalbies-Tran et al., 2001). Die blaue Umrandung kennzeichnet die AS 139-222 von EBNA3A, die für die Interaktion mit EBNA3C und CBF1 essentiell sind. + und - bezeichnen die Stärke der Interaktion semiquantitativ; +/- kennzeichnet eine schwache Interaktion.

4.3.5.4 Peptid-Array-Bindungsstudie zur Feinkartierung der EBNA3C- und CBF1-Bindestelle in EBNA3A

Die Kartierung der Bindestelle von EBNA3C und CBF1 in EBNA3A hat bisher gezeigt, dass sich die beiden Binderegionen überlappen oder eng benachbart sind, sie aber wahrscheinlich nicht völlig identisch sind. Für die funktionelle Analyse der Interaktion von EBNA3A und EBNA3C *in vivo* ist es notwendig, EBNA3A-Mutanten herzustellen, die nicht mehr mit EBNA3C, wohl aber mit CBF1 interagieren. Die vorhergehenden Kartierungen haben jedoch nur gezeigt, dass die EBNA3C- und CBF1-Bindestellen in einem ähnlichen Bereich im N-Terminus von EBNA3A liegen. Um präzise zu bestimmen, welche Aminosäuren von EBNA3A die Interaktion mit EBNA3C und CBF1 vermitteln, wurde die Methode der Peptid-Array-Bindungsstudie verwendet. Dabei werden synthetisch hergestellte, um jeweils drei Aminosäuren versetzte 15mer-Peptide eines Proteins auf eine Cellulose-Membran gespottet. Durch Inkubation dieses Peptid-Arrays mit einem radioaktiv markierten Protein können lineare Binde-Epitope identifiziert werden.

In diesem Experiment wurde in Kooperation mit Dr. Ronald Frank (Helmholtz Centre for Infection Research, Braunschweig) eine Hybridisierung eines Peptid-Arrays durchgeführt, der das gesamte EBNA3A-Protein durch 311 Peptide repräsentierte. Dieser EBNA3A-Peptid-Array wurde mit *in vitro* translatiertem, radioaktiv markiertem EBNA3C oder CBF1 als Sonde inkubiert und gebundenes Protein durch einen Röntgenfilm detektiert. In Abbildung 4.27A ist die Expression der beiden Sonden ^{35}S -EBNA3C und ^{35}S -CBF1 dargestellt.

Wie in Abbildung 4.27B, C zu sehen, ähneln sich die Signale bei Inkubation des EBNA3A-Peptid-Arrays mit ^{35}S -EBNA3C oder ^{35}S -CBF1. Diese Ähnlichkeit ist in Übereinstimmung mit der Annahme, dass sich die Bindestellen von EBNA3C und CBF1 in EBNA3A überlappen. Der Bereich der AS 139-222 von EBNA3A, der als essentiell für die Interaktion mit EBNA3C und CBF1 identifiziert wurde, ist in Abbildung 4.27B, C rot eingerahmt (Peptid 43-74). In diesem Bereich von EBNA3A sind einige Signale zu detektieren, die auf eine Interaktion von EBNA3C, bzw. CBF1 mit EBNA3A deuten. Dennoch lassen sich auch außerhalb der AS 139-222 (Peptid 1-42 und Peptid 75-311) von EBNA3A Signale detektieren, obwohl in den Co-Immunpräzipitationen keine zusätzliche Bindestelle von EBNA3C und CBF1 in EBNA3A identifiziert werden konnte. Dies lässt die Spezifität der übrigen Signale bezweifeln. Auffällig ist, dass die Peptide, die ein starkes Signal aufweisen, eine hohe Anzahl von Arginin (R)- oder Lysin (K)-Resten enthalten (Abb. 4.27D fett; Anhang). Dies wurde in unserer Arbeitsgruppe auch schon bei anderen Peptid-Arrays beobachtet. Es ist daher möglich, dass EBNA3C und CBF1 in dieser Art von Experiment unspezifisch an basische Aminosäurereste binden und die Signale auf dem Peptid-Array keine spezifische Interaktion mit EBNA3A darstellen. Dies würde erklären, warum sich Signale über das gesamte EBNA3A-Protein verteilt finden. Andererseits lässt sich nicht ausschließen, dass die Interaktion von EBNA3A mit EBNA3C und CBF1 über basische Aminosäuren vermittelt wird.

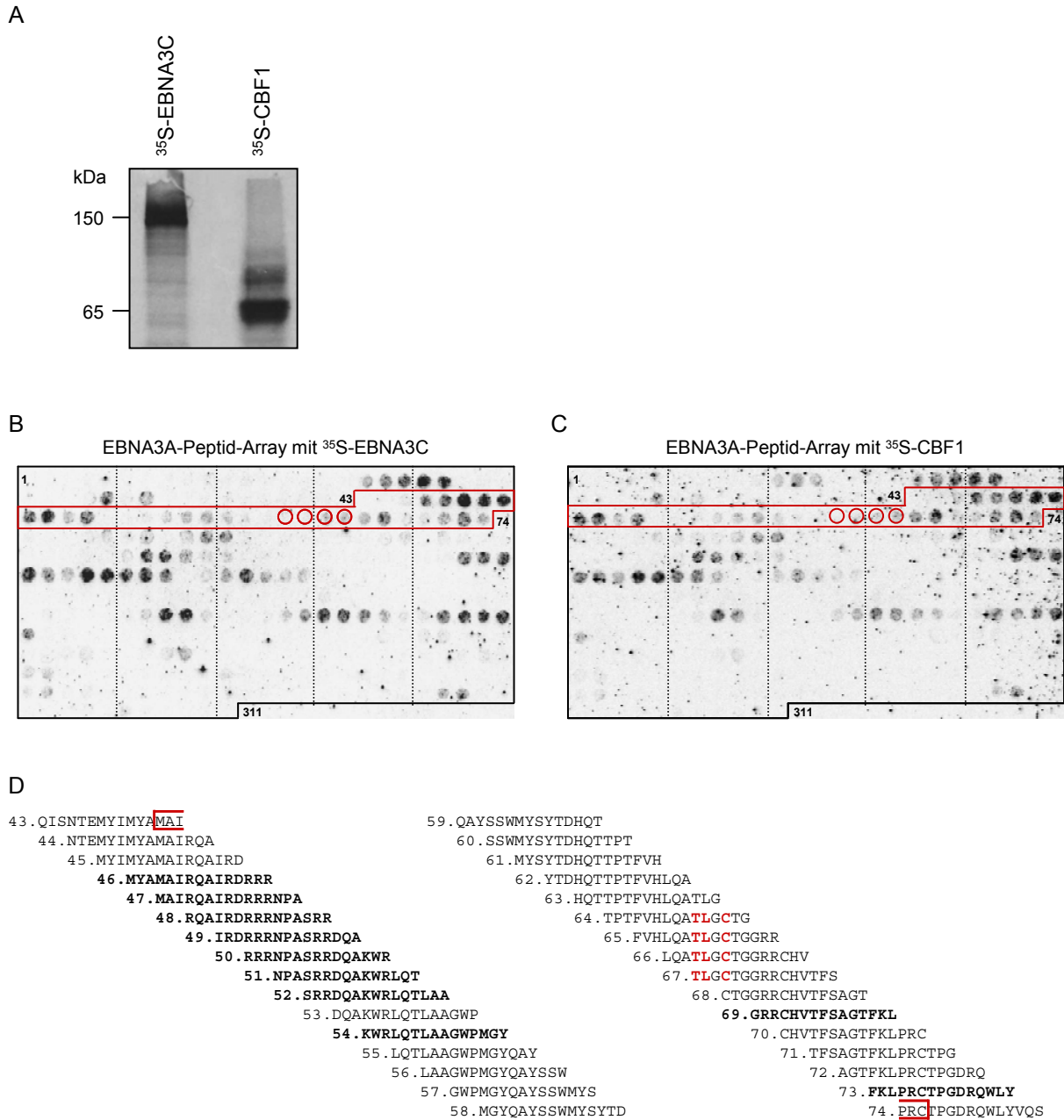


Abb. 4.27 Die Aminosäuren von EBNA3A, welche die Interaktion mit EBNA3C und CBF1 vermitteln, sind im Peptid-Array nicht näher zu bestimmen.

(A) Expression von ³⁵S-EBNA3C und ³⁵S-CBF1 durch *in vitro* Translation. 20 µCi [³⁵S]-Methionin und Expressionsplasmide für EBNA3C (2 µg), bzw. CBF1 (10 µg) wurden in einer *in vitro* Translations-Reaktion mit dem „TNT[®] T7 Coupled Reticulocyte Lysate System“ von Promega eingesetzt. Je 5 µl des Reaktionsansatzes wurden auf ein 10% Polyacrylamidgel aufgetragen und nach dem Trocknen des Gels mit einem Röntgenfilm detektiert. (B) und (C) zeigen den EBNA3A-Peptid-Array, bei dem auf einer Cellulose-Membran 311 um jeweils drei Aminosäuren versetzte 15mer-Peptide gespottet sind, die das gesamte EBNA3A-Protein repräsentieren. Die gestrichelten Linien unterteilen die Membran in Abschnitte von jeweils fünf Peptidspots. Der EBNA3A-Peptid-Array wurde mit *in vitro* translatiertem ³⁵S-EBNA3C (B), bzw. ³⁵S-CBF1 (C) inkubiert und gebundenes Protein mit einem Röntgenfilm detektiert. Der Bereich, der die AS 139-222 von EBNA3A enthält, ist rot umrandet und umfasst die Peptide 43-74. Die roten Kreise markieren die Peptide 64-67 von EBNA3A, die die AS 199, 200 und 202 enthalten. (D) zeigt die Aminosäuresequenz der Peptide 43-74, die die AS 139-222 (rote Klammer) von EBNA3A umfassen. Die AS 199, 200 und 202 sind rot markiert. Die Peptide, die nach der Inkubation mit ³⁵S-EBNA3C (B) oder ³⁵S-CBF1 (C) zu einem starken Signal geführt haben, sind fett dargestellt.

Die Aminosäuresequenz der Peptide, die die AS 139-222 von EBNA3A umfassen, welche essentiell für die Interaktion mit EBNA3C und CBF1 sind, ist in Abbildung 4.27D dargestellt. Innerhalb dieser Region liegen auch die AS 199, 200 und 202, die die Interaktion von EBNA3A mit CBF1 vermitteln sollen (Abb. 4.27C; Peptid 64-67, roter Kreis) (Dalbies-Tran et al., 2001). Dennoch lassen sich bei Inkubation des EBNA3A-Peptid-Arrays mit ^{35}S -CBF1 keine starken Signale bei den Peptiden 64-67 identifizieren. Die Signale sind ebenso schwach, wie bei der Inkubation mit ^{35}S -EBNA3C, dessen Interaktion nicht über die Aminosäuren 199, 200 und 202 von EBNA3A vermittelt wird (Abb. 4.27; vgl. B mit C; Peptid 64-67, roter Kreis). Daher bildet das in den EBNA3-Proteinen konservierte Motiv $^{198}\text{ATLGC}^{202}$ wahrscheinlich kein lineares Epitop für die CBF1-Bindung. Möglicherweise ist die dreidimensionale Konformation dieses Epitops von EBNA3A wichtig für die Interaktion mit CBF1. Es ist aber auch möglich, dass dieses Epitop für die Konformation des EBNA3A-Gesamtproteins notwendig ist.

Um auszuschließen, dass der Reaktionsansatz der *in vitro* Translation unspezifische Signale verursachte, wurde in einem Versuch der Peptid-Array mit einem *in vitro* Translationsansatz inkubiert, in dem keine Plasmid-DNA eingesetzt worden war. In diesem Fall waren keine Signale zu detektieren (Daten von Agnes Nowak in unserer Arbeitsgruppe). Außerdem wurde sichergestellt, dass das in diesem Experiment verwendete *in vitro* translatierte CBF1 richtig gefaltet und aktiv war, denn in einem anderen Peptid-Array konnte ein lineares Binde-Epitop von CBF1 mit derselben Sonde identifiziert werden (Daten von Katharina Heinzelmann in unserer Arbeitsgruppe).

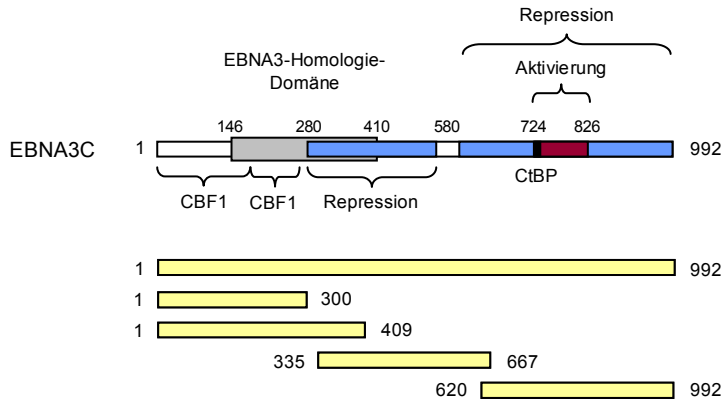
Zusammenfassend konnte auch mit diesem Experiment die Bindestelle von EBNA3C in EBNA3A nicht genauer kartiert und die Unterschiede zur CBF1-Bindestelle herausgearbeitet werden. Möglicherweise handelt es sich bei den EBNA3C- und CBF1-Bindestellen von EBNA3A um konformationsabhängige Epitope, die erst nach Faltung des Proteins entstehen. Interaktionen mit solchen Bereichen können durch einen Peptid-Array, in dem die Aminosäuren lediglich linear angeordnet sind, nicht identifiziert werden.

4.3.5.5 EBNA3A interagiert mit dem Bereich der Aminosäuren 1-300 von EBNA3C

Um ebenfalls die Bindestelle von EBNA3A in EBNA3C zu bestimmen, wurden von Youlia Kostova im Rahmen ihrer Diplomarbeit Vektoren zur Expression von MYC-EBNA3C-Proteinfragmenten kloniert (Abb. 4.28A). EBNA3C AS 1-300 und 1-409 enthalten beide potentiellen CBF1-Bindestellen, die im Bereich der AS 1-183 und 183-240 liegen sollen (Robertson et al., 1996; Zhao et al., 1996). Das Proteinfragment EBNA3C AS 335-667 umfasst eine Repressionsdomäne und das Proteinfragment AS 620-992 enthält eine weitere Repressionsdomäne und die Aktivierungsdomäne von EBNA3C (Bain et al., 1996; Marshall and Sample, 1995). Die Expressionsplasmide für HA-EBNA3A und der MYC-EBNA3C-Proteinfragmente, bzw. deren Leervektor wurden in HEK293 co-transfiziert und eine Co-Immunitätspräzipitation mit dem MYC-Antikörper durchgeführt. Dieser Versuch zeigt, dass die N-

terminalen 300 Aminosäuren von EBNA3C ausreichen, um HA-EBNA3A ähnlich stark wie durch WT-EBNA3C zu co-präzipitieren (Abb. 4.28B; vgl. Spur 2 mit 12). Im C-Terminus von EBNA3C gibt es keine weitere EBNA3A-Bindestelle (Abb. 4.28B; Spur 6-8). Bei Co-Expression des Leervektors kommt es nicht zur Co-Präzipitation von HA-EBNA3A (Abb. 4.28B; Spur 10), was zeigt, dass HA-EBNA3A nicht unspezifisch an die ProteinG-Beads bindet.

A



B

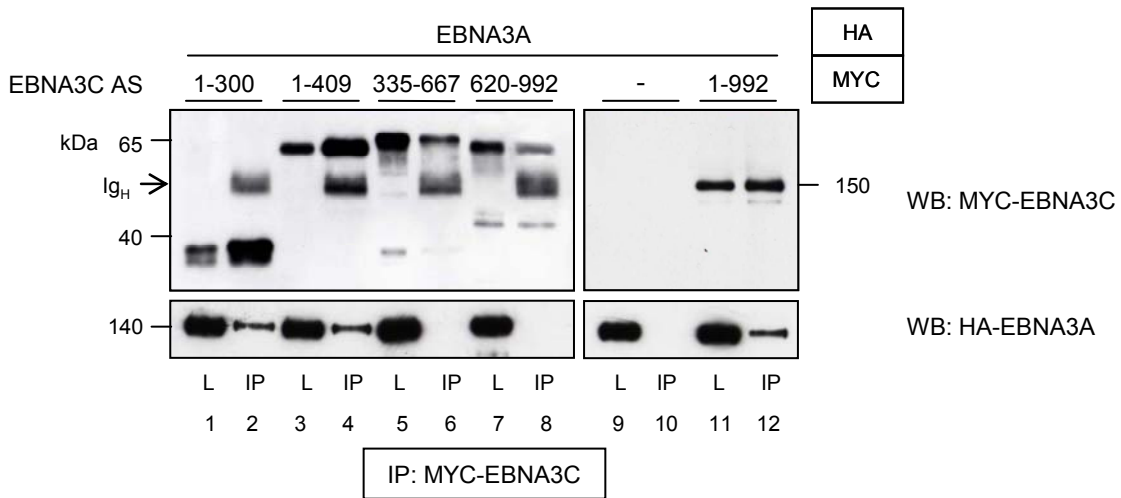


Abb. 4.28 EBNA3A interagiert mit dem Bereich der AS 1-300 von EBNA3C.

(A) EBNA3C-Proteinfragmente. Die Genfragmente zur Expression der dargestellten Proteinfragmente von EBNA3C wurden in einen Vektor zur Expression von MYC-Fusionsproteinen kloniert. Die Abbildung zeigt die in der Literatur beschriebenen Bindestellen von CBF1 und CtBP und gibt den Aminosäurebereich (AS) der hergestellten EBNA3C-Proteinfragmente an. (B) EBNA3A interagiert mit dem Bereich der AS 1-300 von EBNA3C. 70% konfluente HEK293 wurden mit Expressionsplasmiden der MYC-EBNA3C-Proteinfragmente AS 1-300 (3 µg), 1-409 (5 µg), 335-667 (5 µg), 620-992 (14 µg), 1-992 (2 µg) und HA-EBNA3A (0,2 µg) co-transfiziert. Nach 48 h erfolgte die Co-Immunpräzipitation mit einem MYC-Antikörper und die Proben (IP) und die Gesamtzelllysate (L) wurden im Western Blot mit dem MYC- und dem HA-Antikörper detektiert. Die Proben zum Nachweis der EBNA3C-Proteinfragmente (WB: MYC-EBNA3C; Spur 1-8) wurden auf einem 10% Polyacrylamidgel aufgetragen. Die Proben zum Nachweis von MYC-EBNA3C AS 1-992 und von HA-EBNA3A wurden auf einem 8% Polyacrylamidgel aufgetragen. Die Proteinmenge des Lysats entspricht 2% der IP-Probe. Auf der Höhe von ca. 55 kDa liegt die schwere Kette des MYC-Antikörpers (Ig_H).

Um die Interaktion von EBNA3A und EBNA3C über deren N-Termini zu bestätigen, wurden die Plasmide zur Expression von HA-EBNA3A AS 1-222 und MYC-EBNA3C AS 1-300, bzw. MYC-EBNA3C oder der Leervektor in HEK293 co-transfiziert und eine Co-Immunpräzipitation mit dem MYC-Antikörper durchgeführt. Dieser Versuch zeigt, dass HA-EBNA3A AS 1-222 durch MYC-EBNA3C AS 1-300 genauso effizient, wie durch MYC-EBNA3C co-präzipitiert wird (Abb. 4.29; vgl. Spur 2 mit 4).

Die Interaktion von EBNA3A und EBNA3C kann daher allein über deren N-Termini vermittelt werden und es gibt keine weitere Bindestelle im C-Terminus. Dies steht jedoch im Widerspruch zur Literatur, wo die Interaktion von EBNA3A und EBNA3C über deren C-Termini publiziert wurde (Calderwood et al., 2007).

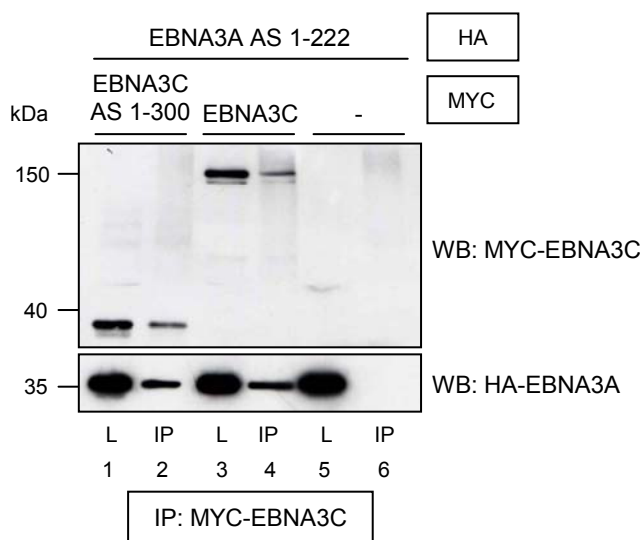


Abb. 4.29 Interaktion der N-Termini von EBNA3A und EBNA3C

70% konfluente HEK293 wurden mit Expressionsplasmiden von MYC-EBNA3C AS 1-300 (3 µg), 1-992 (2 µg) und von HA-EBNA3A AS 1-222 (0,5 µg) co-transfiziert. Nach 48 h wurde eine Co-Immunpräzipitation mit einem MYC-Antikörper durchgeführt. Die Proben der Immunpräzipitation (IP) und die Gesamtzelllysate (L) wurden auf einem 10% Polyacrylamidgel aufgetragen und im Western Blot mit dem MYC- und dem HA-Antikörper detektiert. Die Proteinmenge des Lysats entspricht 2% der IP-Probe.

Abbildung 4.30 fasst die Ergebnisse zur Kartierung der EBNA3A-Bindestelle in EBNA3C im Vergleich zur CBF1-Bindestelle in EBNA3C zusammen. Die CBF1-Bindestelle in EBNA3C wurde von Youlia Kostova im Yeast Two-Hybrid System und durch Co-Immunpräzipitationen im Rahmen ihrer Diplomarbeit bestimmt (Daten nicht gezeigt).

EBNA3A wird durch die N-terminalen 300 Aminosäuren von EBNA3C ebenso effizient co-präzipitiert wie durch WT-EBNA3C. Die Co-Präzipitation von CBF1 durch EBNA3C AS 1-300 ist jedoch schwächer, als die durch WT-EBNA3C. Nur ein EBNA3C-Proteinfragment, das die N-terminalen 409 Aminosäuren umfasst, interagiert ebenso stark mit CBF1 wie WT-EBNA3C. Außerdem findet mit dem EBNA3C-Proteinfragment von AS 335-667 eine schwache Interaktion mit CBF1 statt, während eine Interaktion mit EBNA3A in diesem Bereich nicht nachweisbar ist. Dies deutet auf zwei CBF1-Bindestellen in EBNA3C hin.

Mit diesen Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Interaktion von EBNA3C sowohl mit EBNA3A, als auch mit CBF1 über den N-Terminus von EBNA3C vermittelt wird. Die exakte Bindestelle ist vermutlich nicht identisch, sie wurde jedoch nicht weiter bestimmt. Dennoch ist es möglich, dass die Bindestellen von CBF1 und EBNA3A in EBNA3C teilweise überlappen.

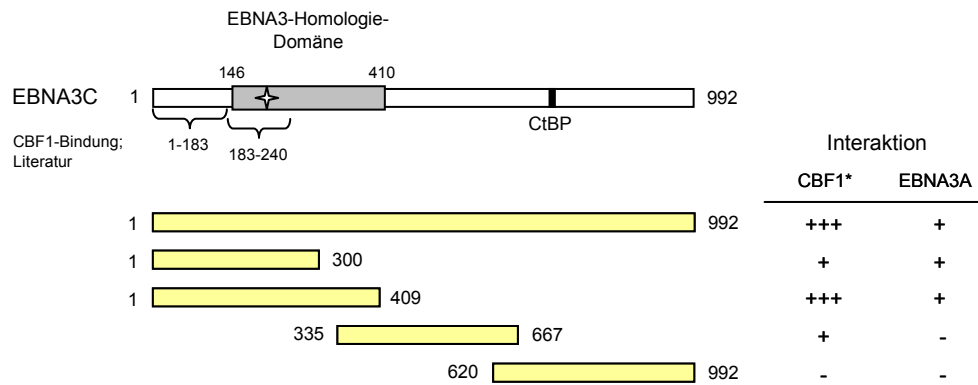


Abb. 4.30 Die AS 1-300 von EBNA3C sind ausreichend für die Interaktion mit EBNA3A.

Die Abbildung fasst die Ergebnisse der Kartierung der minimalen Bindestelle von EBNA3A und CBF1 in EBNA3C zusammen. Oben sind die in der Literatur beschriebenen CBF1- und CtBP-Bindestellen in EBNA3C dargestellt. Der weiße Stern bezeichnet die Position der AS 209-212, deren Austausch zu Alanin die CBF1-Bindung um ca. 70% reduzierte (West et al., 2004). *Die Kartierung der CBF1-Bindestelle in EBNA3C wurde von Youlia Kostova im Rahmen ihrer Diplomarbeit durchgeführt. + und – gibt die Stärke der Interaktion semiquantitativ wieder.

Die Kartierungen haben gezeigt, dass die Interaktion von EBNA3C und CBF1 mit EBNA3A zwar nicht über die gleichen Aminosäuren, aber dennoch über eng benachbarte, sich möglicherweise überlappende Regionen im N-Terminus von EBNA3A vermittelt wird. Auch die Interaktion von EBNA3A mit EBNA3C wird über eine Region im N-Terminus von EBNA3C vermittelt, die möglicherweise mit der CBF1-Bindestelle von EBNA3C überlappt. Um die Funktion der Interaktion von EBNA3A und EBNA3C bei der Genregulation in LCLs zu untersuchen, muss eine EBNA3A-Mutante hergestellt werden, die EBNA3C nicht mehr bindet. Aufgrund der möglichen Überlappung mit der CBF1-Bindestelle muss jedoch darauf geachtet werden, dass die Interaktion mit CBF1 immer noch stattfinden kann.

5 Diskussion

Die EBV-Latenzproteine EBNA3A und EBNA3C sind Repressoren der Transkription und modulieren möglicherweise die Funktion des zentralen EBV-Transaktivators EBNA2. Da bisher keine direkte DNA-Bindung durch EBNA3A und EBNA3C gezeigt wurde, ist für die Regulation der Transkription wahrscheinlich die Rekrutierung eines DNA-bindenden Adapterproteins, zum Beispiel CBF1, notwendig. Obwohl die Funktion von EBNA3A und EBNA3C als Repressoren in Promotor-Reporter-Gen-Studien gut etabliert wurde, sind bisher nur wenige Zielgene bekannt. Durch die gemeinsame Repression des proapoptischen Gens Bim werden EBNA3A und EBNA3C antiapoptische Funktionen zugeschrieben. Auch die Charakterisierung von in unserer Arbeitsgruppe etablierten EBNA3A- und EBNA3C-negativen LCLs hat gezeigt, dass LCLs in Abwesenheit von EBNA3A oder EBNA3C eine höhere Apoptoserate aufweisen (Hertle et al., 2009; Popp, 2006). Die Beteiligung von EBNA3A und EBNA3C an der Regulation des Zellzyklus und der Apoptose wurde auch in Zielgenanalysen bestätigt (Hertle et al., 2009; Diplomarbeit Agnes Nowak).

5.1 Untersuchung der Repression des Transkriptionsfaktors *Foxo3a* durch EBNA3A und EBNA3C

In Affymetrix-Arrays zur Identifikation zellulärer Zielgene von EBNA3A und EBNA3C wurde der Transkriptionsfaktor Foxo3a als ein in Anwesenheit von EBNA3A und EBNA3C reprimiertes Gen identifiziert. Das verwandte Gen Foxo1a wurde nur durch EBNA3A reprimiert. Foxo-Proteine besitzen im Fall von Zellstress zwei verschiedene Funktionen: zum Einen können sie als Tumorsuppressor-Proteine die Apoptose und den Zellzyklusarrest von Zellen induzieren. Zum Anderen kann die Induktion des Zellzyklusarrests das Überleben von Zellen verlängern, da währenddessen die DNA-Reparatur stattfinden kann. Zusätzlich können die Foxo-Proteine in der DNA-Reparatur involvierte Gene induzieren und die Zellschädigung durch reaktive Sauerstoffspezies durch die Induktion von detoxifizierenden Proteinen vermindern.

Gegenüber WT-LCLs weisen die in unserer Arbeitsgruppe etablierten EBNA3A- und EBNA3C-negativen LCLs eine erhöhte Apoptoserate und verringerte Proliferationsrate auf. Da in diesen Zellen Foxo3a exprimiert wird, ist möglicherweise dessen Expression für die verlangsamte Expansion der EBNA3A- und EBNA3C-negativen LCLs verantwortlich. Alternativ ist es möglich, dass Foxo3a durch seine unter Zellstress das Überleben fördernden Eigenschaften erst das Wachstum der EBNA3A- und EBNA3C-negativen LCLs ermöglichte. Um diese beiden Hypothesen zu testen, wurde im Folgenden die Funktion der Foxo-Proteine in EBNA3A- und EBNA3C-negativen LCLs untersucht.

5.1.1 Die Expression von Foxo3a wird in Anwesenheit von EBNA3A und EBNA3C auf dem mRNA-Level reprimiert

Durch die Bestimmung der relativen mRNA-Level konnte die Repression von Foxo3a in mehreren unabhängig etablierten WT-LCLs im Vergleich zu EBNA3A- und EBNA3C-negativen LCLs bestätigt werden. In Übereinstimmung mit der Beobachtung, dass Foxo3a auf dem mRNA-Level reprimiert wird, konnte die Expression von Foxo3a in WT-LCLs nicht durch die Inhibierung einer potentiellen posttranslationalen Regulation stabilisiert werden. Die direkte transkriptionelle Repression von Foxo3a durch EBNA3A und EBNA3C wurde jedoch nicht gezeigt. Dazu wäre es nötig, Chromatin-Immünpräzipitationen durchzuführen, um EBNA3A und EBNA3C direkt im Promotor von Foxo3a nachzuweisen.

Weiterhin schien die Repression von Foxo3a in Anwesenheit EBNA3A und EBNA3C auf dem Proteinlevel stärker zu sein, als auf dem mRNA-Level. Der Grund für diese nicht-lineare Korrelation zwischen mRNA-Level und Proteinlevel von Foxo3a ist jedoch unklar. Vor kurzem wurde gezeigt, dass die Proteinexpression von Foxo1a und Foxo3a in Brustkrebs-, bzw. Melanomzellen durch die microRNAs miR-27a, miR-96 und miR-182 reprimiert werden kann (Guttilla and White, 2009; Segura et al., 2009). Tatsächlich wurde die Induktion der microRNA miR-27a in EBV-infizierten B-Zellen, die das Expressionsmuster der Latenz III aufweisen, gezeigt (Cameron et al., 2008; Mrazek et al., 2007). Eine biologische Bedeutung der Induktion dieser microRNA in EBV-infizierten B-Zellen wurde jedoch bisher nicht untersucht. Möglicherweise bewirkt daher die Expression der microRNA miR-27a in WT-LCLs eine zusätzliche Repression von Foxo3a und erklärt damit die nicht-lineare Korrelation zwischen mRNA- und Proteinlevel von Foxo3a.

Diese Ergebnisse zeigen zum ersten Mal die Repression von Foxo3a in LCLs auf dem mRNA-Level. In Nasopharynx-Karzinom-Zellen war bereits die Repression von Foxo3a durch LMP1 gezeigt worden. Da LMP1 jedoch den PI3K-Signalweg aktiviert, erfolgte dort die Repression von Foxo3a wahrscheinlich posttranslational (Chen et al., 2008). Auch für Foxo1a wurde die Regulation durch LMP1 gezeigt. So konnte die Expression von LMP1 in DG75 die Proteinexpression von Foxo1a deutlich reduzieren. Bei Infektion von BL-Zellen mit EBV war zusätzlich eine Abnahme des Foxo1a-mRNA-Niveaus zu beobachten. Eine Beteiligung von LMP1 bei der transkriptionellen Repression von Foxo1a wurde jedoch nicht nachgewiesen (Shore et al., 2006). Da LMP1 sowohl in WT-LCLs als auch in EBNA3A-, bzw. EBNA3C-negativen LCLs exprimiert ist, ist eine Regulation von Foxo3a durch LMP1 in diesem Fall jedoch auszuschließen.

5.1.2 *Obwohl Foxo3a in LCLs funktionell aktiv sein kann, werden die bekannten Foxo-Zielgene in LCLs nicht reguliert*

Foxo-Proteine sind Transkriptionsfaktoren die, wenn sie exprimiert sind, aktiv sein sollten. Eine Inaktivierung erfolgt durch Kernexport und proteasomale Degradation. Daher wurde zunächst untersucht, ob die bekannten Foxo-Zielgene in den EBNA3A- und EBNA3C-negativen LCLs, die Foxo3a exprimieren, reguliert werden. Dazu wurden die Affymetrix-Arrays zu Identifikation von EBNA3A- und EBNA3C-Zielgenen erneut analysiert. Die Auswertung beschränkte sich dabei vor allem auf Foxo-Zielgene, die bei der Regulation des Zellzyklus, der Apoptose und der Detoxifizierung eine Rolle spielen. Obwohl Foxo3a in den EBNA3A- und EBNA3C-negativen LCLs stark exprimiert war, waren nur die Foxo-Zielgene Cyclin D2 und TXNIP sowohl in den EBNA3A-, als auch in den EBNA3C-negativen LCLs differentiell reguliert. Diese differentielle Regulation konnte jedoch nicht in allen untersuchten Zelllinien durch Real-Time RT-PCR bestätigt werden.

Eine Zellfraktionierung zeigte jedoch die nahezu ausschließliche Lokalisierung von Foxo3a im Zellkern. Auch eine mögliche Protein-Acetylierung, die die DNA-Bindung durch Foxo3a und damit auch seine Funktion verhindern könnte, konnte ausgeschlossen werden. Zusätzlich konnte in einer DNA-Affinitätspräzipitation gezeigt werden, dass das in den EBNA3A- und EBNA3C-negativen LCLs exprimierte Foxo3a fähig war, an DNA zu binden und konstitutiv aktiv sein konnte. Ob Foxo3a in den EBNA3A- und EBNA3C-negativen LCLs auch Zielgene induzieren kann, könnte durch Promotor-Reporter-Gen-Studien mittels eines Reporters, der multimerisierte Foxo-Bindestellen enthält, geklärt werden.

Möglicherweise ist keine differentielle Regulation der in der Literatur beschriebenen Foxo-Zielgene in den EBNA3A- und EBNA3C-negativen LCLs im Vergleich zu WT-LCLs zu beobachten, weil in den WT-LCLs Foxo1a exprimiert ist. Daher kann der Verlust von Foxo3a möglicherweise durch Foxo1a kompensiert werden. Die redundante Funktion der Foxo-Proteine wurde bereits im Mausmodell gezeigt. Dort hatte nur die Deletion aller drei Foxo-Proteine Auswirkungen auf den Phänotyp. Dennoch haben die Foxo-Proteine auch gewebsspezifische Funktionen, denn die Deletion aller drei Foxo-Proteine führte nur in Thymozyten und bestimmten Endothelzellen zur Tumorentwicklung (Übersicht: Arden, 2007; Tothova and Gilliland, 2007). Auch bei der B-Zellentwicklung konnte gezeigt werden, dass dort Foxo1a eine wichtige Rolle übernimmt, während Foxo3a zu vernachlässigen ist. Daher werden die in der Literatur beschriebenen Foxo-Zielgene möglicherweise nicht in aktivierten oder EBV-immortalisierten B-Zellen reguliert. Um Foxo3a-Zielgene in EBNA3A- und EBNA3C-negativen LCLs zu identifizieren, müsste eine differentielle Zielgenanalyse im Vergleich zu Zellen, in denen Foxo3a stabil herunterreguliert wurde, durchgeführt werden. Dadurch könnte der Einfluss von EBNA3A und EBNA3C außer Betracht gelassen werden.

Da gezeigt worden war, dass Foxo3a in LCLs funktionell aktiv sein konnte, jedoch keine Regulation der publizierten Zielgene beobachtet werden konnte, wurde die Hypothese

aufgestellt, dass Foxo3a einen Sensor für Zellstress darstellt. Möglicherweise lag die Proteinmenge von Foxo3a unter einem Schwellenwert, der für transkriptionelle Aktivität erforderlich war. Da der PI3K-Signalweg, durch den Foxo3a inaktiviert wird, durch Zellstress abgeschaltet wird, kommt es anschließend zum Anstieg des Foxo-Proteins (Liu et al., 2005; Nakamura and Sakamoto, 2008; Yang et al., 2006). Außerdem wurde in verschiedenen zellulären Systemen gezeigt, dass H₂O₂-Behandlung und Serumentzug von Zellen zum Anstieg der Foxo-mRNA führen kann (Liu et al., 2005; Nakamura and Sakamoto, 2008). Dennoch war weder in WT-LCLs, noch in den EBNA3A-, oder EBNA3C-negativen LCLs ein reproduzierbarer Anstieg des Foxo3a-Proteins induziert durch γ -Strahlung, H₂O₂ oder Kultivierung in serumfreiem Medium zu beobachten.

Diese Untersuchungen haben gezeigt, dass Foxo3a in EBV-immortalisierten B-Zellen nicht, wie in anderen zellulären Systemen beschrieben, durch Zellstress induziert werden kann. Außerdem zeigt dieses Ergebnis erneut, dass Foxo3a in WT-LCLs strikt auf mRNA-Level reguliert ist.

5.1.3 Die Expression von Foxo3a vermittelt EBNA3A-negativen LCLs einen Wachstumsvorteil

Wie bereits ausgeführt, können die Foxo-Proteine unter Zellstress sowohl die Apoptose induzieren, als auch das Überleben von Zellen verbessern. Um zu ermitteln, welche der beiden Funktionen Foxo3a in den EBNA3A- und EBNA3C-negativen LCLs übernimmt, wurde Foxo3a in diesen Zellen mittels lentiviraler Transduktion einer shRNA herunterreguliert. Der stabile Knockdown von Foxo3a wurde gewählt, da Zellen bei transientem Knockdown nicht über einen längeren Zeitraum hinweg analysiert werden können. Der Knockdown von Foxo3a wurde nur in einer EBNA3A-negativen LCL durchgeführt, da die EBNA3C-negativen LCLs sehr instabil in Bezug auf ihr Wachstumsverhalten waren.

Um die Auswirkung des Verlusts von Foxo3a in EBNA3A-negativen LCLs zu untersuchen, wurde eine Wachstumskurve durchgeführt. Wenn die Expression von Foxo3a zur erhöhten Apoptose der EBNA3A-negativen Zellen führt, sollte der Knockdown von Foxo3a die Expansion dieser Zellen erhöhen. Wenn Foxo3a jedoch das Überleben der EBNA3A-negativen LCLs verbessert, würde der Knockdown von Foxo3a die Expansion dieser Kultur verschlechtern.

Die Wachstumskurve zeigte, dass EBNA3A-negative Foxo3a-Knockdown-LCLs langsamer, als die Foxo3a-exprimierenden EBNA3A-negativen LCLs expandierten. Das verminderte Wachstum der Foxo3a-Knockdown-LCLs ließ sich vermutlich auf eine verringerte Rate von Zellen in der S-Phase zurückführen, während es nicht zu Akkumulation von apoptotischen Zellen durch den Knockdown von Foxo3a kam. In Abwesenheit von Foxo3a verharren die Zellen daher länger in den Gap-Phasen des Zellzyklus. Dies steht im Widerspruch zu der Beobachtung der Arbeitsgruppe Fruman, welche zeigen konnte, dass die Expression von

Foxo3a in primären Maus-B-Zellen zum G1-Arrest führte (Yusuf et al., 2004). Allgemein expandierten lentiviral transduzierte LCLs jedoch besser, als die nicht-transduzierten EBNA3A-negativen LCLs. Dies ist wahrscheinlich auf den Selektionsprozess nach der Transduktion zurückzuführen, den nur die Zellen überleben, die am stärksten proliferieren. Die Analyse der EBNA3A-negativen Foxo3a-Knockdown-LCLs hat gezeigt, dass Foxo3a in Abwesenheit von EBNA3A eher einen Wachstumsfaktor darstellt, als Apoptose induziert. Diese Funktion kann offenbar nicht von Foxo1a übernommen werden. Foxo3a vermittelt EBNA3A-negativen LCLs einen Wachstumsvorteil und bewirkt möglicherweise erst das Auswachsen dieser Zellen. In ruhenden B-Zellen erhält Foxo3a die Quieszenz aufrecht. Zur Proliferation dieser Zellen, sei es aufgrund der Aktivierung durch ein Antigen oder einer EBV-Infektion, ist die Repression von Foxo3a notwendig (Hinman et al., 2007; Shore et al., 2006; Stahl et al., 2002; Yusuf et al., 2004). Andernfalls würde Foxo3a den Zellzyklusarrest aufrecht erhalten und die Apoptose induzieren. Im Falle einer EBV-Infektion erfolgt die Repression von Foxo3a möglicherweise durch das Zusammenspiel von EBNA3A und EBNA3C. Die direkte Repression von Foxo3a durch EBNA3A und EBNA3C konnte in dieser Arbeit jedoch nicht gezeigt werden. Andererseits ist es auch möglich, dass die Expression von Foxo3a EBNA3A- und EBNA3C-negativen LCLs einen Wachstumsvorteil vermittelt und so während der Immortalisierung Foxo3a-exprimierende LCLs herausselektiert werden. Um zu klären, ob Foxo3a direkt durch EBNA3A und EBNA3C reprimiert wird, oder ob es sich um einen Selektionsprozess handelt, müsste das Foxo3a-Expressionslevel in konditional EBNA3A- oder EBNA3C-exprimierenden LCLs untersucht werden. Alternativ könnte das Foxo3a-Expressionslevel zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der EBV-Infektion analysiert werden.

In WT-LCLs haben EBNA3A und EBNA3C antiapoptotische Funktionen und ermöglichen das Überleben EBV-immortalisierter LCLs. In deren Abwesenheit wird diese protektive Funktion möglicherweise durch Foxo3a kompensiert. So wurde im Mausmodell gezeigt, dass die Foxo-Proteine die Apoptoserate und das Level reaktiver Sauerstoffspezies in hämatopoetischen Stammzellen verringern konnten und dadurch deren Überleben verlängern konnte (Übersicht: Arden, 2007; Tothova and Gilliland, 2007). Da die in der Literatur beschriebenen Foxo-Zielgene in EBNA3A- und EBNA3C-negativen LCLs jedoch nicht induziert wurden, wird die Foxo-Funktion in diesen Zellen möglicherweise über bisher noch nicht bekannte Zielgene von Foxo3a vermittelt. Um diese zu identifizieren, müssen vergleichende Genexpressionsanalysen unter Verwendung der Foxo3a-Knockdown-LCLs durchgeführt werden.

5.2 Analyse der Interaktion von EBNA3A mit EBNA3C und CBF1

Die Proteine der EBNA3-Familie sind wahrscheinlich durch Genduplikation entstanden und besitzen eine stark konservierte Domäne im N-Terminus. Auch aufgrund der Bindung an den DNA-Adapter CBF1 wird angenommen, dass EBNA3A, -B und -C zum Teil redundante Funktionen haben. Eine funktionelle Kooperation durch EBNA3A und EBNA3C ist in der Literatur bei der Repression des proapoptotischen Gens Bim beschrieben (Anderton et al., 2008). Die molekulare Interaktion von EBNA3A und EBNA3C wurde bisher jedoch kaum untersucht. Zwar wurde die Heterodimerisierung von EBNA3A und EBNA3C, und auch eine Homodimerisierung von EBNA3A in einem Yeast Two-Hybrid Screen gezeigt, diese Interaktionen konnten jedoch nicht durch biochemische Methoden bestätigt werden (Calderwood et al., 2007).

Da sowohl unsere eigenen Studien, als auch die anderer Arbeitsgruppen gezeigt haben, dass EBNA3A und EBNA3C funktionell kooperieren können, wurde im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit die molekulare Interaktion von EBNA3A und EBNA3C untersucht. Durch die Homo- und Heterodimerisierung von EBNA3A und EBNA3C werden möglicherweise Multiprotein-Repressorkomplexe auf den Promotoren von Zielgenen ausgebildet. Die Co-Expression von EBNA3A und EBNA3C könnte somit die Repression gemeinsamer Zielgene verstärken. Daher sollte zunächst in Promotor-Reporter-Gen-Studien eine mögliche Kooperation bei der Genrepression durch EBNA3A und EBNA3C untersucht werden. Um auch die endogene Genregulation durch die Interaktion von EBNA3A und EBNA3C untersuchen zu können, war es notwendig, die minimale Binderegion von EBNA3C in EBNA3A zu ermitteln. Basierend auf diesen Vorarbeiten sollen später EBV-Mutanten hergestellt werden, die ein EBNA3A-Protein exprimieren, das die Interaktion mit EBNA3C nicht mehr vermitteln kann.

5.2.1 EBNA3A und EBNA3C können Hetero- und Homodimere ausbilden

Obwohl die Interaktion von EBNA3A und EBNA3C und die Homodimerisierung von EBNA3A zuerst in einem Yeast Two-Hybrid Screen gezeigt wurde (Calderwood et al., 2007), konnten diese Interaktionen in dieser Arbeit nicht in einem Yeast Two-Hybrid Experiment bestätigt werden. Erst bei der exogenen Expression der Proteine in Säugetierzellen konnte die Heterodimerisierung von EBNA3A und EBNA3C und die Homodimerisierung von EBNA3A bestätigt werden und auch erstmals die Homodimerisierung von EBNA3C gezeigt werden. Weiterhin konnte erstmals die Interaktion der endogen in LCLs exprimierten Proteine gezeigt werden, was die Heterodimerisierung von EBNA3A und EBNA3C zusätzlich bekräftigte. Während im Yeast Two-Hybrid Experiment vor allem binäre Interaktionen untersucht werden können, ist es bei der Immunpräzipitation von Proteinen aus Säugetierzellen möglich, dass

die Interaktion über Adapterproteine vermittelt wird. Dies wäre eine mögliche Erklärung dafür, warum eine Interaktion nur in Säugetierzellen, nicht jedoch im Yeast-Two Hybrid System nachgewiesen werden kann. Ein möglicher Kandidat, um die Interaktion von EBNA3A und EBNA3C indirekt zu vermitteln, ist das DNA-Adapterprotein CBF1, das mit allen EBNA3-Proteinen interagiert. Durch die Verwendung einer CBF1-negativen Zelllinie konnte jedoch gezeigt werden, dass die Interaktion auch in Abwesenheit von CBF1 stattfindet und daher nicht über dieses Protein vermittelt wird. Die Heterodimerisierung von EBNA3A und EBNA3C über ein anderes Adapterprotein, ist jedoch nicht ausgeschlossen.

Die Homodimerisierung und auch die Heterodimerisierung von EBNA3A und EBNA3C könnte möglicherweise durch den Co-Repressor CtBP vermittelt werden, welcher ebenso in der Lage ist, zu homodimerisieren. Durch die Verwendung einer EBNA3A-Mutante, die nicht mehr in der Lage war, an CtBP zu binden, konnte die Homodimerisierung von EBNA3A über CtBP ausgeschlossen werden. Leider stand keine ähnliche Mutante für EBNA3C zu Verfügung. Eine Homodimerisierung von EBNA3A und EBNA3C über CBF1 ist unwahrscheinlich, da CBF1 nicht homodimerisiert und die EBNA3A- oder EBNA3C-Bindestelle in CBF1 vermutlich nur ein Protein binden kann. Dies könnte jedoch leicht durch Expression der Proteine in CBF1-negativen Zellen und Co-Immunpräzipitation überprüft werden. Dennoch ist es möglich, dass die Homodimerisierung von EBNA3A und EBNA3C über ein anderes unbekanntes Protein vermittelt wird.

Durch die Homo- und Heterodimerisierung können EBNA3A und EBNA3C möglicherweise vielfach Co-Repressoren über lediglich ein Adapterprotein an die DNA rekrutieren. Dadurch bilden EBNA3A und EBNA3C möglicherweise Multiprotein-Repressorkomplexe auf den Promotoren von gemeinsamen Zielgenen aus. Die Ausbildung dieser Komplexe könnte zu einer weitaus stärkeren Repression von Genen führen, als es eines der EBNA3-Proteine allein bewirken könnte.

5.2.2 In Promotor-Reporterstudien ist keine Kooperation von EBNA3A und EBNA3C nachweisbar

Wie im vorigen Abschnitt ausgeführt, können EBNA3A und EBNA3C homo- und heterodimerisieren und dadurch möglicherweise Multiprotein-Repressorkomplexe auf den Promotoren von Zielgenen ausbilden. Da bisher noch keine direkte DNA-Bindung durch EBNA3A und EBNA3C gezeigt wurde, müsste dieser Repressorkomplex über die Bindung an ein Adapterprotein, zum Beispiel CBF1, an die DNA rekrutiert werden.

Um zu untersuchen, ob EBNA3A und EBNA3C bei der Genrepression kooperieren, wurden Promotor-Reporterstudien durchgeführt. Zunächst wurde ein möglicher kooperativer Effekt von EBNA3A, bzw. EBNA3C auf die Repression eines GAL4-abhängigen Promotors durch ein Fusionsprotein aus EBNA3C, bzw. EBNA3A und der GAL4-DBD untersucht. Wie in der Literatur beschrieben, wurde ein GAL4-abhängiger Promotor durch GAL4-DBD-EBNA3A,

bzw. GAL4-DBD-EBNA3C effizient reprimiert. Dieser Effekt wurde jedoch nicht durch Co-Expression der unfusionierten Proteine EBNA3C oder EBNA3A verstärkt.

Da die Expression von EBNA3A und EBNA3C nicht zur Repression eines CBF1-abhängigen Promotors führte, wurde der Promotor zunächst durch CBF1-VP16 aktiviert. Doch auch die Repression des zuvor durch CBF1-VP16 aktivierten CBF1-abhängigen Promotors konnte durch Co-Expression von EBNA3C und ansteigenden Mengen EBNA3A nicht synergistisch verstärkt werden. Es war zwar eine Zunahme der Repression bei Co-Expression beider Proteine zu beobachten. Dies lässt sich jedoch darauf zurückführen, dass EBNA3C im Überschuss gegenüber CBF1 vorlag und so alle noch nicht durch EBNA3C gebundenen CBF1-Proteine bei Co-Expression durch EBNA3A besetzt werden konnten, was zu einer verstärkten Repression führte. Diese Zunahme der Repression wurde jedoch wahrscheinlich nicht durch die Interaktion von EBNA3A und EBNA3C bewirkt. Bei der Expression größerer Mengen von EBNA3A und EBNA3C wurde der Reporter bereits durch ein Protein maximal reprimiert und es war keine weitere Titration möglich.

Zusammenfassend ließ sich in transienten Promotor-Reporter-Gen-Studien keine synergistische Repression durch die Interaktion von EBNA3A und EBNA3C beobachten. Möglicherweise ist ein transientes System ungeeignet, um die Auswirkung eines höhermolekularen Komplexes zu untersuchen, da die Ausbildung solcher Komplexe länger als 48 h dauert. Andererseits ist es auch möglich, dass zunächst aktivierende Chromatin-Modifikationen auf dem Promotor aufgebrochen werden müssen, damit sich reprimierende Chromatin-Modifikationen etablieren können. Dazu ist möglicherweise eine mehrfache Teilung der Zellen notwendig, die während der 48 h nach der Transfektion nicht effizient stattfindet. Möglicherweise lässt sich keine synergistische Zunahme der Repression bei Co-Expression von EBNA3A und EBNA3C beobachten, weil EBNA3A und EBNA3C bereits als Homodimere vorliegen. Diese werden vermutlich bei Co-Expression des jeweils anderen Proteins nicht aufgelöst, um Heterodimere zu bilden. Zudem sind die molaren Verhältnisse und auch die Bindungsaffinitäten von EBNA3A, EBNA3C und CBF1 in der Zelle unbekannt. Daher war in den Promotor-Reporter-Gen-Studien möglicherweise keine Titration der Co-Repression zu beobachten, weil sich bereits EBNA3A-EBNA3C-Komplexe ausgebildet hatten und eines der Proteine im Überschuss vorlag.

Obwohl es möglich ist, dass EBNA3A und EBNA3C Multiprotein-Repressorkomplexe auf den Promotoren von Zielgenen ausbilden, konnte in transienten Promotor-Reporter-Gen-Studien kein kooperativer Effekt von EBNA3A und EBNA3C nachgewiesen werden. Die Existenz eines solchen Komplexes kann nur durch eine native Proteinaufreinigung untersucht werden.

5.2.3 Die Interaktion von EBNA3A und EBNA3C wird über deren N-Termini vermittelt und überlappt möglicherweise mit der CBF1-Bindestelle

5.2.3.1 Kartierung der EBNA3C- und CBF1-Bindestelle in EBNA3A

Da die Funktion der Interaktion von EBNA3A und EBNA3C in Promotor-Reporter-Gen-Studien nicht bestimmt werden konnte, sollte die endogene differentielle Genregulation durch einen EBNA3A-EBNA3C-Komplex in LCLs untersucht werden. Um rekombinante EBV-Genome herstellen zu können, die eine EBNA3A-Mutante exprimieren, die die Interaktion mit EBNA3C nicht mehr vermitteln kann, musste zunächst die minimale Binderegion von EBNA3C in EBNA3A identifiziert werden. Dazu wurden Co-Immünpräzipitationen mit verschiedenen EBNA3A-Proteinfragmenten durchgeführt und parallel die Interaktion mit CBF1 untersucht. Abbildung 5.1 fasst die Ergebnisse dieser Experimente zusammen und stellt sie den in der Literatur beschriebenen Daten zur EBNA3C- und CBF1-Bindestelle in EBNA3A gegenüber.

Das kleinste EBNA3A-Proteinfragment, das sowohl die Interaktion mit EBNA3C, als auch mit CBF1 ebenso stark, wie WT-EBNA3A vermittelte, umfasste die AS 1-222. Davon C-terminal gelegene Proteinfragmente konnten weder mit EBNA3C, noch mit CBF1 interagieren. Ein EBNA3A-Proteinfragment, dessen N-terminale 138 Aminosäuren deletiert waren, konnte jedoch noch immer effizient mit EBNA3C und CBF1 interagieren. Da ein Proteinfragment, das lediglich die ersten 138 Aminosäuren von EBNA3A umfasste, die Interaktion mit EBNA3C oder CBF1 nicht vermittelte, sind wahrscheinlich die AS 139-222 von EBNA3A essentiell sowohl für die Interaktion mit EBNA3C, als auch mit CBF1. Dennoch konnte CBF1 mit einem EBNA3A-Proteinfragment von AS 100-250 nur sehr schwach interagieren. Möglicherweise trägt ein Teil des Bereichs N-terminal der AS 138 von EBNA3A zur CBF1-Bindung bei, auch wenn er nicht isoliert mit CBF1 interagieren kann. Die Interaktion von EBNA3C mit EBNA3A AS 100-250 war jedoch nahezu ebenso effizient wie die Interaktion mit EBNA3A AS 1-222 (Abb. 5.1).

Die Interaktion von EBNA3C im N-Terminus von EBNA3A steht im Widerspruch zu der Beobachtung der Arbeitsgruppen Kieff und Vidal, die die Interaktion zweier C-terminaler Fragmente von EBNA3A und EBNA3C im Yeast Two-Hybrid Experiment zeigten (Calderwood et al., 2007). Diese Diskrepanz lässt sich möglicherweise mit dem unterschiedlichen experimentellen System erklären. Vielleicht erfolgt die Faltung dieser C-terminalen Fragmente in Hefe anders als in Säugetierzellen und führte zu einem falschen Ergebnis. Schließlich konnten die Autoren selbst diese Interaktion nicht in biochemischen Experimenten bestätigen.

Weiterhin wurde gezeigt, dass ein Proteinfragment von EBNA3A AS 1-222, in dem die AS 199, 200 und 202 durch Alanin ersetzt wurden, nicht mehr mit CBF1, wohl aber noch mit EBNA3C interagiert. In einem EBNA3A-Proteinfragment von AS 125-222, in dem die AS 199, 200 und 202 des in allen EBNA3-Proteinen konservierten Motivs ¹⁹⁸ATLGC²⁰² ausgetauscht worden waren, fand im Mammalian Two-Hybrid Experiment keine Interaktion

mit CBF1 mehr statt (Dalbies-Tran et al., 2001). Im Gesamtprotein führten diese Punktmutationen jedoch lediglich zu einer Verminderung der CBF1-Interaktion um ca. 50% (Dalbies-Tran et al., 2001; Maruo et al., 2005).

Um die Funktion der Interaktion von EBNA3A und EBNA3C zu untersuchen, war es jedoch notwendig, eine EBNA3A-Mutante herzustellen, die nicht mehr mit EBNA3C, aber dennoch mit CBF1 interagiert. Daher wurde ein Peptid-Array, der das gesamte EBNA3A-Protein in Form von 15mer Peptiden repräsentierte, mit ^{35}S -EBNA3C, bzw. ^{35}S -CBF1 als Sonden hybridisiert. Mit diesem Experiment können lineare Binde-Epitope identifiziert werden. Die Auswertung des EBNA3A-Peptid-Arrays zeigte für EBNA3C und CBF1 nahezu das gleiche Ergebnis, was eine ähnliche Bindestelle bestätigen würde. Dennoch lagen sehr viele Signale außerhalb der durch die Kartierung bestimmten Binderegion. Auch das häufige Auftreten von Arginin- und Lysinresten in Peptiden, die ein positives Signal ergeben hatten, ließ vermuten, dass EBNA3C und CBF1 in einem solchen Versuch möglicherweise unspezifisch an diese Aminosäuren binden. Das Auftreten starker Signale bei arginin- und lysinreichen Peptiden wurde in unserer Arbeitsgruppe auch für einen anderen Peptid-Array bei Inkubation mit CBF1 beobachtet. Dennoch konnte mit derselben CBF1-Sonde eine CBF1-Bindestelle identifiziert werden, die sich deutlich von Hintergrund abhob (Daten von Katharina Heinzelmann). Trotzdem lässt sich nicht ausschließen, dass EBNA3C und CBF1 über Arginin- und Lysinreste mit EBNA3A interagieren. Weiterhin zeigten die Peptide, die die AS 199, 200 und 202 enthielten, welche die Interaktion mit CBF1 vermitteln sollen, kein starkes Signal bei der Hybridisierung mit ^{35}S -CBF1. Daher bildet das konservierte Motiv $^{198}\text{ATLGC}^{202}$ wahrscheinlich kein lineares Epitop für die CBF1-Bindung und die Aminosäuren 199, 200 und 202 beeinflussen die Konformation der CBF1-Bindestelle.

Diese Untersuchungen haben gezeigt, dass EBNA3C und CBF1 nur eine Bindestelle in EBNA3A besitzen. Diese Bindestellen liegen im N-Terminus von EBNA3A und sind eng benachbart, überlappen möglicherweise sogar. Sie sind jedoch nicht identisch.

Die Position der in dieser Arbeit identifizierten CBF1-Bindestelle in EBNA3A (AS 1 bzw. 139-222) ist größtenteils in Übereinstimmung mit der Literatur. Dort wurde die Bindestelle auf die AS 1, bzw. 125 - 222, bzw. 234 von EBNA3A eingegrenzt (Bourillot et al., 1998; Cludts and Farrell, 1998; Dalbies-Tran et al., 2001; Zhao et al., 1996). Obwohl die Arbeitsgruppen von Farrell und Kieff zwei weitere CBF1-Bindestellen im Bereich der AS 1-138, bzw. 224-566 von EBNA3A beschrieben haben (Cludts and Farrell, 1998; Robertson et al., 1996), konnten diese in dieser Arbeit und auch von anderen Arbeitsgruppen nicht bestätigt werden (Bourillot et al., 1998; Dalbies-Tran et al., 2001) (Abb. 5.1). Die Tatsache, dass die Mutationen der AS 199, 200 und 202 nur in einem EBNA3A-Proteinfragment der AS 125-222 die Interaktion mit CBF1 vollständig verhindern, jedoch nicht im Gesamtprotein, spricht dennoch für eine zweite CBF1-Bindestelle in EBNA3A (Dalbies-Tran et al., 2001). Der EBNA3A-Peptid-Array hat bei der Hybridisierung mit ^{35}S -CBF1 gezeigt, dass das konservierte Motiv $^{198}\text{ATLGC}^{202}$, in dem diese Aminosäuren liegen, wahrscheinlich kein lineares Epitop für die CBF1-Bindung bildet.

Daher wird möglicherweise die dreidimensionale Konformation der CBF1-Bindestelle in dem Proteinfragment EBNA3A AS 125-222 durch die Einführung der Punktmutationen zerstört. Im Gesamtprotein bleibt die Struktur jedoch möglicherweise erhalten und die CBF1-Bindung wird nicht so stark beeinträchtigt. Dadurch ließe sich ohne die Annahme einer zweiten CBF1-Bindestelle erklären, warum die Einführung dieser Punktmutationen nur in einem Proteinfragment und nicht im Gesamtprotein zum Verlust der CBF1-Bindung führt.

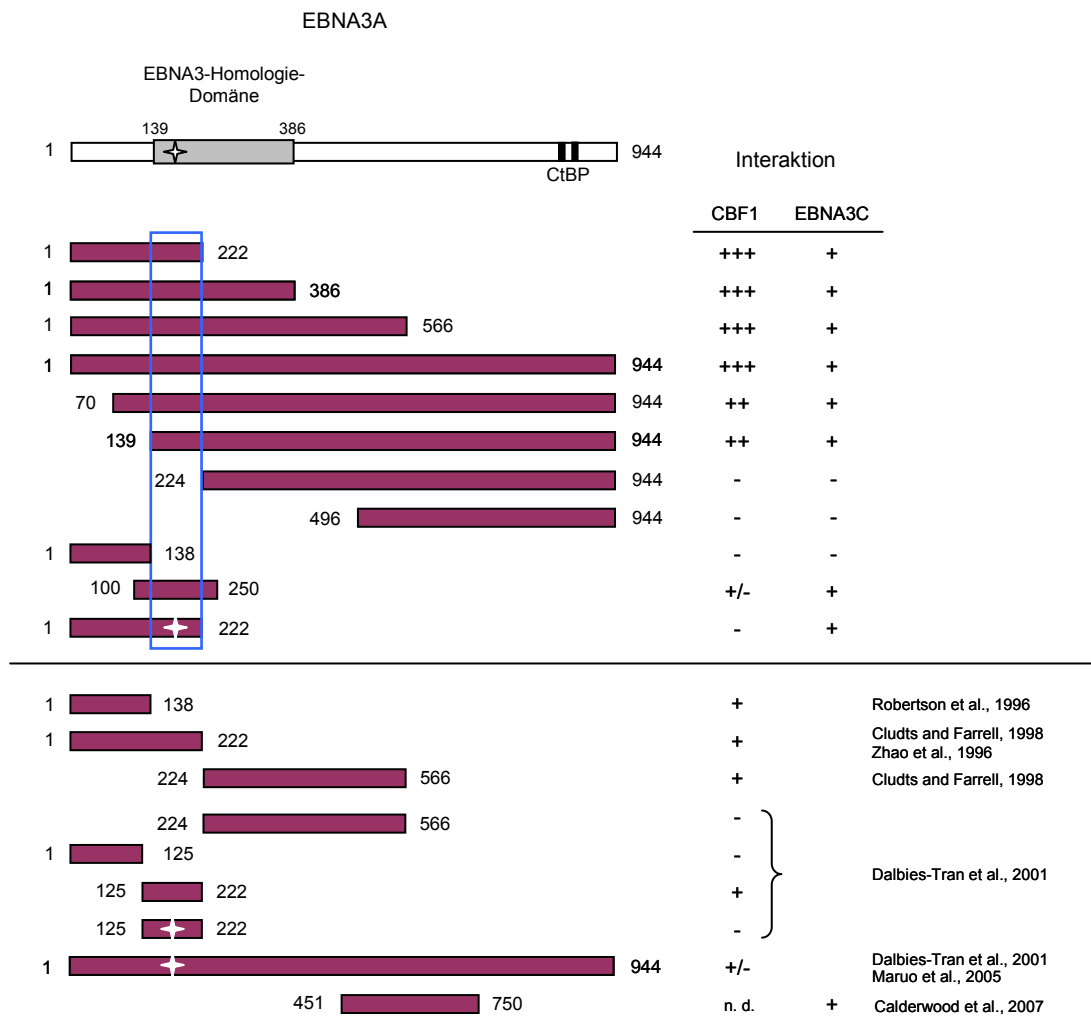


Abb. 5.1 Schematische Darstellung der EBNA3C- und CBF1-Bindestellen in EBNA3A

Die Abbildung fasst die Ergebnisse dieser Arbeit zur Identifikation der EBNA3C- und CBF1-Bindestellen in EBNA3A zusammen und stellt sie den Daten aus der Literatur gegenüber. + und - bewertet die Stärke der Interaktion semiquantitativ. +/- kennzeichnet eine sehr schwache Interaktion. Der weiße Stern bezeichnet die Position der AS 199, 200 und 202, deren Austausch zu Alanin in einem EBNA3A-Proteinfragment der AS 125-222 zum Verlust der CBF1-Bindung führten.

Die Kartierung hat gezeigt, dass sowohl EBNA3C, als auch CBF1 mit einer eng benachbarten, möglicherweise sich überlappenden Region im N-Terminus von EBNA3A interagieren. Auch wenn die Bindestellen in EBNA3A nicht identisch sind, ist es möglich, dass sich EBNA3C und CBF1 sterisch inhibieren. Dadurch könnte EBNA3C möglicherweise

die Fähigkeit von EBNA3A, an CBF1 zu binden und damit die Funktion von EBNA3A modulieren. Damit Repressorkomplexe aus EBNA3A und EBNA3C an Promotoren von Zielgenen binden, müssten sie durch ein anderes Adapterprotein an die DNA rekrutiert werden.

Im Weiteren soll die Funktion der EBNA3A-EBNA3C-Interaktion *in vivo* untersucht werden, wozu EBNA3A-Mutanten hergestellt werden müssen, die EBNA3C nicht mehr binden. Solche Mutanten wurden bereits hergestellt und deren Auswirkung auf die Immortalisierung untersucht. Die Transkomplementation mit einem EBNA3A-Protein, in dem die AS 170-240 deletiert waren und das daher die potentielle EBNA3C-Bindestelle nicht mehr enthielt, konnte die Immortalisierung von EBNA3A-negativen LCLs nicht aufrecht erhalten (Maruo et al., 2005). Da in diesem Fall jedoch auch die CBF1-Bindestelle deletiert war, ist dieser Effekt wohl auf die fehlende Interaktion mit CBF1 zurückzuführen. Für weitere Untersuchungen müssen daher EBNA3A-Mutanten hergestellt werden, in denen lediglich die EBNA3C-Bindung, nicht aber die CBF1-Bindung verhindert ist. Solche EBNA3A-Mutanten können durch die gezielte Einführung von Punktmutationen im Bereich der AS 139-222 von EBNA3A identifiziert werden.

5.2.3.2 Kartierung der EBNA3A-Bindestelle in EBNA3C

Da sich die EBNA3C-Bindestelle in der Homologie-Domäne von EBNA3A befand, war anzunehmen, dass auch die EBNA3A-Bindestelle in dieser Region von EBNA3C lag.

Abbildung 5.2 fasst die Ergebnisse der Kartierungen im Vergleich zur CBF1-Bindung und den Daten aus der Literatur zusammen. Die Kartierung zeigte, dass EBNA3A mit einem EBNA3C-Proteinfragment, das die ersten 300 Aminosäuren umfasste, ebenso stark, wie mit WT-EBNA3C interagiert. Wie auch schon bei der Kartierung der EBNA3C-Bindestelle in EBNA3A steht dies in Widerspruch zu den Beobachtungen der Arbeitsgruppen Vidal und Kieff, wo die Interaktion von C-terminalen Fragmenten von EBNA3A und EBNA3C in einem Yeast Two-Hybrid Screen gezeigt wurde (Calderwood et al., 2007).

Der Vergleich mit der Kartierung der CBF1-Bindestelle in EBNA3C zeigte, dass CBF1 auch mit dem Proteinfragment EBNA3C AS 1-300 interagiert. Dennoch war die Interaktion nicht so stark, wie mit WT-EBNA3C oder EBNA3C AS 1-409. Außerdem konnte eine schwache Interaktion mit dem Proteinfragment EBNA3C AS 335-667 nachgewiesen werden. Da sich die Proteinfragmente EBNA3C AS 1-300 und AS 335-667 nicht überlappen, deutet dies auf zwei CBF1-Bindestellen in EBNA3C hin. Tatsächlich wurde die Interaktion von CBF1 mit einem EBNA3C-Proteinfragment der AS 1-183 gezeigt (Robertson et al., 1996). Diese Interaktion konnte jedoch nicht durch andere Arbeitsgruppen bestätigt werden (Zhao et al., 1996) (Abb. 5.2). Es ist jedoch auch möglich, dass die CBF1-Bindestelle N-terminal von AS 300 beginnt und sich bis AS 409 erstreckt. Damit könnte erklärt werden, dass lediglich das Proteinfragment EBNA3C AS 1-409 die volle Kapazität hat, CBF1 zu binden, während EBNA3C AS 1-300 und AS 335-667 nur eine schwache CBF1-Bindung aufweisen. Dass der

Bereich N-terminal der AS 300 von EBNA3C für die CBF1-Bindung wichtig ist, konnte von der Arbeitsgruppe Sample gezeigt werden: nur ein EBNA3C-Proteinfragment der AS 1-240 konnte die Interaktion mit CBF1 vermitteln; die AS 1-183 waren nicht ausreichend (Zhao et al., 1996). Außerdem reduzierte der Austausch der AS 209-112 zu Alanin in dem in den EBNA3-Proteinen konservierten Motiv $^{208}\text{ATFGC}^{212}$ die CBF1-Bindung um 70% (West et al., 2004) und verhinderte die Repression der EBNA2-vermittelten Aktivierung eines CBF1-abhängigen Reporters (West et al., 2004; Zhao et al., 1996).

Diese Experimente haben gezeigt, dass sowohl die Interaktion von EBNA3A, als auch von CBF1 über den N-Terminus von EBNA3C vermittelt wird. Die exakte Bindestelle scheint sich jedoch zu unterscheiden, wobei CBF1 möglicherweise zwei Bindestellen in EBNA3C besitzt.

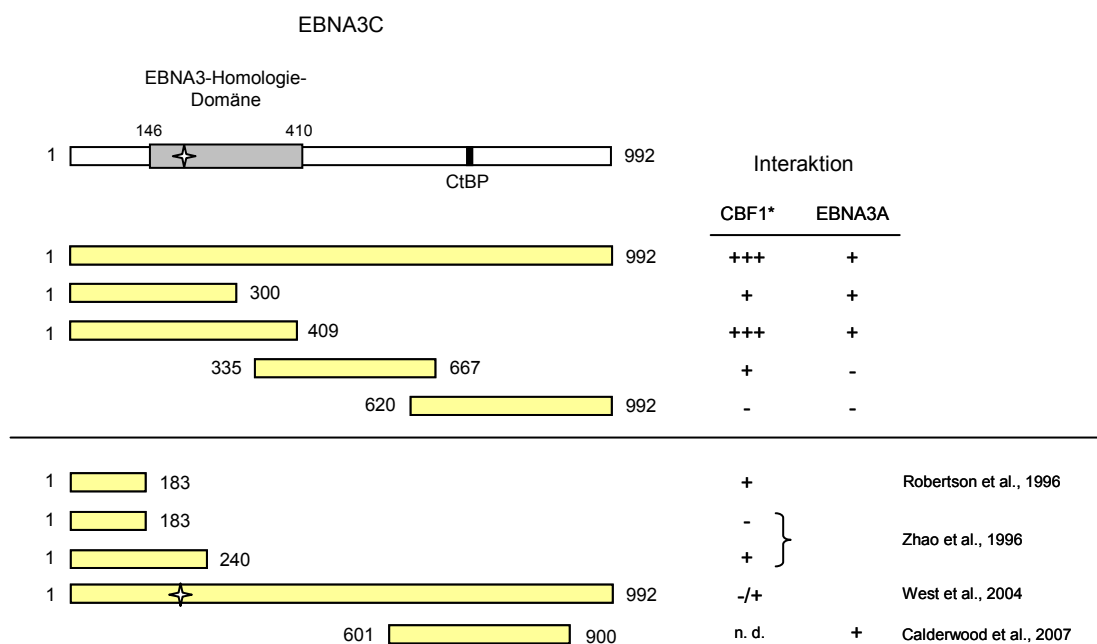


Abb. 5.2 Schematische Darstellung der EBNA3A- und CBF1-Bindestellen in EBNA3C

Die Abbildung fasst die Ergebnisse dieser Arbeit zur Identifikation der EBNA3A- und CBF1-Bindestellen in EBNA3C zusammen und stellt sie den Daten aus der Literatur gegenüber. + und - bewertet die Stärke der Interaktion semiquantitativ. +/- kennzeichnet eine sehr schwache Interaktion. * Die Kartierung der CBF1-Bindestelle wurde von Youlia Kostova durchgeführt. Der weiße Stern kennzeichnet die Position der AS 209-212, deren Austausch der zu Alanin die Interaktion mit CBF1 zu 70% verhinderte.

5.3 Ausblick

Diese Arbeit hat gezeigt, dass die Epstein-Barr Virus nukleären Antigene 3A und 3C in EBV-immortalisierten B-Zellen miteinander interagieren können. Diese Interaktion wird über die N-Termini der beiden Proteine vermittelt und interferiert möglicherweise mit der CBF1-Bindung von EBNA3A. Über DNA-Adapterproteine können EBNA3A und EBNA3C möglicherweise Multiprotein-Repressorkomplexe auf Zielgenen von Promotoren ausbilden und die Transkription von gemeinsamen Zielgenen kooperativ regulieren. Durch einen solchen Mechanismus kommt es möglicherweise zur Repression des Transkriptionsfaktors Foxo3a, wodurch das Auswachsen von LCLs ermöglicht wird. Es ist jedoch auch möglich, dass in Abwesenheit von EBNA3A oder EBNA3C selektiv nur die Zellen überleben, die Foxo3a exprimieren. Um diese beiden Möglichkeiten zu prüfen, muss das Expressionslevel von Foxo3a zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der EBV-Infektion untersucht werden. Alternativ kann die Expression von Foxo3a in für EBNA3A, bzw. EBNA3C konditionalen LCLs untersucht werden. Um die direkte transkriptionale Repression von Foxo3a durch EBNA3A und EBNA3C zu untersuchen und beide Proteine im Promotor von Foxo3a nachzuweisen, müssen Chromatin-Immunpräzipitationen durchgeführt werden. Neue potentielle Foxo3a-Zielgene können durch die vergleichende Genexpressionsanalyse zellulärer Zielgene der Foxo3a-Knockdown-LCLs im Vergleich zu Foxo3a-exprimierenden LCLs identifiziert werden. Die Genexpressionsanalyse gibt möglicherweise Aufschluss darüber, welcher Foxo3a-induzierte Faktor EBNA3A-negativen Foxo3a-exprimierenden LCLs einen Wachstumsvorteil vermittelt.

Durch die Herstellung von EBV-Mutanten, in denen die Interaktion von EBNA3A und EBNA3C nicht mehr stattfinden kann, wird es möglich sein, die Kooperation von EBNA3A und EBNA3C bei der endogenen Zielgenregulation weiter zu untersuchen. Dabei muss jedoch die Interaktion von EBNA3A mit CBF1 noch gewährleistet sein. Die mögliche Existenz eines Multiprotein-Repressorkomplexes kann durch eine native Proteinaufreinigung untersucht werden. Diese Studien werden weiteren Aufschluss über die Funktion von EBNA3A und EBNA3C geben.

6 Anhang

6.1 Abkürzungen

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
#	Anzahl
A	2'-Desoxyadenosin-5'-phosphat
Abb.	Abbildung
Ade	Adenin
AIDS	Acquired immune deficiency syndrome
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
APS	Aminoperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BL	Burkit Lymphom
bp	Basenpaar
C	2'-Desoxycytidin-5'-phosphat
CBF1	C-Promotor Bindungsfaktor 1
Cfu	Colony forming Units
cDNA	komplementäre DNA
cm	Zentimeter
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	2'-Desoxyribonukleinsäure
dNTP	3'-Desoxyribonukleotid-5'-phosphat
DO	selektive Aminosäurelösung
E3A	EBNA3A
E3B	EBNA3B
E3C	EBNA3C
EBER	Epstein-Barr Virus kodierte RNA
EBNA	Epstein-Barr Virus nukleäres Antigen
EBV	Epstein-Barr Virus
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N,N-tetra-acetat
G	2'-Desoxyguanosin-5'-phosphat
g	Erdbeschleunigung
GAL4-AD	Aktivierungsdomäne des Transkriptionsfaktors GAL4
GAL4-DBD	DNA-Bindedomäne des Transkriptionsfaktors GAL4
h	Stunde

HCl	Hydrogenchlorid
His	Histidin
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LB	Luria-Bertani
LCL	Lymphoblastoide Zelllinie (primäre mit EBV infizierte B-Zelle)
Leu	Leucin
LMP	latentes Membranprotein
M	Mol
mA	Milliampere
min	Minute
ml	Milliliter
mM	millimolar
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
Nt	Nukleotid
OD	optische Dichte
PEG	Polyethylenglycol
PBS	Phosphat gepufferte Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SD	Hefe-Selektivmedium
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacryamidgelelektrophorese
sec	Sekunden
T	2'-Desoxythymidin-5'-phosphat
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-acetat-EDTA
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N, N, N, N, Tetramethylethylendiamin
Tris base	Tris-(hydroxymethyl)-ammoniummethan
Trp	Tryptophan
U	Einheit der Enzymaktivität (Unit)
upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
YPDA	Adenin-supplementiertes Hefe-Vollmedium

6.2 Der EBNA3A-Peptid-Array

Die Liste zeigt die Sequenzen der 311 15mer-Peptide von EBNA3A, die im EBNA3A-Peptid-Array auf eine Cellulose-Membran aufgespottet wurden. Die Peptide sind um jeweils drei Aminosäuren verschoben. + bewertet semiquantitativ die Stärke des Signals nach Inkubation der Membran mit ³⁵S-EBNA3C.

1.	MDKDRPGPPALDDNM		
2.	DRPGPPALDDNMEEE		
3.	GPPALDDNMEEEVPS		
4.	ALDDNMEEEVPSV		
5.	DNMEEEVPSVQEQV		
6.	EEEVPSVQEQVVS		
7.	VPSTSVQEQVSAGD		
8.	TSVVQEQVSAGDWEN		
9.	VQEQVSAGDWENVLI		
10.	QVSAGDWENVLIELS		
11.	AGDWENVLIELSDSS		
12.	WENVLIELSDSSSEK		
13.	VLIELSDSSSEKEAE		
14.	ELSDSSSEKEAEDAH		
15.	DSSSEKEAEDAHLEP		
16.	SEKEAEDAHLEPAQK		
17.	EAEDAHLEPAQKGTK		
18.	DAHLEPAQKGTKRKR	+	
19.	LEPAQKGTKRKRVDH	++	
20.	AQKGTKRKRVDHDAG	+++	
21.	GTKRKRVDHDAGGSA	+++	
22.	RKRVDHDAGGSAPAR	+++	
23.	VDHDAGGSAPARPML		
24.	DAGGSAPARPMLPPQ		
25.	GSAPARPMLPPQPD		
26.	PARPMLPPQPDLPGR		
27.	PMLPPQPDLPGREAI		
28.	PPQPDLPGREAILRR		
29.	PDLPGREAILRRFPL		
30.	PGREAILRRFPLDLR	+++	
31.	EAILRRFPLDLRLL		
32.	LRRFPLDLRLLQAI	+	
33.	FPLDLRLLQAIGAA		
34.	DLRLLQAIGAAATR		
35.	TLRLLQAIGAAATRID		
36.	QAIGAAATRIDTRAI		
37.	GAAATRIDTRAIQF		
38.	ATRIDTRAIQFFGS		
39.	IDTRAIQFFGSQIS		
40.	RAIQFFGSQISNTE		
41.	DQFFGSQISNTEMYI		
42.	FGSQISNTEMYIMYA		
43.	QISNTEMYIMYAMAI		
44.	NTEMYIMYAMAIRQA		
45.	MYIMYAMAIRQAIRD		
46.	MYAMAIRQAIRDRI	++	
47.	MAIRQAIRDRIIRNP	++	
48.	RQAIRDRIIRNPASRR	+++	
49.	IRDRRIIRNPASRRDQ	+++	
50.	RRRIIRNPASRRDQAK	+++	
51.	NPASRRDQAKWRLQT	++	
52.	SRRDQAKWRLQTLAA	+++	
53.	DQAKWRLQTLAAGWP	+	
54.	KWRLQTLAAGWPMGY	++	
55.	LQTLAAGWPMGYQAY		
56.	LAAGWPMGYQAYSSW		
57.	GWPMGYQAYSSWMYS		
58.	MGYQAYSSWMYSYTD	+	
59.	QAYSSWMYSYTDHQ	+	
60.	SSWMYSYTDHQTPPT	+	
61.	MYSYTDHQTPPTFVH	+	
62.	YTDHQTPPTFVHLQA		
63.	HQTPPTFVHLQATLG		
64.	TPTFVHLQATLGCTG		
65.	FVHLQATLGCTGGRR		
66.	LQATLGCTGGRRCHV	+	
67.	TLGCTGGRRCHVTFS		+
68.	CTGGRRCHVTFSAGT		+
69.	GRRCHVTFSAGTFKL		++
70.	CHVTFSAGTFKLPRC		
71.	TFSAGTFKLPRCTPG		+
72.	AGTFKLPRCTPGDRQ		++
73.	FKLPRCTPGDRQWLY		++
74.	PRCTPGDRQWLYVQS		+
75.	TPGDRQWLYVQSSVG		
76.	DRQWLYVQSSVGNIV		
77.	WLYVQSSVGNIVQSC		
78.	VQSSVGNIVQSCNPR		
79.	SVGNIVQSCNPRYSI		
80.	NIVQSCNPRYSIFFD		
81.	QSCNPRYSIFFDYMA		
82.	NPRYSIFFDYMAIHR		+
83.	YSIFFDYMAIHRSLT		
84.	FFDYMAIHRSLTKIW		+
85.	YMAIHRSLTKIWEV		++
86.	IHRSLTKIWEVLTTP		++
87.	SLTKIWEVLTTPDQR		
88.	KIWEVLTTPDQRVSF		
89.	EEVLTTPDQRVSFMEF		
90.	LTPDQRVSFMEFLGF		
91.	DQRVSFMEFLGFLQR		
92.	VSFMEFLGFLQRTDL		
93.	MEFLGFLQRTDLSYI		
94.	LGFLQRTDLSYIKSF		
95.	LQRTDLSYIKSFVSD		
96.	TDLSYIKSFVSDALG		
97.	SYIKSFVSDALGTTS		
98.	KSFVSDALGTTSIQ		
99.	VSDALGTTSIQTPWI		
100.	ALGTTSIQTPWIDDN		
101.	TTSIQTPWIDNPNST		
102.	IQTPWIDNPNSTETA		
103.	PWIDNPNSTETAQAW		
104.	DDNPNSTETAQAWNAG		
105.	PSTETAQAWNAGFLR		
106.	ETAQAWNAGFLRGRA		+
107.	QAWNAGFLRGRAYGI		+++
108.	NAGFLRGRAYGIDLL		+++
109.	FLRGRAYGIDLLRTE		++
110.	GRAYGIDLLRTEGEH		+
111.	YGIDLLRTEGEHVEG		+
112.	DLRTEGEHVEGATG		
113.	RTEGEHVEGATGETR		
114.	GEHVEGATGETREES		
115.	VEGATGETREESD		
116.	ATGETREESDTESED		
117.	ETREESDTESDGDD		
118.	EESEDTESDGDDDEL		
119.	EDTESDGDDDELPCI		
120.	ESDGDDDELPCIVSR		
121.	GDDELPCIVSRGGP		
122.	EDLPCIVSRGGPKVK		
123.	PCIVSRGGPKVKRPP		++
124.	VSRGGPKVKRPPIFI		++
125.	GGPKVKRPPIFIRRL		++
126.	KVKRPPIFIRRLHRL		+++
127.	RPPIFIRRLHRLLLM		++
128.	IFIRRLHRLLLMRAG		+

129.	RRLHRLLLMRAGKRT	+++	207.	PPQLTQVSPQQPMEG	
130.	HRLLLLMRAGKRTEQG	+++	208.	LTQVSPQQPMEGPLV	
131.	LLMRAGKRTEQGKEV	++	209.	VSPQQPMEGPLVPEQ	
132.	RAGKRTEQGKEVLEK	++	210.	QQPMEGPLVPEQQMF	
133.	KRTEQGKEVLEKARG	++	211.	MEGPLVPEQQMFPGA	
134.	EQGKEVLEKARGSTY		212.	PLVPEQQMFPGAPFS	
135.	KEVLEKARGSTYGTP		213.	PEQQMFPGAPFSQVA	
136.	LEKARGSTYGTPRPP	+	214.	QMFPGAPFSQVADV	
137.	ARGSTYGTPRPPVVK	++	215.	PGAPFSQVADVVRAP	
138.	STYGTPRPPVVKPRP	+	216.	PFSQVADVVRAPGVP	
139.	GTPRPVVKPRPEVP	+	217.	QVADVVRAPGVPAMQ	
140.	RPPVVKPRPEVPQSD	+	218.	DVVRAPGVPAMQPQY	
141.	VPKPRPEVPQSDETA		219.	RAPGVPAMQPQYFDL	
142.	PRPEVPQSDDETATSH		220.	GVPAMQPQYFDLPLI	
143.	EVPQSDDETATSHGSA		221.	AMQPQYFDLPLIQPI	
144.	QSDDETATSHGSAQVP		222.	PQYFDLPLIQPISQG	
145.	ETATSHGSAQVPEPP		223.	FDLPLIQPISQGAPV	
146.	TSHGSAQVPEPPTIH		224.	PLIQPISQGAPVAPL	
147.	GSAQVPEPPTIHLAA		225.	QPISQGAPVAPLRAS	
148.	QVPEPPTIHLAAQGM		226.	SQGAPVAPLRASMG	
149.	EPTIHLAAQGMAYP		227.	APVAPLRASMGVPP	
150.	TIHLAAQGMAYPLHE		228.	APLRASMGVPPVPA	
151.	LAAQGMAYPLHEQHG		229.	RASMGVPPVPATQP	
152.	QGMAYPLHEQHGMAP		230.	MGPVPPVPATQPQYF	
153.	AYPLHEQHGMAPCPV		231.	VPPVPATQPQYFDIP	
154.	LHEQHGMAPCPVAQA		232.	VPATQPQYFDIPLTE	
155.	QHGMAPCPVAQAPPT		233.	TQPQYFDIPLTEPIN	+
156.	MAPCPVAQAPPTPLP		234.	QYFDIPLTEPINQGA	+
157.	CPVAQAPPTPLPPVS		235.	DIPLTEPINQGASAA	
158.	AQAPPTPLPPVSPGD		236.	LTEPINQGASAAHFL	
159.	PPTPLPPVSPGDQLP		237.	PINQGASAAHFLPQQ	
160.	PLPPVSPGDQLPGVF		238.	QGASAAHFLPQQPME	
161.	PVSPGDQLPGVFSVG		239.	SAAHFLPQQPMEG	
162.	PGDQLPGVFSVSDGRVA		240.	HFLPQQPMEGPLVPE	
163.	QLPGVFSVSDGRVACAP		241.	PQQPMEGPLVPEQWM	
164.	GVFSVSDGRVACAPVA		242.	PMEGPLVPEQWMFPG	
165.	SDGRVACAPVPAPAG		243.	GPLVPEQWMFPGAAL	
166.	RVACAPVPAPAGPIV		244.	VPEQWMFPGAALSQS	
167.	CAPVPAPAGPIVRPW		245.	QWMFPGAALSQSVRP	
168.	VPAPAGPIVRPWEP		246.	FPGAALSQSVRPGVA	
169.	PAGPIVRPWEP		247.	AALSQSVRPGVAQSQ	
170.	PIVRPWEP		248.	SQSVRPGVAQSQYFD	
171.	RPWEP		249.	VRPGVAQSQYFDLPL	
172.	EP		250.	GVAQSQYFDLPLTQP	
173.	LTQAAGQAFAPVRPQ		251.	QSQYFDLPLTQPINH	+
174.	AAGQAFAPVRPQHMP		252.	YFDLPLTQPINHGAP	+
175.	QAFAPVRPQHMPVEP		253.	LPLTQPINHGAPAAH	
176.	APVRPQHMPVEPVPV		254.	TQPINHGAPAAHFLH	
177.	RPQHMPVEPVPVPTV		255.	INHGAPAAHFLHQPP	
178.	HMPVEPVPVPTVALE		256.	GAPAAHFLHQPPMEG	
179.	VEPVPVPTVALERP		257.	AAHFLHQPPMEG	
180.	VPVPTVALERP		258.	FLHQPPMEG	
181.	PTVALERP		259.	QPPMEG	
182.	ALERP	+	260.	MEG	
183.	RPVYPK	+++	261.	PWVPEQ	
184.	YPK	+++	262.	PEQ	
185.	PVRPAPPKIAMQGP	+	263.	WMFQ	
186.	PAPPKIAMQGPGETS		264.	QGAPP	
187.	PKIAMQGPGETSGIR		265.	PPSQ	
188.	AMQGPGETSGIRR		266.	QGT	
189.	GPGETSGIRR	+	267.	DVVQH	
190.	ETSGIRR	++	268.	QH	
191.	GIRR	++	269.	LDAL	
192.	RARR	++	270.	LG	
193.	ERWRP	++	271.	TLH	
194.	RPAP	+	272.	GLN	
195.	PWT		273.	HPG	
196.	PNP		274.	VP	
197.	PRSP	++	275.	SPAV	
198.	PSQ	+++	276.	VN	+
199.	MSV	+++	277.	YH	+
200.	RDR	+++	278.	SQA	
201.	LAR	++	279.	AF	
202.	LRAE		280.	LP	
203.	EAQ		281.	DE	
204.	VKQ		282.	ES	
205.	ASVE		283.	EG	
206.	EVQ		284.	DT	

285. EPCEALDLSIHGRPC
286. EALDLSIHGRPCPQA
287. DLSIHGRPCPQAPEW
288. IHGRPCPQAPEWPVQ
289. RPCPQAPEWPVQEEG
290. PQAPEWPVQEEGGQD
291. PEWPVQEEGGQDATE
292. PVQEEGGQDATEVLD
293. EEEGGQDATEVLDLSI
294. GQDATEVLDLSIHGR
295. ATEVLDLSIHGRPRP
296. VLDLSIHGRPRRPTP
297. LSIHGRPRRPTPEWP ++
298. HGRPRRPTPEWPVQG ++
299. PRRPTPEWPVQEGEG
300. RTPEWPVQEGGGQNV
301. EWPVQEGGGQNVTP
302. VQEGGGQNVTPETR
303. EGGQNVTPETRRVV
304. QNVTPETRRVVVSA
305. TGPETRRVVVSAVVH
306. ETRRVVVSAVVHMCQ
307. RVVVSAVVHMCQDDE
308. VSAVVHMCQDDEFPD
309. VVHMCQDDEFPDLQD
310. MCQDDEFPDLQDPPD
311. QDDEFPDLQDPPDEA

7 Literatur

- Allday, M.J., Crawford, D.H., and Thomas, J.A. (1993).** Epstein-Barr virus (EBV) nuclear antigen 6 induces expression of the EBV latent membrane protein and an activated phenotype in Raji cells. *J Gen Virol* 74 (Pt 3), 361-369.
- Allday, M.J., and Farrell, P.J. (1994).** Epstein-Barr virus nuclear antigen EBNA3C/6 expression maintains the level of latent membrane protein 1 in G1-arrested cells. *J Virol* 68, 3491-3498.
- Anderson, M.J., Viars, C.S., Czekay, S., Cavenee, W.K., and Arden, K.C. (1998).** Cloning and characterization of three human forkhead genes that comprise an FKHR-like gene subfamily. *Genomics* 47, 187-199.
- Anderton, E., Yee, J., Smith, P., Crook, T., White, R.E., and Allday, M.J. (2008).** Two Epstein-Barr virus (EBV) oncoproteins cooperate to repress expression of the proapoptotic tumour-suppressor Bim: clues to the pathogenesis of Burkitt's lymphoma. *Oncogene* 27, 421-433.
- Aoki, M., Jiang, H., and Vogt, P.K. (2004).** Proteasomal degradation of the FoxO1 transcriptional regulator in cells transformed by the P3k and Akt oncoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 13613-13617.
- Arden, K.C. (2006).** Multiple roles of FOXO transcription factors in mammalian cells point to multiple roles in cancer. *Exp Gerontol* 41, 709-717.
- Arden, K.C. (2007).** FoxOs in tumor suppression and stem cell maintenance. *Cell* 128, 235-237.
- Babcock, G.J., Hochberg, D., and Thorley-Lawson, A.D. (2000).** The expression pattern of Epstein-Barr virus latent genes in vivo is dependent upon the differentiation stage of the infected B cell. *Immunity* 13, 497-506.
- Bain, M., Watson, R.J., Farrell, P.J., and Allday, M.J. (1996).** Epstein-Barr virus nuclear antigen 3C is a powerful repressor of transcription when tethered to DNA. *J Virol* 70, 2481-2489.
- Bajaj, B.G., Murakami, M., Cai, Q., Verma, S.C., Lan, K., and Robertson, E.S. (2008).** Epstein-Barr virus nuclear antigen 3C interacts with and enhances the stability of the c-Myc oncoprotein. *J Virol* 82, 4082-4090.
- Bakker, W.J., Harris, I.S., and Mak, T.W. (2007).** FOXO3a is activated in response to hypoxic stress and inhibits HIF1-induced apoptosis via regulation of CITED2. *Mol Cell* 28, 941-953.
- Ben-Bassat, H., Goldblum, N., Mitrani, S., Goldblum, T., Yoffey, J.M., Cohen, M.M., Bentwich, Z., Ramot, B., Klein, E., and Klein, G. (1977).** Establishment in continuous culture of a new type of lymphocyte from a "Burkitt like" malignant lymphoma (line D.G.-75). *Int J Cancer* 19, 27-33.
- Biggs, W.H., 3rd, Cavenee, W.K., and Arden, K.C. (2001).** Identification and characterization of members of the FKHR (FOX O) subclass of winged-helix transcription factors in the mouse. *Mamm Genome* 12, 416-425.
- Biggs, W.H., 3rd, Meisenhelder, J., Hunter, T., Cavenee, W.K., and Arden, K.C. (1999).** Protein kinase B/Akt-mediated phosphorylation promotes nuclear exclusion of the winged helix transcription factor FKHR1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 7421-7426.
- Borggreffe, T., and Oswald, F. (2009).** The Notch signaling pathway: transcriptional regulation at Notch target genes. *Cell Mol Life Sci* 66, 1631-1646.
- Borza, C.M., and Hutt-Fletcher, L.M. (2002).** Alternate replication in B cells and epithelial cells switches tropism of Epstein-Barr virus. *Nat Med* 8, 594-599.

- Bouchard, C., Lee, S., Paulus-Hock, V., Loddenkemper, C., Eilers, M., and Schmitt, C.A. (2007).** FoxO transcription factors suppress Myc-driven lymphomagenesis via direct activation of Arf. *Genes Dev* 21, 2775-2787.
- Bourillot, P.Y., Waltzer, L., Sergeant, A., and Manet, E. (1998).** Transcriptional repression by the Epstein-Barr virus EBNA3A protein tethered to DNA does not require RBP-Jkappa. *J Gen Virol* 79 (Pt 2), 363-370.
- Brownawell, A.M., Kops, G.J., Macara, I.G., and Burgering, B.M. (2001).** Inhibition of nuclear import by protein kinase B (Akt) regulates the subcellular distribution and activity of the forkhead transcription factor AFX. *Mol Cell Biol* 21, 3534-3546.
- Brunet, A., Bonni, A., Zigmond, M.J., Lin, M.Z., Juo, P., Hu, L.S., Anderson, M.J., Arden, K.C., Blenis, J., and Greenberg, M.E. (1999).** Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* 96, 857-868.
- Brunet, A., Kanai, F., Stehn, J., Xu, J., Sarbassova, D., Frangioni, J.V., Dalal, S.N., DeCaprio, J.A., Greenberg, M.E., and Yaffe, M.B. (2002).** 14-3-3 transits to the nucleus and participates in dynamic nucleocytoplasmic transport. *J Cell Biol* 156, 817-828.
- Brunet, A., Park, J., Tran, H., Hu, L.S., Hemmings, B.A., and Greenberg, M.E. (2001).** Protein kinase SGK mediates survival signals by phosphorylating the forkhead transcription factor FKHL1 (FOXO3a). *Mol Cell Biol* 21, 952-965.
- Brunet, A., Sweeney, L.B., Sturgill, J.F., Chua, K.F., Greer, P.L., Lin, Y., Tran, H., Ross, S.E., Mostoslavsky, R., Cohen, H.Y., et al. (2004).** Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase. *Science* 303, 2011-2015.
- Calderwood, M.A., Venkatesan, K., Xing, L., Chase, M.R., Vazquez, A., Holthaus, A.M., Ewence, A.E., Li, N., Hirozane-Kishikawa, T., Hill, D.E., et al. (2007).** Epstein-Barr virus and virus human protein interaction maps. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 7606-7611.
- Cameron, J.E., Fewell, C., Yin, Q., McBride, J., Wang, X., Lin, Z., and Flemington, E.K. (2008).** Epstein-Barr virus growth/latency III program alters cellular microRNA expression. *Virology* 382, 257-266.
- Chen, A., Zhao, B., Kieff, E., Aster, J.C., and Wang, F. (2006a).** EBNA-3B- and EBNA-3C-regulated cellular genes in Epstein-Barr virus-immortalized lymphoblastoid cell lines. *J Virol* 80, 10139-10150.
- Chen, J., Yusuf, I., Andersen, H.M., and Fruman, D.A. (2006b).** FOXO transcription factors cooperate with delta EF1 to activate growth suppressive genes in B lymphocytes. *J Immunol* 176, 2711-2721.
- Chen, Y.R., Liu, M.T., Chang, Y.T., Wu, C.C., Hu, C.Y., and Chen, J.Y. (2008).** Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 represses DNA repair through the PI3K/Akt/FOXO3a pathway in human epithelial cells. *J Virol* 82, 8124-8137.
- Choudhuri, T., Verma, S.C., Lan, K., Murakami, M., and Robertson, E.S. (2007).** The ATM/ATR signaling effector Chk2 is targeted by Epstein-Barr virus nuclear antigen 3C to release the G2/M cell cycle block. *J Virol* 81, 6718-6730.
- Choudhuri, T., Verma, S.C., Lan, K., and Robertson, E.S. (2006).** Expression of alpha V integrin is modulated by Epstein-Barr virus nuclear antigen 3C and the metastasis suppressor Nm23-H1 through interaction with the GATA-1 and Sp1 transcription factors. *Virology* 351, 58-72.
- Chung, C.N., Hamaguchi, Y., Honjo, T., and Kawaichi, M. (1994).** Site-directed mutagenesis study on DNA binding regions of the mouse homologue of Suppressor of Hairless, RBP-J kappa. *Nucleic Acids Res* 22, 2938-2944.

- Clemens, M.J. (2006).** Epstein-Barr virus: inhibition of apoptosis as a mechanism of cell transformation. *Int J Biochem Cell Biol* 38, 164-169.
- Cludts, I., and Farrell, P.J. (1998).** Multiple functions within the Epstein-Barr virus EBNA-3A protein. *J Virol* 72, 1862-1869.
- Cotter, M.A., 2nd, and Robertson, E.S. (2000).** Modulation of histone acetyltransferase activity through interaction of Epstein-Barr nuclear antigen 3C with prothymosin alpha. *Mol Cell Biol* 20, 5722-5735.
- Crawford, D.H. (2001).** Biology and disease associations of Epstein-Barr virus. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 356, 461-473.
- Daitoku, H., Hatta, M., Matsuzaki, H., Aratani, S., Ohshima, T., Miyagishi, M., Nakajima, T., and Fukamizu, A. (2004).** Silent information regulator 2 potentiates Foxo1-mediated transcription through its deacetylase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 10042-10047.
- Dalbies-Tran, R., Stigger-Rosser, E., Dotson, T., and Sample, C.E. (2001).** Amino acids of Epstein-Barr virus nuclear antigen 3A essential for repression of Jkappa-mediated transcription and their evolutionary conservation. *J Virol* 75, 90-99.
- Datta, S.R., Brunet, A., and Greenberg, M.E. (1999).** Cellular survival: a play in three Akts. *Genes Dev* 13, 2905-2927.
- de Candia, P., Blekhman, R., Chabot, A.E., Oshlack, A., and Gilad, Y. (2008).** A combination of genomic approaches reveals the role of FOXO1a in regulating an oxidative stress response pathway. *PLoS ONE* 3, e1670.
- de la Rosa, A., Williams, R.L., and Steeg, P.S. (1995).** Nm23/nucleoside diphosphate kinase: toward a structural and biochemical understanding of its biological functions. *Bioessays* 17, 53-62.
- Dengler, H.S., Baracho, G.V., Omori, S.A., Bruckner, S., Arden, K.C., Castrillon, D.H., DePinho, R.A., and Rickert, R.C. (2008).** Distinct functions for the transcription factor Foxo1 at various stages of B cell differentiation. *Nat Immunol* 9, 1388-1398.
- Dijkers, P.F., Birkenkamp, K.U., Lam, E.W., Thomas, N.S., Lammers, J.W., Koenderman, L., and Coffey, P.J. (2002).** FKHR-L1 can act as a critical effector of cell death induced by cytokine withdrawal: protein kinase B-enhanced cell survival through maintenance of mitochondrial integrity. *J Cell Biol* 156, 531-542.
- Dijkers, P.F., Medema, R.H., Lammers, J.W., Koenderman, L., and Coffey, P.J. (2000).** Expression of the pro-apoptotic Bcl-2 family member Bim is regulated by the forkhead transcription factor FKHR-L1. *Curr Biol* 10, 1201-1204.
- Dillner, J., Kallin, B., Ehlin-Henriksson, B., Rymo, L., Henle, W., Henle, G., and Klein, G. (1986).** The Epstein-Barr virus determined nuclear antigen is composed of at least three different antigens. *Int J Cancer* 37, 195-200.
- Epstein, M., Achong, B., and Barr, Y. (1964).** Virus particles in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. *Lancet* 1, 702-703.
- Essers, M.A., Weijnen, S., de Vries-Smits, A.M., Saarloos, I., de Ruiter, N.D., Bos, J.L., and Burgering, B.M. (2004).** FOXO transcription factor activation by oxidative stress mediated by the small GTPase Ral and JNK. *Embo J* 23, 4802-4812.
- Flachsbart, F., Caliebe, A., Kleindorp, R., Blanche, H., von Eller-Eberstein, H., Nikolaus, S., Schreiber, S., and Nebel, A. (2009).** Association of FOXO3A variation with human longevity confirmed in German centenarians. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 2700-2705.

- Fukuoka, M., Daitoku, H., Hatta, M., Matsuzaki, H., Umemura, S., and Fukamizu, A. (2003).** Negative regulation of forkhead transcription factor AFX (Foxo4) by CBP-induced acetylation. *Int J Mol Med* 12, 503-508.
- Furukawa-Hibi, Y., Yoshida-Araki, K., Ohta, T., Ikeda, K., and Motoyama, N. (2002).** FOXO forkhead transcription factors induce G(2)-M checkpoint in response to oxidative stress. *J Biol Chem* 277, 26729-26732.
- Furuyama, T., Nakazawa, T., Nakano, I., and Mori, N. (2000).** Identification of the differential distribution patterns of mRNAs and consensus binding sequences for mouse DAF-16 homologues. *Biochem J* 349, 629-634.
- Gilley, J., Coffey, P.J., and Ham, J. (2003).** FOXO transcription factors directly activate bim gene expression and promote apoptosis in sympathetic neurons. *J Cell Biol* 162, 613-622.
- Graham, F.L., Smiley, J., Russell, W.C., and Nairn, R. (1977).** Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 36, 59-74.
- Guttilla, I.K., and White, B.A. (2009).** Coordinate regulation of FOXO1 by miR-27a, miR-96, and miR-182 in breast cancer cells. *J Biol Chem*.
- Hennessy, K., Wang, F., Bushman, E.W., and Kieff, E. (1986).** Definitive identification of a member of the Epstein-Barr virus nuclear protein 3 family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 5693-5697.
- Hertle, M.L., Popp, C., Petermann, S., Maier, S., Kremmer, E., Lang, R., Mages, J., and Kempkes, B. (2009).** Differential gene expression patterns of EBV infected EBNA-3A positive and negative human B lymphocytes. *PLoS Pathog* 5, e1000506.
- Hickabottom, M., Parker, G.A., Freemont, P., Crook, T., and Allday, M.J. (2002).** Two nonconsensus sites in the Epstein-Barr virus oncoprotein EBNA3A cooperate to bind the co-repressor carboxyl-terminal-binding protein (CtBP). *J Biol Chem* 277, 47197-47204.
- Hinman, R.M., Bushanam, J.N., Nichols, W.A., and Satterthwaite, A.B. (2007).** B cell receptor signaling down-regulates forkhead box transcription factor class O 1 mRNA expression via phosphatidylinositol 3-kinase and Bruton's tyrosine kinase. *J Immunol* 178, 740-747.
- Honda, Y., and Honda, S. (1999).** The daf-2 gene network for longevity regulates oxidative stress resistance and Mn-superoxide dismutase gene expression in *Caenorhabditis elegans*. *FASEB J* 13, 1385-1393.
- Hsieh, W.S., Lemas, M.V., and Ambinder, R.F. (1999).** The biology of Epstein-Barr virus in post-transplant lymphoproliferative disease. *Transpl Infect Dis* 1, 204-212.
- Hu, M.C., Lee, D.F., Xia, W., Golfman, L.S., Ou-Yang, F., Yang, J.Y., Zou, Y., Bao, S., Hanada, N., Saso, H., et al. (2004).** I κ B kinase promotes tumorigenesis through inhibition of forkhead FOXO3a. *Cell* 117, 225-237.
- Huang, H., Regan, K.M., Wang, F., Wang, D., Smith, D.I., van Deursen, J.M., and Tindall, D.J. (2005).** Skp2 inhibits FOXO1 in tumor suppression through ubiquitin-mediated degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 1649-1654.
- Hutt-Fletcher, L.M. (2007).** Epstein-Barr virus entry. *J Virol* 81, 7825-7832.
- Jacobs, F.M., van der Heide, L.P., Wijchers, P.J., Burbach, J.P., Hoekman, M.F., and Smidt, M.P. (2003).** FoxO6, a novel member of the FoxO class of transcription factors with distinct shuttling dynamics. *J Biol Chem* 278, 35959-35967.
- Jimenez-Ramirez, C., Brooks, A.J., Forshell, L.P., Yakimchuk, K., Zhao, B., Fulgham, T.Z., and Sample, C.E. (2006).** Epstein-Barr virus EBNA-3C is targeted to and regulates expression from the bidirectional LMP-1/2B promoter. *J Virol* 80, 11200-11208.

- Johannsen, E., Miller, C.L., Grossman, S.R., and Kieff, E. (1996).** EBNA-2 and EBNA-3C extensively and mutually exclusively associate with RBPJkappa in Epstein-Barr virus-transformed B lymphocytes. *J Virol* 70, 4179-4183.
- Kaestner, K.H., Knochel, W., and Martinez, D.E. (2000).** Unified nomenclature for the winged helix/forkhead transcription factors. *Genes Dev* 14, 142-146.
- Kallin, B., Dillner, J., Ernberg, I., Ehlin-Henriksson, B., Rosen, A., Henle, W., Henle, G., and Klein, G. (1986).** Four virally determined nuclear antigens are expressed in Epstein-Barr virus-transformed cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 1499-1503.
- Karetsou, Z., Sandaltzopoulos, R., Frangou-Lazaridis, M., Lai, C.Y., Tsolas, O., Becker, P.B., and Papamarcaki, T. (1998).** Prothymosin alpha modulates the interaction of histone H1 with chromatin. *Nucleic Acids Res* 26, 3111-3118.
- Kashuba, E., Kashuba, V., Pokrovskaja, K., Klein, G., and Szekely, L. (2000).** Epstein-Barr virus encoded nuclear protein EBNA-3 binds XAP-2, a protein associated with Hepatitis B virus X antigen. *Oncogene* 19, 1801-1806.
- Kashuba, E.V., Gradin, K., Isaguliants, M., Szekely, L., Poellinger, L., Klein, G., and Kazlauskas, A. (2006).** Regulation of transactivation function of the aryl hydrocarbon receptor by the Epstein-Barr virus-encoded EBNA-3 protein. *J Biol Chem* 281, 1215-1223.
- Kaul, R., Verma, S.C., Murakami, M., Lan, K., Choudhuri, T., and Robertson, E.S. (2006).** Epstein-Barr virus protein can upregulate cyclo-oxygenase-2 expression through association with the suppressor of metastasis Nm23-H1. *J Virol* 80, 1321-1331.
- Kempkes, B., Pich, D., Zeidler, R., Sugden, B., and Hammerschmidt, W. (1995).** Immortalization of human B lymphocytes by a plasmid containing 71 kilobase pairs of Epstein-Barr virus DNA. *J Virol* 69, 231-238.
- Kempkes, B.S., L. J.; Bornkamm, G. W.; Zimmer-Strobl, U. (2005).** EBNA-2 and Notch Signalling. In *Epstein-Barr Virus*, E.S. Robertson, ed., pp. 463-500.
- Kenyon, C. (2005).** The plasticity of aging: insights from long-lived mutants. *Cell* 120, 449-460.
- Kieff, E., and Rickinson, A.B. (2007).** Epstein-Barr Virus and its replication. In *Fields Virology*, P.M.H. D. M. Knipe, ed. (Philadelphia-New York, Lippincott Williams and Wilkins), pp. 2603-2654.
- Knight, J.S., Lan, K., Subramanian, C., and Robertson, E.S. (2003).** Epstein-Barr virus nuclear antigen 3C recruits histone deacetylase activity and associates with the corepressors mSin3A and NCoR in human B-cell lines. *J Virol* 77, 4261-4272.
- Knight, J.S., and Robertson, E.S. (2004).** Epstein-Barr virus nuclear antigen 3C regulates cyclin A/p27 complexes and enhances cyclin A-dependent kinase activity. *J Virol* 78, 1981-1991.
- Knight, J.S., Sharma, N., Kalman, D.E., and Robertson, E.S. (2004).** A cyclin-binding motif within the amino-terminal homology domain of EBNA3C binds cyclin A and modulates cyclin A-dependent kinase activity in Epstein-Barr virus-infected cells. *J Virol* 78, 12857-12867.
- Knight, J.S., Sharma, N., and Robertson, E.S. (2005a).** Epstein-Barr virus latent antigen 3C can mediate the degradation of the retinoblastoma protein through an SCF cellular ubiquitin ligase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 18562-18566.
- Knight, J.S., Sharma, N., and Robertson, E.S. (2005b).** SCFSkp2 complex targeted by Epstein-Barr virus essential nuclear antigen. *Mol Cell Biol* 25, 1749-1763.
- Kops, G.J., Dansen, T.B., Polderman, P.E., Saarloos, I., Wirtz, K.W., Coffey, P.J., Huang, T.T., Bos, J.L., Medema, R.H., and Burgering, B.M. (2002a).** Forkhead transcription factor FOXO3a protects quiescent cells from oxidative stress. *Nature* 419, 316-321.

- Kops, G.J., de Ruiter, N.D., De Vries-Smits, A.M., Powell, D.R., Bos, J.L., and Burgering, B.M. (1999).** Direct control of the Forkhead transcription factor AFX by protein kinase B. *Nature* 398, 630-634.
- Kops, G.J., Medema, R.H., Glassford, J., Essers, M.A., Dijkers, P.F., Coffey, P.J., Lam, E.W., and Burgering, B.M. (2002b).** Control of cell cycle exit and entry by protein kinase B-regulated forkhead transcription factors. *Mol Cell Biol* 22, 2025-2036.
- Krauer, K.G., Burgess, A., Buck, M., Flanagan, J., Sculley, T.B., and Gabrielli, B. (2004).** The EBNA-3 gene family proteins disrupt the G2/M checkpoint. *Oncogene* 23, 1342-1353.
- Krauer, K.G., Kienzle, N., Young, D.B., and Sculley, T.B. (1996).** Epstein-Barr nuclear antigen-3 and -4 interact with RBP-2N, a major isoform of RBP-J kappa in B lymphocytes. *Virology* 226, 346-353.
- Kudo, N., Matsumori, N., Taoka, H., Fujiwara, D., Schreiner, E.P., Wolff, B., Yoshida, M., and Horinouchi, S. (1999).** Leptomycin B inactivates CRM1/exportin 1 by covalent modification at a cysteine residue in the central conserved region. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 9112-9117.
- Kuppers, D.A., Lan, K., Knight, J.S., and Robertson, E.S. (2005).** Regulation of matrix metalloproteinase 9 expression by Epstein-Barr virus nuclear antigen 3C and the suppressor of metastasis Nm23-H1. *J Virol* 79, 9714-9724.
- Küppers, R. (2003).** B cells under influence: transformation of B cells by Epstein-Barr virus. *Nat Rev Immunol* 3, 801-812.
- Kurth, J., Spieker, T., Wustrow, J., Strickler, G.J., Hansmann, L.M., Rajewsky, K., and Kuppers, R. (2000).** EBV-infected B cells in infectious mononucleosis: viral strategies for spreading in the B cell compartment and establishing latency. *Immunity* 13, 485-495.
- Lam, N., and Sugden, B. (2003).** CD40 and its viral mimic, LMP1: similar means to different ends. *Cell Signal* 15, 9-16.
- Le Roux, A., Kerdiles, B., Walls, D., Dedieu, J.F., and Perricaudet, M. (1994).** The Epstein-Barr virus determined nuclear antigens EBNA-3A, -3B, and -3C repress EBNA-2-mediated transactivation of the viral terminal protein 1 gene promoter. *Virology* 205, 596-602.
- Lee, S.S., Kennedy, S., Tolonen, A.C., and Ruvkun, G. (2003).** DAF-16 target genes that control *C. elegans* life-span and metabolism. *Science* 300, 644-647.
- Lee, W., Hwang, Y.H., Lee, S.K., Subramanian, C., and Robertson, E.S. (2001).** An Epstein-Barr virus isolated from a lymphoblastoid cell line has a 16-kilobase-pair deletion which includes gp350 and the Epstein-Barr virus nuclear antigen 3A. *J Virol* 75, 8556-8568.
- Lehmann, O.J., Sowden, J.C., Carlsson, P., Jordan, T., and Bhattacharya, S.S. (2003).** Fox's in development and disease. *Trends Genet* 19, 339-344.
- Lehtinen, M.K., Yuan, Z., Boag, P.R., Yang, Y., Villen, J., Becker, E.B., DiBacco, S., de la Iglesia, N., Gygi, S., Blackwell, T.K., et al. (2006).** A conserved MST-FOXO signaling pathway mediates oxidative-stress responses and extends life span. *Cell* 125, 987-1001.
- Li, X., Rong, Y., Zhang, M., Wang, X.L., LeMaire, S.A., Coselli, J.S., Zhang, Y., and Shen, Y.H. (2009).** Up-regulation of thioredoxin interacting protein (Txnip) by p38 MAPK and FOXO1 contributes to the impaired thioredoxin activity and increased ROS in glucose-treated endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 381, 660-665.
- Liebermann, D.A., and Hoffman, B. (2008).** Gadd45 in stress signaling. *J Mol Signal* 3, 15.

- Lin, J., Johannsen, E., Robertson, E., and Kieff, E. (2002).** Epstein-Barr virus nuclear antigen 3C putative repression domain mediates coactivation of the LMP1 promoter with EBNA-2. *J Virol* 76, 232-242.
- Lindner, S.E., and Sugden, B. (2007).** The plasmid replicon of Epstein-Barr virus: mechanistic insights into efficient, licensed, extrachromosomal replication in human cells. *Plasmid* 58, 1-12.
- Liu, J.W., Chandra, D., Rudd, M.D., Butler, A.P., Pallotta, V., Brown, D., Coffer, P.J., and Tang, D.G. (2005).** Induction of prosurvival molecules by apoptotic stimuli: involvement of FOXO3a and ROS. *Oncogene* 24, 2020-2031.
- Maira, M., Martens, C., Batsche, E., Gauthier, Y., and Drouin, J. (2003).** Dimer-specific potentiation of NGFI-B (Nur77) transcriptional activity by the protein kinase A pathway and AF-1-dependent coactivator recruitment. *Mol Cell Biol* 23, 763-776.
- Marshall, D., and Sample, C. (1995).** Epstein-Barr virus nuclear antigen 3C is a transcriptional regulator. *J Virol* 69, 3624-3630.
- Martinez-Gac, L., Marques, M., Garcia, Z., Campanero, M.R., and Carrera, A.C. (2004).** Control of cyclin G2 mRNA expression by forkhead transcription factors: novel mechanism for cell cycle control by phosphoinositide 3-kinase and forkhead. *Mol Cell Biol* 24, 2181-2189.
- Maruo, S., Johannsen, E., Illanes, D., Cooper, A., and Kieff, E. (2003).** Epstein-Barr Virus nuclear protein EBNA3A is critical for maintaining lymphoblastoid cell line growth. *J Virol* 77, 10437-10447.
- Maruo, S., Johannsen, E., Illanes, D., Cooper, A., Zhao, B., and Kieff, E. (2005).** Epstein-Barr virus nuclear protein 3A domains essential for growth of lymphoblasts: transcriptional regulation through RBP-Jkappa/CBF1 is critical. *J Virol* 79, 10171-10179.
- Maruo, S., Wu, Y., Ishikawa, S., Kanda, T., Iwakiri, D., and Takada, K. (2006).** Epstein-Barr virus nuclear protein EBNA3C is required for cell cycle progression and growth maintenance of lymphoblastoid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 19500-19505.
- Maruo, S., Wu, Y., Ito, T., Kanda, T., Kieff, E.D., and Takada, K. (2009).** Epstein-Barr virus nuclear protein EBNA3C residues critical for maintaining lymphoblastoid cell growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 4419-4424.
- Matsuzaki, H., Daitoku, H., Hatta, M., Aoyama, H., Yoshimochi, K., and Fukamizu, A. (2005).** Acetylation of Foxo1 alters its DNA-binding ability and sensitivity to phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 11278-11283.
- Matsuzaki, H., Daitoku, H., Hatta, M., Tanaka, K., and Fukamizu, A. (2003).** Insulin-induced phosphorylation of FKHR (Foxo1) targets to proteasomal degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 11285-11290.
- McElwee, J.J., Schuster, E., Blanc, E., Thomas, J.H., and Gems, D. (2004).** Shared transcriptional signature in *Caenorhabditis elegans* Dauer larvae and long-lived *daf-2* mutants implicates detoxification system in longevity assurance. *J Biol Chem* 279, 44533-44543.
- Medema, R.H., Kops, G.J., Bos, J.L., and Burgering, B.M. (2000).** AFX-like Forkhead transcription factors mediate cell-cycle regulation by Ras and PKB through p27kip1. *Nature* 404, 782-787.
- Middeldorp, J.M., Brink, A.A., van den Brule, A.J., and Meijer, C.J. (2003).** Pathogenic roles for Epstein-Barr virus (EBV) gene products in EBV-associated proliferative disorders. *Crit Rev Oncol Hematol* 45, 1-36.
- Mitsui, A., Hamuro, J., Nakamura, H., Kondo, N., Hirabayashi, Y., Ishizaki-Koizumi, S., Hirakawa, T., Inoue, T., and Yodoi, J. (2002).** Overexpression of human thioredoxin in transgenic mice controls oxidative stress and life span. *Antioxid Redox Signal* 4, 693-696.

- Modur, V., Nagarajan, R., Evers, B.M., and Milbrandt, J. (2002).** FOXO proteins regulate tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand expression. Implications for PTEN mutation in prostate cancer. *J Biol Chem* 277, 47928-47937.
- Motta, M.C., Divecha, N., Lemieux, M., Kamel, C., Chen, D., Gu, W., Bultsma, Y., McBurney, M., and Guarente, L. (2004).** Mammalian SIRT1 represses forkhead transcription factors. *Cell* 116, 551-563.
- Mrazek, J., Kreutmayer, S.B., Grasser, F.A., Polacek, N., and Huttenhofer, A. (2007).** Subtractive hybridization identifies novel differentially expressed ncRNA species in EBV-infected human B cells. *Nucleic Acids Res* 35, e73.
- Muller, S., Hoegel, C., Pyrowolakis, G., and Jentsch, S. (2001).** SUMO, ubiquitin's mysterious cousin. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 202-210.
- Murphy, C.T., McCarroll, S.A., Bargmann, C.I., Fraser, A., Kamath, R.S., Ahringer, J., Li, H., and Kenyon, C. (2003).** Genes that act downstream of DAF-16 to influence the lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 424, 277-283.
- Nakamura, T., and Sakamoto, K. (2008).** Forkhead transcription factor FOXO subfamily is essential for reactive oxygen species-induced apoptosis. *Mol Cell Endocrinol* 281, 47-55.
- Nasrin, N., Ogg, S., Cahill, C.M., Biggs, W., Nui, S., Dore, J., Calvo, D., Shi, Y., Ruvkun, G., and Alexander-Bridges, M.C. (2000).** DAF-16 recruits the CREB-binding protein coactivator complex to the insulin-like growth factor binding protein 1 promoter in HepG2 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 10412-10417.
- Nemerow, G.R., McNaughton, M.E., and Cooper, N.R. (1985).** Binding of monoclonal antibody to the Epstein Barr virus (EBV)/CR2 receptor induces activation and differentiation of human B lymphocytes. *J Immunol* 135, 3068-3073.
- Nemoto, S., and Finkel, T. (2002).** Redox regulation of forkhead proteins through a p66shc-dependent signaling pathway. *Science* 295, 2450-2452.
- Nowak, K., Killmer, K., Gessner, C., and Lutz, W. (2007).** E2F-1 regulates expression of FOXO1 and FOXO3a. *Biochim Biophys Acta* 1769, 244-252.
- Oh, S.W., Mukhopadhyay, A., Svrzikapa, N., Jiang, F., Davis, R.J., and Tissenbaum, H.A. (2005).** JNK regulates lifespan in *Caenorhabditis elegans* by modulating nuclear translocation of forkhead transcription factor/DAF-16. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 4494-4499.
- Parker, G.A., Crook, T., Bain, M., Sara, E.A., Farrell, P.J., and Allday, M.J. (1996).** Epstein-Barr virus nuclear antigen (EBNA)3C is an immortalizing oncoprotein with similar properties to adenovirus E1A and papillomavirus E7. *Oncogene* 13, 2541-2549.
- Parker, G.A., Touitou, R., and Allday, M.J. (2000).** Epstein-Barr virus EBNA3C can disrupt multiple cell cycle checkpoints and induce nuclear division divorced from cytokinesis. *Oncogene* 19, 700-709.
- Paschos, K., Smith, P., Anderton, E., Middeldorp, J.M., White, R.E., and Allday, M.J. (2009).** Epstein-barr virus latency in B cells leads to epigenetic repression and CpG methylation of the tumour suppressor gene Bim. *PLoS Pathog* 5, e1000492.
- Petti, L., and Kieff, E. (1988).** A sixth Epstein-Barr virus nuclear protein (EBNA3B) is expressed in latently infected growth-transformed lymphocytes. *J Virol* 62, 2173-2178.
- Petti, L., Sample, J., Wang, F., and Kieff, E. (1988).** A fifth Epstein-Barr virus nuclear protein (EBNA3C) is expressed in latently infected growth-transformed lymphocytes. *J Virol* 62, 1330-1338.
- Plas, D.R., and Thompson, C.B. (2003).** Akt activation promotes degradation of tuberin and FOXO3a via the proteasome. *J Biol Chem* 278, 12361-12366.

- Popp, C. (2006).** Die Rolle der Epstein-Barr nukleären Antigene 3A und 3C in der B-Zellimmortalisierung. Dissertation.
- Radkov, S.A., Bain, M., Farrell, P.J., West, M., Rowe, M., and Allday, M.J. (1997).** Epstein-Barr virus EBNA3C represses Cp, the major promoter for EBNA expression, but has no effect on the promoter of the cell gene CD21. *J Virol* 71, 8552-8562.
- Radkov, S.A., Touitou, R., Brehm, A., Rowe, M., West, M., Kouzarides, T., and Allday, M.J. (1999).** Epstein-Barr virus nuclear antigen 3C interacts with histone deacetylase to repress transcription. *J Virol* 73, 5688-5697.
- Ramaswamy, S., Nakamura, N., Sansal, I., Bergeron, L., and Sellers, W.R. (2002).** A novel mechanism of gene regulation and tumor suppression by the transcription factor FKHR. *Cancer Cell* 2, 81-91.
- Real, P.J., Benito, A., Cuevas, J., Berciano, M.T., de Juan, A., Coffey, P., Gomez-Roman, J., Lafarga, M., Lopez-Vega, J.M., and Fernandez-Luna, J.L. (2005).** Blockade of epidermal growth factor receptors chemosensitizes breast cancer cells through up-regulation of Bnip3L. *Cancer Res* 65, 8151-8157.
- Rechsteiner, M.P., Bernasconi, M., Berger, C., and Nadal, D. (2008).** Role of latent membrane protein 2 isoforms in Epstein-Barr virus latency. *Trends Microbiol* 16, 520-527.
- Rena, G., Guo, S., Cichy, S.C., Unterman, T.G., and Cohen, P. (1999).** Phosphorylation of the transcription factor forkhead family member FKHR by protein kinase B. *J Biol Chem* 274, 17179-17183.
- Rena, G., Prescott, A.R., Guo, S., Cohen, P., and Unterman, T.G. (2001).** Roles of the forkhead in rhabdomyosarcoma (FKHR) phosphorylation sites in regulating 14-3-3 binding, transactivation and nuclear targeting. *Biochem J* 354, 605-612.
- Rena, G., Woods, Y.L., Prescott, A.R., Pegg, M., Unterman, T.G., Williams, M.R., and Cohen, P. (2002).** Two novel phosphorylation sites on FKHR that are critical for its nuclear exclusion. *Embo J* 21, 2263-2271.
- Rezk, S.A., and Weiss, L.M. (2007).** Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disorders. *Hum Pathol* 38, 1293-1304.
- Rickinson, A.B., and Kieff, E. (2007).** Epstein-Barr Virus. In *Fields Virology*, D.M. Knipe, and P.M. Howley, eds. (Philadelphia - New York, Lippincott-Williams and Raven), pp. 2656-2700.
- Robertson, E.S., Grossman, S., Johannsen, E., Miller, C., Lin, J., Tomkinson, B., and Kieff, E. (1995).** Epstein-Barr virus nuclear protein 3C modulates transcription through interaction with the sequence-specific DNA-binding protein J kappa. *J Virol* 69, 3108-3116.
- Robertson, E.S., Lin, J., and Kieff, E. (1996).** The amino-terminal domains of Epstein-Barr virus nuclear proteins 3A, 3B, and 3C interact with RBPJ(kappa). *J Virol* 70, 3068-3074.
- Rock, K.L., Gramm, C., Rothstein, L., Clark, K., Stein, R., Dick, L., Hwang, D., and Goldberg, A.L. (1994).** Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell* 78, 761-771.
- Rosendorff, A., Illanes, D., David, G., Lin, J., Kieff, E., and Johannsen, E. (2004).** EBNA3C coactivation with EBNA2 requires a SUMO homology domain. *J Virol* 78, 367-377.
- Saha, A., Murakami, M., Kumar, P., Bajaj, B., Sims, K., and Robertson, E.S. (2009).** Epstein-Barr virus nuclear antigen 3C augments Mdm2-mediated p53 ubiquitination and degradation by deubiquitinating Mdm2. *J Virol* 83, 4652-4669.

Schmidt, M., Fernandez de Mattos, S., van der Horst, A., Klompaker, R., Kops, G.J., Lam, E.W., Burgering, B.M., and Medema, R.H. (2002). Cell cycle inhibition by FoxO forkhead transcription factors involves downregulation of cyclin D. *Mol Cell Biol* 22, 7842-7852.

Segura, M.F., Hanniford, D., Menendez, S., Reavie, L., Zou, X., Alvarez-Diaz, S., Zakrzewski, J., Blochin, E., Rose, A., Bogunovic, D., et al. (2009). Aberrant miR-182 expression promotes melanoma metastasis by repressing FOXO3 and microphthalmia-associated transcription factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 1814-1819.

Seoane, J. (2004). p21(WAF1/CIP1) at the switch between the anti-oncogenic and oncogenic faces of TGFbeta. *Cancer Biol Ther* 3, 226-227.

Seoane, J., Le, H.V., Shen, L., Anderson, S.A., and Massague, J. (2004). Integration of Smad and forkhead pathways in the control of neuroepithelial and glioblastoma cell proliferation. *Cell* 117, 211-223.

Shore, A.M., White, P.C., Hui, R.C., Essafi, A., Lam, E.W., Rowe, M., and Brennan, P. (2006). Epstein-Barr virus represses the FoxO1 transcription factor through latent membrane protein 1 and latent membrane protein 2A. *J Virol* 80, 11191-11199.

Spear, P.G., and Longnecker, R. (2003). Herpesvirus entry: an update. *J Virol* 77, 10179-10185.

Stahl, M., Dijkers, P.F., Kops, G.J., Lens, S.M., Coffey, P.J., Burgering, B.M., and Medema, R.H. (2002). The forkhead transcription factor FoxO regulates transcription of p27Kip1 and Bim in response to IL-2. *J Immunol* 168, 5024-5031.

Subramanian, C., Cotter, M.A., 2nd, and Robertson, E.S. (2001). Epstein-Barr virus nuclear protein EBNA-3C interacts with the human metastatic suppressor Nm23-H1: a molecular link to cancer metastasis. *Nat Med* 7, 350-355.

Subramanian, C., Hasan, S., Rowe, M., Hottiger, M., Orre, R., and Robertson, E.S. (2002). Epstein-Barr virus nuclear antigen 3C and prothymosin alpha interact with the p300 transcriptional coactivator at the CH1 and CH3/HAT domains and cooperate in regulation of transcription and histone acetylation. *J Virol* 76, 4699-4708.

Subramanian, C., and Robertson, E.S. (2002). The metastatic suppressor Nm23-H1 interacts with EBNA3C at sequences located between the glutamine- and proline-rich domains and can cooperate in activation of transcription. *J Virol* 76, 8702-8709.

Sugden, B., and Mark, W. (1977). Clonal transformation of adult human leukocytes by Epstein-Barr virus. *J Virol* 23, 503-508.

Tang, T.T., Dowbenko, D., Jackson, A., Toney, L., Lewin, D.A., Dent, A.L., and Lasky, L.A. (2002). The forkhead transcription factor AFX activates apoptosis by induction of the BCL-6 transcriptional repressor. *J Biol Chem* 277, 14255-14265.

Thorley-Lawson, D.A. (2005). EBV Persistence and latent Infection in vivo. In Epstein-Barr Virus, E.S. Robertson, ed. (Pennsylvania, Caister Academic Press), pp. 309-337.

Toker, A., and Cantley, L.C. (1997). Signalling through the lipid products of phosphoinositide-3-OH kinase. *Nature* 387, 673-676.

Tomkinson, B., and Kieff, E. (1992). Use of second-site homologous recombination to demonstrate that Epstein-Barr virus nuclear protein 3B is not important for lymphocyte infection or growth transformation in vitro. *J Virol* 66, 2893-2903.

Tomkinson, B., Robertson, E., and Kieff, E. (1993). Epstein-Barr virus nuclear proteins EBNA-3A and EBNA-3C are essential for B-lymphocyte growth transformation. *J Virol* 67, 2014-2025.

- Tothova, Z., and Gilliland, D.G. (2007).** FoxO transcription factors and stem cell homeostasis: insights from the hematopoietic system. *Cell Stem Cell* 1, 140-152.
- Toutou, R., Hickabottom, M., Parker, G., Crook, T., and Allday, M.J. (2001).** Physical and functional interactions between the corepressor CtBP and the Epstein-Barr virus nuclear antigen EBNA3C. *J Virol* 75, 7749-7755.
- Tran, H., Brunet, A., Grenier, J.M., Datta, S.R., Fornace, A.J., Jr., DiStefano, P.S., Chiang, L.W., and Greenberg, M.E. (2002).** DNA repair pathway stimulated by the forkhead transcription factor FOXO3a through the Gadd45 protein. *Science* 296, 530-534.
- Tsai, K.L., Sun, Y.J., Huang, C.Y., Yang, J.Y., Hung, M.C., and Hsiao, C.D. (2007).** Crystal structure of the human FOXO3a-DBD/DNA complex suggests the effects of post-translational modification. *Nucleic Acids Res* 35, 6984-6994.
- Tun, T., Hamaguchi, Y., Matsunami, N., Furukawa, T., Honjo, T., and Kawaichi, M. (1994).** Recognition sequence of a highly conserved DNA binding protein RBP-J kappa. *Nucleic Acids Res* 22, 965-971.
- van der Horst, A., de Vries-Smits, A.M., Brenkman, A.B., van Triest, M.H., van den Broek, N., Colland, F., Maurice, M.M., and Burgering, B.M. (2006).** FOXO4 transcriptional activity is regulated by monoubiquitination and USP7/HAUSP. *Nat Cell Biol* 8, 1064-1073.
- van der Horst, A., Tertoolen, L.G., de Vries-Smits, L.M., Frye, R.A., Medema, R.H., and Burgering, B.M. (2004).** FOXO4 is acetylated upon peroxide stress and deacetylated by the longevity protein hSir2(SIRT1). *J Biol Chem* 279, 28873-28879.
- Vlahos, C.J., Matter, W.F., Hui, K.Y., and Brown, R.F. (1994).** A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *J Biol Chem* 269, 5241-5248.
- Wagner, H.J., Cheng, Y.C., Huls, M.H., Gee, A.P., Kuehnle, I., Krance, R.A., Brenner, M.K., Rooney, C.M., and Heslop, H.E. (2004).** Prompt versus preemptive intervention for EBV lymphoproliferative disease. *Blood* 103, 3979-3981.
- Waltzer, L., Perricaudet, M., Sergeant, A., and Manet, E. (1996).** Epstein-Barr virus EBNA3A and EBNA3C proteins both repress RBP-J kappa-EBNA2-activated transcription by inhibiting the binding of RBP-J kappa to DNA. *J Virol* 70, 5909-5915.
- Wang, F., Gregory, C., Sample, C., Rowe, M., Liebowitz, D., Murray, R., Rickinson, A., and Kieff, E. (1990).** Epstein-Barr virus latent membrane protein (LMP1) and nuclear proteins 2 and 3C are effectors of phenotypic changes in B lymphocytes: EBNA-2 and LMP1 cooperatively induce CD23. *J Virol* 64, 2309-2318.
- Weidinger, C., Krause, K., Klagge, A., Karger, S., and Fuhrer, D. (2008).** Forkhead box-O transcription factor: critical conductors of cancer's fate. *Endocr Relat Cancer* 15, 917-929.
- Weigel, D., Jurgens, G., Kuttner, F., Seifert, E., and Jackle, H. (1989).** The homeotic gene fork head encodes a nuclear protein and is expressed in the terminal regions of the Drosophila embryo. *Cell* 57, 645-658.
- West, M.J., Webb, H.M., Sinclair, A.J., and Woolfson, D.N. (2004).** Biophysical and mutational analysis of the putative bZIP domain of Epstein-Barr virus EBNA 3C. *J Virol* 78, 9431-9445.
- Willcox, B.J., Donlon, T.A., He, Q., Chen, R., Grove, J.S., Yano, K., Masaki, K.H., Willcox, D.C., Rodriguez, B., and Curb, J.D. (2008).** FOXO3A genotype is strongly associated with human longevity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 13987-13992.
- Yang, J.Y., Xia, W., and Hu, M.C. (2006).** Ionizing radiation activates expression of FOXO3a, Fas ligand, and Bim, and induces cell apoptosis. *Int J Oncol* 29, 643-648.

- Young, L.S., and Rickinson, A.B. (2004).** Epstein-Barr virus: 40 years on. *Nat Rev Cancer* 4, 757-768.
- Young, P., Anderton, E., Paschos, K., White, R., and Allday, M.J. (2008).** Epstein-Barr virus nuclear antigen (EBNA) 3A induces the expression of and interacts with a subset of chaperones and co-chaperones. *J Gen Virol* 89, 866-877.
- Yusuf, I., Kharas, M.G., Chen, J., Peralta, R.Q., Maruniak, A., Sareen, P., Yang, V.W., Kaestner, K.H., and Fruman, D.A. (2008).** KLF4 is a FOXO target gene that suppresses B cell proliferation. *Int Immunol* 20, 671-681.
- Yusuf, I., Zhu, X., Kharas, M.G., Chen, J., and Fruman, D.A. (2004).** Optimal B-cell proliferation requires phosphoinositide 3-kinase-dependent inactivation of FOXO transcription factors. *Blood* 104, 784-787.
- Zhao, B., Marshall, D.R., and Sample, C.E. (1996).** A conserved domain of the Epstein-Barr virus nuclear antigens 3A and 3C binds to a discrete domain of Jkappa. *J Virol* 70, 4228-4236.
- Zhao, B., and Sample, C.E. (2000).** Epstein-barr virus nuclear antigen 3C activates the latent membrane protein 1 promoter in the presence of Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 through sequences encompassing an spi-1/Spi-B binding site. *J Virol* 74, 5151-5160.
- Zheng, W.H., Kar, S., and Quirion, R. (2000).** Insulin-like growth factor-1-induced phosphorylation of the forkhead family transcription factor FKHRL1 is mediated by Akt kinase in PC12 cells. *J Biol Chem* 275, 39152-39158.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Mein besonderer Dank gilt:

Dr. Bettina Kempkes für das Überlassen des Themas, die hervorragende wissenschaftliche Betreuung und ständige Diskussionsbereitschaft

Dr. Ronald Frank vom Helmholtz Centre for Infection Research in Braunschweig für die EBNA3A-Peptidarrays

Meinen Laborkolleginnen Marie Hertle, Katharina Heinzelmann, Barbara Scholz, Agnes Nowak, Kathrin Griß und Sylvia Fichte, meinen Ex-Kolleginnen Dr. Andrea Hartmann, Dr. Claudia Popp, Katharina Freiin von Roman, Youlia Kostova und Iris Peröbner und meinen Praktikantinnen Anna Sauer und Christine Rümenapp für die freundschaftliche und lustige Atmosphäre im Labor und die uneingeschränkte Hilfe bei allen Problemen. Nicht zu vergessen sind die Wandertage, Wiesn-Ausflüge, Cocktail-Trinken, Turbo-Hasenmobil-Fahren...

Marion Reinhardt und Gabriele Weintz für ihr immer offenes Ohr und die Sicht von Außen

Meinen Eltern, die immer für mich da sind

Meinem Freund Christoph, der mich durch diese Zeit getragen hat. Danke Spatzl!

Ehrenwörtliche Versicherung

Ich versichere hiermit ehrenwörtlich, dass die Dissertation von mir selbstständig und ohne unerlaubte Beihilfe angefertigt worden ist.

München, 8. Dezember 2009

Sabine Petermann

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Sabine Petermann
Geburtsdatum	22. November 1980
Geburtsort	Leipzig
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch

Schulischer Bildungsweg

1987 – 1991	Grundschule, Leipzig
1991 – 2000	Ludwigsgymnasium, München
2000	Abitur

Wissenschaftlicher Werdegang

2000 - 2005	Studium der Biologie an der Ludwig-Maximilians-Universität
März 2005 – Dezember 2005	Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe von PD Dr. Bettina Kempkes im Institut für Klinische Molekularbiologie und Tumorgenetik, Helmholtz Zentrum München; Thema: „Durchführung eines Yeast Two-Hybrid Screens zur Identifizierung neuer Interaktionspartner des Epstein-Barr Virus nukleären Antigens 3A“
Dezember 2005	Abschluß des Studiums: Diplom-Biologin
Februar 2006 – Juli 2009	Promotion in der Arbeitsgruppe von Dr. Bettina Kempkes im Institut für Klinische Molekularbiologie und Tumorgenetik, Helmholtz Zentrum München; Thema: „Funktionelle Charakterisierung der Epstein-Barr Virus nukleären Antigene 3A und 3C (EBNA3A und EBNA3C)“

Publikation

Hertle, M.L., Popp, C., Petermann, S., Maier, S., Kremmer, E., Lang, R., Mages, J., and Kempkes, B. (2009). Differential gene expression patterns of EBV infected EBNA-3A positive and negative human B lymphocytes. PLoS Pathog 5, e1000506.