

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades

der Fakultät für Biologie

der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Das Latente Membranprotein 2A des Epstein-Barr Virus
und der humane B-Zell-Rezeptor
- Ein Vergleich -**



Von

Stephanie Medele

München, 31. Mai 2010

Erstgutachter: Prof. Dr. Dirk Eick

Zweitgutachter: Prof. Dr. Charles N. David

Tag der mündlichen Prüfung: 22. Oktober 2010

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit mit dem Titel

„Das Latente Membranprotein 2A des Epstein-Barr Virus und der humane B-Zell-Rezeptor
- ein Vergleich -“

von mir selbständig und ohne unerlaubte Hilfsmittel angefertigt wurde und ich mich dabei nur der ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfsmittel bedient habe. Diese Arbeit wurde weder in der jetzigen noch in einer abgewandelten Form einem anderen Prüfungskomitee vorgelegt.

München, 31. Mai 2010

Stephanie Medele

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	6
1.1	Das Immunsystem – eine Übersicht	6
1.1.1	Angeborene und adaptive Immunität	6
1.1.2	Lymphozyten – die Vermittler der adaptiven Immunität	7
1.2	B-Zellen und ihr B-Zell-Rezeptor	8
1.2.1	Der B-Zell-Rezeptor	8
1.2.2	B-Zell-Reifung – von der Stammzelle zur Effektorzelle	9
1.2.2.1	B-Zell-Entwicklung	9
1.2.2.2	Die Effektorfunktionen reifer B-Zellen	12
1.2.3	Signaltransduktion durch den B-Zell-Rezeptor	14
1.2.3.1	Rezeptorproximale Aktivierung von Tyrosinkinase – das ITAM Motiv	15
1.2.3.2	Die wichtigsten Signalwege des B-Zell-Rezeptors	16
1.2.3.2.1	PI3K / AKT	16
1.2.3.2.2	PLC γ 2 / Calcium	18
1.2.3.2.3	MAPK / ERK	19
1.2.3.2.4	NF κ B	21
1.2.3.3	Tonische Signale vs. Ligand-induzierte Signale – Die Folge der Mobilität von B-Zell-Rezeptoren in der Zytoplasmamembran	23
1.3	Das Epstein-Barr Virus	26
1.3.1	Allgemeines	26
1.3.2	Der Infektionsweg des Epstein-Barr Virus	27
1.3.3	Das latente Membranprotein 2A - LMP2A	30
1.4	Motivation und Zielsetzung	32
2	Material	35
2.1	Antikörper	35
2.1.1	Antikörper für die Stimulierung von Zellen	35
2.1.2	Antikörper für durchflusszytometrische Analysen	35
2.1.3	Antikörper für Westernblotanalysen und Immunpräzipitation	36
2.2	Oligonukleotide	36
2.2.1	DNA-Oligonukleotide	36
2.2.2	siRNA-Oligonukleotide	37
2.3	maxiEBV Plasmide	38
2.4	Eukaryotische Zellen und Bakterien	38
2.4.1	Bakterien	38
2.4.2	Primäre B-Zellen	38
2.4.3	Zelllinien	39
2.5	Zellkulturmedien und Additive	40
2.5.1	Medien und Additive für eukaryotische Zellen	40
2.5.2	Medium und Additive für prokaryotische Zellen	41
2.6	Kommerzielle Kits	41
2.7	Stammlösungen und Puffer	41
2.7.1	Präparation von maxiEBV-Plasmid-DNA	41
2.7.2	Agarose-Gelelektrophorese	42
2.7.3	Durchflusszytometrie	42

2.7.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	42
2.7.5	Westernblotanalysen.....	43
2.7.6	Zelllyse und Immunpräzipitation.....	43
2.8	Chemikalien und Enzyme.....	43
2.9	Geräte und Sonstiges.....	44
3	Methoden.....	46
3.1	Arbeiten mit Bakterien.....	46
3.1.1	Lagerung und (Re-)Kultivierung von Bakterien.....	46
3.1.2	Präparation von maxiEBV-Plasmid-DNA aus <i>E.coli</i> Bakterien.....	46
3.2	Zellkultur.....	48
3.2.1	Kultivierung von Zellen.....	48
3.2.2	Lagerung von Zellen.....	49
3.2.3	Ernten von Hybridomzellüberstand.....	49
3.2.4	Präparation primärer humaner B-Zellen.....	49
3.2.5	Virusproduktion und Bestimmung von Virustitern.....	50
3.2.5.1	Transfektion von HEK293 Zellen mittels PEI.....	50
3.2.5.2	Etablierung stabil transfizierter, klonaler HEK293 Zelllinien.....	51
3.2.5.3	Induktion der Virusproduktion in HEK293-Zelllinien.....	51
3.2.5.4	Bestimmung von Virustitern.....	51
3.2.6	Etablierung klonaler lymphoblastoider Zelllinien.....	52
3.3	Durchflusszytometrische Methoden.....	53
3.3.1	Detektion von charakteristischen Oberflächenmolekülen.....	53
3.3.2	Phosphospezifische Durchflusszytometrie.....	53
3.3.3	Messung relativer Veränderungen der zytosolischen Ca ²⁺ -Konzentration.....	54
3.4	Protein-Arbeitstechniken.....	55
3.4.1	Zelllyse und Messung der Proteinkonzentration.....	55
3.4.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Westernblotanalyse.....	55
3.4.3	Immunpräzipitation.....	56
3.5	DNA/RNA-Arbeitstechniken.....	57
3.5.1	Extraktion zellulärer RNA.....	57
3.5.2	RNA-Analytik.....	57
3.5.3	Reverse Transkription von mRNA in cDNA.....	58
3.5.4	Semiquantitative Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR).....	59
3.5.5	Quantitative RT-PCR.....	59
3.6	Genexpressionsanalyse mittels Microarray.....	60
3.7	RNAi-Arbeitstechniken.....	61
3.7.1	Resuspendierung und Lagerung von Accell siRNA.....	61
3.7.2	Behandlung von Zellen mit Accell TM siRNA.....	62
3.7.3	Quantifizierung von RNAi-Effekten auf Proteinebene.....	62
4	Ergebnisse.....	63
4.1	Die Rolle von LMP2A bei der Transformation primärer B-Zellen <i>in vitro</i>	63
4.1.1	Herstellung LMP2A-positiver und -negativer EBV-Mutanten.....	64
4.1.2	B-Zell-Rezeptor-Expressionsniveaus variieren mit der Expression von LMP2A65.....	68
4.1.3	Schlussfolgerung der B-Zell-Rezeptor-Expressionsanalysen.....	68
4.2	Ersatz des konstitutiv aktiven Wildtyp LMP2A durch eine induzierbare Mutante.....	69
4.2.1	Das rekombinante maxiEBV Konstrukt 3696.....	69
4.2.2	Expression und Funktionalität des induzierbaren LMP2A:CD69.....	71

4.2.3	Auf einen Blick – lymphoblastoide Zelllinien, die in dieser Arbeit untersucht wurden	72
4.3	Vergleichende Analysen der Signaltransduktionswege von LMP2A und dem B-Zell-Rezeptor	74
4.3.1	Detektion von Phosphorylierungsereignissen auf Einzelzellebene mittels Durchflusszytometrie	75
4.3.2	Analyse des Einstroms von Ca ²⁺ -Ionen in das Zytosol	78
4.3.3	Untersuchung des NFκB Signalweges in lymphoblastoiden Zelllinien und primären humanen B-Zellen.....	81
4.3.4	Schlussfolgerung der Signaltransduktionsanalysen	85
4.4	Vergleich der Regulierung der Genexpression durch LMP2A und den B-Zell-Rezeptor	86
4.4.1	Optimierung der Versuchsparameter	86
4.4.2	Qualitativer und funktionaler Test der isolierten mRNA	88
4.4.3	Genomweite Genexpressionsanalyse mittels cDNA Microarray	90
4.4.4	Schlussfolgerung der Genexpressionsanalysen.....	94
4.5	Die Rolle von LMP2A bei der Induktion des lytischen Zyklus des Epstein-Barr Virus	94
4.5.1	Expression lytischer Gene in LMP2A-positiven und -negativen lymphoblastoiden Zelllinien vor und nach Aktivierung des B-Zell-Rezeptors..	95
4.5.2	Die Expression lytischer Gene ist eine direkte Folge der Expression von LMP2A.....	99
4.5.3	Schlussfolgerung aus den Analysen zur Induktion des lytischen Zyklus	103
5	Diskussion	104
5.1	Die Rolle von LMP2A bei der Transformation primärer B-Zellen in vitro.....	104
5.2	LMP2A imitiert und dominiert den BZR.....	105
5.3	Die Rolle von BZR und LMP2A bei der Aktivierung von NFκB-Transkriptionsfaktoren	107
5.4	Mögliche Funktionen von LMP2A und dem BZR <i>in vivo</i> - eine Hypothese	110
5.5	Die Rolle von LMP2A in Epithelzellen	114
5.6	Offene Fragen und Ausblick.....	116
6	Zusammenfassung	118
	Abkürzungsverzeichnis	120
	Literaturverzeichnis	123
	Anhang	130
	Danksagung	131

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem – eine Übersicht

1.1.1 Angeborene und adaptive Immunität

Wir verbringen unser Leben in Mitten einer enormen Vielfalt potenziell pathogener Mikroorganismen. Tagtäglich treten wir mit ihnen in Kontakt, durch Nahrungsaufnahme, Atmung und Berührungen. Dass wir dieser permanenten Gefahr nicht zum Opfer fallen, verdanken wir unserem Immunsystem. Es fungiert als Zusammenspiel verschiedener Abwehrmechanismen unseres Körpers. Eine Vielzahl spezialisierter Zelltypen kooperiert in zwei parallel vorhandenen, aber miteinander verknüpften Systemen: der angeborenen und der adaptiven Immunität. Beide Systeme basieren auf der Aktivität verschiedener weißer Blutzellen, den Leukozyten. Die angeborene Immunität wird hauptsächlich von Granulozyten und Makrophagen vermittelt. Sie stellt eine erste Verteidigungslinie gegen eindringende Pathogene am Ort der Infektion dar. Oberflächenrezeptoren auf den Zellen der angeborenen Immunität erkennen eine begrenzte Anzahl evolutionär konservierter Merkmale pathogener Mikroorganismen. Wird ein Eindringling detektiert, wird er von der Zelle aufgenommen und verdaut. Diese Art der Pathogenbekämpfung wirkt schnell und effektiv. Die enorme Vielfalt an Mikroorganismen, die sich kontinuierlich weiterentwickeln, um dem Immunsystem zu entfliehen, lässt die angeborene Immunität jedoch an ihre Grenzen stoßen. Um diese Einschränkung zu überwinden, haben Wirbeltiere ein adaptives Immunsystem entwickelt. Es gewährleistet die hoch spezifische Erkennung einer nahezu unendlich großen Vielfalt von Pathogenen, sowie den lang anhaltenden Schutz gegen wiederholte Infektionen mit dem gleichen Pathogen. Während die Eigenschaften der Oberflächenrezeptoren auf Zellen der angeborenen Immunität bereits in der Keimbahn festgelegt werden, haben die Zellen der adaptiven Immunität komplexe Mechanismen entwickelt, um ihre Rezeptoren hoch spezifisch an jedes beliebige Pathogen anzupassen. Die Schlüsselzellen der adaptiven Immunität sind die Lymphozyten, eine weitere Untergruppe der Leukozyten. Zusammen stellen angeborene und adaptive Immunität ein bemerkenswert effektives Abwehrsystem dar, das - so lange es voll funktionsfähig ist - dafür sorgt, dass wir nur relativ selten erkranken.

1.1.2 Lymphozyten – die Vermittler der adaptiven Immunität

Lymphozyten entwickeln sich in lymphatischen Organen, die in primäre und sekundäre lymphatische Organe unterteilt werden (JANEWAY et al. 2005). Die Reifung der beiden Hauptklassen von Lymphozyten findet in primären lymphatischen Organen statt, welche den entstehenden Zellen ihren Namen geben: B-Zellen reifen im Knochenmark (ursprünglich von lat. *Bursa fabricii*¹; auch passend zu engl.: bone marrow), T-Zellen reifen im Thymus. Reife B- und T-Zellen treten aus den primären lymphatischen Organen in die Blutbahn ein und gelangen so in sekundäre lymphatische Organe, wie z.B. die Milz und diverse Lymphknoten. Über das Lymphgefäßsystem erreichen die Zellen schließlich wieder in die Blutbahn, so dass sie kontinuierlich in einem Kreislauf durch den Körper patrouillieren.

Im Unterschied zu den Granulozyten und Makrophagen der angeborenen Immunität erkennt jeder Lymphozyt nur ein einziges Merkmal eines Pathogens: sein spezifisches Antigen. Als Antigen wird jede Substanz bezeichnet, die vom adaptiven Immunsystem als fremd eingestuft und erkannt wird. Die Diversität der Antigenerkennung durch das adaptive Immunsystem entsteht also nicht durch die Expression verschiedener Rezeptoren auf einer Zelle, sondern durch die Existenz Millionen verschiedener Lymphozyten, die jeweils eine spezifische Variante eines Antigenrezeptors (AgR) exprimieren. Entsprechend der Bezeichnung von B und T Lymphozyten, exprimieren B-Zellen einen B-Zell-Rezeptor (BZR) und T-Zellen einen T-Zell-Rezeptor (TZR).

Trifft ein Lymphozyt in einem sekundären lymphatischen Organ auf sein spezifisches Antigen, bindet dieses an den AgR und aktiviert den Lymphozyten. So wird der Lymphozyt veranlasst zu proliferieren und zu einer Effektorzelle zu differenzieren. Dieser Prozess der klonalen Selektion und Expansion ist das zentrale Prinzip der adaptiven Immunität. Es gewährleistet die Bereitstellung einer ausreichenden Anzahl von Effektor-Lymphozyten für die Bekämpfung einer Infektion. Die aktivierten Effektor-B- und -T-Zellen vermitteln zwei unterschiedliche Zweige der adaptiven Immunität: die humorale und die zelluläre Immunantwort. Effektor-B-Zellen sezernieren Antikörper, die über die Blutbahn (früher: lat. [h]umor: Körperflüssigkeiten) im Körper verteilt werden und Antigene zur Eliminierung

¹ Die *Bursa fabricii* ist ein lymphatisches Organ der Vögel. Hier findet die primäre Entwicklung von B-Lymphozyten statt, die zuerst in Vögeln entdeckt wurde. Das Bursa-äquivalente Organ des Menschen, in dem die B-Zell-Entwicklung stattfindet, ist das Knochenmark. Die englische Bezeichnung „bone marrow“ passt zufällig auch zu der Bezeichnung „B“-Lymphozyten.

markieren. Effektor-T-Zellen können infizierte Wirtszellen gezielt töten oder andere Zellen bei der Eliminierung von Pathogenen unterstützen. Im Verlauf einer adaptiven Immunantwort differenzieren einige aktivierte B- und T-Lymphozyten zu langlebigen Gedächtniszellen, die bereitstehen, um bei erneutem Kontakt mit demselben Antigen sofort eine hoch effektive Immunantwort einzuleiten.

1.2 B-Zellen und ihr B-Zell-Rezeptor

1.2.1 Der B-Zell-Rezeptor

Ein funktionierendes Immunsystem ist abhängig von Lymphozyten, die durch die Bindung von Antigenen aktiviert werden. In B-Zellen sind Immunglobuline (Ig) diejenigen Moleküle, die für die Antigenerkennung zuständig sind. Jede B-Zelle exprimiert Ig-Moleküle einer einzigen Antigen-spezifität. Membrangebundene Immunglobuline (mIg) sind der zentrale Bestandteil des B-Zell-Rezeptors (Abb. 1-1). Wird die B-Zelle durch Bindung von Antigenen aktiviert, differenziert sie zur Effektorzelle und sezerniert Immunglobuline derselben Spezifität, die Antikörper.

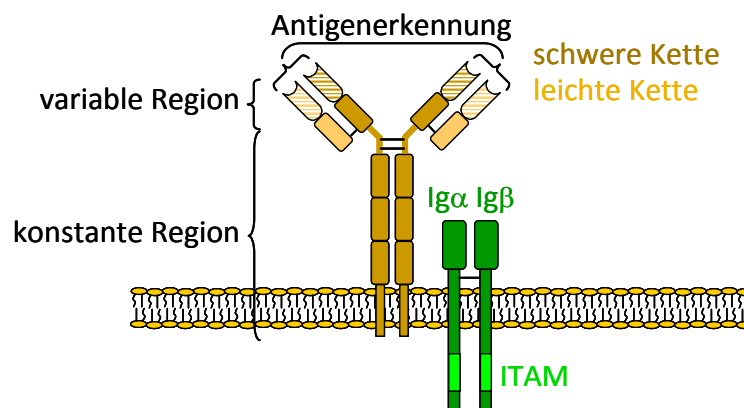


Abb. 1-1: Der B-Zell-Rezeptor.

Ein funktionaler B-Zell-Rezeptor (BZR) besteht aus einem membrangebundenen Immunglobulin (mIg; braun) und einem Heterodimer aus den Korezeptoren Ig α und Ig β (grün). Das mIg ist zusammengesetzt aus zwei schweren und zwei leichten Ketten, welche durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Die variable Region ist für die Antigenerkennung verantwortlich und variiert beträchtlich zwischen BZRen verschiedener B-Zellen. Die konstante Region vermittelt die Effektorfunktion von sezernierten Ig-Molekülen, den Antikörpern, die in fünf Hauptklassen vorkommen: IgM, IgG, IgA, IgD, IgE. Das mIg kann selbst kein Signal generieren und ist deshalb mit den Antigen-un-spezifischen Signalmolekülen Ig α und Ig β assoziiert. Ihre ITAM-Motive ermöglichen die Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden (siehe 1.2.3.1). Ig α und Ig β sind ebenfalls durch eine Disulfidbrücke miteinander verbunden. (ITAM: Immunrezeptor Tyrosin-basiertes Aktivierungs-Motiv)

Die Entwicklung, das Überleben und die Aktivierung von B Lymphozyten sind abhängig von Signalen, die der B-Zell-Rezeptor aussendet (KUROSAKI et al. 2010). Ein funktionaler BZR

besteht aus einem mlg-Molekül und einem nicht-kovalent assoziierten Heterodimer der beiden Korezeptoren $Ig\alpha$ und $Ig\beta$. Das mlg ist in diesem Komplex für die Antigenbindung verantwortlich, während $Ig\alpha/Ig\beta$ -Dimere die Signaltransduktion in die Zelle vermitteln. Die Bindung von Antigen bewirkt eine Veränderung des BZR-Komplexes, die letztlich zur Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden führt. Die wichtigste Rolle bei der Signalweiterleitung durch $Ig\alpha$ und $Ig\beta$ spielen die Immunrezeptor Tyrosin-basierten Aktivierungsmotive (ITAM) (RETH 1989), von welchen sich jeweils eines im zytoplasmatischen Teil von $Ig\alpha$ bzw. $Ig\beta$ befindet. Das ITAM ist ein evolutionär konserviertes Motiv, bestehend aus ca. 19 Aminosäuren mit der Konsensussequenz $D/ExxYxxL/Ix_{6-10}YxxL/I$, wobei x für eine beliebige Aminosäure steht. Die beiden Tyrosine (Y) werden nach Rezeptoraktivierung phosphoryliert und dienen als Bindestelle für spezialisierte Signalmediatoren (siehe 1.2.3.1).

1.2.2 B-Zell-Reifung – von der Stammzelle zur Effektorzelle

1.2.2.1 B-Zell-Entwicklung

Alle zellulären Bestandteile in unserem Blut stammen von denselben pluripotenten hämatopoietischen Stammzellen im Knochenmark ab. Im Zuge der B-Zell-Entwicklung differenzieren diese zunächst zu einer lymphoiden Vorläuferzelle, die ebenfalls Stammzeleigenschaften besitzt. Die ersten spezifischen Vorläuferzellen des B-Zell-Zweiges sind die Pro-B-Zellen (engl.: Progenitor = Vorläufer). Ab diesem Stadium ist das einzige Ziel der Zellen die Differenzierung zur reifen B-Zelle (Abb. 1-2) (JANEWAY et al. 2005).

Die einzelnen Stadien der B-Zell-Entwicklung sind definiert durch die sequentielle Umlagerung und Expression der Ig-Gene der schweren (Ig_H ; H: heavy) und leichten (Ig_L ; L: light) Ig-Kette (Abb. 1-1). Sie können grob in drei aufeinander folgende Schritte eingeteilt werden:

1. Keine Ig-Expression
2. Expression der schweren Ig-Kette (Ig_H)
3. Expression der schweren und leichten Ig-Ketten als funktionales mlg ($Ig_H + Ig_L$)

Die variablen Regionen von Ig_H bzw. Ig_L bestehen aus drei bzw. zwei Gensegmenten, von welchen jeweils eine Vielzahl unterschiedlicher Varianten im Genom vorhanden ist. Diese DNA-Segmente werden in mehreren Schritten somatischer Rekombination zu jeweils einem

intakten Ig_H - und Ig_L -Gen umgelagert. Wie diese Schritte kontrolliert werden und in welcher Reihenfolge sie aufeinander folgen hängt von der präzisen Anpassung der Expression diverser zellulärer Proteine und der gerichteten Interaktion mit unterschiedlichen Stromazellen in Nischen des Knochenmarks ab (NAGASAWA 2006).

In Pro-B-Zellen erfolgt die Umlagerung der Ig_H -Gensegmente. Statistisch betrachtet bringt nur jeder dritte Rekombinationsversuch zweier Gensegmente ein intaktes Gen mit offenem Leseraster, d.h. ohne Verschiebung des Leserasters hervor, sodass ein Großteil der Umlagerungsprodukte unbrauchbar ist. Sobald ein intaktes Ig_H -Gen entstanden ist, wird dieses zusammen mit zwei invarianten Surrogat-Ketten, $VpreB$ und $\lambda 5$, welche strukturelle Homologien zu den leichten Ig -Ketten aufweisen, als Prä-BZR exprimiert.

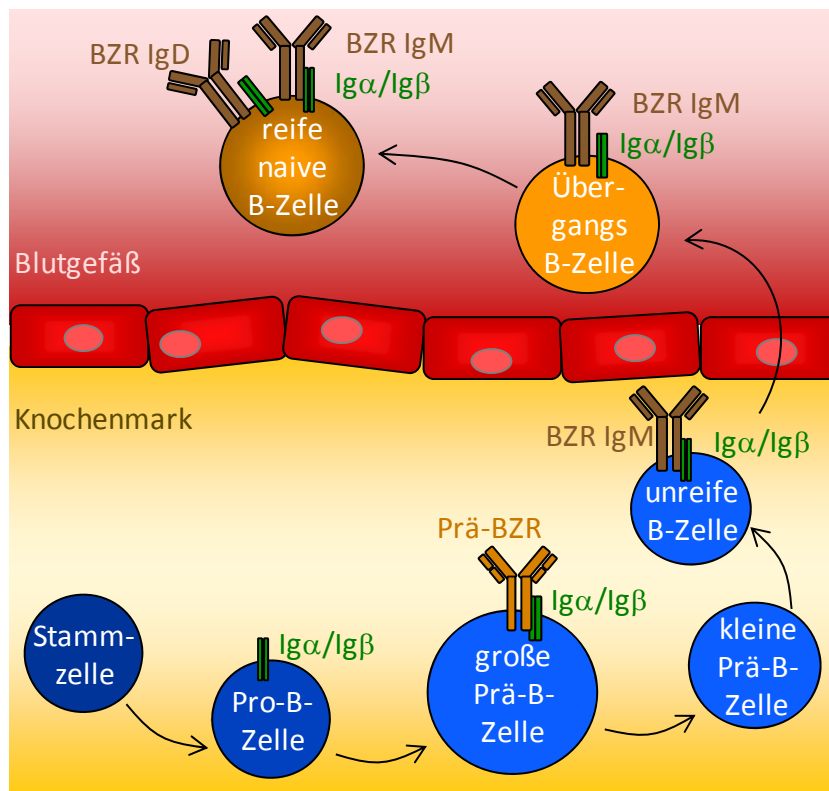


Abb. 1-2: B-Zell-Entwicklung.

B-Zellen reifen im Knochenmark und verlassen dieses erst, wenn sie einen funktionsfähigen, reifen B-Zell-Rezeptor (BZR) exprimieren. B-Zellen entstehen aus hämatopoietischen Stammzellen im Knochenmark. Im Pro-B-Zell-Stadium werden erstmalig $Ig\alpha$ und $Ig\beta$ exprimiert (Abb. 1-1). Große Prä-B-Zellen exprimieren einen Prä-B-Zell-Rezeptor Komplex, bestehend aus der schweren Ig -Kette, zwei leichten Surrogat-Ketten sowie $Ig\alpha$ und $Ig\beta$. Er induziert Proliferation, Allelausschluss der schweren Kette und weitere Differenzierungsschritte. Kleine Prä-B-Zellen arretieren in der G1-Phase des Zellzyklus und aktivieren den Genlocus der $Ig\kappa$ bzw. $Ig\lambda$ leichten Kette. Unreife B-Zellen exprimieren einen funktionsfähigen BZR (IgM), der den Allelausschluss der leichten Kette initiiert, und wandern aus dem Knochenmark in die Blutbahn ein. Übergangs-B-Zellen sind von der Expression eines BZRs abhängig und reifen in der Milz zu naiven, reifen B-Zellen heran, welche IgM und IgD koexprimieren. (Ig : Immunglobulin)

Große Prä-B-Zellen exprimieren einen funktionellen Prä-BZR-Komplex, bestehend aus dem Prä-BZR, $Ig\alpha$ und $Ig\beta$. Die Präsenz dieses Komplexes an der Zelloberfläche signalisiert der Zelle die erfolgreiche Rekombination des Ig_H -Lokus, woraufhin diese verschiedene Reaktionen einleitet.

1. Sie stoppt den Umlagerungsprozess der Ig_H -Gensegmente, so dass keine weitere schwere Kette aus dem Genlocus des zweiten Chromosoms hervorgehen kann (Allelausschluss).
2. Sie proliferiert, um die Anzahl von Prä-B-Zellen mit intakter Ig_H -Kette zu erhöhen.
3. Sie stellt die Expression der Surrogat-Ketten $VpreB$ und $\lambda 5$ ein, was letztlich das Prä-BZR Signal deaktiviert.

Kleine Prä-B-Zellen arretieren mangels Prä-BZR-Signal in der G_1 -Phase des Zellzyklus. Sie induzieren zunächst die Umlagerung des Ig_k -Lokus der leichten Kette. Entsteht dabei kein brauchbares Ig_L -Gen, wird der Vorgang im Ig_λ -Lokus der leichten Kette wiederholt. Nach erfolgreicher Umlagerung exprimiert die Zelle ein vollständiges Immunglobulin der Klasse IgM , welches wiederum den Allelausschluss des Ig_L -Gens des zweiten Chromosoms initialisiert.

Unreife B-Zellen verweilen für etwa drei Tage im Knochenmark, wo sie auf Selbsttoleranz selektioniert werden um sicherzustellen, dass sie keine körpereigenen Merkmale als Antigene erkennen. Während ein Antigen-unabhängiges, konstitutives Signal des intakten BZR-Komplexes für sie überlebenswichtig ist, führt ein induziertes Signal durch Bindung von Selbstantigen zur Verzögerung der weiteren B-Zell-Entwicklung. Kann durch eine Editierung des Rezeptors keine Selbsttoleranz erreicht werden, geht die Zelle durch Apoptose zu Grunde (EDRY and MELAMED 2004).

Übergangs-B-Zellen (engl.: transitional B-cells) wandern aus dem Knochenmark über die Blutbahn in die Milz. Um in der Peripherie zu bestehen, benötigen sie zusätzlich zu einem funktionalen BZR-Komplex einen weiteren Oberflächenrezeptor, den BAFF-Rezeptor (BAFF: engl. B-cell activating factor). Dieser versorgt die B-Zellen mit Signalen, welche für ihre vollständige Reifung essenziell sind. In der Milz differenzieren Übergangs-B-Zellen schließlich zu naiven, reifen B-Zellen.

Naive, reife B-Zellen koexprimieren mit IgM auch IgD als Spleißvariante des Ig-Primärtranskripts. Sie patrouillieren auf der Suche nach Antigen als reife B-Lymphozyten in Blut und Lymphe durch den Körper. Die meiste Zeit verbringen sie dabei in sekundären lymphatischen Organen, welche darauf spezialisiert sind, Antigene einzufangen (VON ANDRIAN and MEMPEL 2003; BATISTA and HARWOOD 2009).

1.2.2.2 Die Effektorfunktionen reifer B-Zellen

Die Aktivierung von B-Zellen erfolgt in sekundären lymphatischen Organen durch die Bindung eines spezifischen Antigens an den BZR. Das Antigen wird von der Zelle internalisiert, prozessiert und in Verbindung mit MHC Klasse II² Molekülen an der B-Zell-Oberfläche präsentiert (BRYANT and PLOEGH 2004). Durch die Antigenpräsentierung werden CD4⁺ T-Helfer-Zellen³ rekrutiert, die zusammen mit der BZR-Antigen-Interaktion B-Zellen zu Proliferation und Differenzierung stimulieren. Es ist mitunter die Stärke der Bindung zwischen BZR und Antigen, die darüber entscheidet, welchen Differenzierungsweg die aktivierte B-Zelle beschreitet (PAUS et al. 2006). BZRen mit hoher Affinität zum Antigen bewirken die Differenzierung zu extrafollikulären Plasmazellen, die für die schnelle Produktion von Antikörpern und eine frühe Immunantwort essenziell sind. B-Zellen mit weniger affinen BZRen, die ihr Antigen dennoch spezifisch erkennen, bilden durch starke Proliferation Keimzentren in den Follikeln sekundärer lymphatischer Organe. Während der Keimzentrumsreaktion (Abb. 1-3) werden Affinität und Effektorfunktion des Immunglobulins in Bezug auf das vorhandene Antigen optimiert. Aus einem Keimzentrum gehen zwei unterschiedliche Arten von B-Zellen hervor: Plasmazellen sezernieren große Mengen hoch affiner Antikörper und vermitteln so die humorale Immunantwort. Langlebige Gedächtnis-B-Zellen gewährleisten den dauerhaften Schutz vor erneuter Infektion mit demselben Antigen, da ihr Ig bereits optimiert ist und sie bei Bedarf sofort zu Antikörper-sezernierenden Plasmazellen differenzieren können.

² MHC: Haupthistokompatibilitäts-Komplex; engl.: **major histocompatibility complex**

³ CD: engl.: **Cluster of differentiation**; Bezeichnung für immun-phänotypische Oberflächenproteine

Die Keimzentrumsreaktion besteht im Wesentlichen aus drei Prozessen:

1. Klonale Expansion spezifischer B-Zellen
2. Somatische Hypermutation der variablen Regionen der Ig_H - und Ig_L -Genloci
3. Klassenwechselrekombination der konstanten Region des Ig_H -Genlokus

Die klonale Expansion dient der gezielten, akuten Vermehrung solcher B-Lymphozyten, die ein vorhandenes Antigen spezifisch erkennen. Sie ist die Grundvoraussetzung für eine effektive Immunantwort.

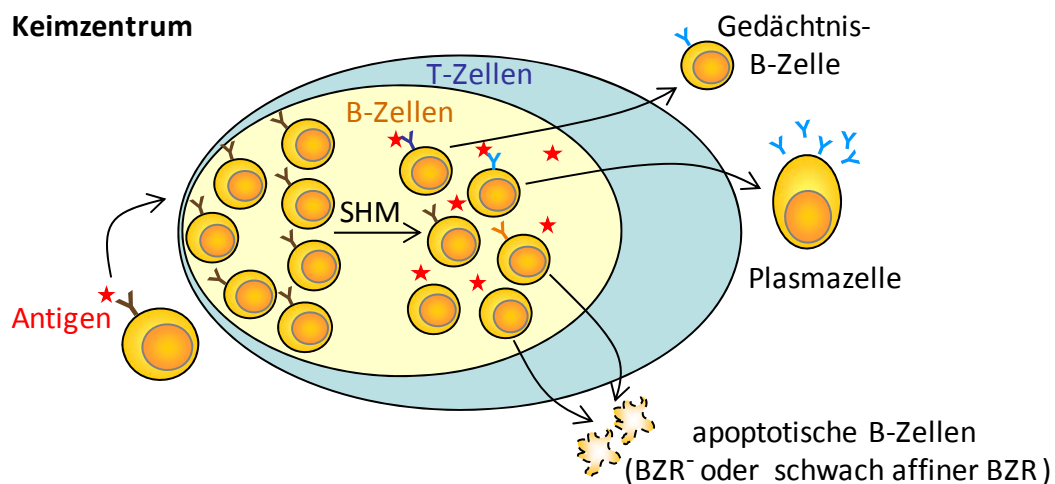


Abb. 1-3: Die Keimzentrumsreaktion.

Während der Keimzentrumsreaktion entscheidet die Stärke des BZR-Signals über das Überleben der B-Zellen. B-Zellen, die in sekundären lymphatischen Organen ein Antigen erkennen, durchlaufen eine Keimzentrumsreaktion. Klonale Expansion aktivierter B-Zellen führt zur Bildung von Keimzentren in den Foliikeln sekundärer lymphatischer Organe. In diesen findet die Affinitätsreifung des BZRs zur optimalen Erkennung des vorhandenen Antigens statt. Während der somatischen Hypermutation (SHM) werden deshalb zufällig Mutationen in variablen Regionen der Ig_H und Ig_L -Gene eingeführt, die sowohl vorteilhafte, als auch nachteilige Auswirkungen auf die Affinität und Expression des BZRs haben können. Aufgrund ihres veränderten Genexpressionsmusters sind Keimzentrums-B-Zellen pro-apoptotisch. B-Zellen, die aus der SHM mit schwach affinem BZR oder zerstörten Ig_H - und Ig_L -Genen hervorgehen, werden apoptotisch, wohingegen B-Zellen mit hochaffinem BZR Überlebenssignale erhalten, die sie vor der Apoptose schützen und die Differenzierung zu Plasma- oder Gedächtnis-B-Zellen ermöglichen. Während der Klassenwechselrekombination wird durch Umlagerung der Gensegmente der konstanten Regionen von Ig_H -Genen die Effektorfunktion sezernierter Antikörper an das vorhandene Antigen angepasst.

Während der somatischen Hypermutation (SHM) werden nach dem Zufallsprinzip Mutationen in die Gensegmente der variablen Regionen der Ig_H - und Ig_L -Ketten eingeführt. Diese Deletionen, Insertionen und Substitutionen einzelner oder mehrerer Nukleotide haben eine Veränderung der Affinität des BZRs zum Antigen zur Folge. Aus statistischen Gründen bedeutet das zufällige, willkürliche Einführen von Mutationen jedoch für den Großteil der

Zellen eine nachteilige Veränderung des BZR, da entweder die Affinität zum Antigen sinkt oder das Ig-Gen durch neu entstandene Stop-Codons oder Leserasterverschiebungen zerstört wird. Während naive B-Zellen durch einen nicht-proliferativen, anti-apoptotischen Phänotyp charakterisiert sind, ändern aktivierte Keimzentrums-B-Zellen ihr Genexpressionsmuster entsprechend einem proliferativen, pro-apoptotischen Phänotyp (KLEIN et al. 2003). Um dem programmierten Zelltod zu entkommen, benötigen sie deshalb u.a. die starken Signale eines hochaffinen, aktivierten BZR sowie die Hilfe von CD4⁺ T-Helfer-Zellen. B-Zellen, die keinen oder nur einen schwachaffinen BZR exprimieren, erhalten keine ausreichend starken Überlebenssignale und werden apoptotisch. B-Zellen mit einem hochaffinen BZR hingegen können weitere Runden der SHM durchlaufen und letztlich zu Plasma- oder Gedächtnis-B-Zellen differenzieren. Durch diese positive Selektion hochaffiner B-Zellen wird die optimale Effektivität der humoralen Immunantwort sichergestellt.

Die Klassenwechselrekombination (KWR) dient der Optimierung der Effektorfunktion von Antikörpern in Bezug auf das vorhandene Antigen. Unterschiedliche Immunglobulin-Klassen unterscheiden sich in der konstanten Region ihrer schweren Kette (Abb. 1-1). Diese kann durch gezielte Interaktionen mit verschiedenen Zellen und Proteinen des Immunsystems unterschiedliche Verteidigungsmechanismen aktivieren. Während der KWR werden deshalb die Gensegmente der konstanten Regionen des Ig_H-Genlokus umgelagert. Naive B-Zellen exprimieren Immunglobuline der Klassen IgM und IgD, während Post-Keimzentrums-B-Zellen auch Immunglobuline der Klassen IgG, IgA oder IgE exprimieren und sezernieren können. In unserem Blut finden sich aufgrund der KWR folglich Antikörper aller fünf Hauptklassen von Immunglobulinen: IgM, IgD, IgG, IgA und IgE.

1.2.3 Signaltransduktion durch den B-Zell-Rezeptor

Die Signaltransduktion durch den BZR spielt für die Funktion und Entwicklung von B-Zellen eine essenzielle Rolle. In Abhängigkeit des Entwicklungsstadiums der Zelle induzieren die Signale sehr unterschiedliche zelluläre Reaktionen. Aus diesem Grund ist die präzise Regulierung der Signaltransduktion in jedem Stadium der B-Zell-Entwicklung sehr wichtig. Ein einfaches Ein- und Ausschalten des BZR würde den Anforderungen nicht genügen. Wie BZRen aktiviert werden und wie ihre Signaltransduktion reguliert wird ist deshalb seit langem ein faszinierendes Feld für viele Wissenschaftler.

1.2.3.1 Rezeptorproximale Aktivierung von Tyrosinkinasen – das ITAM Motiv

Ein funktioneller BZR-Komplex besteht im Wesentlichen aus zwei Komponenten: Dem membrangebundenen Immunglobulin (mIg) als Antigen-bindende Einheit und dem nicht-kovalent assoziierten Heterodimer aus $Ig\alpha$ und $Ig\beta$ (Abb. 1-1), das für die Signaltransduktion verantwortlich ist (KUROSAKI 1998). Die wohl wichtigsten Erkenntnisse hinsichtlich der frühen Signaltransduktionsereignisse des aktivierten BZR-Komplexes waren die Entdeckung von Immunrezeptor Tyrosin-basierten Aktivierungsmotiven (ITAM) (RETH 1989) (siehe Abschnitt 1.2.1) und die Aktivierung von Protein-Tyrosin-Kinasen (PTK) (Abb. 1-4) (GOLD et al. 1990). Wie jedoch die extrazelluläre Bindung von Antigen an das mIg in das Zellinnere vermittelt wird, um dort die Signaltransduktion zu induzieren, ist bis heute Gegenstand der Forschung. Jüngste Ergebnisse, die durch den Einsatz moderner, hoch auflösender Mikroskopie-Techniken erzielt wurden, liefern Modellvorstellungen der frühen Vorgänge der Antigen-vermittelten B-Zell-Aktivierung (zusammengefasst in: BATISTA and HARWOOD 2009; KUROSAKI and HIKIDA 2009; HARWOOD and BATISTA 2010; KUROSAKI et al. 2010).

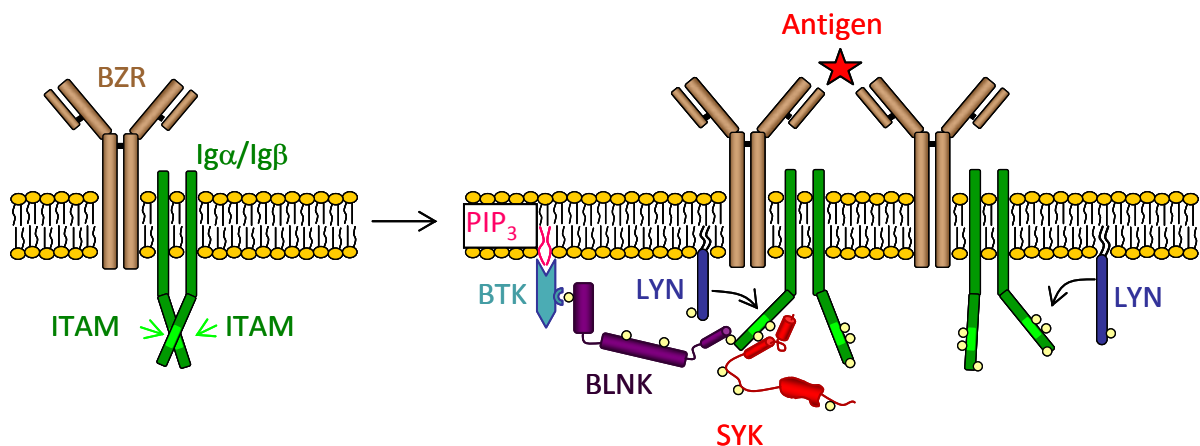


Abb. 1-4: Rezeptorproximale Aktivierung von Tyrosinkinasen.

Bei der Signaltransduktion durch den BZR phosphorylieren aktivierte Protein-Tyrosin-Kinasen (PTKs) Adapterproteine und initiieren somit die Aktivierung nachgeschalteter Effektormoleküle. Nach Antigenbindung sammeln sich mehrere BZR/ $Ig\alpha$ / $Ig\beta$ Komplexe (Abb. 1-1) zu Clustern in der Zytoplasmamembran. Die Src-PTK LYN phosphoryliert ITAM Motive in der zyttoplasmatischen Domäne von $Ig\alpha$ und $Ig\beta$. SYK bindet an phosphorylierte ITAM Motive und phosphoryliert weitere Tyrosine von $Ig\alpha$ / $Ig\beta$ und Adaptermolekülen. Das Adapterprotein BLNK bindet phosphoryliertes $Ig\alpha$ und rekrutiert zusätzliche Signalmoleküle in das BZR-Signalosom. (ITAM: Immunrezeptor Tyrosin-basiertes Aktivierungsmotiv; BLNK: engl.: B cell linker protein; gelbe Kreise: Phosphorylierungsstellen)

Die Oligomerisierung von BZRen nach der Bindung von Antigen, welches löslich oder häufiger gebunden an Antigen-präsentierende Zellen (APZ) vorliegt, ist ausreichend für die Initiation der Signaltransduktion. Mit dem mIg clustern auch $Ig\alpha$ / $Ig\beta$ -Dimere, deren

Konformation sich daraufhin von einem geschlossenen zu einem offenen Zustand ändert (TOLAR et al. 2005) (Abb. 1-4). Für die Stabilisierung der offenen Konformation müssen die ITAM-Motive von Ig α /Ig β phosphoryliert sein. Nach Antigenbindung tritt der BZR-Komplex deshalb transient mit LYN, einer Protein-Tyrosin-Kinase (PTK) aus der Familie der Src-PTKn, in Kontakt (SOHN et al. 2006). LYN wird daraufhin durch Autophosphorylierung aktiviert und phosphoryliert seinerseits die Tyrosine der ITAM-Motive von Ig α und Ig β , wodurch deren offene Konformation induziert und stabilisiert wird.

Phosphorylierte ITAM (pITAM) Motive werden von Proteinen mit einer Tandem-SH2-Domäne gebunden. SH2-Domänen (src-homology 2) sind spezialisierte Proteindomänen, die spezifisch an phosphorylierte Tyrosine (pTyr) in einem definierten Aminosäure-Kontext binden (KRAUSS 2008). Die beiden Tyrosine in einem ITAM können aufgrund ihrer räumlichen Anordnung und den benachbarten Aminosäuren spezifisch von Proteinen mit einer Tandem-SH2-Domäne, die zwei SH2-Domänen vereint, gebunden werden. In B-Zellen übernimmt diese Aufgabe die PTK SYK (engl.: spleen tyrosine kinase). SYK wird durch die Bindung an ein pITAM rekrutiert und wechselt dabei in eine aktive Konformation (KULATHU et al. 2009). Transphosphorylierung durch LYN verstärkt die Aktivität von SYK, welches weitere Tyrosine innerhalb und außerhalb der ITAMs von Ig α /Ig β phosphoryliert. Das Adapterprotein BLNK (engl.: B-cell linker protein) bindet mit seiner SH2-Domäne an ein pTyr von Ig α , welches kein Bestandteil des ITAM ist (ENGELS et al. 2001b). SYK phosphoryliert daraufhin BLNK an mehreren Tyrosinen, die als Anlagerungsstellen für SH2-Domänen weitere Proteine rekrutieren, wie z.B. BTK (engl.: Bruton's tyrosine kinase) und PLC γ 2 (Phospholipase C γ 2) (Abb. 1-6; siehe auch Abschnitt 1.2.3.2.2).

1.2.3.2 Die wichtigsten Signalwege des B-Zell-Rezeptors

1.2.3.2.1 PI3K / AKT⁴

Der PI3-Kinase / AKT Signaltransduktionsweg (Abb. 1-5) wird nach BZR-Stimulierung unter Beteiligung mehrerer Signalmediatoren aktiviert und induziert in der Folge die Expression proliferativ und anti-apoptotisch wirkender Gene (KRAUSS 2008).

⁴ PI3K: Phosphatidylinositol-(3')-Kinase;
AKT=PKB: Proteinkinase B (virales Homolog v-AKT als Onkogen des Retrovirus AKT8)

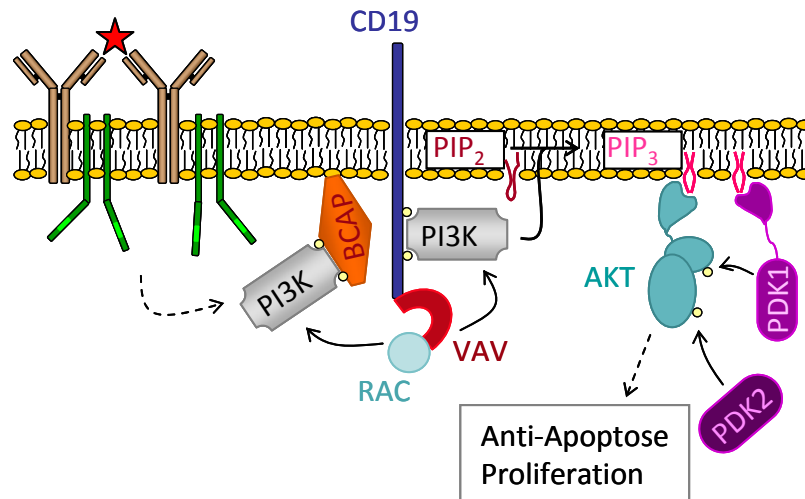


Abb. 1-5: Der PI3K / AKT Signalweg.

Die PI3-Kinase phosphoryliert den membranständigen Botenstoff PIP₂ zu PIP₃, welcher u.a. AKT an die Zytosolmembran rekrutiert. Aktivierung von AKT wirkt anti-apoptotisch und stimuliert die Proliferation. Der B-Zell-spezifische Oberflächenmarker CD19 wird nach BZR Stimulierung von LYN phosphoryliert und gebunden und fungiert so als Adaptermolekül für Proteine mit SH2-Domänen, wie z.B. PI3K und VAV. Sowohl CD19 als auch das Adapterprotein BCAP rekrutieren PI3K an die Zytosolmembran. VAV bindet an CD19, bewirkt eine Konformationsänderung der PI3K und aktiviert RAC. RAC verstärkt die enzymatische Aktivität der PI3K, welche ihr Substrat PIP₂ zu PIP₃ phosphoryliert. PIP₃ wird von AKT und PDK1 gebunden. PDK1 und PDK2 aktivieren AKT mittels Threonin-Phosphorylierung. AKT aktiviert proliferativ und anti-apoptotisch wirkende Effektormoleküle. (PI3K: Phosphatidylinositol-(3')-Kinase; AKT=PKB: Proteinkinase B; PIP₂: Phosphatidylinositol-(4,5)-diphosphat; PIP₃: Phosphatidylinositol-(3,4,5)-triphosphat; BCAP: engl.: B cell adapter for PI3K; PDK: engl.: Phospho-inositide-dependent protein kinase)

CD19, ein B-Zell-spezifisches Oberflächenmolekül, wird nach der Bindung von Antigenen in gebildete BZR-Cluster rekrutiert (DEPOIL et al. 2008). LYN phosphoryliert CD19 an mehreren zytosolischen Tyrosinen, so dass Bindestellen für die SH2-Domänen weiterer Proteine entstehen. CD19 bringt so die PI3K in räumliche Nähe der Proteine VAV und RAC. VAV, ein Guanin-Nukleotid Austausch Faktor, wird ebenfalls von LYN phosphoryliert und aktiviert, woraufhin es RAC aktiviert. RAC wiederum aktiviert die PI3K (INABE et al. 2002). Studien in CD19 Knockout Mäusen zeigten, dass CD19 nicht alleine ursächlich an der Aktivierung der PI3K beteiligt ist. Auch das Adapterprotein BCAP (engl.: B cell adapter for PI3K) rekrutiert die PI3K in aktivierte BZR-Cluster und kann diese auch in Abwesenheit von CD19 aktivieren (XU et al. 2005). Wie BCAP an die Membran dirigiert wird und mit welchen Proteinen es interagiert ist noch nicht geklärt. Offensichtlich wird die Funktion grundlegender Vorgänge der Signaltransduktion durch den BZR jedoch durch redundant agierende Moleküle gesichert.

Die PI3K ist eine Lipidkinase, die das 3'-C-Atom des Phosphatidylinositol phosphoryliert. PIP₂ (Phosphatidylinositol-(4,5)-diphosphat), das wichtigste Substrat der PI3K, ist in der Membran verankert. Wird es von der PI3K zu PIP₃ (Phosphatidylinositol-(3,4,5)-triphosphat)

phosphoryliert, dient es als Bindestelle für Proteine mit einer PH-Domäne (engl.: Pleckstrin-homology). Sowohl AKT als auch PDK1 (engl.: Phosphoinositide dependent kinase) binden mittels PH-Domäne an PIP_3 . AKT wird durch eine Konformationsänderung in Folge der Bindung teilweise aktiviert, diese Aktivierung wird durch Phosphorylierung zweier Threonine durch PDK1 und PDK2 komplettiert (KRAUSS 2008). So gilt die BZR-vermittelte Aktivierung von AKT als Indikator für die Aktivität der PI3K. Viele Substrate der AKT-Kinase unterstützen wiederum direkt oder indirekt Proliferation und verhindern Apoptose.

1.2.3.2.2 PLC γ 2 / Calcium

Die Phospholipase C γ 2 (PLC γ 2) ist essenziell für die Freisetzung von Ca^{2+} -Ionen aus intra- und extrazellulären Ca^{2+} -Speichern. Nach Aktivierung des BZR werden SYK, BLNK und BTK rekrutiert und phosphoryliert (Abb. 1-4). Das Adapterprotein BLNK ist der wichtigste Bindungspartner für PLC γ 2 (Abb. 1-6) (Fu et al. 1998). Mit seinen beiden SH2-Domänen bindet PLC γ 2 an Tyrosin-phosphoryliertes BLNK und wird so an die Membran und in die Nähe des BZR rekrutiert. Aufgrund ihrer räumlichen Nähe wird PLC γ 2 dort von SYK und BTK phosphoryliert und aktiviert. Als aktivierte Phospholipase spaltet PLC γ 2 PIP_2 in das Lipid Diacylglycerol (DAG) und den Zucker Inositol-(1,4,5)-Triphosphat (IP_3). Während DAG membranständig bleibt, wird IP_3 in das Zytosol freigesetzt. IP_3 bindet an IP_3 -Rezeptoren (IP_3R) in den Membranen intrazellulärer Ca^{2+} -Speicher, von welchen das endoplasmatische Retikulum (ER) der wichtigste ist. IP_3 -Rezeptoren formen Calcium-spezifische Ionenkanäle, so dass Ca^{2+} -Ionen in das Zytosol einströmen. Die resultierende Abnahme der Ca^{2+} -Konzentration in intrazellulären Ca^{2+} -Speichern hat den Einstrom von Ca^{2+} -Ionen aus dem extrazellulären Raum zur Folge (PUTNEY 1986). So wird ein schneller, dramatischer Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration erreicht. Calmodulin ist ein zytosolisches Ca^{2+} -bindendes Protein, das als Calciumsensor dient. Ca^{2+} -Calmodulin-Komplexe aktivieren verschiedene Moleküle, welche letztlich wiederum Ca^{2+} -abhängige Transkriptionsfaktoren, wie z.B. NFAT (engl.: Nuclear factor of activated T cells) aktivieren. NFAT spielt u.a. eine wichtige Rolle bei der Differenzierung von B-Zellen zu Antikörper-sezernierenden Plasmazellen (KUROSAKI et al. 2010). Ca^{2+} -Ionen können auch direkt Proteine aktivieren, so ist z.B. die Aktivität der PKC β (Proteinkinase C β) von der direkten Bindung an Ca^{2+} -Ionen abhängig (Abb. 1-7). Die Messung eines schnellen Anstiegs der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ist ein Merkmal akuter Signaltransduktion durch den BZR.

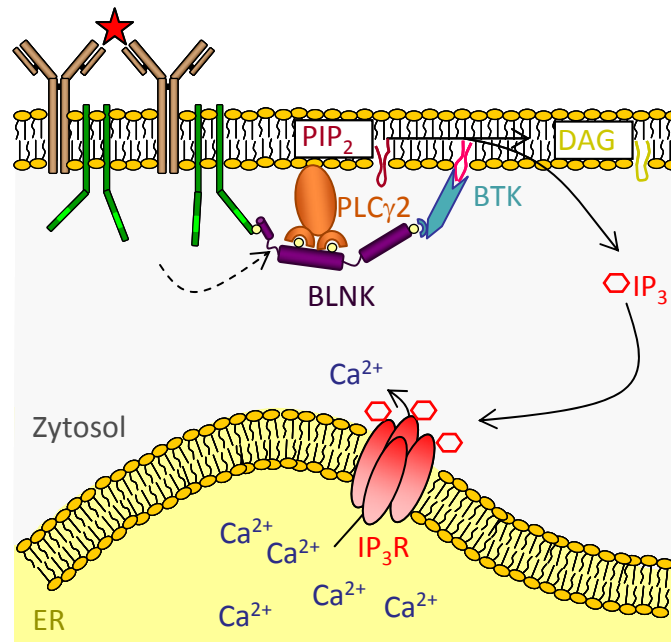


Abb. 1-6: Der PLCγ2 / Calcium Signalweg.

Aktivierung von PLCγ2 mobilisiert interne Calciumspeicher und aktiviert mehrere Signalmediatoren. Aktiviertes BLNK (Abb. 1-4) rekrutiert PLCγ2 durch Phosphotyrosin-SH2-Interaktionen an die Zytoplasmamembran. SYK und BTK phosphorylieren PLCγ2 und aktivieren so deren Phospholipase-Aktivität. PLCγ2 spaltet PIP₂ in das membranständige DAG und freies IP₃. IP₃ bindet seinen Rezeptor (IP₃R) in der Membran des ER und induziert die schnelle Freisetzung von Ca²⁺-Ionen aus dem ER in das Zytosol. Ca²⁺-Ionen aktivieren - direkt oder indirekt - diverse Calcium-abhängige Enzyme und Transkriptionsfaktoren (hier nicht dargestellt, vgl. z.B. Abb. 1-7) und stimulieren so u.a. die zelluläre Replikation. (PLCγ2: Phospholipase Cγ2; PKC: Proteinkinase C; IP₃: Inositol-(1,4,5)-triphosphat; DAG: Diacylglycerol; ER: Endoplasmatisches Retikulum)

1.2.3.2.3 MAPK / ERK

Die Signalübertragungswege von Mitogen-aktivierten Protein Kinasen (MAPK) bestehen aus drei Proteinkinasen, die in einer linearen Abfolge phosphoryliert und aktiviert werden und so extrazelluläre Signale bis hin zur Ebene der Transkription weiterleiten (KRAUSS 2008). Dabei phosphoryliert eine MAP3K (MAPK Kinase Kinase) eine spezifische MAP2K, welche daraufhin eine MAPK phosphoryliert. Die MAP3K erhält ein aktivierendes Signal von zuvor stimulierten, zellulären Signalmediatoren, während die MAPK ein Signal an Transkriptionsfaktoren übermittelt.

In B-Zellen spielen drei Familien der MAPKinasen eine wichtige Rolle: ERK1/2-, JNK1/2- und p38-MAPKinasen⁵. JNK und p38 werden vornehmlich durch Signale des CD40-Rezeptors aktiviert und induzieren hauptsächlich Transkriptionsfaktoren der AP-1 Familie (engl.: activator protein 1) wie z.B. c-Jun und ATF-1,2,6 (KRAUSS 2008). Die Signaltransduktion durch

⁵ ERK: engl.: extracellular signal-regulated kinase
 JNK: engl.: c-jun N-terminal kinase
 p38: Protein 38 kDa

den BZR aktiviert JNK und p38 nur in geringem Maß (SUTHERLAND et al. 1996). ERK1/2 hingegen werden nur durch den BZR, nicht aber durch CD40 aktiviert (Abb. 1-7) (TORDAI et al. 1994).

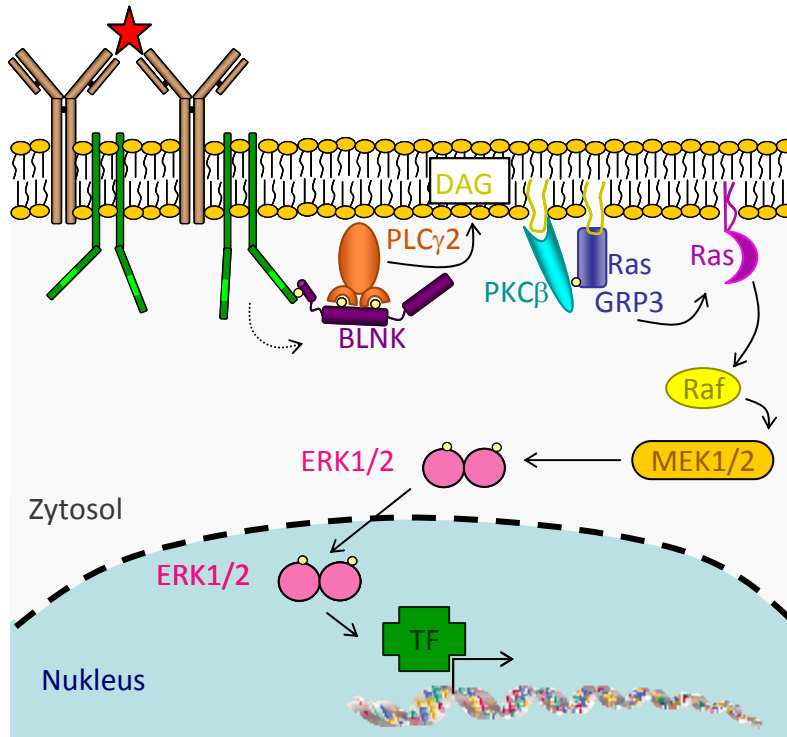


Abb. 1-7: Der MAPK / ERK Signalweg.

Der Signaltransduktionsweg, der von einem stimulierten BZR über die Ras-GTPase und die MAPKinase Kaskade ERK1/2 aktiviert, induziert letztlich die Transkription von Genen, welche für die Aktivierung und Proliferation der Zelle von Bedeutung sind. PLCγ2-Aktivität stellt DAG und Ca²⁺ für die Signaltransduktion in der Zelle bereit (Abb. 1-6). DAG rekrutiert PKCβ und den G-Nukleotid-Austausch-Faktor RasGRP3 an die Zytoplasmamembran. Die Aktivität beider Proteine ist Ca²⁺ abhängig. PKCβ phosphoryliert RasGRP3. Aktiviertes RasGRP3 verhilft Ras zu seiner GTP gebundenen, aktiven Konformation. Ras aktiviert die MAP3Kinasen Raf-1 und B-Raf, welche die MAP2Kinasen MEK1/2 phosphorylieren. ERK1/2 sind die terminalen MAPKinasen dieser Kaskade. Phosphorylierte ERK Kinasen translozieren als Dimere in den Nukleus, wo sie verschiedene Transkriptionsfaktoren (TF), wie z.B. Elk-1 und c-Fos, aktivieren. (MAPK: Mitogen-aktivierte Protein Kinase; MEK: MAP/ERK Kinase; ERK: engl.: extracellular signal-regulated kinase; RasGRP: engl.: Ras G-nucleotide releasing protein; Elk-1: engl.: ETS-like gene 1)

Typische Substrate von ERK1/2 sind die Transkriptionsfaktoren Elk-1 (ETS-like gene 1) und c-Fos. In dem MAPKinase-Signalweg, der zur Aktivierung von ERK1/2 führt, sind MEK1/2 (MAP/ERK Kinase) die MAP2Kinasen und Raf1/B-Raf die MAP3Kinasen. Das aktivierende Signal für Raf1/B-Raf kommt von dem kleinen G-Protein Ras, welches in der Membran verankert ist. Um von seinem inaktiven, GDP-gebundenen Zustand in den aktiven, GTP-gebundenen Zustand überzugehen, benötigt Ras den Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor RasGRP3. RasGRP3 wiederum bindet membranständiges DAG, ein Produkt der PLCγ2.

Protein Kinase C β (PKC β), aktiviert durch Ca²⁺-Ionen und DAG (Abb. 1-6), phosphoryliert und aktiviert RasGRP3 (KUROSAKI et al. 2010). So ist es wiederum die Aktivität der Rezeptorproximalen Signalmediatoren SYK, BLNK und PLC γ 2, welche letztlich zur Folge hat, dass phosphorylierte ERK1/2 Kinasen als Dimere in den Nukleus translozieren und dort Transkriptionsfaktoren wie Elk-1 und c-Fos phosphorylieren, welche die Transkription diverser Gene aktivieren.

Die Tatsache, dass CD40 und der BZR unterschiedliche MAPKinasen aktivieren und damit die Induktion unterschiedlicher Transkriptionsfaktoren kontrollieren, erlaubt es ihnen, auf unterschiedliche Weise Einfluss auf die Aktivierung und Differenzierung von B-Zellen zu nehmen. Während die Stimulierung von nur einem der beiden Rezeptoren wie beschrieben jeweils zur Induktion bestimmter Transkriptionsfaktoren führt, würde eine gleichzeitige Aktivierung, z.B. durch Antigenbindung und T-Zell-vermittelte CD40-Stimulierung, zur vermehrten Ausbildung von c-Fos/c-Jun AP-1-Heterodimeren führen, welche die Transkription zusätzlicher Gene aktivieren.

1.2.3.2.4 NF κ B

Die Mitglieder der Familie der NF κ B-Transkriptionsfaktoren (engl.: nuclear factor κ B) regulieren die Expression von Genen, welche für die Aktivierung von Lymphozyten und den Ablauf von Immunantworten und Entzündungsreaktionen von Bedeutung sind (GHOSH et al. 1998). Es gibt fünf Proteine dieser Familie: NF κ B1 (p50), NF κ B2 (p52), Rel-A (p65), Rel-B und c-Rel. Sie formen verschiedene Homo- und Heterodimere, die bei der Regulierung der Transkription unterschiedliche Aufgaben übernehmen. Diverse extrazelluläre Signale induzieren verschiedene NF κ B-Signaltransduktionswege, die wiederum zur Aktivierung verschiedener NF κ B-Dimere führen. So gibt es den klassischen, kanonischen NF κ B-Signalweg sowie einen nicht-kanonischen und mehrere atypische Wege (PERKINS 2007). Die Stimulierung des BZR leitet den kanonischen NF κ B-Signalweg ein, welcher im Folgenden näher beschrieben wird (Abb. 1-8).

Der kanonische NF κ B-Signalweg führt zur Aktivierung von Heterodimeren, die die DNA-bindende Untereinheit p50 enthalten (THOME 2004). Solche Dimere werden im nicht-aktivierten Zustand der Zelle von I κ B α (engl.: Inhibitor of κ B) gebunden und im Zytoplasma zurückgehalten. Nach BZR Stimulierung wird der IKK-Komplex (I κ B Kinase) aktiviert. Er

besteht aus den katalytisch aktiven Untereinheiten IKK α und IKK β sowie der regulatorischen Untereinheit IKK γ (auch NEMO). IKK phosphoryliert I κ B α , woraufhin dieses ubiquitiniert und proteasomal degradiert wird (KARIN and DELHASE 2000). In Abwesenheit von I κ B α translozieren NF κ B-Transkriptionsfaktoren als Dimere in den Nukleus und nehmen aktiv an der Regulierung der Transkription diverser Gene teil. Welche Faktoren in dieser Signalkaskade für die Aktivierung des IKK-Komplexes verantwortlich sind, war lange unklar und ist bis heute ein aktives Feld der Forschung.

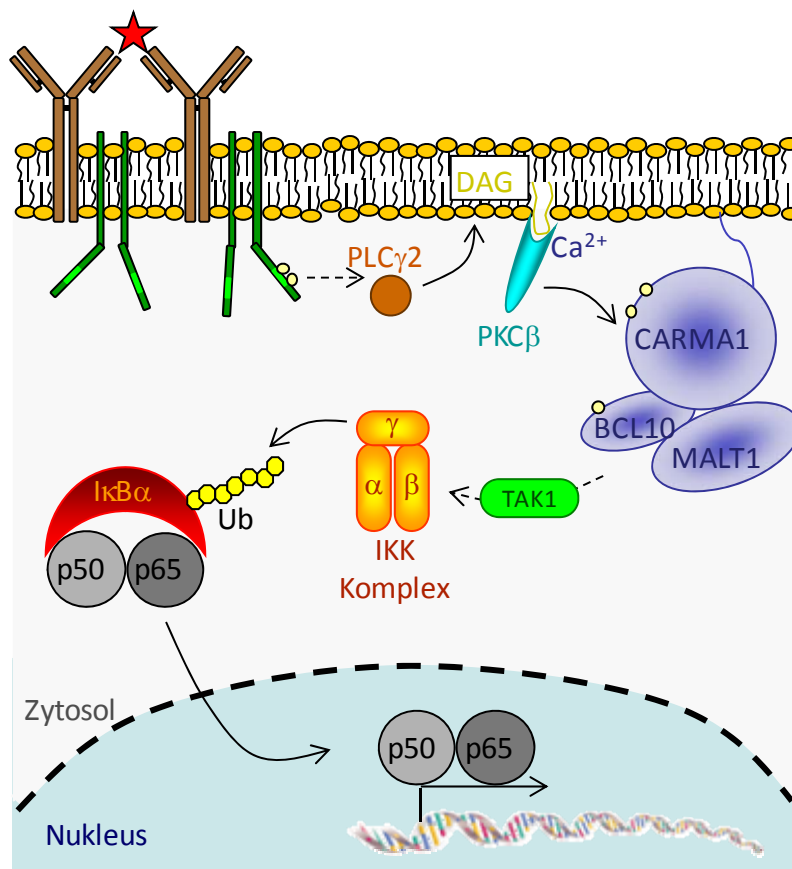


Abb. 1-8: Der NF κ B Signalweg.

Der Transkriptionsfaktor NF κ B reguliert Gene, die z.B. für Immunantworten und Entzündungsreaktionen von Bedeutung sind. NF κ B Transkriptionsfaktoren (z.B. p50 und p65) werden durch Bindung an I κ B α im Zytoplasma zurückgehalten. Stimulierung des BZR führt zur Aktivierung des IKK Komplexes, wodurch I κ B α phosphoryliert und letztlich degradiert wird, so dass NF κ B in den Nukleus translozieren und Transkription aktivieren kann. Die Aktivierung des IKK-Komplexes wird mit Hilfe eines Komplexes aus drei Adaptermolekülen streng reguliert: CARMA1:BCL10:MALT1 (CBM). PKC β (Abb. 1-6 und Abb. 1-7) induziert die Formierung des Komplexes durch Phosphorylierung von CARMA1. Der IKK-Komplex und die MAP3Kinase TAK1 werden durch CBM rekrutiert, so dass TAK1 IKK phosphorylieren und aktivieren kann. Diverse positive und negative Rückkopplungsschleifen zwischen IKK, CBM und weiteren, z.T. unbekanntem Faktoren können die IKK-Aktivität exakt regulieren. (NF κ B: engl.: Nuclear factor κ B; I κ B α : engl.: Inhibitor of κ B α ; IKK: I κ B Kinase; CARMA: engl.: Caspase recruitment domain-containing membrane-associated guanylate kinase; MALT: engl.: Mucosa associated lymphoid tissue; BCL: engl.: B cell lymphoma; TAK: engl.: Transforming growth factor β activated kinase)

Defekte in der Aktivierung von PKC β , welche als Folge der Aktivität von PLC γ 2 durch Ca²⁺ und DAG aktiviert wird (Abb. 1-6, Abb. 1-7), haben eine fehlerhafte Aktivierung des kanonischen NF κ B-Signalwegs zur Folge (SAIJO et al. 2002). Zwischen PKC β und dem IKK-Komplex, formiert sich nach Aktivierung von PKC β ein Komplex aus drei Adapterproteinen: CARMA1, MALT1 und BCL10⁶ (RULAND and MAK 2003). Während MALT1 und BCL10 konstitutiv interagieren (LUCAS et al. 2001), ist eine von PKC β vermittelte Phosphorylierung von CARMA1 notwendig für deren Translokation an die Zytoplasmamembran und die anschließende Ausbildung des CARMA1:MALT1:BCL10-Komplexes (CBM-Komplex) (SHINOHARA et al. 2005). Nach einem Modell von Kurosaki et al. (KUROSAKI et al. 2010) rekrutiert phosphoryliertes CARMA1 auch die MAP3K TAK1⁷ an die Zytoplasmamembran, während der IKK-Komplex vermutlich durch MALT1/BCL10 rekrutiert wird. Da ein Fehlen von TAK1 die Aktivierung von IKK nach BZR-Stimulierung vollständig verhindert (SHINOHARA et al. 2005), wird vermutet, dass der CBM-Komplex durch seine Adapterfunktion IKK und TAK1 in räumliche Nähe zueinander bringt und so die Phosphorylierung und Aktivierung von IKK induziert. Diverse positive und negative Rückkopplungsschleifen zwischen IKK- und CBM-Komplex, sowie weiteren inhibierenden und stimulierenden Faktoren ermöglichen eine sehr fein abgestimmte Regulierung der NF κ B-Aktivierung (WEGENER et al. 2006; LOBRY et al. 2007; SHINOHARA et al. 2007; COORNAERT et al. 2008).

1.2.3.3 Tonische Signale vs. Ligand-induzierte Signale – Die Folge der Mobilität von B-Zell-Rezeptoren in der Zytoplasmamembran

Wie soeben beschrieben, konnten in vielen Jahren intensiver Forschung wichtige und detaillierte Erkenntnisse über die Signaltransduktionswege des BZR gewonnen werden. Jedoch wurden alle zugrunde liegenden Experimente mittels aktiver Stimulierung des BZR durchgeführt. In den meisten Entwicklungsstadien der B-Zellen ist es jedoch nicht die Antigen-vermittelte Stimulierung des BZR, welche das Überleben der Zellen sichert und die Differenzierung der B-Zelle weiter vorantreibt (siehe Abschnitt 1.2.2). Überleben und Differenzierung hängen von der Existenz eines intakten BZR-Komplexes ab, der aus einem mlg (bzw. dem Prä-BZR) und den Korezeptoren Ig α /Ig β (Abb. 1-1) besteht und an der

⁶ CARMA1 : engl.:caspase recruitment domain (CARD) /
membrane-associated guanylate kinase (MAGUK) protein 1

MALT1: engl.: mucosa-associated lymphoid tissue translocation protein 1

BCL10: engl.: B-cell lymphoma 10

⁷ TAK1: engl.: Transforming growth factor β (TGF β) activated kinase 1

Zelloberfläche exprimiert wird. Dieser BZR-Komplex übermittelt konstitutiv schwache, aber dennoch überlebenswichtige Signale, so genannte tonische Signale, an deren Generierung die signaltransduzierenden Korezeptoren $Ig\alpha/Ig\beta$ essenziell beteiligt sind. Das Fehlen von $Ig\alpha$ verhindert bereits frühe Stadien der B-Zell-Entwicklung (KRAUS et al. 2004), wohingegen ein rekombinantes, membranständiges Fusionsprotein, bestehend aus $Ig\alpha$ und $Ig\beta$, in BZR-defizienten Mäusen für die Entwicklung bis hin zu reifen B-Zellen ausreicht (FUENTES-PANANA et al. 2005). Die experimentelle Charakterisierung solcher Ligand-unabhängigen Signale bereitet jedoch Schwierigkeiten, so dass es lange nur sehr eingeschränkte Erklärungsversuche gab, die meist spekulative Schlussfolgerungen aus den Erkenntnissen über Ligand-induzierte Signalwege darstellten.

Neueste Forschungsergebnisse ermöglichten eine Einsicht in die Diffusionsdynamik des BZR durch die Visualisierung einzelner Immunglobuline auf der Zelloberfläche (TRENOR et al. 2010). So konnte ein Zusammenhang zwischen der Dichte von Aktinfilamenten und der Diffusionsfähigkeit des BZR hergestellt werden: Je dichter die Aktinstruktur ist, desto eingeschränkter ist die Beweglichkeit von BZR in der Zytoplasmamembran (Abb. 1-9). Ebenso ist die Diffusionsdynamik von BZR in Ezrin-reichen Regionen stark beschränkt. Ezrin ist ein Protein, das Aktinfilamente mit Membranproteinen verbindet. So wird vermutet, dass das Zytoskelett die Mobilität einzelner BZR-Komplexe einschränkt, indem es durch die Verbindung mit Ezrin und Membranproteinen Barrieren errichtet. Diese durch das Zytoskelett vermittelte Einschränkung der BZR-Diffusion ist vermutlich essenziell für die Vermeidung einer spontanen BZR-Aktivierung in Abwesenheit von Antigen. Nach Behandlung mit Reagenzien, welche Aktinfilamente zerstören, wie z.B. Latrunculin A (LatA), steigt die Diffusionsgeschwindigkeit von BZR stark an und verursacht den Einstrom von Ca^{2+} -Ionen in das Zytosol (Abb. 1-6), sowie die Aktivierung von ERK und AKT (Abb. 1-7; Abb. 1-5) (TRENOR et al. 2010). Ebenso wurde gezeigt, dass die Ligand-induzierte Stimulierung des BZR eine schnelle Depolymerisierung, gefolgt von einer Repolymerisierung der Aktinfilamente, zur Folge hat (HAO and AUGUST 2005). Es scheint also möglich, dass nach BZR Stimulierung eine erhöhte Mobilität der BZR die Formierung von BZR-Clustern unterstützt und die Dissoziation der Cluster anschließend durch Aktin-Repolymerisierung inhibiert wird, was die Signaltransduktion stabilisieren würde (SASAKI and KUROSAKI 2010). Eine solche stabilisierende Funktion wurde bisher den als „lipid rafts“ bekannten Cholesterin- und

Spingolipid-reichen Regionen der Zytoplasmamembran zugesprochen, welche vermutlich zusätzlich zur Immobilisierung oligomerisierter BZR-Cluster beitragen.

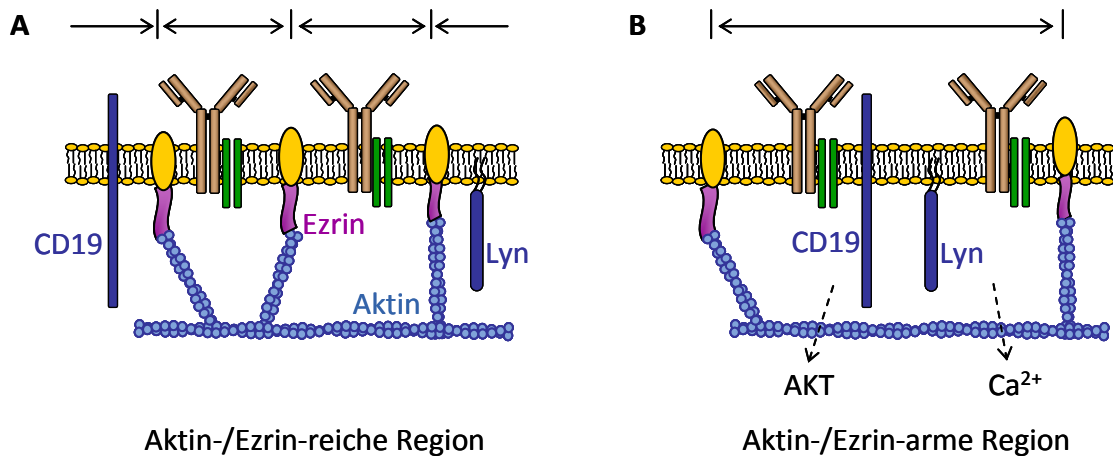


Abb. 1-9: Regulierung tonischer BZR-Signale durch Kompartimentalisierung der Zytoplasmamembran.

Die Dynamik der Diffusion von B-Zell-Rezeptoren ist ausschlaggebend für die Aktivierung der Signaltransduktion und wird von Aktinfilamenten kontrolliert. B-Zell-Rezeptoren diffundieren in Aktin-armen Regionen verstärkt in der Lipiddoppelschicht (B), während Aktin-reiche Regionen diese Mobilität stark einschränken (A). Das Protein Ezrin verbindet Aktin mit Membranproteinen (gelbe Ovale) wodurch eine Barriere für diffundierende BZRen entsteht. Mobile BZRen können spontan mit Signalmolekülen interagieren und sind verantwortlich für die kontinuierliche Generierung tonischer Signale (B). Ligand-induzierte BZR Stimulierung bewirkt eine schnelle Depolymerisierung von Aktinfilamenten, gefolgt von einer Repolymerisierung, wodurch kurzzeitig verstärkte Interaktionen von BZRen und Signalmolekülen zugelassen werden (hier nicht dargestellt).

In Bezug auf die Generierung tonischer Signale (Abb. 1-9) wurde postuliert, dass mobile BZRen in Aktin-armen Regionen verbesserte Chancen haben, mit aktivierenden Signalmediatoren, wie z.B. CD19 oder LYN (Abb. 1-5; Abb. 1-4), zu interagieren und so kontinuierlich schwache tonische Signale auszusenden. Diese Signale können sich aufgrund der Aktin-Ezrin-Barrieren, welche die Membran in Kompartimente unterteilen, jedoch nicht lateral ausbreiten und bleiben sowohl örtlich als auch zeitlich beschränkt. Immobile BZRen in Aktin-reichen Regionen hingegen befinden sich in einem inaktiven Zustand, aus dem sie erst nach BZR-Stimulierung befreit werden. Nach diesem Modell wären die Signalkaskaden tonischer und Ligand-induzierter BZR-Signale prinzipiell dieselben, wobei tonische Signale von transienter Natur sind und nicht immer alle Facetten des BZR-Signaltransduktions-Netzwerks zugleich aktivieren. Ligand-induzierte Signale hingegen aktivieren durch einen starken Impuls alle Mediatoren des BZR-Signaltransduktions-Netzwerks. Die Stärke des Signals rührt dabei von einer Art positivem Rückkopplungsmechanismus her, da die

verstärkte Mobilität der BZRen durch vermehrte Interaktionen die Transaktivierung zahlreicher BZR-Komplexe und Signalmediatoren bewirkt.

Diese aktuellen Erkenntnisse stehen im Einklang mit dem Modell einer kompartmentalisierten Zytoplasmamembran (KUSUMI et al. 2005), welches im Jahr 2005 Teile des Fluid-Mosaik-Modells von Singer und Nicolson (SINGER and NICOLSON 1972) ablöste.

1.3 Das Epstein-Barr Virus

1.3.1 Allgemeines

Das Epstein-Barr Virus (EBV) ist ein äußerst erfolgreiches humanes Herpesvirus, mit einer Infektionsrate von >95% aller erwachsenen Menschen weltweit. Eine faszinierende Gemeinsamkeit aller Herpesviren ist es, dass sie eine latente Infektion etablieren, die es ihnen ermöglicht, in ihrem gesunden Wirtsorganismus ein Leben lang zu persistieren. Ihre Strategie ist dabei ähnlich: sie verharren, unsichtbar für das Immunsystem und in einem nicht-pathogenen Modus, in langlebigen Zellen. Einige Herpesviren werden jedoch auch mit lebensbedrohlichen Erkrankungen in Verbindung gebracht, die besonders in Patienten mit geschwächtem Immunsystem ein Problem darstellen. So wird EBV ursächlich mit der Entstehung maligner Erkrankungen, wie dem Burkitt-Lymphom, dem Hodgkin-Lymphom oder auch dem Nasopharynx-Karzinom assoziiert.

EBV infiziert bevorzugt B-Lymphozyten und gelegentlich Epithelzellen. Infektiöse Viruspartikel werden durch den Speichel übertragen, so dass die meisten Menschen bereits im Kindesalter durch ihre Eltern infiziert werden. Solch eine frühe Infektion verläuft meist asymptomatisch. Eine Infektion zu einem späteren Zeitpunkt führt in 35-50% der Fälle zur Entwicklung einer infektiösen Mononukleose (IM) (umgangssprachlich auch als Pfeiffer'sches Drüsenfieber oder „kissing disease“ bezeichnet). Die IM ist in aller Regel eine selbst-limitierende lymphoproliferative Erkrankungen, die aufgrund mannigfaltiger Symptome oft nicht erkannt wird. Sie geht einher mit Fieber, Halsschmerzen und Appetitlosigkeit, kann aber auch zu Hepatomegalie, Gelbsucht und weiteren Symptomen führen.

Unabhängig vom Ablauf der Erstinfektion etabliert EBV in seinem Wirt einen latenten Zustand, der es ihm ermöglicht, einer Eliminierung durch das Immunsystem zu entgehen. Für das B-lymphotrope Virus sind langlebige Gedächtnis-B-Zellen der perfekte Ort für eine

lebenslange Persistenz im Wirtsorganismus. Tatsächlich konnte auch experimentell nachgewiesen werden, dass EBV *in vivo* selektiv nicht-teilungsaktive, zirkulierende Gedächtnis-B-Zellen latent infiziert (BABCOCK et al. 1998). *In vitro* jedoch infiziert EBV jede Art von B-Zellen mit vergleichbarer Effizienz (EHLIN-HENRIKSSON et al. 2003) und veranlasst diese aus ihrem ruhenden Zustand in einen transformierten, proliferierenden Zustand überzugehen (POPE et al. 1968). Für die EBV-Forschung ist diese Eigenschaft von großer Bedeutung, da aus humanen B-Zellen durch Infektion mit EBV, lymphoblastoide Zelllinien (engl.: lymphoblastoid cell lines: LCLs) generiert werden können, die als Modell einer latenten Virusinfektion und stabiler Virus-Wirts-Interaktionen dienen. Es stellt sich aber die Frage, wie dasselbe Virus es schafft, *in vitro* in B-Zellen einen lymphoblastoiden, proliferierenden Phänotyp hervorzurufen, *in vivo* jedoch in nicht-teilungsaktiven Gedächtnis-B-Zellen vom Immunsystem unerkannt zu persistieren.

1.3.2 Der Infektionsweg des Epstein-Barr Virus

EBV persistiert in seinem gesunden Wirt selektiv in ruhenden Gedächtnis-B-Zellen. Das Virus hat prinzipiell zwei Möglichkeiten, dieses spezielle B-Zell-Kompartiment zu erreichen: Es kann Gedächtnis-B-Zellen direkt infizieren oder naive B-Zellen zur Differenzierung zu Gedächtnis-B-Zellen stimulieren. Ein gängiges Modell beschreibt, wie EBV den normalen Weg des Immunsystems ausnutzt, um nach Infektion naiver B-Zellen auf natürlichem Weg das Kompartiment der Gedächtnis-B-Zellen zu erreichen (Abb. 1-10) (THORLEY-LAWSON 2001). Dieser Weg schließt jedoch auch die Möglichkeit einer direkten Infektion von Gedächtnis-B-Zellen nicht aus.

EBV kann je nach Differenzierungsstadium und Aufenthaltsort einer infizierten Zelle fünf verschiedene Programme viraler Genexpression abrufen. Das Programm der lytischen Phase dient der Produktion neuer Viruspartikel und ist durch die Expression zahlreicher viraler Proteine, insbesondere viraler Strukturproteine, charakterisiert. Die vier weiteren Programme dienen zur Unterscheidung verschiedener Stadien der latenten Infektion (Tabelle 1-1).

In den ersten Tagen nach Infektion werden die Proteine der Latenz III benötigt, um B-Zellen zu starker Proliferation zu stimulieren, wie es auch nach der Aktivierung durch den ersten Kontakt mit Antigen geschieht. EBNA2 (engl.: Epstein-Barr Virus nuclear antigen 2) ist dabei

der entscheidende Transkriptionsfaktor, der die Expression weiterer acht latenter Proteine reguliert (LING et al. 1994). *In vivo* wird die unkontrollierte Proliferation EBV-infizierter B-Zellen in diesem Stadium durch eine zellvermittelte Immunreaktion EBV-spezifischer zytotoxischer T-Zellen kontrolliert.

Tabelle 1-1: Die Latenz-Stadien des Epstein-Barr Virus

Latenz-Stadium	Exprimierte Gene	Funktion viraler Proteine
Latenz III	EBNA1, 2, 3A, 3B, 3C, LP LMP1, 2A, 2B EBV-kodierte microRNAs	Aktivierung ruhender B-Zellen zu proliferierenden lymphoblastoiden Zellen
Latenz II	EBNA1 LMP1, 2A, 2B EBV-kodierte microRNAs	Bereitstellung von Überlebenssignalen während der Keimzentrumsreaktion; Differenzierung zu Gedächtnis-B-Zellen
Latenz I	EBNA1 EBV-kodierte microRNAs	Nur in malignen Erkrankungen, Aufrechterhaltung der EBV-Infektion in proliferierenden B-Zellen, z.B. Burkitt-Lymphom
Latenz 0	EBV-kodierte microRNAs	keine Expression viraler Proteine; Persistenz in Gedächtnis-B-Zellen, nicht pathogen, nicht erkennbar für das Immunsystem

EBNA: engl.: EBV nuclear antigen; LMP: engl.: latent membrane protein

Der initialen Expansion aktivierter B-Zellen folgt im Verlauf einer Immunantwort die Keimzentrumsreaktion (siehe auch Abschnitt 1.2.2.2). Auch durch EBV aktivierte B-Zellen durchlaufen nach einer initialen Phase starker Proliferation eine Keimzentrums-ähnliche Reaktion. Die dafür erforderlichen Überlebenssignale liefern die viralen Proteine der Latenz II: LMP1, LMP2A/B und EBNA1 (Tabelle 1-1) (BABCOCK et al. 2000; BABCOCK and THORLEY-LAWSON 2000). EBNA1 stellt dabei die Replikation des EBV-Genoms, durch die zelluläre Replikationsmaschinerie, während der Zellteilung sicher. Ob EBNA1 über diese rein virale Funktion hinaus weitere Aufgaben übernimmt ist unklar. Das latente Membranprotein 1 (LMP1) liefert ein Signal, das dem eines aktivierten CD40-Rezeptors gleicht (GIRES et al. 1997) und u.a. für die konstitutive Aktivität des kanonischen und nicht-kanonischen NFκB-Signalwegs sorgt. Der CD40-Rezeptor an der Oberfläche von B-Zellen wird während einer genuinen Keimzentrumsreaktion von CD4⁺ T-Helfer-Zellen stimuliert. LMP1 simuliert also einen wichtigen Teil der T-Zell-Hilfe. Das latente Membranprotein 2A (LMP2A) hingegen versorgt die Zellen mit einem BZR-ähnlichen Signal (CALDWELL et al. 1998), welches ebenfalls für das Überleben einer Keimzentrumsreaktion essenziell ist. LMP2B ist eine trunkeerte Form von LMP2A, welcher die Signalkapazität fehlt. Seine Funktion ist noch nicht vollständig

geklärt, vermutlich reguliert es die Aktivität von LMP2A (ROVEDO and LONGNECKER 2007; RECHSTEINER et al. 2008).

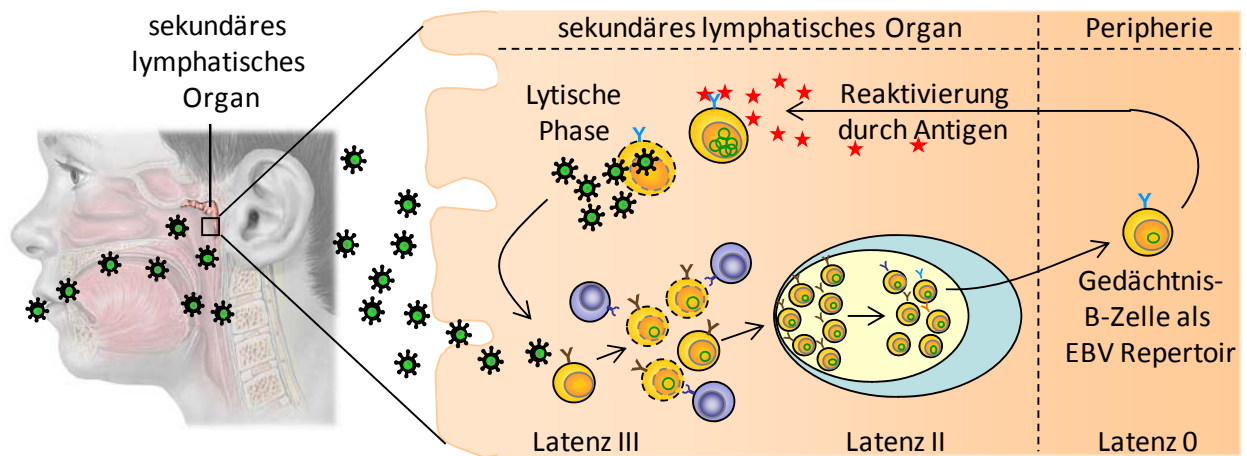


Abb. 1-10: Der Infektionsweg des Epstein-Barr Virus.

EBV nutzt zelluläre Vorgänge der B-Zell-Aktivierung für seinen eigenen Lebenszyklus aus. EBV Partikel dringen nach Tröpfchenübertragung in die lymphatischen Gewebe des Nasopharynx ein. Naive, reife B-Zellen werden infiziert und durch die Expression neun viraler Proteine zu starker Proliferation stimuliert (Latenz III). Die Anzahl infizierter B-Zellen wird durch zytotoxische T-Zellen kontrolliert (blau). Im Stadium der Latenz II durchlaufen B-Zellen eine keimzentrumsartige Reaktion (vgl.: Abb. 1-3), wobei ihr Überleben durch die Expression dreier EBV-Proteine gesichert ist: LMP1, LMP2A/B und EBNA1. Haben infizierte B-Zellen das Gedächtnis-B-Zell-Stadium erreicht, wird die Expression viraler Proteine eingestellt, wodurch infizierte Zellen für das Immunsystem des Wirts unsichtbar werden (Latenz 0). EBV-positive Gedächtnis-B-Zellen zirkulieren in der Peripherie. Treffen sie im Rachenraum erneut auf ihr spezifisches Antigen, werden sie aktiviert und produzieren EBV-Partikel, die weitere B-Zellen infizieren, oder die EBV-Infektion auf andere Menschen übertragen können. (Bild links: http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/presentations/100076_1.htm)

Aus der Differenzierungsphase der Keimzentrumsreaktion gehen EBV-infizierte B-Zellen als Gedächtnis-B-Zellen hervor. In diesem Stadium wird die Expression viraler Proteine vollständig eingestellt (HOCHBERG et al. 2004). Gedächtnis-B-Zellen sind langlebig und nicht teilungsaktiv. Sie zirkulieren auf der Suche nach Antigen durch den Blut- und Lymphkreislauf unseres Körpers. Treffen EBV-positive Gedächtnis-B-Zellen dabei erneut auf ihr spezifisches Antigen, wird ihr BZR stimuliert und damit das lytische Programm viraler Genexpression aktiviert (TOVEY et al. 1978; TAKADA 1984).

1.3.3 Das latente Membranprotein 2A - LMP2A

LMP2A wurde im Jahr 1990 als zweites latentes Membranprotein des Epstein-Barr-Virus entdeckt (LONGNECKER and KIEFF 1990), seine Funktion wird seither kontrovers diskutiert.

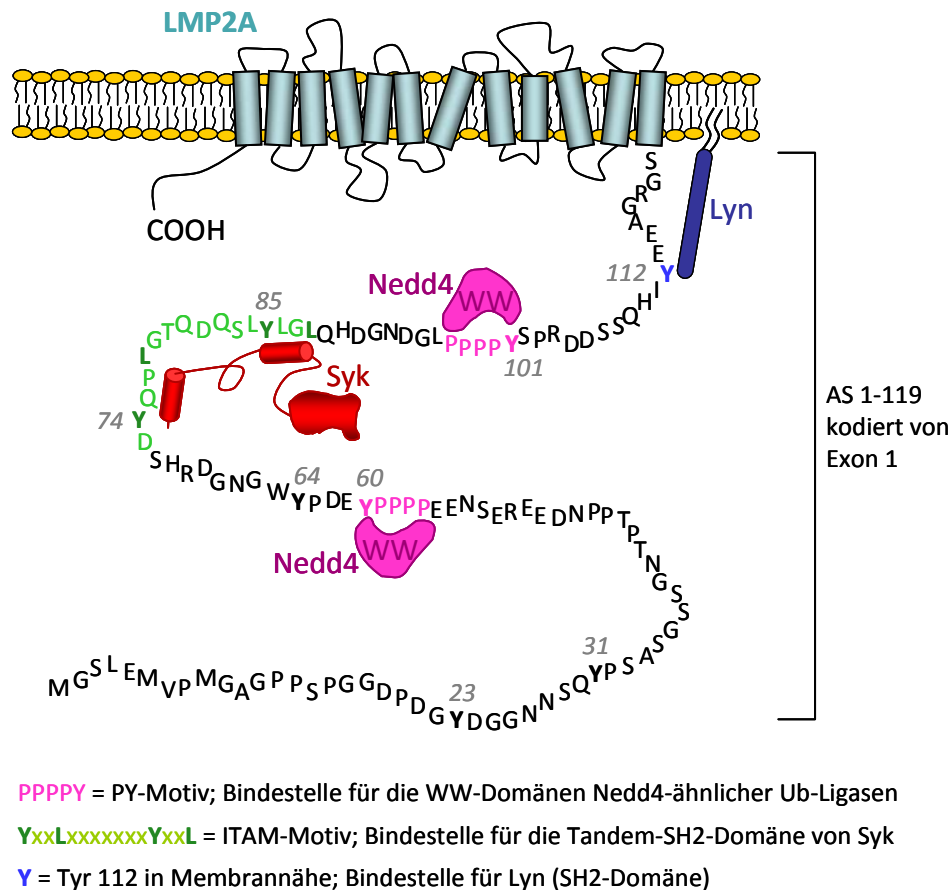


Abb. 1-11: Signaltransduktionsmotive von LMP2A und ihre Interaktionspartner.

Die aminoterminele zytosolische Domäne von LMP2A enthält bekannte Sequenzmotive für die Interaktion mit Signalmediatoren. Membran-assoziiertes LYN kann mittels seiner SH2-Domäne an phosphoryliertes Tyrosin 112 von LMP2A binden. SYK bindet mit seinen beiden SH2-Domänen an die Tyrosine 74 und 85 des ITAM Motivs. Nedd4-ähnliche Ubiquitin-Ligasen binden mithilfe ihrer WW-Domäne an PY-Motive von LMP2A und initiieren die Internalisierung und Degradation des gesamten Komplexes. Potenzielle Bindestellen weiterer Proteine sind mangels experimenteller Nachweise nicht aufgeführt; die Positionen aller 8 Tyrosine sind nummeriert.

Das Gen, welches LMP2A kodiert, besteht aus neun Exons (Abb. 4-1). Das erste Exon kodiert 119 Aminosäuren (AS), die als relativ unstrukturierte, zytosolische Domäne (PARK et al. 2005) den Aminoterminus von LMP2A darstellen (Abb. 1-11). Die Exons zwei bis acht kodieren zwölf Transmembrandomänen, die LMP2A in der Zytoplasmamembran verankern, gefolgt von einem kurzen, 27 AS langen Carboxyterminus, der sich wiederum auf der zytosolischen Seite der Membran befindet. Exon neun ist nicht kodierend. LMP2B teilt

sich die Exons zwei bis neun mit LMP2A, so dass es mit Ausnahme der 119 aminoterminalen AS, identisch mit LMP2A ist (SAMPLE et al. 1989).

Die zwölf Transmembrandomänen von LMP2A sind in Verbindung mit den 27 AS des Carboxyterminus für die Oligomerisierung von LMP2A Proteinen, sowie deren Lokalisierung in Cholesterin- und Sphingolipid-reichen Membranbereichen, den so genannten „lipid rafts“, verantwortlich (MATSKOVA et al. 2001; KATZMAN and LONGNECKER 2004). Die 119 AS des zytoplasmatischen Aminoterminus verleihen LMP2A seine signaltransduzierende Aktivität (BEAUFILS et al. 1993). Dabei weisen sie strukturelle Homologien zu den zytoplasmatischen, signaltransduzierenden Domänen der $Ig\alpha/Ig\beta$ Korezeptoren des BZR-Komplexes auf. Die bedeutendste Gemeinsamkeit stellt dabei das ITAM Motiv dar (Abb. 1-1; Abb. 1-4), welches sowohl bei LMP2A, als auch bei $Ig\alpha/Ig\beta$ ursächlich an der Signaltransduktion beteiligt ist (siehe auch Abschnitt 1.2.3.1). Für LMP2A, wie auch für $Ig\alpha/Ig\beta$, konnte gezeigt werden, dass SYK mit dem phosphorylierten ITAM interagiert (FRUEHLING and LONGNECKER 1997; FRUEHLING et al. 1998). Zusätzlich finden sich in der aminoterminalen Domäne von LMP2A weitere Motive, die für die Signaltransduktion von Bedeutung sind (Abb. 1-11). Tyrosin 112 wird im Kontext des YEEA-Motivs von LYN phosphoryliert und gebunden (ROVEDO and LONGNECKER 2008), wodurch LYN konstitutiv mit LMP2A interagiert und weitere Tyrosine, inklusive derjenigen des ITAM Motivs, phosphoryliert. PY-Motive mit der Konsensussequenz PPPPY sind Bindestellen für die WW-Domänen Nedd4-ähnlicher Ubiquitin-Ligasen (IKEDA et al. 2001; PARK et al. 2005). Ubiquitinierung von LMP2A hat dessen Internalisierung und Degradation zur Folge, wodurch die relative Halbwertszeit von LMP2A verkürzt wird. Weitere Tyrosine und Serine stellen potentielle Phosphorylierungsstellen dar, welchen jedoch noch keine spezifische Funktion zugeordnet werden konnte. Ebenso wenig ist über Prolin-reiche Regionen von LMP2A bekannt, welche potenzielle Bindestellen für Proteine mit SH3-Domänen darstellen.

1.4 Motivation und Zielsetzung

Erkenntnisse aus verschiedenen Experimenten führten in der Vergangenheit zu der Annahme, dass LMP2A in der Lage ist, die Funktionen des BZRs zu ersetzen. Untersuchungen an Mäusen, die LMP2A als Transgen in den frühen B-Zellen des Knochenmarks exprimieren, zeigten, dass diese Mäuse BZR-negative reife B-Zellen entwickelten (CALDWELL et al. 1998). Ohne LMP2A überleben BZR-negative B-Zellen nicht. *In vitro* ist LMP2A essenziell für die Transformation BZR-negativer Keimzentrums-B-Zellen, da eine LMP2A-negative Mutante von EBV nicht in der Lage ist, solche primären, humanen, B-Zellen zu immortalisierten, lymphoblastoiden B-Zellen zu transformieren (MANCAO and HAMMERSCHMIDT 2007). Im Einklang mit dieser Feststellung stehen die Ergebnisse einer Untersuchung von Gewebeproben aus Hodgkin-Lymphomen. Die malignen Zellen des Hodgkin-Lymphoms, die so genannten Hodgkin-Reed-Sternberg-Zellen (HRS-Zellen), sind transformierte Keimzentrums-B-Zellen. In ca. 40 % aller Hodgkin-Lymphome sind die HRS-Zellen EBV-positiv. Die EBV-Infektionsrate liegt bei 100 %, wenn ausschließlich solche HRS-Zellen betrachtet werden, die nicht-funktionelle Immunglobulingene tragen, die aufgrund der SHM während der Keimzentrumsreaktion (Abb. 1-3) zerstört wurden (Ralf Küppers 2009, bisher unveröffentlichte Ergebnisse). EBV scheint also auch *in vivo* in der Lage zu sein, das Überleben BZR-negativer Keimzentrums-B-Zellen zu sichern (Abb. 1-12).

Auf molekularer Ebene wurde die Interaktion von LMP2A mit verschiedenen Signalmediatoren gezeigt, die auch charakteristisch für den BZR sind (vgl. Abb. 1-11). Eine systematische Untersuchung der Signalwege, die von LMP2A aktiviert werden, war jedoch aufgrund der konstitutiven Aktivität von LMP2A bisher nicht möglich. Deshalb basiert der aktuelle Erkenntnisstand über die Signalwege von LMP2A auf Experimenten, die in der Regel in artifiziellen Systemen durchgeführt wurden. LMP2A wurde meist in nicht-humanen B-Zellen überexprimiert und daher ohne den viralen Hintergrund von EBV untersucht. Auch Unterschiede zwischen LMP2A-positiven und -negativen LCLs lassen nicht immer auf unmittelbare Folgen der Aktivität von LMP2A schließen, da stets zwei verschiedene Zelllinien mit individuellen Charakteristika verglichen werden. Dennoch weisen die Ergebnisse dieser Experimente auf Parallelen zwischen den Signalwegen von LMP2A und jenen des BZRs hin (PORTIS and LONGNECKER 2004; ANDERSON and LONGNECKER 2008).

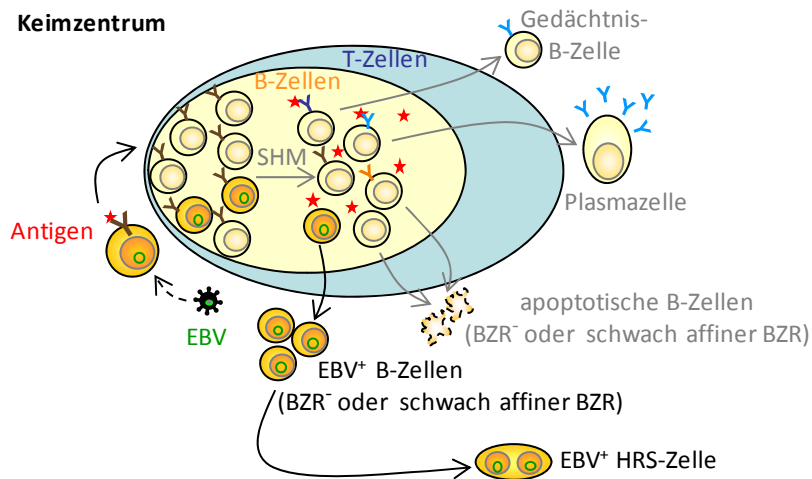


Abb. 1-12: EBV rettet B-Zellen vor negativer Selektion im Keimzentrum

EBV Proteine ahmen während der Keimzentrumsreaktion die Funktion wichtiger zellulärer Proteine nach. Unvorteilhafte Mutationen des Ig-Gens während der SHM in Keimzentren führen B-Zellen in die Apoptose (Abb. 1-3). EBV-infizierte B-Zellen exprimieren virale Proteine, von welchen sie mit Überlebenssignalen versorgt werden, so dass ein Überleben ohne funktionellen BZR möglich wird. Solche BZR-negativen, effektorfunktionslosen B-Zellen können letztlich z.B. zu malignen HRS-Zellen differenzieren und ursächlich an der Entstehung eines Hodgkin-Lymphoms beteiligt sein. (HRS: Hodgkin-Reed-Sternberg)

Aus den beschriebenen Erkenntnissen folgt die Annahme, dass LMP2A sowohl die Signaltransduktion als auch die Funktion des BZRs nachahmen und ersetzen kann. In deutlichem Widerspruch zu dieser Aussage steht eine Reihe weiterer Experimente, welche die Funktion des BZRs in Gegenwart von LMP2A untersuchten. Wird der BZR in B-Zellen stimuliert, die LMP2A exprimieren, so kann keine Aktivierung der bekannten Signaltransduktionswege detektiert werden. Die Phosphorylierung von Tyrosin-Kinasen wie auch der Einstrom von Ca^{2+} -Ionen in das Zytosol bleiben aus (MILLER et al. 1993; MILLER et al. 1994a; MILLER et al. 1995). Auch die Fähigkeit des BZRs, EBV aus dem latenten Zustand zu reaktivieren, scheint in Gegenwart von LMP2A blockiert zu sein (MILLER et al. 1994b). Als zugrunde liegende Mechanismen werden der Ausschluss des BZRs aus lipid rafts (DYKSTRA et al. 2001) sowie die gemeinsame Degradation von LMP2A und assoziierten Tyrosin-Kinasen, wie z.B. Lyn und Syk, nach Ubiquitinierung durch Nedd4-ähnliche Ubiquitin-Ligasen, genannt (vgl. Abb. 1-11) (WINBERG et al. 2000).

Dieser Blockade-Mechanismus von LMP2A gegenüber dem BZR steht im Widerspruch zu der Eigenschaft von LMP2A den BZR nachzuahmen. Es stellt sich deshalb die Frage, ob LMP2A tatsächlich diese beiden gegensätzlichen Funktionen ausübt, oder ob die Interpretationen bisheriger Ergebnisse und die daraus resultierenden Modellvorstellungen nicht zutreffen.

Um diese kontrovers diskutierten und widersprüchlichen Erkenntnisse zu klären, sollte ich im Rahmen meiner Promotionsarbeit einen systematischen Vergleich der Funktionen von LMP2A und dem BZR durchführen. Diese Untersuchungen sollten vor dem natürlichen Hintergrund EBV-infizierter humaner B-Zellen stattfinden, um möglichst nahe der *in vivo* Situation die Aktivierung von Signalwegen durch LMP2A bzw. BZR, sowie deren Einfluss auf die Regulierung der Genexpression und die Reaktivierung von EBV zu analysieren.

2 Material

2.1 Antikörper

2.1.1 Antikörper für die Stimulierung von Zellen

Spezifität	Spezies	Molekül	Bezugsquelle	Bemerkung
Anti-mCD69	Armenischer Hamster	H+L	Hybridomüberstand aus eigener Zellkultur, gereinigt von E. Kremmer	Klon H1.2F3
Anti-armenischer Hamster	Ziege	H+L	Dianova	
Anti-IgG/M	Ziege	H+L	Dianova	
Anti-IgG	Ziege	H+L	Dianova	nur für Abs. 4.3.3
Anti-IgG	Ziege	(Fab) ₂	Dianova	nur für Abs. 4.3.3
Anti-IgM	Ziege	H+L	Dianova	nur für Abs. 4.3.3
Anti-IgM	Ziege	(Fab) ₂	Dianova	nur für Abs. 4.3.3
Anti-Ziege	Rind	H+L	Dianova	nur für Abs. 4.3.3

2.1.2 Antikörper für durchflusszytometrische Analysen

Spezifität	Spezies	Fluorochrom	Bezugsquelle	Bemerkung
Anti-IgM	Ziege	PE	Serotec	
Anti-IgG	Ziege	PE	Beckman Coulter	
Anti-mCD69	Armenischer Hamster	PE-Cy7	ebiosciences	Klon H1.2F3
Anti-pSYK	Maus	Alexa Fluor®647	BD Biosciences	pTyr352
Anti-pBLNK	Maus	Alexa Fluor®647	BD Biosciences	pTyr84
Anti-pBTK	Maus	Alexa Fluor®647	BD Biosciences	pTyr551
Anti-pPLCγ2	Maus	Alexa Fluor®647	BD Biosciences	pTyr759
Anti-pAKT	Kaninchen	Alexa Fluor®647	Cell Signaling	pSer473
Anti-pERK	Maus	Alexa Fluor®647	BD Biosciences	pThr202, pTyr204
Anti-Igκ leichte Kette	Maus	APC	CALTAG	

Spezifität	Spezies	Fluorochrom	Bezugsquelle	Bemerkung
Anti-Igκ leichte Kette	Maus	APC	Invitrogen	
Anti-Igλ leichte Kette	Maus	PE	BD Biosciences	
Anti-Igλ leichte Kette	Maus	PE	Invitrogen	

2.1.3 Antikörper für Westernblotanalysen und Immunpräzipitation

Spezifität	Spezies	Konjugat	Bezugsquelle	Bemerkung
Anti-LMP2A	Ratte		E. Kremmer, HMGU	Hybridomüberstand Klon 14B7
Anti-pTyr	Maus		Cell Signaling Technology	
Anti-BCL10	Ziege		Santa Cruz Biotechnology	Klon C17
Anti-BCL10	Maus		Santa Cruz Biotechnology	Klon 331.3
Anti-CARMA1	Kaninchen		Cell Signaling Technology	Klon 1D12
Anti-IκBα	Kaninchen		Santa Cruz Biotechnology	Klon C21
Anti-CENP-A	Kaninchen		Lifespan Biosciences	Klon EP8004
Anti-Zta (BZLF1)	Maus		E. Kremmer, HMGU	Hybridomüberstand Klon AZ1
Anti-Ratte	Ziege	HRP	Cell Signaling Technology	
Anti-Maus	Pferd	HRP	Cell Signaling Technology	
Anti-Kaninchen	Ziege	HRP	Promega	

2.2 Oligonukleotide

2.2.1 DNA-Oligonukleotide

Alle DNA-Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion (Martinsried) synthetisiert. Die Sequenzen sind in 5'-3'-Richtung aufgeführt.

Bezeichnung	Sequenz
BZLF1-F2	AAGCCACCCGATTCTTGTATCG
BZLF1-B2	CAGCAGCAGCAGTGGTGTGG
BMR1-F10	CCAGACATACGGTCAGTCCATCTC
BMR1-B13	TGCTTCACTTTCTTGGGGTGC

Bezeichnung	Sequenz
BLLF1-F	ACCGAGCATTCTGTTTTTACGC
BLLF1-B	GATGTCTACTTTCAAGATGTGTTTGAAC
ICYC-F1	CCTGGTGGGCGTGTGCTAC
ICYC-B1	CAATGCTCCGTTGTTGGCAG
GAPDH-F3	GACATCAAGAAGGTGGTGAAGCAG
GAPDH-B4	AAGTGGTCGTTGAGGGCAATG
LMP2A 1 st exon-F	AGAAATGGTGCCAATGGGCG
LMP2A 1 st exon-B	TGTTGAGATGAGTCATCCCGTGG
c-MYC-F	GTCTCCCCTACCCTCTCAACG
c-MYC-B	GGAGCCTGCCTCTTTCCAC

2.2.2 siRNA-Oligonukleotide

Alle siRNA-Oligonukleotide wurden von der Firma Thermo Scientific Dharmacon synthetisiert. Die Sequenzen sind in 5'-3'-Richtung aufgeführt.

Bezeichnung	Sequenz / Katalognummer
Accell siGAPDH	D-001930-01-20
Accell SMARTpool non targeting	D-001910-10-50
Custom Accell SMARTpool LMP2A	CTATCAACCACTAGGAACC TGAGGAACGTGAATCTAAT GTCTGTAATTGGGATTGCA CCATCTGCTTCTGGCTCTT

2.3 maxiEBV Plasmide

Alle drei verwendeten maxiEBV-Plasmide waren bereits in der Arbeitsgruppe konstruiert worden. Lediglich p2525 wurde aus *E.coli* Bakterien präpariert (siehe Abschnitt 3). Eine detaillierte Beschreibung der Plasmide liefern die Abschnitte 4.1.1 und 4.2.1.

Bezeichnung Beschreibung

p2190	maxiEBV-Plasmid; phänotypisch Wildtyp-EBV; basiert auf p2089 (DELECLUSE et al. 1998); Promotor und erstes Exon von LMP2A „gefloxt“ (MANCAO and HAMMERSCHMIDT 2007)
p2525	maxiEBV-Plasmid; LMP2A-Knockout; basiert auf p2190; Promotor und erstes Exon von LMP2A entfernt durch Cre-vermittelte Rekombination in <i>E.coli</i> (MANCAO and HAMMERSCHMIDT 2007)
p3696	maxiEBV-Plasmid; induzierbares chimäres LMP2A; basiert auf p2525; zusätzliche Expressionskassette (CMV-Promotor und erstes Exon von LMP2A fusioniert mit der cDNA der Transmembrandomäne und des extrazellulären Bereichs des murinen CD69) in den nicht essenziellen BALF1 Lokus eingefügt

2.4 Eukaryotische Zellen und Bakterien

2.4.1 Bakterien

Bezeichnung	Stamm	Bemerkung
2525	DH5α (F-, lacI-, recA1, endA1, hsdR17, Δ(lacZYA-argF), U169, F80dlacZΔM15, supE44, thi-1, gyrA96, relA1)	DH5α <i>E.coli</i> Bakterien, stabil transfiziert mit dem maxiEBV-Plasmid 2525

2.4.2 Primäre B-Zellen

Primäre humane B-Zellen wurden aus frisch operativ entfernten Adenoiden von Kindern isoliert, die das fünfte Lebensjahr noch nicht vollendet hatten. Adenoide wurden von der Kinderklinik Dritter Orden in München, sowie dem Universitätsklinikum Großhadern, der Ludwig-Maximilians-Universität München bezogen.

2.4.3 Zelllinien

HEK293 *	Humane immortalisierte Zelllinie aus embryonalen Nierenepithelzellen, transformiert durch Transfektion mit DNA-Fragmenten des Adenovirus Typ 5 Genoms (GRAHAM et al. 1977); (HEK: engl. human embryonic kidney)
HEK293/2190 *	HEK293-Zelllinie, stabil transfiziert mit dem maxiEBV-Plasmid 2190 zur Produktion infektiöser EBV-Partikel des Genotyps 2190
HEK293/2525.18K **	Subklon der HEK293/2525-Zelllinie, stabil transfiziert mit dem maxiEBV-Plasmid 2525 zur Produktion infektiöser EBV-Partikel des Genotyps 2525
H1.2F3 *	Hybridomzelllinie für die Produktion monoklonaler Antikörper gegen murines CD69
Raji *	Humane, EBV-positive Burkitt-Lymphom-Zelllinie zur Bestimmung der Titer von Virusüberständen aus HEK293/2190 oder HEK293/2525.18K (PULVERTAFT 1964)
SU-DHL-6 ***	Humane, EBV-negative B-Zelllinie aus Peritonealguss eines 43-jährigen Non-Hodgkin-Lymphom Patienten (EPSTEIN et al. 1978)
B95.8 *	Lymphoblastoide Zelllinie, entstanden durch <i>in vitro</i> Infektion von B-Zellen von Marmoset-Affen (MILLER et al. 1972)
3696.10 LCL *	Klonale, lymphoblastoide Zelllinie, entstanden durch Infektion humaner adenoidaler B-Zellen mit 3696 EBV-Partikeln, die mithilfe der Verpackungszelllinie HEK293/TR ⁻ gewonnen wurden (DELECLUSE et al. 1999); im Folgenden als 3696 LCL bezeichnet.
2190 LCLs **	Lymphoblastoide Zelllinien, entstanden durch Infektion humaner adenoidaler B-Zellen mit 2190 EBV-Partikeln, die mithilfe der Zelllinie HEK293/2190 gewonnen wurden.
2525 LCLs **	Lymphoblastoide Zelllinien, entstanden durch Infektion humaner adenoidaler B-Zellen mit 2525 EBV-Partikeln, die mithilfe der Zelllinie HEK293/2525.18K gewonnen wurden.

*: Zelllinien aus dem Repertoire der Abteilung Genvektoren, HMGU

** : Selbst etablierte Zelllinien

***: freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Daniel Krappmann, HMGU

2.5 Zellkulturmedien und Additive

2.5.1 Medien und Additive für eukaryotische Zellen

Bezeichnung	Verwendungszweck	Bezugsquelle
RPMI 1640	Zellkulturmedium zur Kultivierung aller aufgeführten HEK293- und B-Zelllinien	Invitrogen GmbH
Optimem I	Zellkulturmedium für die Transfektion von HEK293 Zellen	Invitrogen GmbH
DMEM	Zellkulturmedium zur Kultivierung der Hybridomzelllinie H1.2F3	Invitrogen GmbH
Accell™ delivery medium	Zellkulturmedium für transfektionsfreies Einbringen von Accell™ siRNA in LCLs	Thermo Scientific Dharmacon®
Fötales Rinderserum (FBS)	Nährstoff als Zusatz für RPMI 1640	PAA Laboratories GmbH
Natriumpyruvat	Schützendes Antioxidans, Zusatz für RPMI 1640	Invitrogen GmbH
Penicillin / Streptomycin	Antibiotika zur Verringerung der Kontaminationsgefahr als Zusatz für RPMI 1640	Invitrogen GmbH
Natriumselenit	Schützendes Antioxidans, Zusatz für RPMI 1640	Sigma Aldrich
Hygromycin	Antibiotikum für die Selektion eukaryotischer Zellen, inhibiert die Proteinbiosynthese	PAA Laboratories GmbH
BSA	Nährstoff für kurzzeitige Kultivierung primärer B-Zellen	AppliChem
α -Thioglycerol und Bathocuproindisulfonsäure	Thiole als schützende Antioxidantien, Zusatz für RPMI 1640	Sigma Aldrich
HEPES	Puffer zur Stabilisierung des pH-Werts	Invitrogen GmbH
Nicht-essenzielle Aminosäuren	Steigern die Sekretion von Antikörpern in Hybridomzellkulturen (FASSNACHT et al. 1997)	Invitrogen GmbH

2.5.2 Medium und Additive für prokaryotische Zellen

Bezeichnung	Verwendungszweck	Bezugsquelle
LB-Medium	Flüssiges Nährmedium für die Vermehrung von Bakterien in Suspensionskulturen	Invitrogen GmbH
Select-Agar	LB-Medium mit 1,5 % Select-Agar als halbfestes Nährmedium für die Kultivierung von Bakterienkolonien	Invitrogen GmbH
Chloramphenicol	Antibiotikum für die Selektion stabil transformierter 2525- <i>E.coli</i> Bakterien	Sigma-Aldrich

2.6 Kommerzielle Kits

Bezeichnung	Verwendungszweck	Bezugsquelle
RNeasy Mini Kit	Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellen	Qiagen
DNase I Amplification Grade	Entfernung von DNA-Kontaminationen aus RNA-Präparationen	Invitrogen GmbH
SuperScript™ III First Strand cDNA Synthesis Kit	reverse Transkription zellulärer mRNA in cDNA	Invitrogen GmbH

2.7 Stammlösungen und Puffer

2.7.1 Präparation von maxiEBV-Plasmid-DNA

Lösung I	Lösung II	Lösung III
50 mM Glucose	0,2 M NaOH	600 ml KaAc [5M]
25 mM Tris-HCl, pH 8	0,1 % SDS	115 ml Eisessig
10 mM EDTA in H ₂ O	in H ₂ O	285 ml H ₂ O
Spezieller TE-Puffer, pH 8	CsCl-Lösung	TE-Puffer (normal)
50 mM Tris-HCl, pH 8	1,55 g/ml CsCl	10 mM Tris-HCl pH 8
20 mM EDTA in H ₂ O	in H ₂ O	1 mM EDTA in H ₂ O

2.7.2 Agarose-Gelelektrophorese

TAE-Laufpuffer

40 mM Tris
20 mM Essigsäure
1 mM EDTA

TBE-Laufpuffer

89 mM Tris
89 mM Borsäure
2 mM EDTA

Auftragspuffer

1 mg/ml Bromphenolblau
1 mg/ml Xylencyanol
50 % Sucrose

2.7.3 Durchflusszytometrie

FACS-Puffer

2 % FBS
in PBS

Färbungspuffer

0,5 % BSA
0,02 % Natriumazid
in PBS

Fixierungspuffer

4 % Paraformaldehyd
in PBS

100 x Färbungslösung (Calcium-Messungen)

2 µl Fura Red [10 mg/ml]
1 µl Fluo-4 [10 mg/ml]
28 µl Pluronsäure [10 % in H₂O]

2.7.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Trenngel (12 % Acrylamid) Σ 10 ml

4 ml Acrylamid 30%
1,66 ml Tris-HCl pH 8,9 [2 M]
66,7 µl EDTA [0,5M]
100 µl SDS [10 %]
10 µl TEMED
70 µl APS [10 %]
4,2 ml H₂O

Sammelgel (5 % Acrylamid) Σ 50 ml

6,7 ml Acrylamid 30%
7,5 ml Tris-HCl pH 6,8 [2 M]
400 µl SDS [10 %]
50 µl TEMED
350 µl APS [10 %]
36 ml H₂O

Laufpuffer (10x)

30 g Tris
144 g Glyzin
100 ml SDS [10 %]
H₂O bis Endvolumen 1 l

Auftragspuffer (5x Lämmli)

6,25 ml Tris-HCl pH 6,8 [2 M]
5 g SDS [10 %]
3,9 g DTT
0,2 % Bromphenolblau
25 ml Glycerin [50 %]
H₂O bis Endvolumen 50 ml

2.7.5 Westernblotanalysen

Blotpuffer (1x)

3 g	Tris
14 g	Glyzin
200 ml	Methanol
H ₂ O bis Endvolumen 1l	

Blockierungspuffer (allgemein)

5 g	Magermilchpulver
100 ml	PBS-T

Waschpuffer (PBS-T)

0,1 %	Monolaurat (Tween-20)
in PBS	

Blockierungspuffer (NFκB-Analysen)

3 g	BSA
100 ml	PBS-T

2.7.6 Zellyse und Immunpräzipitation

RIPA-Lysepuffer

50 mM	Tris-HCl pH 8
150 mM	NaCl
0,1 %	SDS
1 %	NP40
0,5 %	DOC

CoIP-Puffer (ohne Inhibitoren)

150 mM	NaCl
50 mM	HEPES pH 7,5
0,2 %	NP40 [10 %]
1 mM	Glyzerin

Protein G Sepharose

500 µl	Protein G
	Sepharose
1 ml	PBS

Inhibitor für 10ml RIPA*

1 Tablette	Complete Mini
	Protease
	Inhibitor, Roche

Inhibitoren für 10ml CoIP-Puffer*

1 Tablette	Complete Mini Protease Inhibitor, Roche
1 Tablette	PhosStop Phosphatase Inhibitor, Roche
10 µl	DTT [1 M]

*Puffer mit Inhibitoren wurden aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

2.8 Chemikalien und Enzyme

Bezugsquelle

Bezeichnung

AppliChem, Darmstadt	RNaseA, Lysozym
Biochrom AG, Berlin	PBS-Pulver
Carl Roth GmbH, Karlsruhe	Rotiphorese Gel30 (Acrylamid), Magermilchpulver
Fermentas, St. Leon-Rot	Größenstandards für Agarosegele und Polyacrylamidgele
GE Healthcare, München	Protein G Sepharose Fast Flow
Hoechst, Frankfurt	Hoechst-Farbstoff H33342
Invitrogen GmbH, Karlsruhe	Agarose, Fura Red, Fluo-4, Luria broth base, Pluronsäure, Select Agar, Trypsin-EDTA

Bezugsquelle	Bezeichnung
Merck-Eurolab GmbH, Darmstadt	Cäsiumchlorid (CsCl), Essigsäure, Ethanol, Ethidiumbromid, Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), Glucose, Glycerin, Glyzin, Ionomycin, Isopropanol, Kaliumacetat, Natriumazid, Natriumchlorid, Natriumdodecylsulfat, Natriumhydroxid, Paraformaldehyd, Salzsäure, Sucrose, Tetramethylethylen-diamin (TEMED), Triton-X-100, Xylencyanol
Promega, Mannheim	goTaq-Polymerase, 5x goTaq-Puffer, RNasin® RNase-Inhibitor, Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA)
Roche Diagnostics GmbH, Mannheim	Complete Mini Protease Inhibitor Tabletten, CyberGreen, dNTPs, PhosStop Phosphatase Inhibitor Tabletten, Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)
Sigma-Aldrich, München	Agarose, β -Mercaptoethanol, Bromphenolblau, Chloramphenicol, Dimethylsulfoxid (DMSO), Dithiothreitol (DTT), Monolaurat (Tween-20), NP40, Polyethylenimin (PEI), Ponceau S (Fluka ATX), Proteinase K

2.9 Geräte und Sonstiges

Bezugsquelle	Bezeichnung
AGFA, Köln	CP1000 Entwicklermaschine
Beckmann Coulter, Heidelberg	Particle Counter Z-Serie, Ultrazentrifuge L8-70M, Zentrifuge Avanti J-25
Becton Dickinson GmbH, Heidelberg	FACS-Calibur, Plastikreagenzgefäße
Bio-Rad Laboratories, USA	Mini Protean Tetra Cell (Aparatur für SDS-PAGE)
Biozym Scientific GmbH, Oldendorf	PCR-Reagenzgefäße
BIO-TEK Instruments Inc., USA	Universal Microplate Reader E2800
Henry Schein Vet GmbH, Hamburg	Bovivet Veterinärkanülen (2,1 mm)
Carl Roth GmbH, Karlsruhe	Einmalspritzen und Kanülen (0,9 mm)
Eastman Kodak Company, USA	Röntgenfilme XAR5
Eppendorf, Hamburg	Reaktionsgefäße verschiedener Volumina
GE Healthcare, München	Hybond™-ECL-Nitrozellulosemembran, ECL-Lösung, ECL-Plus-Lösung
Greiner Bio One, Solingen	Diverse Kunststoffartikel für Zellkultur und Laborarbeiten

Bezugsquelle	Bezeichnung
Hartenstein, Würzburg	Neubauer-Zählkammer
Hewlett Packard, USA	HP Scan-Jet G4050
Hitachi Koki Co., Ltd., Japan	Tischzentrifuge HIMAC CT15RE
HLC Biotech, Bovenden	Blockthermostat TK23
Hoefer Scientific Instruments, USA	Semidry Blottingsystem
Nunc GmbH, Wiesbaden	Zellkulturschalen, 96-Loch Platten, Cryotubes 1,8 ml,
Peqlab, Erlangen	Agarose-Gelelektrophorese-Kammern, Nanodrop ND-1000
Raytest, Straubenhardt	AIDA Alias Software
Roche Diagnostics GmbH, Mannheim	Light Cyclor
Schott, Mainz	Diverse Glasartikel
Stratagene, Heidelberg	Robocycler Gradient 96
Thermo Scientific, USA	Heraeus Multifuge 3L-R
Zeiss, Göttingen	Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200M

3 Methoden

3.1 Arbeiten mit Bakterien

Im Zusammenhang dieser Arbeit wurde ein stabil transfizierter Bakterienstamm rekultiviert um 2525 maxiEBV-Plasmid DNA zu isolieren.

3.1.1 Lagerung und (Re-)Kultivierung von Bakterien

Ein mit 2525 maxiEBV-Plasmid DNA stabil transfizierter DH5 α *E.coli* Stamm (Bezeichnung: 2525) war mit 16 % Glycerin versetzt und bei -80°C gelagert. Das MaxiEBV-Genom enthält ein Chloramphenicol-Resistenzgen. Mithilfe einer Impföse wurden Bakterien aus der eingefrorenen Kultur auf LB-Agarplatten, die mit 15 μ g/ml Chloramphenicol versetzt waren, ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Eine Bakterienkolonie wurde in 50 ml flüssigem LB-Medium, das mit 15 μ g/ml Chloramphenicol versetzt war, wiederum über Nacht bei 37 °C inkubiert. Für eine letzte Amplifikationsrunde wurden sechs mal 400 ml LB-Medium (versetzt mit 15 μ g/ml Chloramphenicol und 0,3 M NaCl) mit jeweils 150 μ l der 50 ml Kultur angeimpft und etwa 16 h bei 30 °C kultiviert, bis eine optische Dichte von 4,6 - 4,8 bei einer Wellenlänge von 600 nm erreicht war.

3.1.2 Präparation von maxiEBV-Plasmid-DNA aus *E.coli* Bakterien

Sechs mal 400ml der 2525 Bakterien (siehe oben) wurden bei 6000 rpm und 20 °C 15 min lang zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Bakterienpellet fortan im Eisbad weiter bearbeitet. Jedes der sechs Pellets wurde in 10 ml Lösung I resuspendiert und nach vollständiger Homogenisierung auf ein Endvolumen von 45 ml mit Lösung I aufgefüllt. Jede der sechs Suspensionen wurde mit 10 mg Lysozym versetzt, durch Wenden gemischt und für 10 min auf Eis inkubiert. Lösung II wurde unmittelbar vor der alkalischen Lyse der Bakterien frisch angesetzt. Pro Suspension wurden 58 ml Lösung II zugegeben, durch vorsichtiges Wenden vermischt und für 5-6 min auf Eis inkubiert. Die Bakterien wurden so nach dem Prinzip der alkalischen Lyse mit zusätzlicher Unterstützung von Lysozym lysiert. Die Neutralisation des pH-Wertes erfolgte durch Zugabe von jeweils 70 ml Lösung III, Mischen der Suspension durch Wenden und einer anschließenden Inkubationszeit von mindestens 30 min auf Eis. Im Anschluss wurden alle sechs Proben nochmals gemischt und 20 min lang bei 3000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Durch Filtrieren der Überstände über Gaze und

Faltenfilter wurde restliches Zellmaterial entfernt. Die Filtrate wurden vereint und auf vier 500 ml Flaschen verteilt. Die Fällung der DNA erfolgte durch Zugabe von 75 Vol% Isopropanol, der durch mehrmaliges Wenden mit dem Filtrat vermischt wurde. Nach einer Inkubationszeit von 10-30 min bei Raumtemperatur (RT) wurden die Proben 40 min lang bei 9000 rpm und 20 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Pellets nach Zugabe von jeweils 200 ml Ethanol [80 %] durch Schwenken von der Flaschenwand gelöst. Einer erneuten Inkubationszeit von 5 min bei RT folgte eine 20-minütige Zentrifugation der Proben bei 9000 rpm und 20 °C. Anschließend wurde das DNA-Pellet mindestens 5 min lang getrocknet, wobei Ethanolreste zuvor mit einer Pipette entfernt wurden. 40 ml des speziellen TE-Puffers wurden nach Pelletgröße auf die vier Flaschen verteilt und die Pellets durch Inkubation auf einem Schüttler bis zu 1 h lang bei RT gelöst. Um RNA-Kontaminationen zu entfernen, wurden die gelösten DNA-Proben vereint und 15 min lang bei 37 °C mit 400 µg RNaseA inkubiert. Proteinkontaminationen wurden durch Zugabe von 4-6 mg Proteinase K und einer Inkubationszeit von 45 min bei 50 °C entfernt. Um zuletzt die maxiEBV-Plasmid-DNA von der bakteriellen DNA zu trennen, erfolgte eine CsCl-Dichtegradienten-Zentrifugation. Dazu wurden die Proben zu je 20 ml auf zwei Reaktionsgefäße verteilt und das Füllgewicht wurde bestimmt. Das ermittelte Gewicht zzgl. 1 g ergab die Menge an CsCl, welche in mehreren Schritten bei 50 °C in der DNA-Lösung gelöst wurde. Nach vollständigem Auflösen des CsCl wurde jeweils 1 ml Ethidiumbromid [10 mg/ml] zugegeben und die Proben wurden in Ultrazentrifugenröhrchen (35 ml) überführt. Das restliche Füllvolumen wurde mit CsCl-Lösung [1,55 g/ml] aufgefüllt. Die Ultrazentrifugation erfolgte bei 38.000 rpm und 20 °C drei Tage lang in einem Festwinkelrotor. Nach drei Tagen hatte sich ein kontinuierlicher CsCl-Dichtegradient eingestellt. Das zugegebene Ethidiumbromid interkaliert in DNA, wobei DNA-Ethidiumbromid-Komplexe entstehen, deren Dichte geringer ist, als die Dichte reiner DNA. Plasmid-DNA ist ringförmig geschlossen und zusätzlich zur Doppelhelix-Struktur in sich verwunden (supercoiled). Sie steht deshalb unter Spannung und kann weniger Ethidiumbromid einbauen, als die bakterielle, linearisierte DNA. Die Dichte von Plasmid-DNA ist also höher als die Dichte linearisierter DNA, wodurch die beiden DNA-Typen in einem CsCl-Dichtegradienten voneinander getrennt werden. Die Bande der vollständig intakten Plasmid-DNA liegt dabei im Gradienten knapp unter der Bande der linearisierten DNA. Die Banden sind aufgrund des interkalierten Ethidiumbromids unter UV-Licht sichtbar. Die untere Bande wurde durch Anstechen des Ultrazentrifugenröhrchens mithilfe einer Spritze (Veterinär-

kanüle: 2,1mm Durchmesser) als reine Plasmid-DNA entnommen, während die bakterielle DNA im Röhrchen zurückblieb. Die Plasmid-DNA aus beiden Gradienten wurde vereint und in ein kleineres Ultrazentrifugenröhrchen (11,5 ml) überführt. Nach Zugabe von 0,5 ml Ethidiumbromid [10 mg/ml] wurde das Röhrchen mit der CsCl-Lösung aufgefüllt und wiederum drei Tage lang bei 38.000 rpm und 20 °C zentrifugiert. Die untere DNA-Bande aus dem Gradienten wurde in ein Glasröhrchen überführt. Das Ethidiumbromid wurde durch mehrmaliges Mischen mit CsCl-gesättigtem Isopropanol, der jeweils nach erfolgter Phasentrennung abgenommen und erneuert wurde, extrahiert. Die so gereinigte Plasmid-DNA-Lösung wurde in TE-Puffer im Verhältnis 1:5 verdünnt. Die Fällung der Plasmid-DNA erfolgte durch Zugabe von 80 Vol% Isopropanol. Nach 30-minütiger Zentrifugation bei 5000 rpm und 20 °C wurde das DNA-Pellet in 5 ml Ethanol (80 %) gewaschen und 10 min lang bei 5000 rpm und 20 °C zentrifugiert. Nachdem alle Ethanolreste entfernt bzw. verdampft waren, wurde das DNA-Pellet in 600 µl TE-Puffer aufgenommen und durch langsames Schwenken auf einem Schüttler bei 4 °C 1-3 Tage lang gelöst. Zur Kontrolle wurde die Plasmid-DNA mit drei verschiedenen Restriktionsenzymen (BamHI, XhoI, AgeI) verdaut. Die drei Proben wurden elektrophoretisch aufgetrennt (0,8 % Agarose in TAE-Puffer) und anhand des entstandenen Bandenmusters überprüft. Die DNA-Konzentration wurde nach Inkubation mit dem interkalierenden Farbstoff Hoechst H33342 in einem Fluorimeter gemessen.

3.2 Zellkultur

3.2.1 Kultivierung von Zellen

Alle Zellen wurden bei 37 °C unter einer Atmosphäre von 5 % CO₂ kultiviert. Als Kulturmedium für alle HEK293- und B-Zelllinien wurde RPMI 1640 mit 10 % FBS, 100 µg/ml Streptomycin, 100 IE/ml Penicillin, 1 mM Natriumpyruvat, 0,433 % α-Thioglyzerol, 20 µM Bathocuproindisulfonsäure (BCS) und 100 nM Natriumselenit versetzt. Dem Medium für stabil transfizierte HEK293-Zelllinien wurden zur Aufrechterhaltung des episomalen maxiEBV-Plasmids zusätzlich 80 µg/ml Hygromycin beigelegt. Primäre B-Zellen wurden nur für wenige Stunden in RPMI 1640 kultiviert, das lediglich mit 0,2 % BSA (0,8 µm steril filtriert) und 0,1 % β-Mercaptoethanol versetzt war. Die Hybridomzelllinie H1.2F3 wurde in DMEM Medium kultiviert, das mit 10 % FBS, 100 µg/ml Streptomycin, 100 IE/ml Penicillin, 5mM HEPES und 100 µM nicht-essenziellen Aminosäuren versetzt war. H1.2F3 Zellen

wachsen adhären und wurden in Zellkulturflaschen (175 cm²) kultiviert. HEK293-Zelllinien wurden adhären in Schalen kultiviert und alle drei bis vier Tage nach Benetzung mit Trypsin-EDTA im Verhältnis 1:5 bis 1:10 mit frischem Medium verdünnt. Alle anderen Zelllinien (siehe Abschnitt 2.4.3) wurden als Suspensionskulturen in Zellkulturflaschen kultiviert und nach drei bis vier Tagen im Verhältnis 1:5 mit frischem Medium verdünnt. Die Zelldichte von Suspensionskulturen wurde mithilfe eines Partikelzählers (Beckman Coulter) ermittelt.

3.2.2 Lagerung von Zellen

Für die langfristige Lagerung wurden Zellen in einer Lösung aus 10 % DMSO und 90 % FBS aufgenommen und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Der Einfriervorgang erfolgte stufenweise, um die Zellen schonend abzukühlen. Dabei wurden jeweils 10⁷ Zellen in 1 ml der Einfrierlösung aufgenommen und in spezielle Kunststoffröhrchen überführt (Nunc Cryotubes 1,8 ml). Die Röhrchen wurden in einer Einfrierbox (Nunc Cryobox) mit Isopropanolmantel langsam (ca. 1 °C/min) auf -80 °C gekühlt und nach etwa einer Woche für die langfristige Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt. Eingefrorene Zellen wurden wieder in Kultur genommen, nachdem sie in einem 37 °C warmen Wasserbad schnell aufgetaut wurden. Durch das Waschen in 35 ml vorgewärmtem Zellkulturmedium wurde DMSO entfernt. Anschließend wurden die Zellen in frischem Medium aufgenommen und wie beschrieben kultiviert.

3.2.3 Ernten von Hybridomzellüberstand

Für die Gewinnung monoklonaler Antikörper gegen murines CD69 wurde der Zellkulturüberstand von konfluent gewachsenen H1.2F3 Hybridomzellen einmal pro Woche geerntet. Die gesamte Kultur wurde dafür in Zentrifugenröhrchen überführt und 15 min lang bei 2500 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde zur Lagerung mit 0,02% NaAz versetzt. Die zentrifugierten Zellen wurden im Verhältnis 1:10 verdünnt und erneut in eine Zellkulturflasche ausgesät. Ein gesammeltes Gesamtvolumen von etwa 2 l Überstand wurde freundlicherweise von der AG Kremmer (HMGU) gereinigt.

3.2.4 Präparation primärer humaner B-Zellen

Adenoide sind lymphatische Organe des Nasopharynx, die bei Schwellung und Entzündung routinemäßig operativ entfernt werden. Für die Isolierung primärer humaner B-Zellen wurden ausschließlich Adenoide kleiner Kinder (bis max. 5 Jahre alt) verwendet, um die

Wahrscheinlichkeit einer EBV-Infektion des Spenders zu minimieren. Wenige Stunden nach Operation wurden die Adenoide mithilfe von Skalpell mechanisch zerkleinert. Die anschließende Filtration durch ein Zellsieb (100 µm Porengröße) diente zur Gewinnung einer Einzelzellsuspension. Eine Erythrozyten-Rosettierung der adenoidalen T-Zellen erfolgte durch Zugabe von 0,5 ml Schafsblut während einer Inkubationszeit von 15 min bei RT. Anschließend wurde die Zellsuspension mit PBS auf ein Volumen von 35 ml aufgefüllt. In ein Zentrifugenröhrchen (50 ml) wurden 15 ml einer 30%-igen Ficoll-Lösung (Dichte 1,077 g/ml) vorgelegt und mit der Zellsuspension überschichtet. Nach einer 45-minütigen Dichtegradienten-Zentrifugation bei 1850 rpm (750 x g) und 15 °C befanden sich die B-Zellen in der Interphase des Gradienten und wurden mit einer Pipette abgenommen. Ficollreste wurden durch dreimaliges Waschen der Zellen mit PBS entfernt (Zentrifugationsschritte: 1700 rpm, 1500 rpm, 1200 rpm, jeweils 7 min lang bei 15 °C). Die so gewonnenen primären B-Zellen wurden in Kulturmedium aufgenommen, mithilfe einer Neubauer-Zählkammer gezählt und direkt verwendet.

3.2.5 Virusproduktion und Bestimmung von Virustitern

3.2.5.1 Transfektion von HEK293 Zellen mittels PEI

2525 maxi-EBV-Plasmide wurden in HEK293-Zellen transfiziert, um stabile Virusproduzenten herzustellen und diese anschließend für die Produktion von Viruspartikeln zu benutzen. Die Transfektion erfolgte mithilfe des kationischen Polymers Polyethylenimin (PEI), das mit der negativ geladenen maxi-EBV-DNA Komplexe bildet, die das Einschleusen der DNA in die Zelle ermöglichen. 24 h vor der Transfektion wurden 2×10^5 Zellen pro Vertiefung einer 6-Loch-Platte ausgesät. Für die Transfektion wurde das Kulturmedium durch 1 ml Optimem (ohne Zusätze) ersetzt. Pro Loch wurde ein Transfektionsansatz wie folgt vorbereitet:

Lösung A: 500 µl Optimem + 1 µg maxiEBV-DNA

Lösung B: 500 µl Optimem + 5 µl PEI [1 mg/ml]

Beide Lösungen wurden zunächst separat gemischt und anschließend vereint. Nach einer Inkubationszeit von 15 min bei RT sollten sich DNA-PEI-Komplexe ausgebildet haben. Um das Volumen der Transfektionsreaktion möglichst gering zu halten, wurde das Optimem-Medium aus den 6-Loch-Platten abgesaugt und anschließend 1 ml Transfektionsansatz je Vertiefung zugegeben. Nach 5 h wurden 2 ml RPMI 1640 Medium (mit Zusätzen, ohne

Selektion) zugegeben. Nach weiteren 24 h wurde das Medium ersetzt durch RPMI 1640 mit Zusätzen und 80 µg/ml Hygromycin.

3.2.5.2 Etablierung stabil transfizierter, klonaler HEK293 Zelllinien

Einen Tag nach der Transfektion mit maxiEBV-DNA wurden HEK293-Zellen aus der Vertiefung einer 6-Loch-Platte (ca. 10 cm²) in eine Zellkulturschale (ca. 170 cm²) umgesetzt und in 25 ml RPMI 1640 (mit Zusätzen und 80 µg/ml Hygromycin) kultiviert. Durch die starke Verdünnung waren die Zellen in der Kulturschale vereinzelt. Stabil transfizierte Zellen proliferierten und bildeten nach zwei bis vier Wochen makroskopisch sichtbare, klonale Kolonien aus. Einzelne Kolonien wurden in 6-Loch-Platten transferiert und weiter expandiert.

3.2.5.3 Induktion der Virusproduktion in HEK293-Zelllinien

Für die Produktion von Viruspartikeln wurden 2×10^5 stabil transfizierte Zellklone in eine Vertiefung einer 6-Loch-Platte ausgesät. Nach 24 h wurde das Kulturmedium durch 1ml Optimem ersetzt und die Zellen wurden mithilfe von PEI (siehe Abschnitt 3.2.5.1) mit den Expressionsplasmiden für BZLF1 (p509) und BALF4 (p2670) transfiziert, um die Produktion von Viruspartikeln zu induzieren. Der Transfektionsansatz setzte sich dabei wie folgt zusammen:

Lösung A: 100 µl Optimem + 0,5 µg p509 + 0,5 µg p2670

Lösung B: 100 µl Optimem + 4 µl PEI

Nach 15-minütiger Inkubation bei RT wurde der Ansatz auf die Zellen gegeben, ohne das Optimem-Medium vorher abzusaugen. Nach 5h wurde Optimem durch RPMI 1640 (mit Zusätzen, ohne Hygromycin) ersetzt und die Zellen wurden drei Tage lang kultiviert. Anschließend wurde der Kulturüberstand, der die produzierten Viruspartikel enthält, in ein Zentrifugenröhrchen überführt und 15 min lang bei 2500 rpm und RT zentrifugiert, um zelluläre Bestandteile zu pelletieren und zu entfernen.

3.2.5.4 Bestimmung von Virustitern

Um Virustiter der Kulturüberstände lytisch induzierter HEK293/maxiEBV-Zellen zu bestimmen, wurden Raji-Zellen in 24-Loch-Platten ausgesät (2×10^5 Zellen/Loch in 2ml Gesamtvolumen) und mit unterschiedlichen Mengen eines Virusüberstandes infiziert. Infizierte Raji-Zellen exprimieren GFP (engl.: green fluorescent protein; kodiert durch

maxiEBV-DNA), so dass die Anzahl infizierter Zellen mittels Durchflusszytometrie nach drei Tagen ermittelt werden konnte. Aus der Anzahl GFP-positiver Raji-Zellen (Green Raji Units, GRUs) konnte folglich die Anzahl infektiöser EBV-Partikel in einer bestimmten Menge Virusüberstand errechnet werden.

3.2.6 Etablierung klonaler lymphoblastoider Zelllinien

Die Etablierung klonaler LCLs wurde nach dem Prinzip des „limiting dilution assays“ (FRISAN et al. 2001) durchgeführt. Hierbei wird eine geringe Menge primärer B-Zellen mit einer limitierenden Anzahl infektiöser Viruspartikel inkubiert um dabei letztlich nur eine einzige Zelle zu infizieren. Diese Zelle wird durch Infektion transformiert, beginnt zu proliferieren und wird damit zu einer klonalen lymphoblastoiden Zelllinie.

In jede Vertiefung einer 96-Loch-Platte (insgesamt 2,5 Platten) wurden 5×10^4 primäre B-Zellen in 200 μ l RPMI 1640 (mit Zusätzen) ausgesät. Eine halbe Platte (48 Vertiefungen) blieb zur Kontrolle uninfiziert. Zu den übrigen vier halben Platten wurden unterschiedliche Mengen infektiöser EBV-Partikel gegeben: 10 GRU/Loch; 30 GRU/Loch; 100 GRU/Loch; 300 GRU/Loch (GRU: Green Raji Unit, siehe Abschnitt 3.2.5.4). Die Zellen wurden sechs bis acht Wochen lang kultiviert, wobei wöchentlich 100 μ l Medium/Loch durch frisches Kulturmedium ersetzt wurden. Infizierte, transformierte B-Zellen proliferieren. Die Anzahl der Vertiefungen der 96-Loch-Platten, in welchen proliferierende LCLs detektiert werden konnten, wurde durch makroskopische und mikroskopische Betrachtung ermittelt. Nach statistischen Berechnungen von Frisan et al. wurde durchschnittlich genau eine Zelle pro Loch infiziert, wenn in mindestens 37 % der Löcher keine proliferierenden Zellen detektiert werden können. In beiden 96-Loch-Platten galt für alle vier unterschiedlichen Virusverdünnungen, dass in mehr als 40 % der Löcher keine Infektion und Transformation von Zellen stattgefunden hatte. Deshalb wurden alle LCLs, die aus diesem Versuch etabliert werden konnten als klonale LCLs betrachtet.

Der beschriebene Versuch wurde sowohl unter Verwendung von 2190 EBV als auch 2525 EBV durchgeführt. So konnten 34 klonale 2190 LCLs und 27 klonale 2525 LCLs etabliert werden.

3.3 Durchflusszytometrische Methoden

3.3.1 Detektion von charakteristischen Oberflächenmolekülen

Die Detektion der Ig κ oder Ig λ leichten Ketten, sowie des murinen CD69 erfolgte mittels Durchflusszytometrie (FACS Calibur, Beckton Dickinson). Für eine Färbung wurden 5×10^5 Zellen in FACS-Puffer gewaschen und anschließend in 50 μ l FACS-Puffer resuspendiert. Die verwendeten Antikörper waren direkt an Fluorochrome gekoppelt und wurden 15min lang auf Eis im Dunkeln mit den Zellen inkubiert (Verdünnung der Antikörper, siehe unten). Die Zellen wurden anschließend in FACS-Puffer (4 °C) gewaschen und für die Messung in 200 μ l FACS-Puffer resuspendiert. Als Negativkontrolle für die spezifische Färbung von Oberflächenmolekülen wurden Zellen mit irrelevanten Antikörpern desselben Isotyps und Fluoreszenzfarbstoffs inkubiert.

Antikörperverdünnungen in PBS:

Anti-Ig κ -APC (CALTAG):	0,3 μ l pro 50 μ l Zellsuspension
Anti-Ig κ -APC (Invitrogen)*:	0,5 μ l pro 50 μ l Zellsuspension
Anti-Ig λ -PE (BD Biosciences):	1,0 μ l pro 50 μ l Zellsuspension
Anti-Ig λ -PE (Invitrogen)*:	2,0 μ l pro 50 μ l Zellsuspension
Anti-mCD69-PE-Cy7 (ebiosciences):	1,0 μ l pro 50 μ l Zellsuspension

*Antikörper gegen die leichten Ig-Ketten mussten zwischenzeitlich nachbestellt werden, wobei eine Bestellung der exakt gleichen Antikörper nicht mehr möglich war. Aus diesem Grund lassen die Versuche aus 4.1.2 keinen quantitativen Vergleich der BZR-Expression zwischen Zelllinien zu.

3.3.2 Phosphospezifische Durchflusszytometrie

In Anlehnung an die Angaben von BD Biosciences⁸ und Nolan et al.⁹, wurde für die intrazelluläre Färbung phosphorylierter Signalmediatoren ein Protokoll etabliert. 5×10^5 Zellen wurden mit den stimulierenden Antikörpern (siehe unten) 15 min lang auf Eis inkubiert und anschließend 10 min lang bei 37 °C im Wasserbad stimuliert. Danach wurden die Zellen im Verhältnis 1:1 mit vorgewärmtem Fixierungspuffer vermischt und weitere 10 min bei 37 °C inkubiert, um den Phosphorylierungszustand zu fixieren. Nach 7-minütiger Zentrifugation bei 300 x g und RT wurden die Zellen in 50 μ l des Überstandes resuspendiert

⁸ http://wwwbdbiosciences.com/support/resources/protocols/protocol_pbmcs.jsp

⁹ <http://proteomics.stanford.edu/nolan/phosphoflow/>

und mit 1 ml Methanol (4 °C) 30 min lang auf Eis inkubiert. Die Zellmembran wurde so permeabilisiert und das Zytoplasma für Antikörper zugänglich gemacht. Methanolreste wurden durch zweimaliges Waschen in Färbungspuffer entfernt. Die Zellen wurden in 50 µl Färbungspuffer resuspendiert. Die Färbung mit Phosphorylierungs-spezifischen Antikörpern erfolgte durch 30-minütige Inkubation bei RT im Dunkeln. 50 µl Zellsuspension wurden dabei jeweils mit 10 µl Antikörper gefärbt. Im Anschluss wurden die Zellen einmal mit Färbungspuffer gewaschen und für die durchflusszytometrische Analyse in 200 µl Färbungspuffer resuspendiert.

Stimulierung des BZR _s :	25 µg/ml Ziege anti-IgG/M
Stimulierung des LMP2A:CD69:	1 µg/ml armenischer Hamster anti-mCD69
	5 µg/ml anti-armenischer Hamster

3.3.3 Messung relativer Veränderungen der zytosolischen Ca²⁺-Konzentration

Veränderungen der zytosolischen Ca²⁺-Konzentration wurden mithilfe von Ca²⁺-bindenden Fluoreszenzfarbstoffen durchflusszytometrisch ermittelt. Der Farbstoff Fura Red emittiert Licht einer Wellenlänge von 685 nm, seine Fluoreszenzintensität sinkt nach Bindung von Ca²⁺-Ionen. Der Farbstoff Fluo-4 emittiert Licht einer Wellenlänge von 525 nm, wobei die Fluoreszenzintensität nach Bindung von Ca²⁺-Ionen steigt. 1 x 10⁶ Zellen wurden in PBS gewaschen und in 1 ml RPMI 1640 (ohne Zusätze) aufgenommen. Nach Zugabe von 10 µl der 100 x Färbungslösung (Abschnitt 2.7.3) wurden die Zellen 45 min lang bei 37 °C in einem Wasserbad im Dunkeln inkubiert. Dabei passieren die Fluoreszenzfarbstoffe Fura Red und Fluo-4 die Zellmembran und gelangen ins Zytosol, wobei die Membranpermeabilität der Farbstoffe durch Pluronsäure verbessert wird. Mit Farbstoff beladene Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen, in 500 µl RPMI 1640 (ohne Zusätze) aufgenommen und bis zur durchflusszytometrischen Messung in einem Wasserbad bei 37 °C aufbewahrt. Die Grundfluoreszenz unstimulierter Zellen wurde zunächst 1 min lang gemessen. Die Zellen wurden aus dem Durchflusszytometer entnommen, stimuliert (siehe unten), kräftig gemischt und direkt im Anschluss weiter gemessen. Die Rohdaten der Analyse wurden nach Beendigung der Messung mithilfe der FlowJo Software ausgewertet.

Stimulierung:	Positivkontrolle:	10 μ M	Ionomycin
	BZR-Stimulierung:	25 μ g/ml	anti-IgG/M
	LMP2A:CD69-Stimulierung:	1 μ g/ml	anti-mCD69
		5 μ g/ml	anti-armenischer Hamster

3.4 Protein-Arbeitstechniken

3.4.1 Zellyse und Messung der Proteinkonzentration

Für die Analyse mittels SDS-PAGE und Westernblot (Abschnitt 3.4.2) wurden Zellen 20 min lang auf Eis in RIPA-Puffer lysiert (ca. $1,5 \times 10^6$ Zellen je 35 μ l RIPA) und anschließend 10 min lang bei 4 °C und 21.000 x g zentrifugiert. Die Proteinkonzentration der Lysate wurde mittels Bradford-Assay bestimmt. Hierfür wurden in die Vertiefungen einer 96-Loch-Platte je 200 μ l Bradford-Reagenz (Bio-Rad) vorgelegt und mit 0,5 μ l Lysat vermischt. Bei einem Bradfordassay korreliert die Stärke der Absorption von Licht der Wellenlänge 595 nm mit der Proteinkonzentration der untersuchten Probe. Sie wurde mithilfe eines Mikroplatten-Lesegeräts (BIO-TEK) gemessen. Die Proteinkonzentration aller Lysate wurde in Duplikaten bestimmt. Bei jeder Messung wurden auch die Konzentrationen einer BSA-Standardreihe von 0,5 bis 10 μ g/ μ l gemessen.

3.4.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Westernblotanalyse

Die SDS-PAGE wurde mithilfe der Protean Mini Apparatur der Firma Bio-Rad durchgeführt. Gele wurden wie unter 02.7.4 beschrieben gegossen. Zelllysate, die quantitativ verglichen werden sollten, wurden zunächst mit RIPA-Puffer auf dieselbe Proteinkonzentration verdünnt und im Verhältnis 4 : 1 mit 5 x Lämmli-Puffer gemischt (wenn möglich 50 μ g Protein in ca. 25 μ l Gesamtvolumen). Die Proben wurden bei 100 °C 5 min lang im Sandbad gekocht, kurz abzentrifugiert und in die Taschen des Polyacrylamidgels geladen. Bei 180 V betrug die Laufzeit etwa 1,5 h. Für eine anschließende Westernblotanalyse wurde das Gel, sowie ein Stück Nitrozellulosemembran und Whatmanpapier in Blotpuffer getränkt. Mithilfe einer „Semidry“-Westernblotkammer (Hoefer) wurden die Proteine 1 h lang bei 22 V aus dem Gel auf die Membran transferiert. Der Proteintransfer wurde anschließend durch Anfärben der Membran mit Ponceau S überprüft. Die freien Bindungsstellen der Membran wurden durch einstündiges Schwenken in Blockierungspuffer besetzt. Die Inkubation der

Membran in einer Verdünnung des Primärantikörpers erfolgte bei 4 °C über Nacht. Ungebundene Antikörper wurden durch fünf Waschschriffe von jeweils 5 min in PBS-T entfernt. Anschließend wurde die Membran 45 min lang bei RT in einer Verdünnung des HRP-konjugierten Sekundär-antikörpers inkubiert und wiederum fünfmal 5 min lang in PBS-T gewaschen (HRP: engl. horseradish peroxidase). Nach Zugabe von ECL-Reagenz, dem Substrat der HRP, katalysiert diese eine Lumineszenzreaktion, so dass durch Auflegen eines Röntgenfilms die Antikörper-gebundenen Proteine auf der Membran detektiert werden konnten.

Antikörperverdünnungen in Blockierungspuffer:

Primärantikörper:		Sekundärantikörper:	
Anti-LMP2A:	1:50	Anti-Maus-HRP:	1:5000
Anti-BZLF1:	1:50	Anti-Ratte-HRP:	1:20000
Anti-pTyr:	1:1000	Anti-Kaninchen-HRP:	1:5000
Anti-CENP-A:	1:2500		

3.4.3 Immunpräzipitation

Die Analyse des CBM-Komplexes (Abschnitt 4.3.3) erfolgte durch Immunpräzipitation von BCL10 nach Stimulierung des BZR oder des LMP2A:CD69. Die Stimulierung erfolgte dabei wie unter 3.3.2 beschrieben, wobei für die Stimulierung des BZR verschiedene Antikörper getestet wurden (siehe 2.1.1). Als Positivkontrolle diente eine Stimulierung der Zellen mit 2 µg/ml PMA und 3 µg/ml Ionomycin. Die Immunpräzipitation erfolgte nach dem Protokoll der AG Krappmann (HMGU). Stimulierte Zellen wurden einmal in PBS (4 °C) gewaschen und anschließend in 900 µl CoIP-Puffer (4 °C, mit Inhibitoren) resuspendiert und lysiert. Alle weiteren Schritte wurden ebenfalls bei 4 °C durchgeführt. Die Lyse erfolgte während einer Inkubationszeit von 20 min in einem Drehrad. Durch 10-minütige Zentrifugation bei 15.000 rpm wurden Zelltrümmer aus dem Lysat entfernt. Das Lysat wurde 25 min lang mit 15 µl Protein G Sepharose in einem Drehrad inkubiert und anschließend 2 min lang bei 5000 rpm zentrifugiert, um Proteine zu entfernen, die unspezifisch an Protein G Sepharose binden. 30 µl des gereinigten Lysats wurden als Input-Probe zurückgehalten, mit Lämmli-Auftragungspuffer gemischt, 5 min lang gekocht und bei -20 °C aufbewahrt. Der Rest des Lysats wurde mit 3 µl des anti-BCL10 Antikörpers (C17) über Nacht in einem Drehrad inkubiert.

Anschließend wurden 30 µl Protein G Sepharose zugegeben und mit den Lysaten weitere 1-2 h lang in einem Drehrad inkubiert. Die Sepharose mit den gebundenen Antikörper-Protein-Komplexen wurde 3 x 10 min lang in 1 ml CoIP-Puffer (ohne Inhibitoren) gewaschen und danach jeweils 2 min lang bei 2000 rpm zentrifugiert. Gewaschene Protein G Sepharose wurde in 20 µl 2 x Lämmli-Auftragspuffer resuspendiert, 5 min lang gekocht und kurz abzentrifugiert. Der Überstand wurde wie unter 3.4.2 beschrieben auf ein Polyacrylamidgel geladen und mittels SDS-PAGE und Westernblot analysiert, wobei ein spezieller Blockierungspuffer verwendet wurde (siehe 2.7.5).

Antikörperverdünnungen in Blockierungspuffer, 1:1 verdünnt mit PBS-T:

Primärantikörper:		Sekundärantikörper:	
Anti-CARMA1:	1:1000	Anti-Maus-HRP:	1:5000
Anti-BCL10 (331.3):	1:1000	Anti-Kaninchen-HRP:	1:5000
Anti-IκBα:	1:2000		

3.5 DNA/RNA-Arbeitstechniken

3.5.1 Extraktion zellulärer RNA

Gesamtzelluläre RNA wurde mithilfe des „RNeasy Mini Kits“ der Firma Qiagen aus kultivierten Zellen isoliert. Die Zellen werden dabei zunächst in einem Puffer lysiert, der zugleich RNasen inaktiviert. Die Lysate werden durch mehrmaliges Passieren einer Einweg-Kanüle (0,9 mm Durchmesser) mithilfe einer Spritze homogenisiert. Die Reinigung der RNA erfolgt über ein silikatisches Säulenmaterial, das unter Hochsalzbedingungen selektiv RNA bindet. Kontaminierende Bestandteile des Zelllysats können so effizient ausgewaschen werden. Letztlich wird die RNA mit RNase-freiem Wasser von der Säule eluiert. Um eine maximale Ausbeute an RNA zu erreichen, wurde die Säule zunächst mit 50 µl H₂O und in einem zweiten Schritt nochmals mit 30 µl H₂O eluiert. Mit dieser Methode konnten aus 2 x 10⁶ Zellen ca. 24 µg RNA isoliert werden.

3.5.2 RNA-Analytik

Die RNA-Konzentration und Reinheit wurde mithilfe des Nanodrop ND1000 Photospektrometers (Peqlab) bestimmt. Nukleinsäuren absorbieren Licht einer Wellenlänge von

260 nm. Zusätzlich zur Konzentration der RNA können Kontaminationen durch Proteine oder Lösungsmittel aus dem RNA-Extraktionsprozess detektiert werden, die bei weiteren Schritten störend wirken. Aromatische Aminosäuren in Proteinen absorbieren Licht einer Wellenlänge von 280 nm, wohingegen das Absorptionsmaximum von Kohlehydraten und anderen Reagenzien bei 230 nm liegt. Die Absorptionsverhältnisse $A_{260/280}$ und $A_{260/230}$ geben folglich Auskunft über die Reinheit der RNA.

Die Integrität der RNA wurde vor einer genomweiten Genexpressionsanalyse von der Firma IMGM mithilfe eines Agilent-2100-Bioanalyzers bestimmt (siehe Abschnitt 4.4.2).

3.5.3 Reverse Transkription von mRNA in cDNA

Da RNA-Eluat des „RNeasy Mini Kits“ (Abschnitt 3.5.1) immer auch geringe Mengen an DNA enthalten, musste diese Kontamination vor einer reversen Transkription der RNA beseitigt werden. Hierfür wurden 2 µg isolierter RNA 90 min lang bei 37 °C mit 2 U DNase I, 2 µl 10 x DNase-Puffer (Invitrogen) und 1 µl rRNasin RNase-Inhibitor (Promega) inkubiert (Gesamt-Reaktionsvolumen von 20 µl mit H₂O aufgefüllt). Die DNase wurde anschließend durch 10-minütiges Erhitzen auf 65 °C inaktiviert. Eine PCR-Reaktion diente als Kontrolle des DNase-Verbaus. Hierbei durfte in RNA-Proben, die mit DNase behandelt wurden, nach 38 Zyklen kein DNA-Produkt nachweisbar sein.

Die reverse Transkription von mRNA in cDNA erfolgte mithilfe des „SuperScript™ III First-Strand Synthesis System“ der Firma Invitrogen. Hierbei wurde 1 µg RNA zusammen mit 0,05 nmol Oligo(dT)₂₀-Primern und 10 nmol dNTPs zunächst denaturiert (65 °C, 5 min). Die Bindung der Primer erfolgte anschließend durch einminütige Inkubation auf Eis. Nach Zugabe des cDNA-Synthese-Ansatzes (2 µl 10 x RT-Puffer, 4 µl MgCl₂ [25mM], 2 µl DTT [0.1M], 200 U SuperScript™ III reverse Transkriptase, 40 U RNaseOUT RNase-Inhibitor) erfolgte 50 min lang bei 50 °C die Synthese von cDNA. Durch 5-minütiges Erhitzen auf 85 °C wurde die Reaktion beendet. Verbliebene DNA-RNA-Hybride wurden durch Zugabe von RNaseH entfernt (37 °C, 20 min). Die erhaltene cDNA wurde bei -20 °C gelagert oder unmittelbar für (semi-)quantitative RT-PCR-Analysen weiter verwendet.

3.5.4 Semiquantitative Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR)

Die Durchführung semiquantitativer RT-PCR-Analysen erfolgte in einem Robocycler (Stratagene).

PCR-Ansatz	Primer-Konzentrationen	PCR-Programm
4 µl 5xPuffer goTaq (grün)	BZLF1-F2 [50 µM]	95 °C 5 min
0,4 µl Vorwärts-Primer (F)	BZLF1-B2 [50 µM]	<u>33 Zyklen:</u>
0,4 µl Rückwärts-Primer (B)	BMRF1-F10 [20 µM]	95 °C 1 min
0,4 µl dNTPs [10 mM]	BMRF1-B13 [20 µM]	57 °C 45 sec
0,6 µl DMSO	BLLF1-F [20 µM]	72 °C 1 min
13 µl H ₂ O	BLLF1-C [20 µM]	
1 µl cDNA	ICYC-F1 [10 µM]	72 °C 10 min
0,2 µl goTaq Polymerase [5 U/µl]	ICYC-B1 [10 µM]	6 °C ∞

Nach erfolgter PCR wurden die Proben mittels Agarose-Gelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt (Gel: 0,7 % Agarose in TBE-Puffer). Durch Anfärben mit Ethidiumbromid konnten die Banden der PCR-Produkte unter UV-Licht detektiert und anschließend semiquantitativ miteinander verglichen werden.

3.5.5 Quantitative RT-PCR

Quantitative RT-PCR-Analysen wurden mithilfe eines Light Cyclers (Roche) durchgeführt. Der Ablauf des verwendeten PCR-Programms wurde wie folgt programmiert:

<u>Schritt 1:</u>	<u>Schritt 2: 5 Zyklen</u>	<u>Schritt 3: 2 Zyklen</u>	<u>Schritt 4: 2 Zyklen</u>
95 °C 10 min	95 °C 1 sec	95 °C 1 sec	95 °C 1 sec
	65 °C 10 sec	64 °C 10 sec	63 °C 10 sec
	72 °C 10 sec	72 °C 10 sec	72 °C 10 sec
<u>Schritt 5: 35 Zyklen</u>	<u>Schritt 6:</u>	<u>Schritt 7:</u>	<u>Schritt 8:</u>
95 °C 1 sec	75 °C 3 sec	67 °C → 95 °C	30 °C halten
62 °C 10 sec		in 5 min	
72 °C 10 sec			

Alle PCR-Reaktionen wurden nach folgendem Protokoll angesetzt:

PCR-Ansatz	Primer-Effizienzen
0,25 µl Vorwärts-Primer (F) [10 µM]	BZLF1-F2/B2: 1,96
0,25 µl Rückwärts-Primer (B) [10 µM]	LMP2A 1 st exon-F/B: 1,9
6,7 µl H ₂ O	ICYC-F1/B1: 2,00
0,8 µl MgCl ₂ [25 mM]	c-MYC-F/B: 1,945
1 µl cDNA	GAPDH-F3/B4: 1,96
1 µl Cyber Green (Roche) (10 µl <i>1a</i> in 1 Röhrrchen <i>1b</i>)	

Die Effizienzen (E) der verwendeten Primerpärchen wurden anhand der Ergebnisse einer qRT-PCR-Analyse einer Konzentrationsreihe von cDNA-Verdünnungen mithilfe folgender Formel (PFAFFL 2001) ermittelt:

$$E = 10^{\left(-\frac{1}{\Delta CP / \Delta(\log[cDNA])} \right)}$$

CP: crossing point, ermittelt durch Light Cycler
 [cDNA]: Menge der eingesetzten cDNA

CytochromC (Primer ICYC-F1/B1) diente in allen qRT-PCR-Analysen als Referenzgen. Relative Unterschiede (U_{rel}) der Transkriptmengen verschiedener Proben wurden im Anschluß an eine PCR-Reaktion anhand folgender Formel (PFAFFL 2001) in Excel berechnet und als Balken- oder Liniendiagramm ausgegeben.

$$U_{rel} = \frac{(E_{Zielgen})^{\Delta CP_{Zielgen}(Kontrolle - Probe)}}{(E_{Referenzgen})^{\Delta CP_{Referenzgen}(Kontrolle - Probe)}}$$

E: Primer-Effizienz
 Kontrolle: unstimulierte Probe
 Probe: stimulierte Probe
 CP: crossing point, ermittelt durch Light Cycler

3.6 Genexpressionsanalyse mittels Microarray

Für die genomweite Expressionsanalyse zellulärer Gene mittels cDNA-Microarray (EXP0160, HG18 60mer, # A4542-00-01), wurde RNA wie unter 3.5.1 und 3.5.23.5.3 beschrieben isoliert und analysiert. RNA Proben wurden der Firma Roche NimbleGen übersandt, die alle weiteren Schritte durchführte. Eine detaillierte Beschreibung der Aktivitäten von Roche NimbleGen befindet sich im Anhang dieser Arbeit („Durchführung des Microarray Experiments durch Roche NimbleGen.pdf“: NimbleChip Arrays User’s Guide: Gene

Expression Analysis v2.0). Die wesentlichen Schritte sind im Folgenden nur kurz zusammengefasst.

Probenvorbereitung: 10 µg RNA wurden mithilfe des „Superscript Double-Stranded cDNA Synthesis Kit“ (Invitrogen) in doppelsträngige cDNA umgeschrieben. Durch einen Verdau mit RNase A wurden anschließend alle RNA-Reste entfernt. Die cDNA wurde durch Ethanolfällung gereinigt und in Reinstwasser aufgenommen. Qualität und Integrität der cDNA wurden mittels Nanodrop ND1000 und Agilent-2100-Bioanalyzer bestimmt, wie unter 3.5.2 beschrieben.

Fluorochrom-Markierung der cDNA-Proben: Mithilfe von 5'-Cy3-markierten Zufallsnucleotid-Oligonukleotiden (Cy3 9mer Wobble, Trilink Biotechnologies) wurde die cDNA mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy3 markiert.

Hybridisierung und Waschen der Microarrays: Die Hybridisierung der markierten cDNA-Proben auf dem Microarray erfolgte in einem NimbleGen Hybridisierungssystem unter Verwendung der Reagenzien des NimbleGen Hybridierungs Kits 16 - 20 h lang bei 42 °C. Hybridisierte Microarrays wurden nacheinander in drei Waschlösungen (NimbleGen Hybridierungs Kit) inkubiert und dabei jeweils 15 sec bis 1 min lang kräftig geschwenkt. Anschließend wurden die Arrays in einer Microarray Hochgeschwindigkeits-Zentrifuge getrocknet.

Scannen der Microarrays: Die Arrays wurden mit einem GenePix 4000B Scanner (Axon Instruments) bei einer Wellenlänge von 532 nm (Cy3) und einer Pixelgröße von 5 µm gescannt.

Mit der Auswertung der Scanner-Daten wurde die Firma MicroDiscovery beauftragt. Ein detaillierter Bericht befindet sich im Anhang dieser Arbeit, das Endergebnis wird unter 4.4.3 vorgestellt.

3.7 RNAi-Arbeitstechniken

3.7.1 Resuspendierung und Lagerung von Accell™ siRNA

Accell™ siRNA wurde lyophilisiert geliefert und musste vor Gebrauch resuspendiert werden. Für die Herstellung einer 100 µM Stammlösung wurde die siRNA in einem entsprechenden

Volumen 1 x siRNA-Puffer resuspendiert (5 x siRNA-Puffer im Verhältnis 1:4 in H₂O verdünnt, Wasser und Puffer von Thermo Scientific Dharmacon). Die Resuspendierung erfolgte durch 30-minütiges Schütteln bei RT. Die RNA-Konzentration wurde mithilfe eines Nanodrop ND1000 Photospektrometers (Peqlab) überprüft, sie sollte etwa 1300ng/μl betragen. Gelöste siRNA wurde aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

3.7.2 Behandlung von Zellen mit Accell™ siRNA

Für Knockdown-Experimente wurden jeweils 8×10^5 Zellen mit 2 nmol Accell™ siRNA behandelt. Die Zellen wurden dafür bei 300 x g 7 min lang zentrifugiert, in 2 ml Accell™ Delivery Medium aufgenommen, mit der siRNA vermischt und in eine Vertiefung einer 12-Loch-Platte transferiert. Nach 72 h Inkubation unter normalen Zellkulturbedingungen (siehe Abschnitt 3.2.1) wurden die Zellen entweder in ein Zentrifugenröhrchen überführt, abzentrifugiert und für die Präparation von RNA weiter verwendet (siehe Abschnitt 3.5.1), oder sie wurden weitere 1-2 Tage lang kultiviert. In diesem Fall wurde das Accell™ Delivery Medium nach 72 h gegen RPMI 1640 (mit Zusätzen) ausgetauscht. Maximal 5 Tage nach Zugabe der siRNA wurden die Zellen entweder mittels (semi-) quantitativer RT-PCR oder im Westernblot analysiert, wie unter 3.4 und 3.5 beschrieben.

3.7.3 Quantifizierung von RNAi-Effekten auf Proteinebene

Für die Quantifizierung von Proteinbanden einer Westernblotanalyse wurde der entwickelte Röntgenfilm zunächst mit einem Durchlichtscanner (HP Scan-Jet G4050) gescannt und als TIF-Datei (Tagged Image File Format) gespeichert. Die Intensität einzelner Banden wurde mithilfe der AIDA Alias Software (Raytest) densitometrisch bestimmt. So konnten die Banden einer Westernblotanalyse unter Berücksichtigung der Hintergrundfärbung des Röntgenfilms quantitativ miteinander verglichen werden.

4 Ergebnisse

4.1 Die Rolle von LMP2A bei der Transformation primärer B-Zellen *in vitro*

EBV infiziert *in vitro* mit großer Effizienz humane B-Lymphozyten unterschiedlicher Entwicklungsstadien und transformiert diese zu proliferierenden lymphoblastoiden Zelllinien (LCLs) (EHLIN-HENRIKSSON et al. 2003). Dieses charakteristische Merkmal von EBV wird für die Forschung ausgenutzt um aus primären humanen B-Zellen schnell und einfach LCLs zu generieren. LCLs sind ein Modellsystem für die Infektion und EBV-vermittelte Transformation von B-Zellen. Während latente EBV-Proteine wie EBNA1, EBNA2 und LMP1 (vgl. Abschnitt 1.3.2) erwiesenermaßen während des Immortalisierungsprozesses von B-Zellen eine Schlüsselrolle übernehmen (WANG et al. 1990; HAMMERSCHMIDT and SUGDEN 2004; ALTMANN et al. 2006), war eine essenzielle Funktion von LMP2A bei der Transformation von B-Zellen lange umstritten. Obwohl LMP2A zusammen mit oben genannten Proteinen stets sehr früh nach einer EBV-Infektion exprimiert wird, transformiert eine LMP2A defiziente EBV-Mutante humane B-Lymphozyten ebenso effizient wie Wildtyp-EBV (SPECK et al. 1999).

Bei detaillierterer Betrachtung konnte jedoch eine Rolle für LMP2A während der Transformation von B-Zellen nachgewiesen werden. Nachdem bekannt war, dass BZR-negative, pro-apoptotische Keimzentrums-B-Zellen (Abb. 1-3) *in vitro* durch eine Infektion mit EBV vor der Apoptose geschützt werden (BECHTEL et al. 2005; CHAGANTI et al. 2005; MANCAO et al. 2005), konnten Mancao und Hammerschmidt zeigen, dass diese Schutzfunktion von EBV durch LMP2A vermittelt wird (MANCAO and HAMMERSCHMIDT 2007). Die Funktion von LMP2A bei der Transformation humaner B-Zellen scheint darin zu bestehen, das Überleben pro-apoptotischer Keimzentrums-B-Zellen zu sichern um die Anzahl potenziell infizierbarer und transformierbarer B-Zellen drastisch zu erhöhen. Die Abhängigkeit dieser Zellen von der Expression und Funktionalität ihres BZR wird durch LMP2A aufgehoben. Aus diesem und weiteren Gründen (vgl. 1.4) ist anzunehmen, dass LMP2A die Funktionen des BZR ersetzen kann.

Für die Durchführung der Experimente von Mancao und Hammerschmidt wurden zwei EBV-Mutanten hergestellt, die im Folgenden detailliert vorgestellt werden, da sie auch für meine Arbeit von grundlegender Wichtigkeit waren.

4.1.1 Herstellung LMP2A-positiver und -negativer EBV-Mutanten

Die Zellen der Linie B95.8 sind lymphoblastoide Zellen, die durch Infektion von Marmoset-B-Lymphozyten mit EBV eines IM-Patienten (IM: infektiöse Mononukleose, Abschnitt 1.3.1) generiert wurden (MILLER et al. 1972). Delecluse et al. ist es gelungen, die zirkuläre EBV-DNA der B95.8 Zelllinie durch homologe Rekombination mit einem bakteriellen Plasmid zu vereinen, das in *E.coli* als eine Kopie in jeder Zelle vorliegt (DELECLUSE et al. 1998). In das EBV-Genom wurden der prokaryotische Replikationsursprung und die Partitionierungsproteine des F-Faktors integriert, um die stabile Aufrechterhaltung des ca. 180 kb großen Plasmids in Bakterien zu gewährleisten. Zusätzlich wurden ein Chloramphenicol-Resistenzgen für die bakterielle Selektion, ein Hygromycin-Resistenzgen für die eukaryotische Selektion, sowie das eGFP-Gen in das B95.8-EBV-Genom integriert. Das Plasmid, das das rekombinante EBV beinhaltet, wird als maxiEBV 2089 bezeichnet. Es erlaubt die Präparation reiner EBV-DNA sowie die Herstellung von EBV-Mutanten in *E.coli* Bakterien. Die rekombinante EBV-DNA dient u.a. zur Produktion von infektiösen Viruspartikeln in eukaryotischen Zellen (siehe Abschnitt 33.2.5). Primäre humane B-Zellen, welche *in vitro* mit 2089-Virus infiziert und zu LCLs transformiert werden, gleichen phänotypisch humanen B95.8-infizierten Wildtyp-LCLs, exprimieren aber zusätzlich den phänotypischen Marker GFP.

Basierend auf dem maxiEBV-Plasmid 2089 wurden für Untersuchungen des EBV-Proteins LMP2A zwei maxiEBV-Mutanten kloniert (Abb. 4-1) (MANCAO and HAMMERSCHMIDT 2007). MaxiEBV 2190 entstand durch das Einbringen von zwei LoxP-Stellen in das maxiEBV 2089. LoxP-Stellen dienen als Erkennungssequenzen für die ortsspezifische Cre-Rekombinase (Cre: engl. „causes recombination“). Cre katalysiert die Spaltung von LoxP-Stellen und die anschließende Neuverknüpfung von DNA. DNA-Bereiche, welche von zwei LoxP-Stellen flankiert werden, also „gefloxt“ sind, werden durch die Aktivität der Cre-Rekombinase deletiert und von der Zelle abgebaut, während die beiden verbleibenden DNA-Enden neu verknüpft werden. In dem maxiEBV 2190 sind die beiden LoxP-Stellen links und rechts des Promotors und ersten Exons von LMP2A platziert (Abb. 4-1). Da die eingefügten LoxP-Stellen keinen Einfluss auf die Funktionalität des 2089 maxiEBV haben, sind 2089 und 2190 LCLs phänotypisch identisch. Durch transiente Expression der Cre-Rekombinase in 2190-tragenden *E.coli* Bakterien konnte anschließend das maxiEBV-Plasmid 2525 gewonnen werden. Ihm fehlen der Promotor und das erste Exon von LMP2A. Die beiden verbleibenden

Hälften der loxP-Stellen wurden von der Cre-Rekombinase zu einer loxP-Stelle verknüpft (Abb. 4-1). Das maxiEBV 2525 entspricht somit einem LMP2A Knockout (Δ LMP2A), der jedoch die Expression von LMP2B und LMP1 nicht beeinträchtigt.

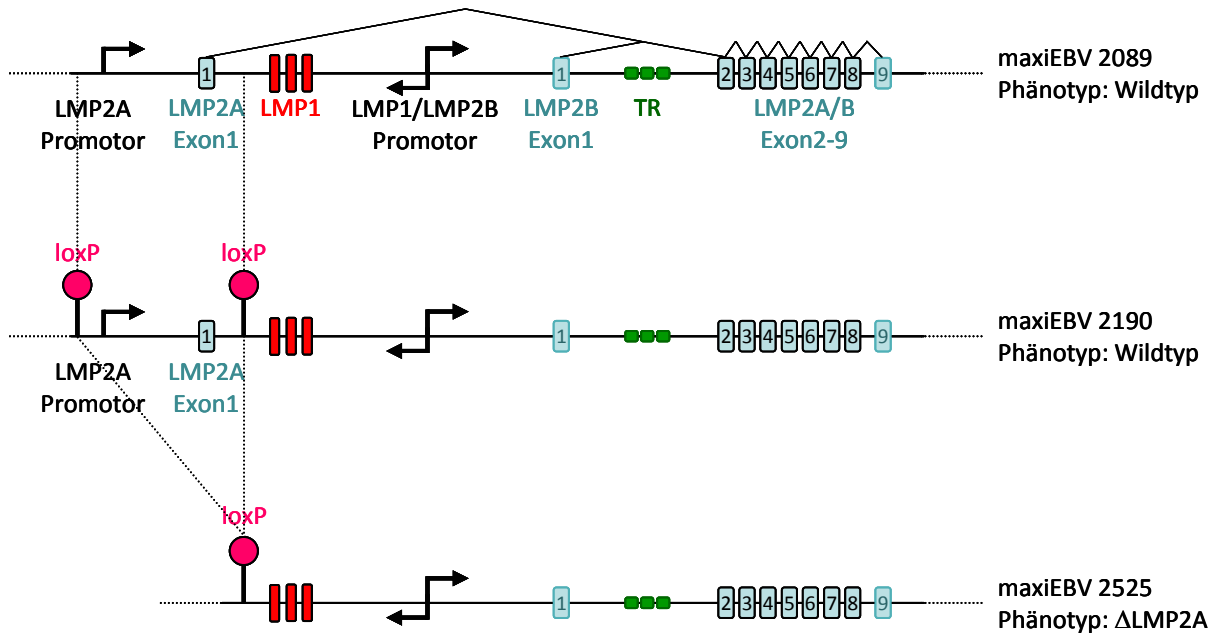


Abb. 4-1: LMP2A Genlokus in wtLCLs und Δ LMP2A LCLs

Das 2089 MaxiEBV-Plasmid basiert auf der DNA des EBV-Stamms B95.8, trägt jedoch zusätzlich ein Hygromycin-Resistenzgen und ein GFP-Gen. Mit 2089-Virus *in vitro* infizierte B-Zellen (2089 LCLs) gleichen phänotypisch B95.8 infizierten B-Zellen (ausgenommen der Expression von GFP). 2190 ist ein maxiEBV-Plasmid, welches auf 2089 basiert. Es enthält zusätzlich lediglich zwei Sequenzen, welche eine homologe Rekombination mithilfe der Cre-Rekombinase ermöglichen, die LoxP-Stellen. Diese flankieren den Promotor und das erste Exon des LMP2A-Genlokus. LoxP-Stellen *per se* verändern den Phänotyp infizierter Zellen nicht, sodass sich 2089 LCLs phänotypisch nicht von 2190 LCLs unterscheiden. Das maxiEBV-Plasmid 2525 wurde aus 2190-positiven *E.coli* Bakterien nach transienter Expression der Cre-Rekombinase gewonnen. Diesem maxiEBV fehlt folglich der Promotor und das erste Exon von LMP2A, was phänotypisch einem LMP2A-Knockout (Δ LMP2A) entspricht. LMP2B und LMP1 können nach wie vor exprimiert werden. (TR: terminal repeats)

4.1.2 B-Zell-Rezeptor-Expressionsniveaus variieren mit der Expression von LMP2A

In vitro kann EBV BZR-negative, pro-apoptotische Keimzentrums-B-Zellen vor der Apoptose schützen und diese zu LCLs transformieren. Diese Schutzfunktion wird von dem viralen Protein LMP2A vermittelt (siehe Seite 63).

Humane, EBV-negative Keimzentrums-B-Zellen lassen sich aus Adenoiden kleiner Kinder gewinnen (siehe Abschnitt 3.2.4). Adenoide (umgangssprachlich: Nasenpolypen) werden häufig aufgrund chronischer Entzündung chirurgisch entfernt. In diesen lymphatischen Organen befinden sich B-Zellen verschiedener Entwicklungsstadien: naive, reife B-Zellen,

Keimzentrums-B-Zellen, Gedächtnis-B-Zellen und Plasmazellen. Infiziert man diese gemischte Population humaner B-Lymphozyten *in vitro* mit 2190 oder 2525 EBV, also Wildtyp oder Δ LMP2A, lassen sich innerhalb weniger Tage LCLs etablieren. Eine Analyse der BZR-Expression auf der Oberfläche dieser LCLs zehn Tage nach Infektion zeigte, dass in 2190 wtLCLs die ursprüngliche Verteilung BZR-positiver (ca. 70 %) und -negativer (ca. 30 %) B-Zellen der Ausgangspopulation unverändert erhalten blieb. 2525 Δ LMP2A LCLs hingegen waren nach zehn Tagen ausschließlich BZR-positiv. Die BZR-negative Population von Keimzentrums-B-Zellen, welche am Tag der Infektion etwa 30 % der B-Zellen ausmachte, konnte nicht mehr detektiert werden (MANCAO and HAMMERSCHMIDT 2007). In einem ähnlichen Experiment bestand die Ausgangspopulation am Tag der Infektion ausschließlich aus sortierten, BZR-negativen Keimzentrums-B-Zellen. Hier war eine Transformation der Zellen zu LCLs nur mithilfe des 2190 wtEBV möglich, nicht jedoch mit 2525 Δ LMP2A EBV.

Das Resultat dieser *in vitro* Transformationsexperimente ließ vermuten, dass LMP2A einen fehlenden BZR ersetzen und BZR-negative B-Zellen mit den nötigen Überlebenssignalen versorgen kann. Unerwartet war jedoch das Ergebnis eines weiteren Experiments: Die Cre-vermittelte Deletion von LMP2A in stabil etablierten, BZR-positiven 2190 LCLs hatte letale Folgen für die Zellen (MANCAO and HAMMERSCHMIDT 2007). Eine mögliche Erklärung liegt in der Expressionsstärke des BZRs, welche in LMP2A-negativen 2525 LCLs wesentlich höher zu sein scheint, als in LMP2A-positiven 2190 LCLs. Die geringen Mengen des BZRs in LMP2A-deletierten 2190 LCLs wären folglich nicht in der Lage, ausreichend starke Überlebenssignale zu generieren.

Ein Vergleich der Funktionen von LMP2A und dem BZR auf molekularer Ebene sollte den molekularen und zellbiologischen Hintergrund dieser neuen Erkenntnisse aufdecken. Bevor diese vergleichenden Analysen jedoch erarbeitet wurden, galt es die beschriebenen Transformationsexperimente mit den EBV-Mutanten 2190 und 2525 zu reproduzieren. In sogenannten „limiting dilution assays“ wurde eine statistisch belastbare Anzahl klonaler Wildtyp und Δ LMP2A LCLs hergestellt, um diese auf die Expression eines BZRs an der Zelloberfläche hin zu untersuchen. Primäre humane B-Lymphozyten werden dabei in den Vertiefungen einer 96-Loch-Platte in geringem Volumen kultiviert und mit einer limitierenden Anzahl an Viruspartikeln infiziert, so dass maximal eine Zelle je Vertiefung infiziert wird (siehe Abschnitt 3.2.6). Infizierte Zellen werden transformiert und proliferieren,

so dass eine klonale Zelllinie entsteht. Mithilfe dieser Methode konnten 34 klonale 2190 LCLs und 27 klonale 2525 LCLs etabliert werden. In allen LCLs wurde ca. drei Monate nach Infektion mittels Durchflusszytometrie die Expression der leichten Kette membranständiger Immunglobuline untersucht (Abb. 4-2). Es gilt zu beachten, dass eine B-Zelle entweder die leichte Ig-Kette des κ - oder des λ -Subtyps exprimiert, nicht jedoch beide Subtypen, so dass auch klonale LCLs lediglich entweder κ - oder λ -positiv sein können.

Das Resultat der Untersuchungen von insgesamt 61 klonalen LCLs bestätigte sehr deutlich die oben beschriebenen Ergebnisse der Transformationsexperimente von Mancao et al. (Abb. 4-2). Die 34 LCLs, die mit dem LMP2A-positiven maxiEBV 2190 generiert worden waren, reflektierten die Zusammensetzung der ursprünglich infizierten B-Zellen: 44 % waren BZR-negativ, 56 % waren BZR-positiv. In LMP2A-negativen 2525 LCLs war dieses Verhältnis sehr deutlich zu Gunsten der BZR-positiven Zellen verschoben: 91 % der Zellen waren BZR-positiv.

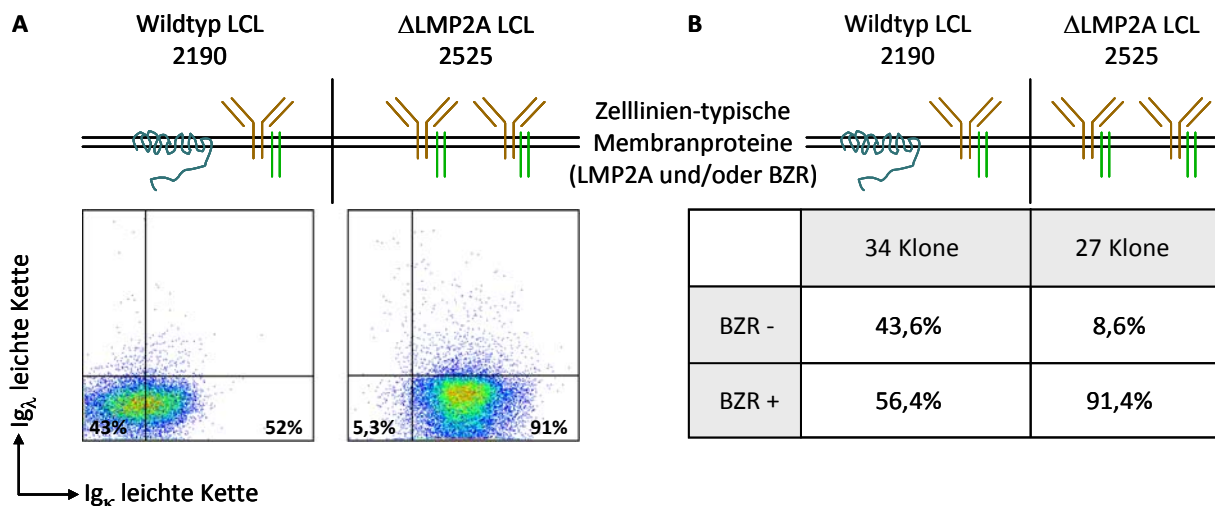


Abb. 4-2: EBV-immortalisierte LCLs sind abhängig von LMP2A oder der hohen Expression des BZR.

Primäre humane B-Zellen wurden mit Verdünnungen von Virusüberständen der EBV-Mutanten 2190 und 2525 infiziert, um klonale LCLs zu generieren. Es wurden 34 klonale 2190 LCLs und 27 klonale 2525 LCLs als stabile Zelllinien etabliert. Die durchflusszytometrische Analyse der Oberflächenexpression der leichten Ig-Ketten κ und λ diente der Ermittlung der Expressionsniveaus von mIg-Molekülen (Abb. 1-1). **A:** Beispielhafte Darstellung typischer Dotplots von 2190 bzw. 2525 LCLs, wobei die Expression von Ig λ entlang der y-Achse, von Ig κ entlang der x-Achse aufgetragen ist. Einzelzellklone können entweder Ig λ oder Ig κ exprimieren, nicht jedoch beide Subtypen der leichten Ig-Kette. BZR-negative Zellen befinden sich im linken, unteren Quadranten (43 % der 2190 LCL, 5,3 % der 2525 LCL), Ig κ -positive Zellen im rechten, unteren Quadranten (52 % der 2190 LCL, 91 % der 2525 LCL). Beide Zelllinien sind Ig κ -positiv und Ig λ -negativ. **B:** Mittelwerte der Ig κ /Ig λ -Expressionsanalyse von 34 klonalen 2190 LCLs und 27 klonalen 2525 LCLs. Fazit: Nur das Überleben LMP2A-negativer 2525 LCLs hängt von der starken Expression des BZR ab. Die Expression von LMP2A in 2190 LCLs hebt diese Abhängigkeit auf.

Wie erwartet, konnten auch innerhalb der BZR-positiven Zellpopulationen Unterschiede in der Expressionshöhe des BZR beobachtet werden (vgl. die rechten unteren Quadranten aus

Abb. 4-2 A). In 2525 LCLs fehlt nicht nur die BZR-negative Zellpopulation, auch scheinen die BZR-Expressionsniveaus der BZR-positiven 2525 LCLs deutlich höher zu sein, als die der BZR-positiven 2190 LCLs. Obwohl der experimentelle Aufbau der Versuche aus Abb. 4-2 einen direkten, quantitativen Vergleich der BZR-Expressionsniveaus von 2190 und 2525 LCLs nicht zulässt (siehe Abschnitt 3.3.1*), wurde dieses Phänomen dennoch auch in der in Abb. 4-5 gezeigten quantitativen Analyse der BZR-Expression beobachtet und bereits zuvor von unserem Labor (MANCAO and HAMMERSCHMIDT 2007) und anderen Arbeitsgruppen (MILLER et al. 1993; MILLER et al. 1994b) beschrieben.

4.1.3 Schlussfolgerung der B-Zell-Rezeptor-Expressionsanalysen

Aus den beschriebenen Analysen klonaler, LMP2A-positiver und -negativer LCLs resultieren im Wesentlichen zwei Aussagen:

1. Für das Überleben von LCLs ist es essenziell, dass entweder der BZR oder LMP2A exprimiert wird. Es ist nicht möglich LCLs zu etablieren, welche sowohl BZR- als auch LMP2A-negativ sind. LMP2A kann also die überlebenswichtigen Funktionen des BZRs ersetzen.
2. Für das Überleben LMP2A-negativer LCLs ist es essenziell, dass die Überlebenssignale des BZRs einen Schwellenwert übersteigen, weil LMP2A-negative LCLs nur dann überleben, wenn sie den BZR sehr stark exprimieren. Da LMP2A die Abhängigkeit von LCLs einen BZR zu exprimieren vollständig aufhebt, muss die Stärke der Überlebenssignale, die von LMP2A ausgehen, stets über diesem Schwellenwert liegen.

In den folgenden Experimenten wird vor allem die erste dieser beiden Aussagen näher untersucht. Es wird also analysiert, worauf die Fähigkeit von LMP2A, den BZR funktionell zu ersetzen, beruht. Dabei werden die Aktivitäten dieser beiden Moleküle hinsichtlich der Signaltransduktion und der Regulierung zellulärer und viraler Genexpression systematisch verglichen. Einige der durchgeführten Experimente klären jedoch nicht nur die Frage, welche Signale aktiviert werden, sie lassen auch einen Vergleich der Signalstärken von LMP2A und dem BZR zu und beziehen sich damit auf die zweite der beiden genannten Aussagen.

4.2 Ersatz des konstitutiv aktiven Wildtyp-LMP2A durch eine induzierbare Mutante

Für die Untersuchung von Signalwegen ist ein induzierbares System ideal, das das Ein- und Ausschalten der Signaltransduktion erlaubt. Durch den Vergleich des zellulären Zustandes vor und nach Induktion können eindeutige Rückschlüsse auf die Wege der Signaltransduktion und die zellulären Zielgene gezogen werden. Der BZR kann *in vitro* durch Antigen- oder auch Antikörper-vermittelte Quervernetzung stimuliert werden. Die Signalwege, welche durch Stimulierung des BZR aktiviert werden, wurden in solchen Experimenten bereits detailliert untersucht. LMP2A hingegen ist unabhängig von der Bindung eines Liganden konstitutiv oligomerisiert und funktionell aktiv. Ein induzierbares Protein, das die Signalkapazität von LMP2A behält, jedoch konditional aktiviert werden kann, wäre von großem Nutzen für die Untersuchung der von LMP2A induzierten Signalwege und damit verbundener Funktionen, insbesondere für die Identifizierung der Zielgene von LMP2A.

4.2.1 Das rekombinante maxiEBV-Konstrukt 3696

Das EBV-Protein LMP2A kann im Wesentlichen in zwei Bereiche unterteilt werden: Der zytoplasmatische Carboxyterminus und die Transmembrandomänen sind verantwortlich für die Oligomerisierung und die damit verbundene konstitutive Aktivität von LMP2A, der zytoplasmatische Aminoterminus hingegen vermittelt die Signaltransduktion durch LMP2A (Abb. 1-11). Für die Konstruktion einer induzierbaren Version von LMP2A sollte folglich der Carboxyterminus zusammen mit den Transmembrandomänen durch andere Proteindomänen ersetzt werden. Ziele dieser Maßnahmen waren es einerseits die Membranständigkeit von LMP2A zu bewahren und andererseits die Signaltransduktions-eigenschaften von LMP2A konditional zu gestalten. Hierfür wurde das murine CD69-Protein gewählt. CD69 ist ein Typ-II-Transmembranprotein, das als Oberflächenmarker aktivierter Leukozyten gilt. Bisher wurde kein spezifischer Ligand für CD69 identifiziert, jedoch ist bekannt, dass es mithilfe eines monoklonalen Antikörpers gegen murines CD69 (Klon H1.2F3) durch Quervernetzung aktiviert werden kann. Die Exodomäne des mCD69, also der extrazelluläre Carboxyterminus sowie die Transmembran-domäne von CD69, sollten folglich mit dem Aminoterminus, der intrazellulären Signaldomäne, von LMP2A fusioniert werden. Zu diesem Zweck wurde ein rekombinantes Gen, welches für ein chimäres LMP2A:CD69 Protein kodiert, in das maxiEBV-Plasmid 2525 (Δ LMP2A) integriert (Abb. 4-3). Das erste Exon

von LMP2A wurde in Kombination mit der cDNA der Exodomäne des murinen CD69 der Kontrolle des CMV-Promotors unterstellt und mittels homologer Rekombination in den BALF1-Lokus des 2525 EBV-Genoms eingefügt. BALF1 gilt als eines von zwei EBV-kodierten anti-apoptotisch wirkenden Bcl2-Homologen. Eine Deletion von BALF1 hat keinen Einfluss auf die *in vitro*-Transformationskapazität von EBV (ALTMANN and HAMMERSCHMIDT 2005). Das resultierende Konstrukt, bezeichnet als maxiEBV 3696, kodiert demnach ein chimäres LMP2A:CD69 Protein, dessen extrazellulärer Teil nach anti-CD69-Antikörper-vermittelter Quervernetzung die Aktivierung der intrazellulären Signaltransduktionsdomäne von LMP2A bewirken soll. Ebenso wie das maxiEBV-Plasmid 2525 kodiert 3696 nicht für wtLMP2A, während die Expression von LMP2B und LMP1 unberührt bleibt (Abb. 4-3).

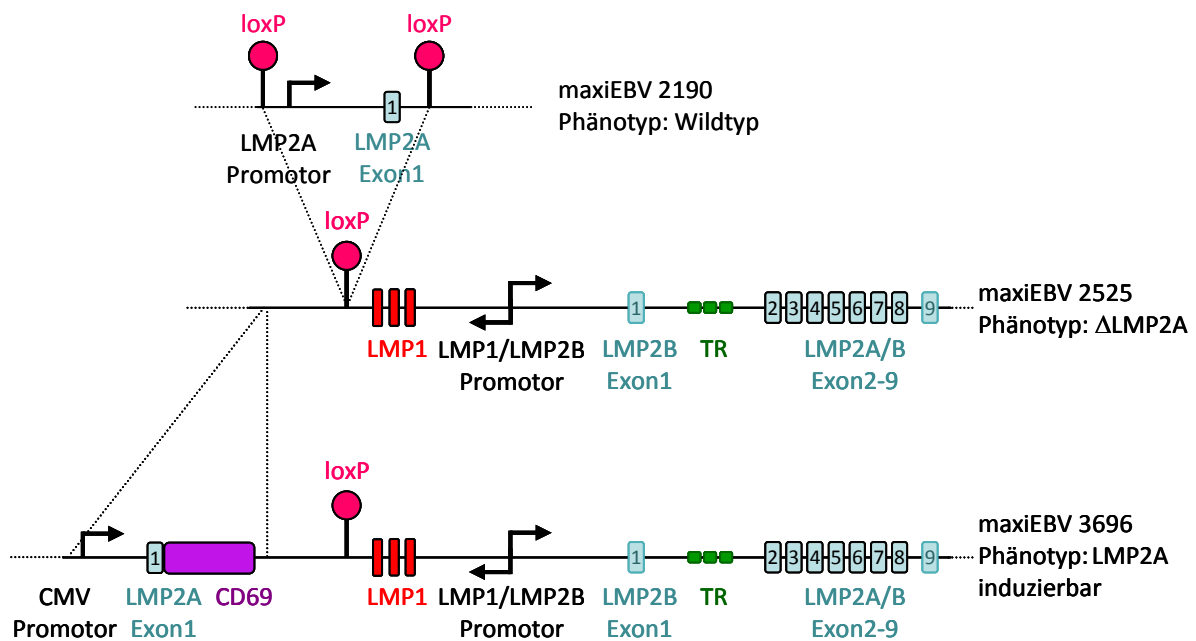


Abb. 4-3: Das rekombinante maxiEBV Konstrukt 3696

Mittels homologer Rekombination in *E.coli* Bakterien wurde ein Gen in den BALF1-Lokus des 2525 maxiEBV-Plasmids eingefügt, das ein konditionales LMP2A kodiert. Es besteht aus dem ersten Exon von LMP2A und der cDNA des extrazellulären und transmembranen Bereichs des murinen CD69. Das 3696 maxiEBV-Plasmid kodiert somit ein chimäres Protein, bestehend aus den 119 aminoterminalen, zytoplasmatischen Aminosäuren von LMP2A (Abb. 1-11) sowie dem carboxyterminalen, extrazellulären und transmembranen Bereich des murinen CD69. LCLs, die durch Infektion mit 3696 EBV entstehen, exprimieren kein wtLMP2A (vgl. maxiEBV 2190, kopiert aus Abb. 4-1), aber das chimäre LMP2A:CD69. Es stellt ein induzierbares LMP2A dar, dessen Signaltransduktion durch Quervernetzung mittels CD69-spezifischem Antikörper aktiviert werden kann (siehe Abschnitte 4.2.2 ff).

4.2.2 Expression und Funktionalität des induzierbaren LMP2A:CD69

Bevor mithilfe des LMP2A:CD69 Proteins die Signaltransduktionswege von LMP2A untersucht werden konnten, galt es sicher zu stellen, dass das chimäre Protein in 3696 LCLs exprimiert wird und durch anti-CD69-Antikörper-vermittelte Stimulierung aktiviert werden kann. Die Expression von LMP2A:CD69 wurde zunächst im Westernblot analysiert. Gesamtzelllysate von 2190, 2525 und 3696 LCLs wurden elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrozellulose-Membran geblottet. Die Detektion von LMP2A erfolgte mithilfe eines monoklonalen Antikörpers (Klon 14B7), welcher spezifisch die Aminosäuren 37-64 des LMP2A-Aminoterminus erkennt (Abb. 4-4 A). Das Molekulargewicht des wtLMP2A beträgt 54 kDa, während für LMP2A:CD69 ein Molekulargewicht von ca. 34 kDa erwartet wurde.

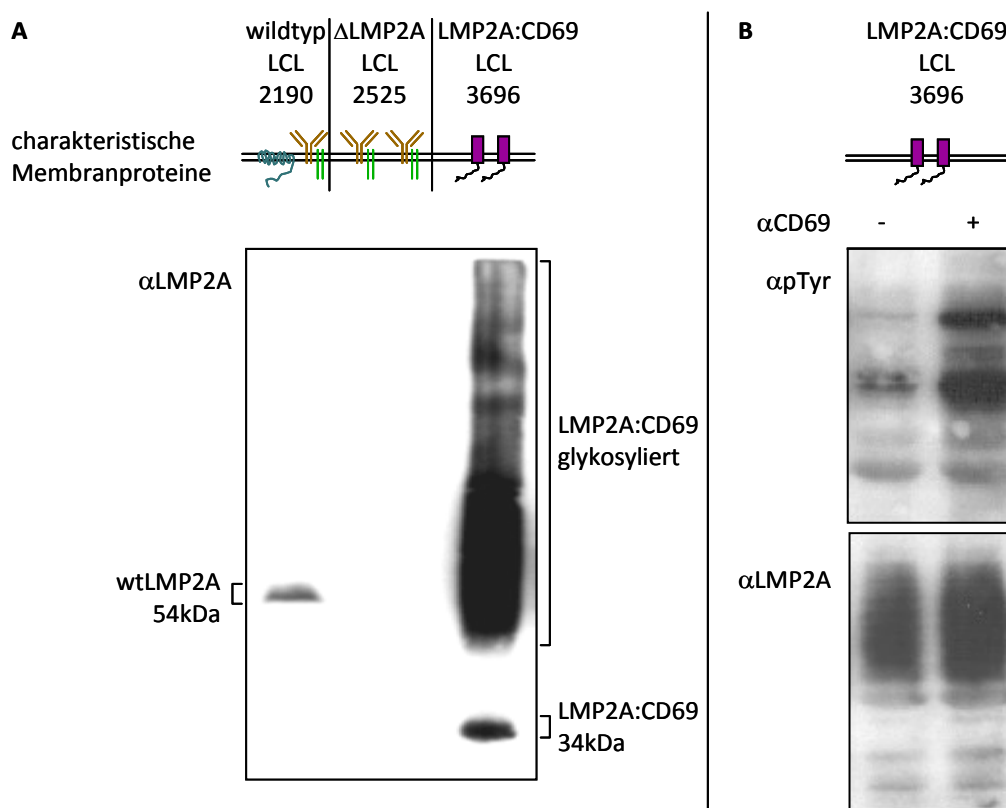


Abb. 4-4: Expression und Funktionalität des induzierbaren LMP2A:CD69.

Expression und Induzierbarkeit des chimären LMP2A:CD69 Proteins wurden mittels Westernblot-Analysen verifiziert. **A:** Zelllysate von 2190, 2525 und 3696 LCLs wurden elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrozellulose-Membran geblottet. Die Detektion von LMP2A erfolgte mit einem monoklonalen Antikörper, welcher spezifisch die Aminosäuren 37-64 des LMP2A-Aminoterminus erkennt (Klon 14B7). 2190 LCLs exprimieren wie erwartet wtLMP2A (54kDa), 2525 LCLs sind LMP2A-negativ, 3696 LCLs exprimieren das chimäre LMP2A:CD69 (34kDa). LMP2A:CD69-Proteine werden vermutlich unterschiedlich stark glykosyliert und wurden deshalb als Schmier im Westernblot detektiert. **B:** Die 10-minütige Quervernetzung von LMP2A:CD69 mittels anti-CD69-Antikörper hat eine Zunahme der Tyrosin-Phosphorylierung in der Zelle zur Folge (oben). Ladekontrolle: Detektion von LMP2A:CD69 vor und nach Antikörper-vermittelter Stimulierung (unten). Fazit: Quervernetzung von LMP2A:CD69 induziert die Tyrosinphosphorylierung zellulärer Proteine durch die zytoplasmatische Signaltransduktionsdomäne von LMP2A.

Ein Zelllysat der 2525 LCL diente als Negativkontrolle. Zelluläres CD69 ist ein Oberflächen-Glykoprotein. Unterschiedliche Grade der Glykosylierung von Proteinen verändern deren Laufverhalten während der Gelelektrophorese erheblich. Das verwischte Signal, welches in dem Zelllysat der 3696 LCL detektiert wurde, geht deshalb vermutlich auf die Glykosylierung des LMP2A:CD69 Proteins zurück. Die Lokalisierung des exprimierten LMP2A:CD69 an der Zelloberfläche wurde durchflusszytometrisch bestätigt (Abb. 4-5).

Um die Funktionalität des LMP2A:CD69 Proteins zu überprüfen, wurden 3696 LCLs mithilfe des monoklonalen anti-CD69-Antikörpers H1.2F3 stimuliert. Die Westernblotanalyse von Gesamtzelllysaten zeigte eine deutliche Zunahme der Tyrosin-Phosphorylierung nach CD69-Stimulierung durch Quervernetzung. Die Detektion konstanter Mengen an LMP2A:CD69 vor und nach Stimulierung diente als Ladekontrolle.

Diese vorangehenden Experimente bestätigten die Expression und Funktionalität des chimären LMP2A:CD69 Proteins in 3696 LCLs. Für den systematischen Vergleich von LMP2A und dem BZR stand damit eine induzierbare Version von LMP2A im Kontext eines rekombinanten EBV zur Verfügung.

4.2.3 Auf einen Blick – lymphoblastoide Zelllinien, die in dieser Arbeit untersucht wurden

Bislang wurden drei unterschiedliche LCLs vorgestellt, die in unserer Arbeitsgruppe für die Untersuchung der Funktion von LMP2A etabliert wurden: 2190 wtLCLs, 2525 Δ LMP2A LCLs und 3696 LMP2A:CD69 LCLs. Abb. 4-5 zeigt eine schematische Darstellung der charakteristischen Membranproteine dieser Zelllinien, die in allen folgenden Abbildungen des Ergebnisteils dieser Arbeit als Orientierungshilfe zu finden sein wird.

Mittels Durchflusszytometrie wurde in allen drei LCLs die Stärke der Oberflächenexpression des BZR und des chimären LMP2A:CD69 vergleichend ermittelt (Abb. 4-5). Die BZR-Expression wurde durch Anfärben der leichten Ig-Ketten detektiert, die Expression von LMP2A:CD69 durch Anfärben des extrazellulären CD69 mithilfe des oben genannten monoklonalen Antikörpers H1.2F3, welcher auch für die Stimulierung von LMP2A:CD69 eingesetzt wird. Wie zu erwarten war, konnte an der Oberfläche der LCLs 2190 und 2525 kein LMP2A:CD69 detektiert werden, während die LCL 3696 dieses deutlich exprimiert. Eine Expression des BZR war in den LCLs 2190 und 2525 klar zu erkennen, wobei die mittlere

Intensität des Fluoreszenzsignals (engl.: mean fluorescence intensity = MFI) der BZR-Färbung zeigt, dass das BZR-Expressionsniveau in 2190 LCLs (MFI=218) nur etwa die Hälfte dessen in 2525 LCLs (MFI=441) erreicht (vgl. Abschnitt 4.1.2). Die LCL 3696 exprimiert vernachlässigbar geringe Mengen des BZR, was vermuten lässt, dass das chimäre LMP2A:CD69, ebenso wie der BZR, in der Lage ist tonische Signale zu generieren, welche für das Überleben dieser sowohl wtLMP2A- als auch BZR-negativen LCL essenziell sind. Ein direkter Vergleich der MFI-Werte von Ig_κ- und CD69-Detektion ist aufgrund der unterschiedlichen Bindungs- und Fluoreszenzeigenschaften der eingesetzten Antikörper nicht möglich. Die Expression von wtLMP2A in 2190 LCLs konnte mangels extrazellulär bindendem Antikörper nicht durchflusszytometrisch ermittelt werden, wurde jedoch bereits in Abb. 4-4 anhand einer Westernblotanalyse bestätigt.

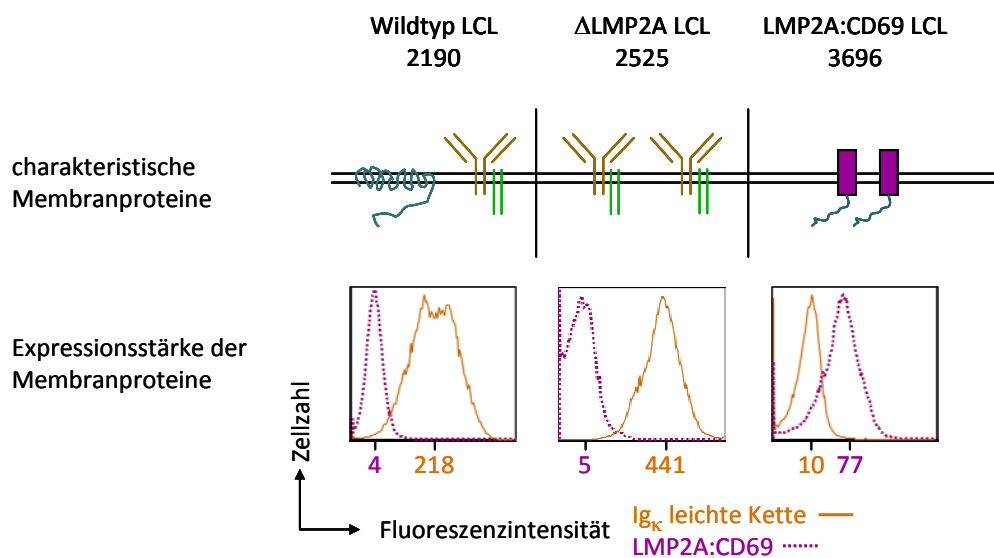


Abb. 4-5: Oberflächenmerkmale der LCLs 2190, 2525 und 3696.

Die charakteristischen Oberflächenproteine der drei LCLs 2190, 2525 und 3696 sind schematisch dargestellt. Ihre Expressionsniveaus wurden mittels Durchflusszytometrie ermittelt. Wie erwartet, exprimieren 2190 und 2525 LCLs kein LMP2A:CD69 (violette, gestrichelte Linie). 2190 LCLs exprimieren wtLMP2A, welches mangels extrazellulär bindendem Antikörper durchflusszytometrisch nicht detektiert werden konnte (vgl. Abb. 4-4). Zusätzlich exprimieren sie den BZR (braune Linie). Das Expressionsniveau des BZR ist in 2190 LCLs jedoch geringer als in 2525 LCLs (vgl. die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) von 218 für 2190 LCLs und 441 für 2525 LCLs) (siehe auch Abschnitt 4.1.2 und Abb. 4-2). 3696 LCLs exprimieren nur geringe Mengen des BZR (MFI=10), jedoch erhebliche Mengen des chimären LMP2A:CD69-Proteins. Ein direkter Vergleich der MFI-Werte von Ig_κ und LMP2A:CD69 ist aufgrund unterschiedlicher Bindungseigenschaften der verwendeten Antikörper nicht möglich. Alle drei untersuchten Zelllinien waren Ig_κ-positiv und Ig_λ-negativ.

4.3 Vergleichende Analysen der Signaltransduktionswege von LMP2A und dem B-Zell-Rezeptor

In der Vergangenheit haben verschiedene Arbeitsgruppen in zahlreichen Experimenten versucht, die Signaltransduktionswege, die von LMP2A aktiviert werden, zu charakterisieren. Aus diesen Untersuchungen konnten viele wichtige Erkenntnisse über potenzielle Funktionen von LMP2A gewonnen werden. Die konstitutive Aktivität von LMP2A führte jedoch teilweise dazu, dass Experimente mit ektoisch exprimiertem LMP2A in Systemen ohne den viralen Hintergrund von EBV durchgeführt wurden. So wurden EBV-negative Zelllinien mit Expressionsplasmiden für LMP2A oder LMP2A-Fusionsproteine transfiziert und anschließend mit nicht transfizierten Zellen derselben Linie verglichen (PANOUSIS and ROWE 1997; MERCHANT and LONGNECKER 2001; ROVEDO and LONGNECKER 2008). Auch machten einige Arbeitsgruppen Gebrauch von LMP2A-transgenen Mäusen, aus welchen wiederum mithilfe von Kreuzungsexperimenten B-Zellen gewonnen werden konnten, die einerseits LMP2A exprimierten, denen andererseits aber z.B. eine wichtige Kinase des BZR-Signaltransduktionsnetzwerks fehlte (ENGELS et al. 2001a; MERCHANT and LONGNECKER 2001; ROVEDO and LONGNECKER 2008). Diese Versuche lieferten zwar interessante und wichtige Ergebnisse, jedoch wird EBV auf natürliche Weise niemals eine Maus infizieren und LMP2A wird nicht überexprimiert und ohne jeglichen EBV-Hintergrund in kultivierbaren Zelllinien zu finden sein.

Diese Problematik ist bekannt und einige Experimente wurden auch in dem wesentlich realeren Modellsystem humaner LCLs durchgeführt (FRUEHLING and LONGNECKER 1997; SWART et al. 2000; MERCHANT and LONGNECKER 2001). Hier trat jedoch das Problem auf, dass stets wtLCLs mit LMP2A-negativen LCLs verglichen wurden. Diese Vergleiche bringen ein gewisses Risiko mit sich, da verschiedene Zelllinien nicht nur unterschiedlich viel LMP2A exprimieren, sondern sich auch immer in weiteren, unbekanntem Eigenschaften unterscheiden können, z.B. in den Expressionsniveaus des BZR (siehe auch Abb. 4-5) oder weil die zugrunde liegenden B-Zellen von verschiedenen Spendern stammen.

Aufgrund dieser genannten Unsicherheiten und Probleme wurden im Rahmen dieser Arbeit mithilfe des LMP2A:CD69-Proteins die Signaltransduktionswege von LMP2A systematisch mit denen des BZR (siehe Abschnitt 1.2.3) verglichen.

4.3.1 Detektion von Phosphorylierungsereignissen auf Einzelzellebene mittels Durchflusszytometrie

Für die Untersuchung von Phosphorylierungsereignissen, die als Folge der Stimulierung von LMP2A:CD69 oder dem BZR detektiert werden sollten, wurde die Methode der phosphospezifischen Durchflusszytometrie gewählt. Diese Methode erlaubt die Detektion phosphorylierter Signalmediatoren in einzelnen Zellen und ist deshalb dem herkömmlichen Westernblot in seiner Sensitivität weit überlegen. Die Probenvorbereitung besteht dabei aus mehreren Schritten:

1. Stimulierung der Zellen durch Quervernetzung von BZR oder LMP2A:CD69, unmittelbar gefolgt von der Fixierung des hervorgerufenen Phosphorylierungszustands.
2. Permeabilisierung der Zellmembran, um das Zytoplasma für die Antikörpervermittelte Detektion von Phosphorylierungsereignissen zugänglich zu machen.
3. Markierung von phosphorylierten Signalmediatoren mithilfe spezifischer, monoklonaler Antikörper, welche direkt an ein Fluorochrom gekoppelt sind.
4. Detektion des Phosphorylierungszustands einzelner Zellen mithilfe eines Durchflusszytometers.

Für die vergleichende Analyse der Signalwege des BZR mit jenen von LMP2A wurde die Aktivierung einiger bekannter Signalmediatoren des BZR-Signaltransduktionsnetzwerks (siehe Abschnitt 1.2.3) untersucht (Abb. 4-6). Um Signale des BZR zu analysieren, wurden 2525 LCLs 10 min lang mittels anti-IgG/M-Antikörper stimuliert. Im Gegensatz zu BZR-positiven 2190 LCLs eignen diese sich dafür besonders gut, weil einerseits keine interferierenden Signale des wtLMP2A zu erwarten sind und andererseits der BZR hoch exprimiert wird. Mithilfe des chimären LMP2A:CD69 Proteins der 3696 LCLs wurden Signaltransduktionswege detektiert, welche unmittelbar durch LMP2A aktiviert werden. Die Induktion erfolgte hier ebenfalls für die Dauer von 10 min durch Quervernetzung des LMP2A:CD69 mittels CD69-spezifischem Antikörper.

Abb. 4-6 zeigt die Ergebnisse dieser Analyse. Der Phosphorylierungszustand ausgewählter Signalmediatoren wurde anhand von bekannten Hierarchien der Signalkaskaden vom Rezeptor absteigend ermittelt: SYK, BLNK, BTK, PLC γ 2, AKT und ERK.

Die Stimulierung des BZR in 2525 LCLs führte zur Phosphorylierung aller untersuchten Signalmediatoren. Ebenso konnte LMP2A:CD69 in 3696 LCLs mit Ausnahme von BTK (siehe Seite 78) alle Signalmediatoren aktivieren. 2525 LCLs und 3696 LCLs zeigten dabei vor Stimulierung vergleichbare Grundniveaus der Phosphorylierung, die durch den Mittelwert der Fluoreszenzintensität (MFI) von gefärbten, aber unstimulierten Zellen erfasst sind (Abb. 4-6 graue Linien und graue MFI-Werte rechts oben).

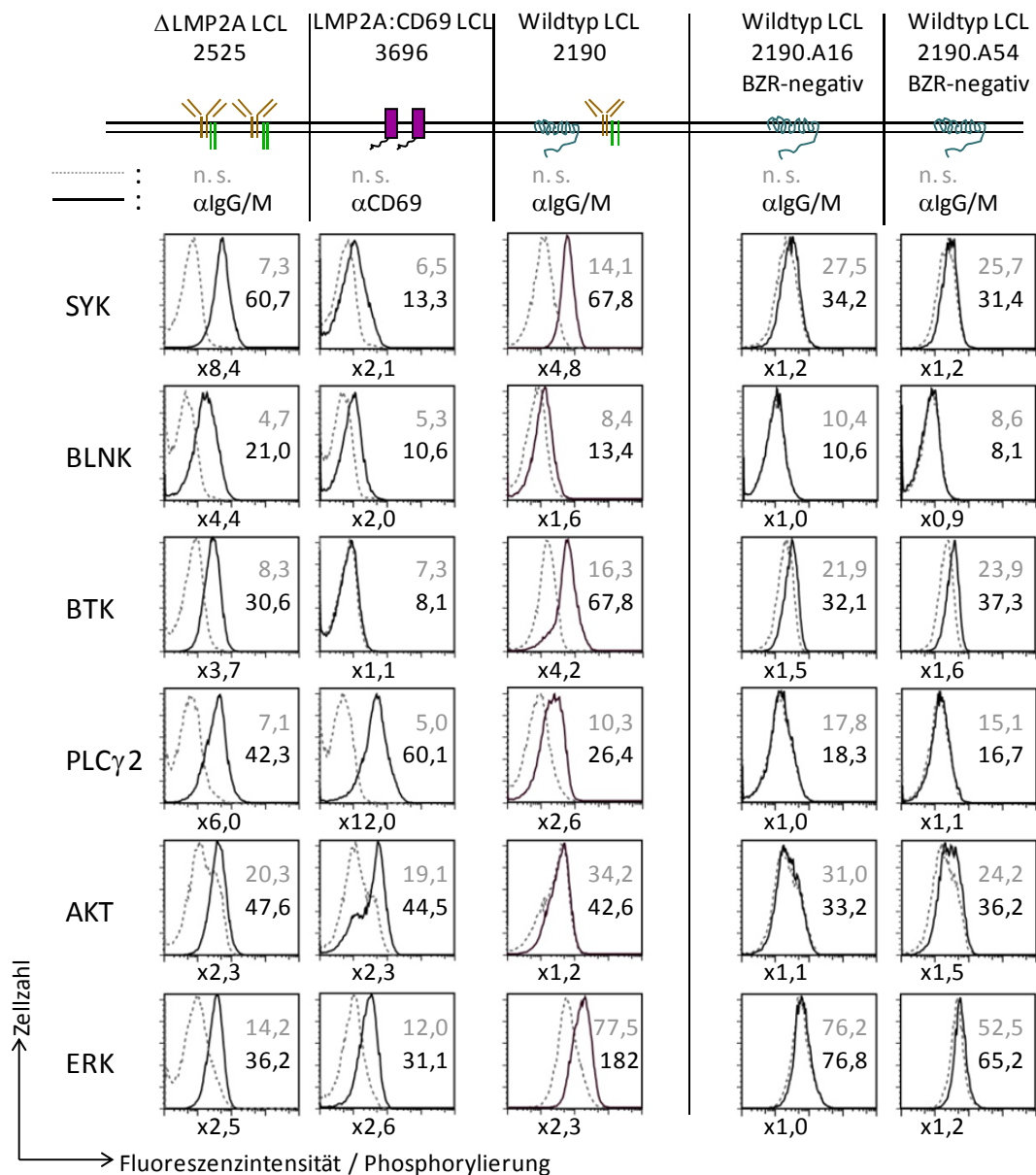


Abb. 4-6: LMP2A und der BZR aktivieren dieselben Signalmediatoren. (Erklärung auf Seite 77)

Zu Abb. 4-6: LMP2A und der BZR aktivieren dieselben Signalmediatoren.

Die Phosphorylierung ausgewählter, bekannter Signalmediatoren des BZR-Signaltransduktions-Netzwerks (siehe Abschnitt 1.2.3) wurde mittels Durchflusszytometrie analysiert. Der BZR bzw. LMP2A:CD69 wurden durch Antikörper-vermittelte Quervernetzung für die Dauer von 10 min stimuliert (anti-IgG/M bzw. anti-CD69). Stimulierte wie auch unstimulierte Zellen wurden fixiert und permeabilisiert. Phosphorylierte Signalmediatoren wurden anschließend mit spezifischen Antikörpern, welche direkt an ein Fluorochrom gekoppelt waren, angefärbt und im Durchflusszytometer detektiert. Mit zunehmender Entfernung zum Rezeptor wurden analysiert: SYK, BLNK, BTK, PLC γ 2, AKT und ERK. Während der Phosphorylierungsgrad uninduzierter 2525 LCLs dem uninduzierter 3696 LCLs glich, war er in 2190 LCLs aufgrund der konstitutiven Aktivität des wtLMP2A in etwa um den Faktor zwei erhöht mit Ausnahme von ERK: Faktor fünf (graue Zahlen und Linien). BZR-Stimulierung in 2525 LCLs führte nach 10 min zur Phosphorylierung aller untersuchten Signalmediatoren (schwarze Zahlen und Linien). Mit Ausnahme von BTK galt das auch für die Stimulierung von LMP2A:CD69. Da BTK in 2190 LCLs jedoch konstitutiv phosphoryliert war, reagiert dieses womöglich verzögert auf die Stimulierung von LMP2A:CD69, so dass lediglich nach 10 min noch keine Phosphorylierung detektiert werden konnte. Stimulierung des BZRs in 2190 LCLs führte entgegen aller bisher veröffentlichten Ergebnisse ebenfalls zu einer Erhöhung des Phosphorylierungsgrads der untersuchten Signalmediatoren. Aufgrund des konstitutiv erhöhten Ausgangswertes war eine zusätzliche Phosphorylierung jedoch nur mithilfe dieser sensitiven, durchflusszytometrischen Methode detektierbar. Anti-IgG/M-Behandlung der genotypisch Ig-negativen 2190 LCL Klone A16 und A54 diente als Negativkontrolle, um unspezifische Auswirkungen von anti-IgG/M-Antikörpern ausschließen zu können. Fazit: LMP2A und der BZR induzieren dieselben Signalkaskaden. Signaltransduktion durch den BZR wird nicht aktiv von LMP2A blockiert, lediglich die Detektion zusätzlicher Phosphorylierungsereignisse nach BZR-Stimulierung wird erschwert. (n.s.: nicht stimuliert)

Die Zunahme der Phosphorylierung nach Stimulierung variierte teilweise zwischen BZR und LMP2A:CD69 (vgl. den Faktor der MFI-Zunahme unter jedem Diagramm). SYK, BLNK und BTK wurden durch BZR-Aktivierung stärker phosphoryliert, PLC γ 2 reagierte stärker auf LMP2A:CD69-Stimulierung, während AKT und ERK durch beide Stimuli vergleichbar stark aktiviert wurden (Abb. 4-6 schwarze Linien und schwarze MFI-Werte).

Der nächste Schritt war die Untersuchung der Signaltransduktion des BZRs in 2190 LCLs. Wie bereits erwähnt (Abschnitt 1.4), führten in der Vergangenheit zahlreiche fehlgeschlagene Versuche der Detektion von BZR-Signalen in Anwesenheit von wtLMP2A zu der Annahme, dass LMP2A die Signaltransduktion durch den BZR blockiert. All diese Experimente basierten jedoch auf Westernblotanalysen, mit oder ohne vorangehender Immunpräzipitation. Die sensitive Methode der phosphospezifischen Durchflusszytometrie bot sich deshalb an, um dieses Phänomen neu zu untersuchen. So wurden 2190 LCLs, wie oben beschrieben, vor und nach zehnminütiger BZR-Stimulierung mittels anti-IgG/M-Antikörper analysiert. Bereits vor der Stimulierung des BZRs waren im Vergleich zu 2525 und 3696 LCLs, die Phosphorylierungsniveaus aller untersuchten Signalmediatoren in etwa um den Faktor zwei erhöht, ERK war im unstimulierten Zustand sogar ca. fünffach stärker phosphoryliert (Abb. 4-6 graue MFI-Werte der drei LCLs im Vergleich). Ungeachtet dieser konstitutiv erhöhten Ausgangsphosphorylierung konnte der BZR trotz seiner schwächeren Expression in 2190 LCLs (Abb. 4-5) die Phosphorylierungsniveaus einiger Signalmediatoren deutlich steigern (Abb.

4-6 schwarze Linien und MFI-Werte der 2190 LCL). Lediglich eine zusätzliche Aktivierung von AKT konnte nicht detektiert werden und BLNK reagierte nur sehr schwach.

Die beiden klonalen 2190 LCLs A16 und A54 dienten als Negativkontrolle. Ihre Ig-Gene werden aufgrund von Mutationen in den Immunglobulinloci nicht exprimiert (MANCAO et al. 2005). Keiner der beiden Klone reagierte auf anti-IgG/M-Stimulierung. Eine unspezifische Wirkung des anti-IgG/M Antikörpers, beispielsweise durch Bindung seiner konstanten Region an Fc-Rezeptoren, konnte so ausgeschlossen werden.

Die Ergebnisse dieser Phosphorylierungsanalysen erlauben verschiedene interessante Interpretationen. So ist LMP2A prinzipiell in der Lage, all jene Signalmediatoren zu aktivieren, welche auch durch den BZR aktiviert werden können. BTK zeigte als einziger Signalmediator nach zehnminütiger LMP2A:CD69-Stimulierung keine Reaktion. In 2190 LCLs war das Phosphorylierungsniveau von BTK aber dennoch konstitutiv erhöht. Es ist also denkbar, dass die konstitutive Expression von LMP2A zu diesem erhöhten Phosphorylierungsgrad beiträgt und BTK zeitverzögert von LMP2A aktiviert wird. BTK ist für die Fähigkeit von LMP2A entbehrlich, in transgenen Mäusen den BZR zu ersetzen (MERCHANT and LONGNECKER 2001). Möglicherweise spielt BTK in der Signaltransduktion von LMP2A keine Schlüsselrolle.

Des Weiteren zeigen die Ergebnisse der Phosphorylierungsanalysen in 2190 LCLs sehr deutlich, dass der BZR auch in Gegenwart von wtLMP2A durchaus in der Lage ist Signaltransduktionskaskaden zu aktivieren. Die Existenz eines aktiven Blockademechanismus von LMP2A gegenüber dem BZR scheint also unwahrscheinlich. Lediglich die Detektion von Phosphorylierungsereignissen, welche zusätzlich zu einer konstitutiven Grundphosphorylierung auftreten, erfordert eine sehr sensitive Methode und schlug in Westernblotanalysen bisher fehl.

4.3.2 Analyse des Einstroms von Ca^{2+} -Ionen in das Zytosol

Ein schneller Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration tritt als Folge akuter Signaltransduktion durch den BZR auf (vgl. Abschnitt 1.2.3.2.2). Der Einstrom von Ca^{2+} -Ionen in das Zytosol ist nach BZR-Stimulierung in Anwesenheit von wtLMP2A jedoch nicht beobachtet worden (MILLER et al. 1993). Dieser Befund führte in der Vergangenheit zu dem Schluss, dass LMP2A die BZR-vermittelte Calcium-Mobilisierung in B-Lymphozyten blockiert. Der erste Versuch, die Signaltransduktion durch LMP2A mithilfe eines induzierbaren,

chimären LMP2A-Konstrukts zu untersuchen (BEAUFILS et al. 1993) zeigte jedoch, dass LMP2A selbst in der Lage ist, einen Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration hervor zu rufen. Bei genauerer Betrachtung dieser Experimente fallen allerdings drei wesentliche Mängel auf. Zum einen entstand das chimäre LMP2A-Konstrukt durch den Ersatz des zytoplasmatischen Anteils des $\text{CD8}\alpha$ -Membranproteins durch jenen von LMP2A. $\text{CD8}\alpha$ ist ein Typ-I Membranprotein, dessen Carboxyterminus intrazellulär lokalisiert ist, während der Aminoterminus den extrazellulären Bereich darstellt. Folglich führte die Fusionierung von $\text{CD8}\alpha$ mit dem zytoplasmatischen Aminoterminus von LMP2A dazu, dass dieser in „umgekehrter“ Orientierung eingefügt wurde. Zum zweiten bestand die eingefügte zytoplasmatische Domäne von LMP2A nicht aus allen 119 Aminosäuren, sondern lediglich aus 102 Aminosäuren. Es fehlte also Tyr112 (vgl. Abb. 1-11), welches für die Bindung von Lyn und die nachgeschaltete Aktivierung der Signaltransduktion von wesentlicher Bedeutung ist. Zum dritten wurde das LMP2A: $\text{CD8}\alpha$ -Konstrukt in EBV-negativen B- und T-Zelllinien exprimiert und somit von seinem natürlichen, viralen Hintergrund separiert. Aus diesen Gründen wurde der Einfluss von LMP2A auf die Calcium-Mobilisierung in LCLs in unserer Arbeitsgruppe erneut untersucht.

Die Messung relativer Änderungen der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration erfolgte mit der Methode der Durchflusszytometrie. Hierzu wurden die zu untersuchenden LCLs zunächst mit zwei Calcium-bindenden Fluoreszenzfarbstoffen beladen: „Fura Red“ und „Fluo-4“. Fura Red fluoresziert bei einer Wellenlänge von 685 nm, wobei die Fluoreszenzintensität sinkt, sobald Ca^{2+} -Ionen gebunden werden. Fluo-4 wiederum fluoresziert bei einer Wellenlänge von 525 nm, wobei die Fluoreszenzintensität bei Ca^{2+} -Bindung steigt. Die gemessenen Änderungen der Fluoreszenzintensitäten spiegeln folglich die relative Änderung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration wider.

Vor der durchflusszytometrischen Analyse erfolgte zunächst die Beladung der drei LCLs 2525, 3696 und 2190 mit den genannten Fluoreszenzfarbstoffen. Anschließend wurde das Grundniveau der relativen zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration gemessen (Abb. 4-7). Nach einer Minute wurde der BZR oder LMP2A: CD69 durch Zugabe von IgG/M- bzw. CD69 -spezifischen Antikörpern stimuliert und das Niveau der relativen zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration über einen Zeitraum von 500 Sekunden verfolgt.

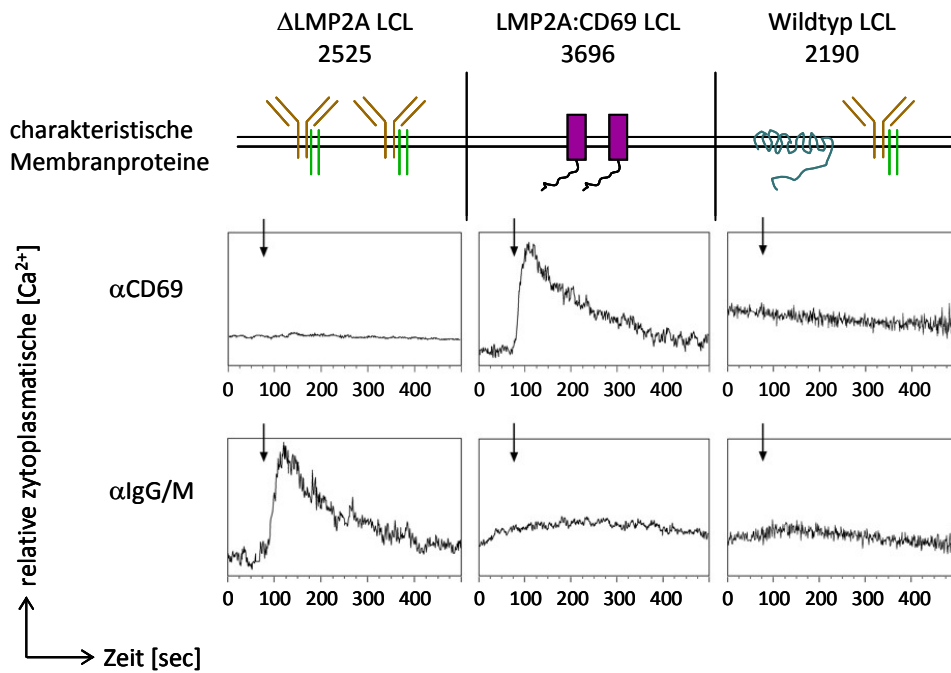


Abb. 4-7: LMP2A und der BZR induzieren den Einstrom von Ca^{2+} -Ionen in das Zytosol.

Das Zytosol der drei LCLs 2525, 3696 und 2190 wurde mit den Ca^{2+} -bindenden Fluoreszenzfarbstoffen Fura Red (685 nm Emission) und Fluo-4 (525 nm Emission) beladen. Die Intensität der Fura Red Fluoreszenz nimmt nach Ca^{2+} -Bindung ab, während die Intensität von Fluo-4 zunimmt. Änderungen des Intensitätsverhältnisses der beiden Farbstoffe reflektieren eine Veränderung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration. Stimulierung (markiert durch: ↓) des BZR in 2525 LCLs führte, wie in der Literatur beschrieben, zu einem schnellen Einstrom von Ca^{2+} -Ionen in das Zytosol. Auch die Stimulierung von LMP2A:CD69 in 3696 LCLs bewirkte den Einstrom von Ca^{2+} -Ionen. Folglich ist LMP2A theoretisch in der Lage, Ca^{2+} -abhängige Signalwege zu induzieren. BZR-Stimulierung in 2190 LCLs hatte keinen akuten Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration zur Folge, was durch die Desensibilisierung der Zellen aufgrund konstitutiver wtLMP2A-Signale zu erklären ist. Fazit: LMP2A ist potenziell in der Lage, den Einstrom von Ca^{2+} -Ionen in das Zytosol zu induzieren. Auf die konstitutive Aktivität von LMP2A können die Zellen nicht mit akuten Ca^{2+} -Einstößen reagieren, sie sind desensibilisiert. Auch Signale des BZR können in diesem zellulären Zustand keinen Ca^{2+} -Einstrom bewirken.

Wie erwartet reagierten 2525 LCLs nicht auf CD69-Stimulierung, die Zugabe von anti-IgG/M-Antikörpern führte jedoch zu einem schnellen Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration, wie bereits von Miller et al. beschrieben (MILLER et al. 1993). Ein umgekehrtes Bild ergab sich für 3696 LCLs. Hier führte die Stimulierung von LMP2A:CD69 zu einem raschen Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration, was beweist, dass LMP2A potenziell in der Lage ist, ebenso wie der BZR die Freisetzung von Ca^{2+} -Ionen zu bewirken. Nach der Zugabe von anti-IgG/M-Antikörpern konnte keine Veränderung der relativen zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration detektiert werden, 3696 LCLs BZR-negativ sind (Abb. 4-5). 2190 LCLs wiederum reagierten weder auf die Zugabe von anti-CD69-Antikörpern, noch auf die Stimulierung des BZR. Nachdem LMP2A:CD69 die Freisetzung von Ca^{2+} -Ionen veranlassen kann, ist das negative Resultat der BZR-Stimulierung in 2190 LCLs vermutlich nicht die Folge eines aktiven Blockademechanismus von LMP2A gegenüber dem BZR. Die konstitutive Aktivität des

wtLMP2A führt jedoch zu einer Desensibilisierung der LCLs. Nach der Entleerung intrazellulärer Calciumspeicher benötigen Zellen einen gewissen Erholungszeitraum in der Größenordnung von mehreren Minuten, bevor sie erneut in der Lage sind, auf eine Stimulierung des BZR mit einem Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration zu reagieren (ALES-MARTINEZ et al. 1990; LAZARUS et al. 1990). Aus dieser Tatsache lässt sich eine erklärende Modellvorstellung ableiten, die besagt, dass ein konstitutives Signal keine Möglichkeit bietet, solche Erholungsphasen einzuhalten, so dass die Signaltransduktion des wtLMP2A eine permanente Desensibilisierung der LCLs in Bezug auf die Calcium-Mobilisierung zur Folge hat.

4.3.3 Untersuchung des NFκB Signalweges in lymphoblastoiden Zelllinien und primären humanen B-Zellen

Es ist seit langem bekannt und auch seit vielen Jahren ein fester Bestandteil von Lehrbüchern, dass die Signaltransduktion durch den BZR zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFκB führt. Wie in Abschnitt 1.2.3.2.4 beschrieben, gibt es verschiedene Wege der Aktivierung von NFκB, von welchen der kanonische und der nicht-kanonische Signalweg am besten untersucht sind. Je nach Stimulus und aktiviertem Rezeptor wird selektiv nur einer dieser Wege oder auch beide induziert. Letztlich resultiert die Stimulierung dieser Signalwege jedoch immer in der Aktivierung des IKK-Komplexes (Abb. 1-8), gefolgt von der Phosphorylierung von NFκB-Inhibitoren, wie z.B. IκBα. IκBα wird daraufhin durch das Proteasom abgebaut, sodass NFκB-Dimere in den Nukleus translozieren und dort die Transkription nachgeschalteter Zielgene regulieren können. Klassische Experimente für den Nachweis der Aktivierung von NFκB-Transkriptionsfaktoren untersuchen deshalb z.B. die Phosphorylierung von IKK oder IκBα, bzw. die Degradation von IκBα, die Translokation von NFκB-Dimeren in den Nukleus oder auch deren Bindung an DNA-Moleküle, welche spezifische NFκB-Erkennungssequenzen beinhalten.

Da die Familie der NFκB-Transkriptionsfaktoren ein bekanntes Ziel der Signaltransduktion durch den BZR darstellt, sollte auch die Fähigkeit von LMP2A in Bezug auf die Aktivierung von NFκB untersucht werden. In LCLs ergibt sich dabei jedoch ein Problem: Das konstitutiv aktive latente Membranprotein 1 (LMP1) von EBV bewirkt die permanente Aktivierung des kanonischen und auch des nicht-kanonischen NFκB-Signalwegs. LMP1 ist für die Transformation und das Überleben von LCLs essenziell und wird deshalb in allen LCLs

exprimiert. Aus diesem Grund entstand im Lauf meiner experimentellen Arbeiten die Idee, einen BZR-spezifischen NF κ B-Aktivierungsweg zu untersuchen, der oberhalb von IKK wirkt und nicht mit der Signaltransduktion von LMP1 interferiert.

Die Frage nach Verbindungselementen in der Signaltransduktion von Antigenrezeptoren hin zu einem aktivierten IKK-Komplex war in den vergangenen Jahren ein aktiver Gegenstand der Forschung. So konnten viele neue Erkenntnisse gewonnen werden, welche in ein zunehmend komplexer werdendes Modell eingehen (Abb. 1-8). Eine Schlüsselrolle kommt dabei den Adapterproteinen CARMA1, MALT1 und BCL10 zu (vgl. Abschnitt 1.2.3.2.4). Ein Teil der zellulären CARMA1-Moleküle ist in Cholesterin- und Sphingolipid-reichen Kompartimenten der Membran, den lipid rafts, lokalisiert (GAIDE et al. 2002), während MALT1 und BCL10 im Zytoplasma konstitutiv interagieren (UREN et al. 2000; LANGEL et al. 2008). Nachdem CARMA1 von PKC β phosphoryliert wird, ändert es seine Konformation (SOMMER et al. 2005), so dass es zum einen mit weiteren CARMA1-Molekülen interagieren kann und zum anderen BCL10 und MALT1 durch Interaktion mit CARMA1 an die Zytoplasmamembran rekrutiert werden (RAWLINGS et al. 2006). Die Stimulierung von Antigenrezeptoren hat also die Formierung des makromolekularen CBM-Komplexes zur Folge, welcher letztlich die Aktivierung des IKK-Komplexes bewirkt. Ein Großteil der Erkenntnisse über die Formierung und Funktion des CBM-Komplexes stammt aus Experimenten in T-Zellen, in welchen sich der Komplex nach TZR-Stimulierung ausbildet. Dennoch konnte auch in DT40 Zellen, einer B-Zelllinie aus dem Huhn, nach BZR-Stimulierung der CBM-Komplex detektiert werden (SHINOHARA et al. 2005; SHINOHARA et al. 2007) und das Fehlen von MALT1 oder BCL10 in primären murinen B-Zellen hatte Auswirkungen auf die Aktivität von NF κ B (RULAND et al. 2001; RULAND et al. 2003; FERCH et al. 2007).

Wie soeben beschrieben führt die Signaltransduktion durch den BZR über die Formierung des CBM-Komplexes zur Aktivierung von IKK und damit auch von NF κ B. Das EBV-Protein LMP1 aktiviert IKK über eine Signalkaskade, welche u.a. die Proteine TRAF6 und TAK1¹⁰ involviert, nicht aber den CBM-Komplex (KIESER 2008). Folglich schien die Untersuchung des CBM-Komplexes nach Stimulierung von BZR oder LMP2A:CD69 in LCLs eine Möglichkeit zu

¹⁰ TRAF6: Tumor necrosis factor receptor associated factor 6
TAK1: Transforming growth factor β activated kinase 1

sein, die BZR- oder LMP2A-vermittelte Aktivierung von NF κ B ohne den starken Hintergrund von LMP1 zu detektieren.

Die Ausbildung des CBM-Komplexes nach Aktivierung eines vorgeschalteten Rezeptors kann in humanen Lymphozyten zum Beispiel durch Koimmunpräzipitation nachgewiesen werden (WEGENER et al. 2006). Dabei wird BCL10 immunpräzipitiert und anschließend dessen Interaktion mit CARMA1 im Westernblot analysiert (Abb. 4-8). BCL10 wird nach Rezeptorstimulierung durch Phosphorylierung posttranslational modifiziert. Diese Modifikation kann aufgrund der verlangsamten Laufgeschwindigkeit von BCL10 während der Gelelektrophorese ebenfalls im Westernblot detektiert werden. Als weitere Kontrolle der Aktivierung von NF κ B nach Stimulierung dient die Detektion der Degradation von I κ B α im Westernblot.

Um zu ermitteln, ob der BZR und LMP2A in LCLs die Ausbildung des CBM-Komplexes bewirken, wurde in 2525 LCLs der BZR und in 3696 LCLs LMP2A:CD69 durch Zugabe der entsprechenden Antikörper stimuliert (Abb. 4-8). Die beiden Chemikalien PMA und Ionomycin (Abb. 4-8) forcieren den Einstrom von Ca²⁺-Ionen und die Aktivierung der PKC β unabhängig von einer Aktivierung des Rezeptors. Sie dienen als Positivkontrolle für die Ausbildung des CBM-Komplexes und die Aktivierung von NF κ B. Aus Gründen der Übersichtlichkeit ist in den Abbildungen 4-8 A-C nur das Resultat einer 30-minütigen Stimulierung dargestellt, da Stimulierungszeiten von 2 min bis 240 min zum selben Ergebnis führten.

Abb. 4-8 A zeigt die Reaktion von 2525 LCLs auf die Stimulierung mittels anti-IgG/M-Antikörper oder PMA/Ionomycin (P/I). Eine Kontrollstimulierung durch P/I führte in allen Belangen zur Ausbildung des CBM-Komplexes und zur Aktivierung von NF κ B. BCL10 wurde phosphoryliert, CARMA1 wurde mit BCL10 koimmunpräzipitiert und I κ B α wurde degradiert. Die Antikörper-vermittelte Stimulierung des BZR hatte wider Erwarten keine Auswirkungen auf die untersuchten Parameter. Für 3696 LCLs ergab sich ein ähnliches Bild (Abb. 4-8 B). Die Stimulierung mittels P/I zeigt, dass die Ausbildung des CBM-Komplexes und die Aktivierung von NF κ B in LCLs durchaus stattfindet, dennoch reagieren die beteiligten Proteine nicht auf Stimulierung des LMP2A:CD69.

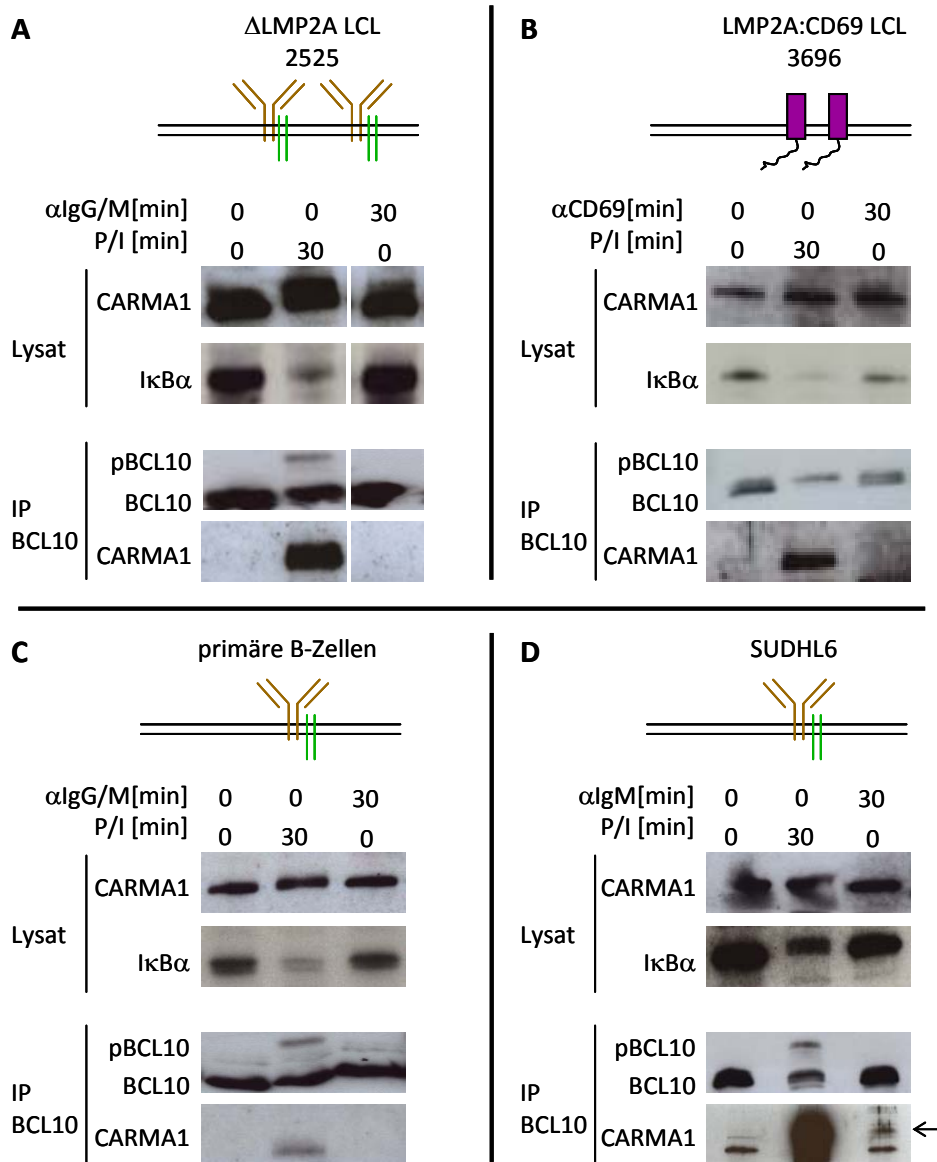


Abb. 4-8: Ausbildung des CBM-Komplexes nach Stimulierung von BZR oder LMP2A:CD69.

Die Stimulierung des BZR bewirkt die Ausbildung eines makromolekularen Proteinkomplexes, bestehend aus CARMA1, MALT1 und BCL10 (CBM-Komplex) (Abb. 1-8). Dieser Komplex ist maßgeblich an der Degradation von I κ B α und der damit verbundenen Aktivierung von NF κ B-Transkriptionsfaktoren beteiligt. Nach Ausbildung des CBM-Komplexes koimmunpräzipitiert CARMA1 mit BCL10 und kann im Westernblot detektiert werden. Weitere Folgen der BZR-Stimulierung sind die Phosphorylierung von BCL10 und die Degradation von I κ B α . Beide Merkmale können im Westernblot nachgewiesen werden. Als Positivkontrolle für die Aktivierung von NF κ B werden Zellen mit PMA und Ionomycin behandelt, zwei Chemikalien, die den Einstrom von Ca²⁺-Ionen und die Aktivierung der PKC β forcieren (Abb. 1-8). **A:** BZR-Stimulierung in 2525 LCLs führt weder zur Degradation von I κ B α noch zur Ausbildung des CBM-Komplexes. **B:** Auch die Stimulierung von LMP2A:CD69 hat keine Aktivierung von NF κ B zur Folge. Kontrollstimulierung mit P/I bewirkt in 3696 LCLs die Interaktion von CARMA1 mit BCL10 und die Degradation von I κ B α , jedoch nicht die Phosphorylierung von BCL10. **C:** In primären, EBV-negativen, humanen B-Zellen konnte wider Erwarten nach Stimulierung des BZR keine NF κ B-Aktivierung detektiert werden. **D:** Nach BZR-Stimulierung der B-Zell-Lymphom-Zelllinie SUDHL6 kann eine geringe Menge an CARMA1 mit BCL10 koimmunpräzipitiert werden (Pfeil). (PMA: Phorbol-12-myristat-13-acetat; P/I: PMA/Ionomycin; IP: Immunpräzipitation)

Diese negativen Ergebnisse könnten darauf beruhen, dass LMP1 möglicherweise auch auf dieser Ebene mit der NFκB-Signaltransduktion interferiert. Um diese Möglichkeit auszuschließen, wurde die Ausbildung des CBM-Komplexes in frisch isolierten, EBV-negativen, humanen adenoidalen B-Zellen untersucht. Diese reagierten schwächer als LCLs auf die Kontrollstimulierung durch P/I, aber die Aktivierung des BZR hatte auch hier keinen Einfluss auf den CBM-Komplex oder NFκB (Abb. 4-8 C). Allein in der zuletzt untersuchten Zelllinie SUDHL6, einer EBV-negativen Zelllinie eines diffusen großzelligen B-Zell-Lymphoms, konnte nach BZR-Stimulierung eine geringe Menge an CARMA1 mit BCL10 koimmunpräzipitiert werden (Abb. 4-8 D). Auch auf die Stimulierung mittels P/I reagierten SUDHL6-Zellen deutlich stärker als LCLs und primäre humane B-Zellen. SUDHL6-Zellen exprimieren große Mengen an NFκB-Proteinen (HECKMAN et al. 2002) und eignen sich gut für die Detektion der Aktivierung von NFκB. Das schwache, aber dennoch positive Ergebnis hinsichtlich der Ausbildung des CBM-Komplexes nach BZR-Stimulierung in SUDHL6-Zellen zeigt, dass humane B-Zellen theoretisch in der Lage sind, auf die Stimulierung des BZR mit der Aktivierung von NFκB zu reagieren. Dennoch führten zahlreiche Optimierungsversuche und Änderungen von Versuchsparametern, wie z.B. unterschiedliche Antikörper für die Stimulierung oder die Variation diverser Inkubationszeiten sowie der eingesetzten Zellzahlen, zu keinem positiven Ergebnis in LCLs und primären humanen B-Zellen. Nachdem die P/I-Positivkontrolle in allen untersuchten Zellen funktionierte und kein offensichtlicher Grund für die ausbleibende Aktivierung von NFκB nach BZR- oder auch LMP2A:CD69-Stimulierung vorliegt, müssen andere Ursachen für dieses Ergebnis diskutiert werden (siehe 5.3).

4.3.4 Schlussfolgerung der Signaltransduktionsanalysen

Die vergleichende Analyse der Signaltransduktion durch BZR und LMP2A, hinsichtlich induzierter Phosphorylierungsereignisse (Abb. 4-6), der Mobilisierung von Ca²⁺-Ionen (Abb. 4-7) und der Aktivierung von NFκB (Abb. 4-8), erlauben den Schluss, dass der BZR und LMP2A prinzipiell in der Lage sind, die gleichen Signaltransduktionswege zu aktivieren. Dennoch sind gewisse Unterschiede zu erkennen. So variieren Stärke und Kinetik der Phosphorylierung einiger untersuchter Signalmediatoren je nach Stimulus. Die konstitutive Aktivität von LMP2A bewirkt ein dauerhaft erhöhtes Maß an Phosphorylierung, dieses erreicht jedoch nicht dasselbe hohe Niveau, das auf die induzierte Stimulierung von BZR oder LMP2A:CD69 folgt. Der Einstrom von Ca²⁺-Ionen in das Zytosol kann sowohl durch den

BZR als auch durch LMP2A:CD69 induziert werden. In Gegenwart des konstitutiv aktiven wtLMP2A ist eine Induzierung der Calcium-Mobilisierung jedoch nicht möglich, so dass sich LMP2A in dieser Hinsicht durchaus von einem BZR unterscheidet. Die negativen Ergebnisse der Untersuchung des NF κ B-Signalwegs stellen eine weitere Gemeinsamkeit von LMP2A und dem BZR dar.

4.4 Vergleich der Regulierung der Genexpression durch LMP2A und den B-Zell-Rezeptor

Die Aktivierung von Oberflächenrezeptoren hat in vielen Fällen eine Regulierung der Genexpression zur Folge. So kann die Zelle auf Reize aus der Umgebung reagieren. In Abschnitt 4.3 wurde gezeigt, dass LMP2A und der BZR prinzipiell dieselben Signaltransduktionswege aktivieren. Diese Beobachtungen ließen vermuten, dass LMP2A und der BZR gemeinsame, nachgeschaltete Zielgene in der Zelle regulieren könnten. Um dieser Hypothese nachzugehen, wurde in einem genomweiten Vergleich die Genregulation des LMP2A und des BZR analysiert. Hierfür wurde wiederum in 2525 LCLs der BZR und in 3696 LCLs LMP2A:CD69 stimuliert. Mithilfe eines Microarrays zur Analyse des gesamten humanen Transkriptom wurde anschließend die Auswirkung dieser Rezeptoraktivierung auf die Regulierung der zellulären Genexpression analysiert.

4.4.1 Optimierung der Versuchsparameter

Vor der tatsächlichen Durchführung einer genomweiten Expressionsanalyse wurden verschiedene Versuchsparameter optimiert. Ein für die sinnvolle Auswertung dieses Experimentes entscheidender Parameter ist die Dauer der Stimulierung von BZR oder LMP2A:CD69. Für die Aktivierung der direkten Zielgene, deren Transkription und die Synthese detektierbarer Mengen an Transkripten benötigt die Zelle eine gewisse Zeit. Werden die synthetisierten Transkripte jedoch zu Proteinen translatiert, so können diese Proteine wiederum die Transkription weiterer Gene beeinflussen. Um solche indirekten Effekte möglichst ausschließen zu können, aber dennoch die Synthese ausreichend hoher Transkriptmengen abzuwarten, musste eine Entscheidung für die Dauer der Stimulierung gefunden werden.

Die Expression des Transkriptionsfaktors c-myc wird durch Stimulierung des BZR induziert, so dass bereits zwei Stunden nach Stimulierung erhöhte Mengen an c-myc-Protein detektiert werden können (LEE et al. 1995). C-myc schien daher ein geeignetes Modellgen zu sein, um die Zunahme der Transkriptmengen über einen Zeitraum von drei Stunden nach Stimulierung von BZR oder LMP2A:CD69 zu verfolgen (Abb. 4-9).

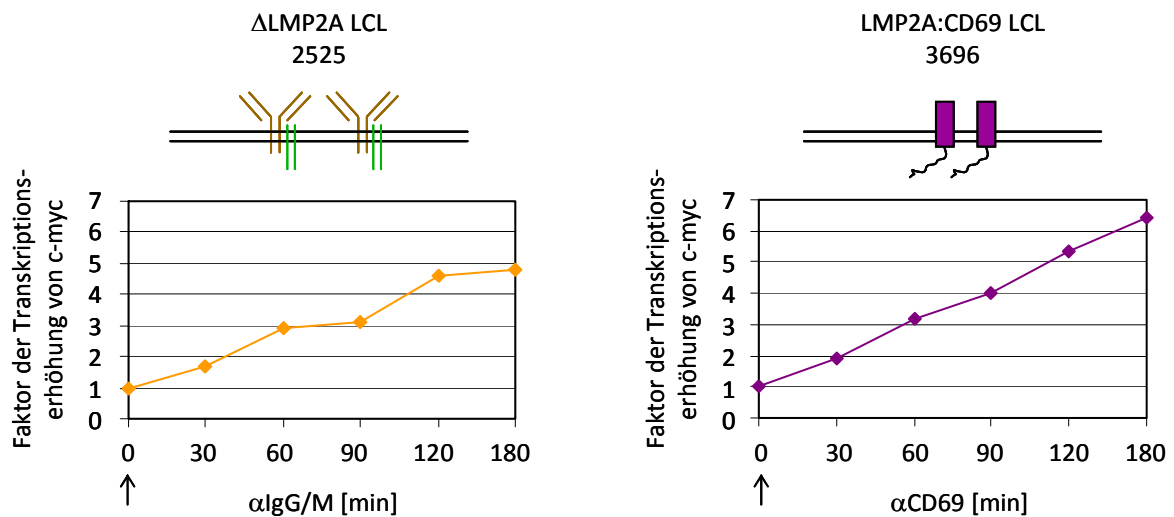


Abb. 4-9: Detektion der Transkripte von c-myc zur Optimierung der Dauer der Rezeptoraktivierung.

Über einen Zeitraum von drei Stunden wurde mittels qRT-PCR die Regulierung der Transkription des c-myc Gens verfolgt. Sowohl eine Stimulierung des BZR in 2525 LCLs als auch eine Stimulierung von LMP2A:CD69 in 3696 LCLs bewirkte einen nahezu linearen Anstieg der Transkriptmengen von c-myc. Für weitere Versuche wurde eine Stimulierungsdauer von 90 min gewählt, um einerseits erhöhte Transkriptionsraten deutlich erfassen zu können, andererseits jedoch die Gefahr der Detektion sekundär regulierter Gene zu minimieren. (qRT-PCR: quantitative PCR nach reverser Transkription; ↑: Start der Stimulierung)

Der BZR in 2525 LCLs bzw. LMP2A:CD69 in 3696 LCLs wurden 30, 60, 90, 120 und 180 min lang stimuliert. Im Anschluss wurde die RNA aus den Zellen isoliert. DNA-Kontaminationen wurden durch DNase-Verdau aus der RNA-Präparation entfernt. Die so gewonnene zelluläre RNA wurde schließlich mittels reverser Transkriptase in cDNA übersetzt. Als Primer für die reverse Transkriptase dienten oligo-dT-Nukleotide eingesetzt wurden, um ausschließlich mRNA in cDNA zu übersetzen. Die synthetisierte cDNA wurde für die Quantifizierung von c-myc-Transkripten mittels quantitativer RT-PCR eingesetzt.

Abb. 4-9 zeigt die relative Zunahme von c-myc Transkripten während einer dreistündigen Stimulierung des BZR in 2525 LCLs oder des LMP2A:CD69 in 3696 LCLs, im Vergleich zu unstimulierten Zellen. Dabei wurden alle Ergebnisse gegen die Transkriptmengen des Referenzgens Cytochrom C normalisiert (siehe 3.5.5). In beiden Zelllinien konnte ein nahezu linearer Anstieg der Transkriptmengen von c-myc detektiert werden, der in 3696 LCLs

stärker war als in 2525 LCLs. In beiden Zelllinien war nach 90 min die Menge an c-myc-Transkripten auf das Drei- bis Vierfache gestiegen, unerwünschte Effekte bereits neu synthetisierter Proteine sollten zu diesem frühen Zeitpunkt jedoch begrenzt sein. Die optimale Stimulierungsdauer vor einer genomweiten Expressionsanalyse wurde aufgrund dieses Ergebnisses auf 90 min festgelegt.

4.4.2 Qualitativer und funktionaler Test der isolierten mRNA

Unter Verwendung optimierter Versuchsparameter wurde für die genomweite Genexpressionsanalyse aus jeweils drei Kulturen stimulierter und unstimulierter 2525 und 3696 LCLs RNA isoliert. Die Analyse von Triplikaten jeder einzelnen Probe dient der statistischen Sicherheit und Belastbarkeit des Endergebnisses. Insgesamt wurden folglich zwölf RNA-Proben isoliert: 2525 LCLs unstimuliert (drei Proben), 2525 LCLs stimuliert (drei Proben), 3696 LCLs unstimuliert (drei Proben), 3696 LCLs stimuliert (drei Proben).

RNA-Proben, welche für die genomweite Expressionsanalyse mittels Microarray eingesetzt werden, müssen von hoher Qualität sein. Des Weiteren sollte auch die Funktionalität jeder einzelnen Probe vorweg sichergestellt werden, da ein misslungenes Microarray-Experiment eine zeit- und kostenintensive Wiederholung des Versuchs bedeuten würde. Die Qualität der zwölf RNA-Proben wurde mithilfe eines Agilent-Bioanalyzers gemessen. Hierbei werden die RNA-Proben mittels Kapillarelektrophorese der Größe nach aufgetrennt. Für jede Probe wird ein Elektropherogramm erstellt in dem detektierte RNA-Fragmente als Ausschlag (Peak) einer Kurve angezeigt werden. Elektropherogramme können auch als virtuelles Gelbild ausgegeben werden (Abb. 4-10). Die beiden deutlichsten Peaks bzw. „Banden“ einer RNA-Kapillarelektrophorese stammen dabei von den 28S und 18S ribosomalen RNAs, welche etwa 80 % der zellulären Gesamt-RNA darstellen. Das Verhältnis von 28S zu 18S rRNA liegt bei RNA von hoher Qualität bei > 2:1. Zusätzlich detektierte Peaks entstehen aus Abbauprodukten der ribosomalen RNAs und deuten auf eine mehr oder weniger stark degradierte RNA-Probe hin. Als Folge verändert sich auch das 28S/18S rRNA-Verhältnis.

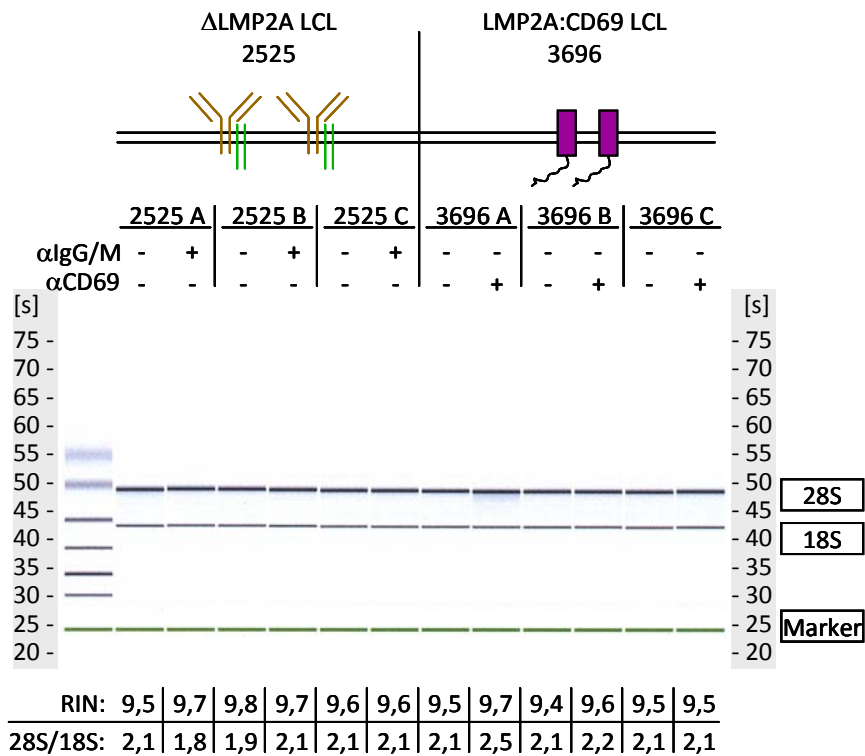


Abb. 4-10: Qualitätsanalyse der RNA-Proben durch Kapillarelektrophorese.

Jeweils drei separat kultivierte 2525 bzw. 3696 LCLs wurden 90 min lang durch Zugabe von αIgG/M- bzw. αCD69-Antikörpern stimuliert. Aus diesen sechs stimulierten und den sechs korrespondierenden unstimulierten Proben wurde RNA isoliert. Als Qualitätstest wurde die Messung der RNA-Integrität mittels Kapillargelelektrophorese herangezogen. Das Ergebnis der Trennung der RNA-Proben nach Fragmentgrößen wird dabei als Elektropherogramm ausgegeben und kann in ein „virtuelles Gelbild“ umgewandelt werden (siehe Abbildung). Basierend auf der Integration der ribosomalen 28S- und 18S-rRNA-Peaks der Elektropherogramme wird das Verhältnis von 28S- zu 18S-rRNA berechnet. Bei einer RNA-Probe von hoher Qualität wird von einem 28S/18S-rRNA-Verhältnis von > 2,0 ausgegangen. Die RNA-Integritätsnummer (RIN) dient als Kennzahl der RNA-Integrität. Alle zwölf analysierten RNA-Proben zeichnen sich durch eine sehr gute RNA-Integrität aus.

Als Maß für die RNA-Integrität dient die RNA-Integritätsnummer (RIN), deren Berechnung von Agilent Biotechnologies und Quantiom Bioinformatics entwickelt wurde. Dabei wird der RNA-Qualität ein Zahlenwert zwischen eins und zehn zugeordnet, wobei zehn für die höchst mögliche RNA-Qualität steht und eins einer vollständig degradierten RNA-Probe entspricht. In die Berechnung der RIN-Nummer fließt neben dem Verhältnis von 28S zu 18S rRNA auch das restliche Profil des Elektropherogramms mit ein, welches alle Peaks degradierteter RNA-Fragmente enthält. Wie aus Abb. 4-10 zu ersehen ist, waren alle zwölf RNA Proben mit einer $RIN \geq 9,4$ von hoher Qualität und konnten für eine genomweite Expressionsanalyse eingesetzt werden.

Als letzte Kontrolle wurden alle RNA Proben wie unter 4.4.1 beschrieben auf die Induktion der c-myc-Transkription hin untersucht. Abb. 4-11 zeigt, dass alle Proben auf Stimulierung von BZR oder LMP2A:CD69 mit einer Zunahme der c-myc-Transkription reagierten. Die Stimulierung von LMP2A:CD69 führte dabei wie bereits in Abb. 4-9, zu einer stärkeren Induktion der Transkription des c-myc Gens.

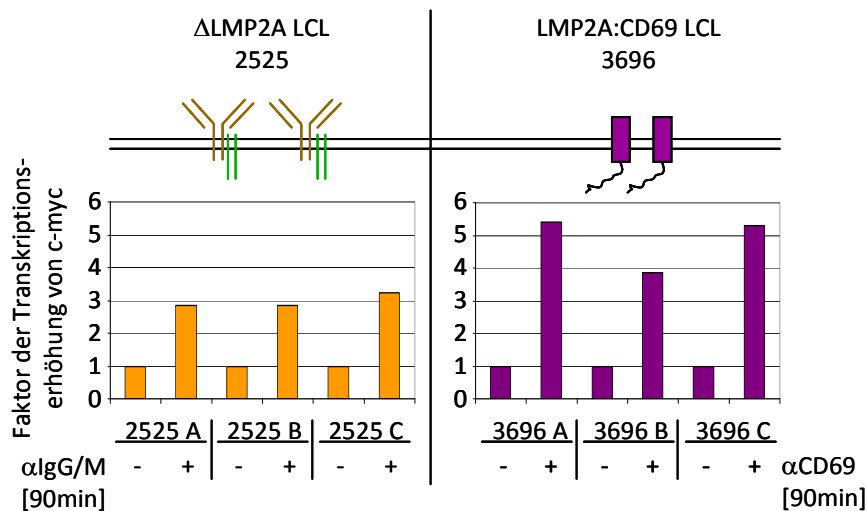


Abb. 4-11: Funktionalität der RNA-Proben.

Vor der Durchführung der Genexpressionsanalyse wurden alle präparierten RNA-Proben mittels qRT-PCR auf die Expressionserhöhung des c-myc-Gens nach BZR- bzw. LMP2A:CD69-Stimulierung untersucht (vgl. Abb. 4-9). Stimulierung führte in allen Zelllinien zur Expressionserhöhung von c-myc.

Mit diesen Ergebnissen waren alle Tests der RNA-Proben abgeschlossen. Die Proben wurden der Firma Roche NimbleGen Inc. übersandt, welche alle weiteren Schritte der genomweiten Expressionsanalyse durchführte.

4.4.3 Genomweite Genexpressionsanalyse mittels cDNA Microarray

Für die genomweite Analyse der Genexpression wurden Oligonukleotid-Microarrays verwendet. An definierten Stellen (Spots) eines solchen Microarrays sind 60-mer DNA-Oligonukleotide von jeweils einer einzigen Sequenz je Spot verankert. Die Sequenzen dieser Oligonukleotide wurden speziell darauf ausgerichtet, die cDNA jeweils eines Transkripts komplementär zu binden. Jedes Transkript kann an mehrere verschiedene Sequenzen bzw. Spots binden. In ihrer Summe decken die Oligonukleotide eines Microarrays das gesamte Transkriptom (25010 Transkripte) einer Zelle mehrfach ab (47634 Spots).

Die zwölf eingesandten RNA Proben der 2525 und 3696 LCLs wurden von Roche NimbleGen Inc. zunächst revers transkribiert, um cDNA zu erhalten. Alle cDNA-Proben wurden

anschließend mit demselben Fluoreszenzfarbstoff markiert, da jede Probe auf einem separaten Microarray hybridisiert werden sollte. Nach Hybridisierung einer markierten cDNA-Probe an die Oligonukleotide des Microarrays konnte anhand der Fluoreszenzintensitäten einzelner Spots die relative Häufigkeit vorhandener Transkripte in Form von hybridisierten cDNAs jedes einzelnen Gens bestimmt werden. Vergleicht man die Ergebnisse zweier Microarrays einer Probe vor und nach Stimulation, können differenziell exprimierte Gene identifiziert und zusätzlich der Faktor der Expressionszu- oder -abnahme bestimmt werden.

Die bioinformatische Analyse und Auswertung der Rohdaten dieser Microarray-Experimente wurde von der Firma MicroDiscovery GmbH durchgeführt. Das Endergebnis der Auswertung ist in Abb. 4-12 dargestellt. Ein detaillierter Bericht, welcher von MicroDiscovery erstellt wurde, sowie eine Liste der gemeinsam regulierten Gene von BZR und LMP2A (Abb. 4-12 „a“) sind im Anhang dieser Arbeit zu finden. Jeder der Punkte, die in Abb. 4-12 dargestellt sind, entspricht dem Transkript eines Gens, so dass insgesamt 25010 Punkte dargestellt sind. Entlang der X-Achse ist die Regulierung der Gene durch die Stimulierung von LMP2A:CD69 aufgetragen, die Y-Achse repräsentiert die Genregulierung durch Stimulierung des BZRs. Die meisten der 25010 Punkte liegen in einem Bereich nahe dem gemeinsamen Nullpunkt von X- und Y-Achse und stellen demnach kein direktes Ziel der Genregulierung durch den BZR oder LMP2A:CD69 dar (man beachte die Einheit $[\log_2\text{Faktor}]$ der Achsenbeschriftung, 0 entspricht einer relativen Änderung der Genexpression um den Faktor $2^0 = 1$). Aufgrund statistischer Erfahrungswerte wurden in diesem Experiment lediglich diejenigen Gene als „eindeutig regulierte Zielgene“ betrachtet, deren Expression sich nach Stimulierung um den Faktor zwei oder mehr verändert, was durch die roten Linien in Abb. 4-12 verdeutlicht wird.

Die Farbskalierung der Punkte in Abb. 4-12 gibt den errechneten P-Wert der Regulierung jedes einzelnen Gens in diesem Experiment wider. Der P-Wert ist ein Maß für die statistische Signifikanz eines Wertes. Er liegt immer zwischen Null und Eins. Dieser Wert gibt an, wie groß die Wahrscheinlichkeit ist, dass ein Gen, welches nicht auf dem gemeinsamen Nullpunkt von X- und Y-Achse liegt, alleine durch Zufall an einem anderen Ort liegt, nicht aber, weil seine Expression tatsächlich reguliert wurde. Ein kleiner P-Wert, also ein dunkler Punkt, spricht deshalb dafür, dass ein Gen tatsächlich reguliert wurde und nicht nur durch Zufall an einer Position der Grafik erscheint, die für eine Regulierung des Gens sprechen

würde. Zufall meint, dass die drei Proben einer Zelllinie, in Bezug auf die Regulierung eines bestimmten Gens, völlig unterschiedliche Werte der Genregulierung ergeben haben, deren Mittelwert zufällig weit entfernt vom Nullpunkt liegt. In Abb. 4-12 kommt hinzu, dass die angegebenen P-Werte die Mittelwerte aus den P-Werten sind, welche jedem Gen nach BZR-Stimulierung bzw. LMP2A:CD69-Stimulierung zugeteilt wurden. Zusammengefasst ergeben sich daraus drei wesentliche Aussagen:

1. Je näher die detektierte Regulierung eines Gens dem gemeinsamen Nullpunkt von X-Achse und Y-Achse kommt, desto Größer ist die Wahrscheinlichkeit, dass der ermittelte Wert nur durch Zufall nicht genau auf dem Nullpunkt liegt und desto größer ist folglich sein P-Wert (verdeutlicht durch die hellgelben Punkte in der Nähe des Nullpunktes).
2. Der P-Wert sinkt sowohl mit zunehmender Entfernung zum Nullpunkt, als auch mit der Reproduzierbarkeit der Regulierung eines Gens innerhalb der drei Proben je Zelllinie. Ist die Regulierung nicht reproduzierbar, sinkt der P-Wert jedoch nicht alleine durch seine Entfernung zum Nullpunkt auf einen Wert, der für die signifikante Regulierung eines Gens sprechen würde (deshalb sind auch hellgelbe Punkte in weiter Entfernung vom Nullpunkt zu finden).
3. Da der P-Wert eines Gens in Abb. 4-12 einen Mittelwert aus zwei P-Werten aus den Experimenten mit BZR- bzw. LMP2A:CD69-Stimulierung darstellt, kann er nur dann minimal werden, wenn eine signifikante Regulierung sowohl durch den BZR als auch durch LMP2A:CD69 stattgefunden hat (verdeutlicht durch die dunkelsten Punkte in Rechteck „a“ der Abb. 4-12).

In Abb. 4-12 sind also zwei Kriterien für die Analyse differenzieller Genregulierung vereint dargestellt: Der Faktor der Expressionsänderung nach Stimulierung und der P-Wert, welcher ein Maß für die statistische Signifikanz der Regulierung darstellt. Die Erfahrung der Bioinformatiker der Firma MicroDiscovery GmbH besagt jedoch, dass bei nur drei Proben je Zelllinie der Faktor der Expressionsänderung das verlässlichere Kriterium für die Identifizierung differenziell regulierter Gene ist.

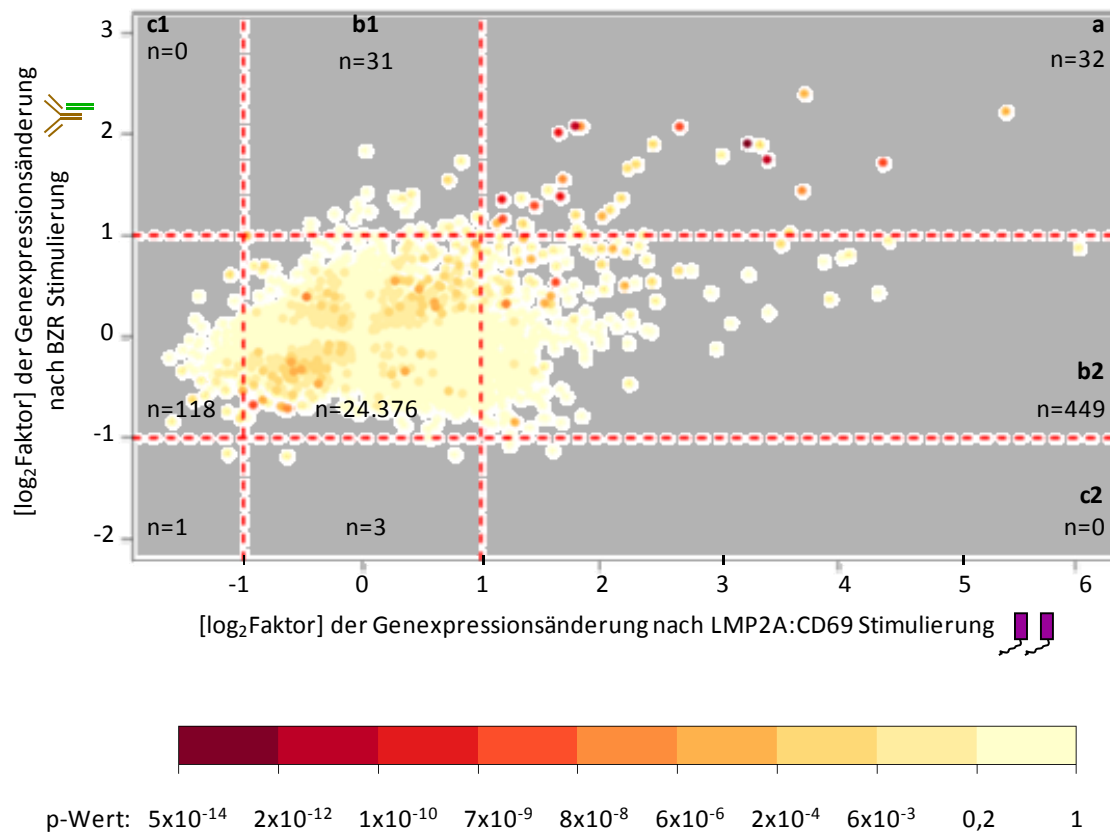


Abb. 4-12: LMP2A und der BZR regulieren zelluläre Zielgene selektiv und gleichsinnig.

Die genomweite Genexpressionsanalyse mittels cDNA Microarray wurde von der Firma Roche NimbleGen Inc. durchgeführt. Eingesandte RNA-Proben (Abb. 4-10, Abb. 4-11) wurden revers in cDNA transkribiert, mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert und auf jeweils einen Microarray hybridisiert, der 25010 zelluläre Transkripte umfasst. Bioinformatische Analysen der generierten Daten wurden von der Firma MicroDiscovery GmbH durchgeführt. Sie beinhalten u.a. die Normalisierung der Rohdaten, die Optimierung des Signal-Rausch-Verhältnisses sowie die Berechnung der statistischen Signifikanz einzelner Werte nach Vergleich der sechs analysierten Proben je Zelllinie. Als Ergebnis der Berechnungen erscheint jedes Gen als Punkt in oben gezeigter Grafik. Entlang der x-Achse ist dabei die Genregulierung durch LMP2A:CD69, entlang der y-Achse die Genregulierung durch den BZR aufgetragen. Die farbliche Markierung der einzelnen Gene spiegelt den P-Wert der berechneten Regulierung eines Gens wider. Ein kleiner P-Wert (errechnet nach dem t-Test; genauere Erklärung im Text: Abschnitt 4.4.3) spricht für ein hoch signifikantes Ergebnis. (n: Anzahl der Punkte je Rechteck)

Die Ergebnisse der genomweiten Expressionsanalyse zellulärer Gene nach Stimulierung von BZR oder LMP2A:CD69 zeigen, dass die beiden Oberflächenproteine viele Zielgene gemeinsam haben und diese gleichsinnig regulieren. Einen ersten Hinweis darauf liefert die annähernd diagonale Anordnung der Punkte in Abb. 4-12, von links unten nach rechts oben. Sie zeigt, dass LMP2A:CD69 und der BZR prinzipiell die Expression derselben Gene regulieren. Diese fiktive Diagonale ist in Richtung der X-Achse geneigt. Wie bereits in Abb. 4-9 und Abb. 4-11 beobachtet, führt die Stimulierung von LMP2A:CD69 zu einer stärkeren Regulierung der Genexpression als die Stimulierung des BZRs, was diese Neigung erklärt. Die Expression der Gene in Rechteck „a“ (siehe Anhang) wird sowohl durch den BZR als auch durch LMP2A:CD69 statistisch signifikant erhöht. Rechteck „b1“ zeigt, dass es kaum Gene gibt,

welche ausschließlich durch die Stimulierung des BZR aktiviert werden, nicht aber durch LMP2A:CD69. Für das Vorhandensein einiger Punkte in Rechteck „b2“ können zwei mögliche Erklärungen gefunden werden. Zum einen reagieren 3696 LCLs, wie bereits erwähnt, stärker auf die Stimulierung von LMP2A:CD69 als 2525 LCLs auf die Stimulierung des BZR reagieren. Deshalb liegen einige Gene knapp unterhalb des Schwellenwertes (rote Linie) für eine deutliche Regulierung durch den BZR und knapp oberhalb des entsprechenden Schwellenwertes für LMP2A:CD69. Diese Gene liegen dann links oben in „b2“. Zum anderen könnten die Punkte in „b2“ bedeuten, dass LMP2A zusätzliche Funktionen zu denen des BZR hat und die Stimulierung von LMP2A:CD69 deshalb auch zusätzliche Zielgene aktiviert. Eine letzte wichtige Aussage kann nach Betrachtung der Rechtecke „c1“ und „c2“ getroffen werden. Hier sind keine Punkte zu finden, was deutlich zeigt, dass kein einziges Gen von LMP2A:CD69 und dem BZR gegensinnig reguliert wird.

4.4.4 Schlussfolgerung der Genexpressionsanalysen

Die vergleichende Analyse der Regulierung der Expression zellulärer Gene nach Stimulierung des BZR oder des LMP2A:CD69 ergab, dass die beiden Proteine prinzipiell dieselben Gene regulieren. Da diese Stimulierung auch zur Aktivierung derselben Signaltransduktionswege führt (vgl. Abschnitt 4.3), war dieses Ergebnis zu erwarten. Es zeigt, dass LMP2A auch hinsichtlich der regulierten Zielgene den BZR nachahmt.

4.5 Die Rolle von LMP2A bei der Induktion des lytischen Zyklus des Epstein-Barr Virus

Als letzter Teil der vergleichenden Analyse von BZR und LMP2A sollte ein wichtiger funktioneller Aspekt untersucht werden. Es ist seit langem bekannt, dass der BZR in einigen EBV-positiven Zelllinien das Virus reaktivieren und den lytischen Zyklus des EBV induzieren kann (TOVEY et al. 1978; TAKADA 1984). Diese Zelllinien stammen von Burkitt-Lymphomen und exprimieren LMP2A im Allgemeinen nicht. Die Rolle von LMP2A bei der Induktion des lytischen Zyklus von EBV wird seit Jahren kontrovers diskutiert. Während die BZR-vermittelte Induktion des lytischen Zyklus in wtLCLs, die LMP2A konstitutiv exprimieren, in der Regel erfolglos ist, reagieren LMP2A-negative LCLs auf eine Stimulierung des BZR mit der Induktion des lytischen Zyklus (MILLER et al. 1993). Andere Versuche kamen jedoch zu dem Ergebnis, dass alleine die Expression von LMP2A dazu führt, dass die lytische Phase des EBV

aktiviert wird (SCHAADT et al. 2005; IKEDA and LONGNECKER 2009). Um diese kontroverse Diskussion zu klären und gleichzeitig einen funktionellen Vergleich zwischen BZR und LMP2A anzustellen, wurde im Folgenden die Fähigkeit von LMP2A und dem BZR hinsichtlich der Induktion des lytischen Zyklus von EBV systematisch untersucht.

4.5.1 Expression lytischer Gene in LMP2A-positiven und -negativen lymphoblastoiden Zelllinien vor und nach Aktivierung des B-Zell-Rezeptors

Die Expression von EBV-Genen, welche für den Ablauf der lytischen Replikation verantwortlich sind, kann in drei Phasen unterteilt werden (TSURUMI et al. 2005). Die ersten Gene, so genannte „immediate early“ (IE) Gene, welche unmittelbar nach Induktion des lytischen Zyklus exprimiert werden, sind die beiden Transkriptionsfaktoren BZLF1 und BRLF1. Sie aktivieren die Expression viraler und zellulärer Gene und leiten damit die geordnete Abfolge von Prozessen der lytischen Replikation ein. Zeitlich verzögert werden anschließend Gene exprimiert, welche als virale Expressionsmaschinerie das EBV-Genom 100- bis 1000-fach amplifizieren. Sie werden als „early“ (E) Gene bezeichnet. Virale Gene, welche während der späten lytischen Phase exprimiert werden, „late“ (L) Gene, kodieren hauptsächlich virale Strukturproteine, welche für die Generierung infektiöser EBV-Partikel von Bedeutung sind.

Für die Untersuchung der Rolle von LMP2A bei der Induktion des lytischen Zyklus konnte von dem chimären LMP2A:CD69 Protein kein Gebrauch gemacht werden. Da die Etablierung einer stabilen Virus-produzierenden Zelllinie für die 3696-EBV-Mutante bisher nicht möglich war (siehe 2.4.3), existieren lediglich zwei klonale 3696 LCLs. Eine dieser beiden LCLs exprimiert konstitutiv lytische Gene, die andere nicht. Die Ursachen für dieses unterschiedliche Verhalten sind unbekannt. Was beiden jedoch gemeinsam ist, ist die Tatsache, dass sie weder auf die Stimulierung des BZR noch des LMP2A:CD69 ihr Verhalten bezüglich der Expression lytischer Gene veränderten. Aus diesem Grund wurden in den folgenden Versuchen jeweils 2190 wtLCLs mit 2525 Δ LMP2A LCLs verglichen. Um hierbei nicht ebenfalls Ergebnisse zu produzieren, welche ausschließlich die charakteristischen Eigenschaften eines einzelnen Zellklons demonstrieren, wurden von jedem der beiden LCL-Typen jeweils zehn klonale Zelllinien untersucht, wodurch die Aussagekraft der Resultate von der experimentellen Breite und statistischen Relevanz gestärkt wird.

Ein erster Eindruck der Auswirkungen des wtLMP2A-Proteins und des BZR auf die Induktion des lytischen Zyklus von EBV wurde mithilfe einer semiquantitativen RT-PCR-Analyse verschiedener viraler Leittranskripte gewonnen (Abb. 4-13). Hierbei wurde in 2190 und 2525 LCLs der BZR jeweils 60 Stunden lang stimuliert, um anschließend die Aktivierung der Transkription lytischer Gene zu analysieren. Stellvertretend für die drei Phasen der lytischen Genexpression, IE, E und L, wurden die drei Gene BZLF1 (IE), BMRF1 (E) und BLLF1 (L) untersucht. Die Probenvorbereitung von der RNA-Extraktion bis zur cDNA erfolgte dabei wie unter 3.5 beschrieben. Die cDNA wurde anschließend als Matrize für eine normale PCR-Reaktion verwendet. Dabei war eine empirisch ermittelte Anzahl von 33 Amplifikationszyklen optimal, um nach der PCR quantitative Unterschiede der amplifizierten DNA-Produkte detektieren zu können. Die PCR-Proben wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und die amplifizierten DNA-Produkte mithilfe von Ethidiumbromid sichtbar gemacht. Das Ergebnis dieser Analyse ist in Abb. 4-13 dargestellt.

Bei Betrachtung der Ergebnisse fällt auf, dass in allen zehn klonalen 2190 LCLs (Abb. 4-13 A) bereits vor einer Stimulierung durch den BZR die Transkripte der drei untersuchten lytischen Gene detektiert werden konnten. Die Aktivierung des BZR bewirkte jedoch nur in manchen Klonen eine leichte Zunahme der Transkripte. Ein anderes Bild ergibt sich für LMP2A-negative 2525 LCLs (Abb. 4-13 B). Vor einer Stimulierung des BZR konnten mit Ausnahme von Klon #13 keine oder lediglich sehr geringe Mengen an Transkripten lytischer Gene detektiert werden. Die Aktivierung des BZR führte in nahezu allen klonalen 2525 LCLs zu einer starken Induktion der Transkription lytischer Gene. Die Ergebnisse zeigen, dass die konstitutive Expression von LMP2A unabhängig von der Aktivität des BZR die Transkription von EBV-Genen aus allen drei Phasen des lytischen Zyklus induziert. LMP2A-negative LCLs dagegen zeigen in der Regel keine spontane Induktion des lytischen Zyklus von EBV. Der BZR kann lytische Transkripte lediglich in LMP2A-negativen LCLs induzieren. Eine mögliche Erklärung dafür ist das niedrige Expressionsniveau des BZR in 2190 LCLs im Vergleich zu 2525 LCLs (vgl. Abb. 4-2 und Abb. 4-5). Aber auch die konstitutive Aktivität von LMP2A könnte verhindern, dass wtLCLs auf ein zusätzliches Signal des BZR reagieren.

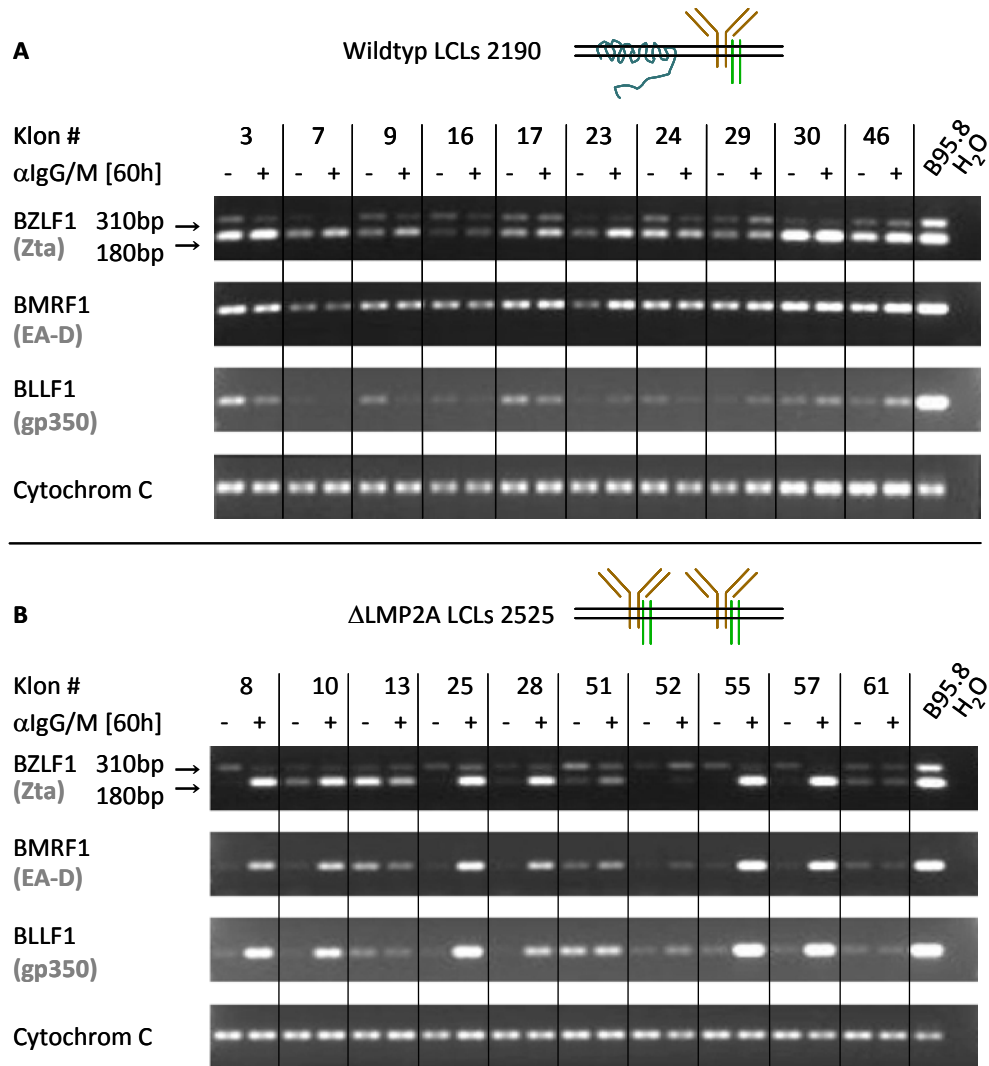


Abb. 4-13: LMP2A induziert die Expression lytischer Gene.

In zehn Klonen von 2190 und 2525 LCLs wurde mittels semi-quantitativer RT-PCR die Expression von drei lytischen Genen des EBV untersucht: BZLF1 (sehr frühes Gen (IE), Genprodukt: Zta); BMRF1 (frühes Gen (E), Genprodukt: EA-D); BLLF1 (spätes Gen (L), Genprodukt: gp350). Die Transkription dieser Gene wurde vor und nach 60-stündiger Stimulierung des BZR ermittelt. **A:** In allen 10 Klonen der 2190 LCLs konnten bereits vor der Stimulierung des BZR Transkripte lytischer Gene detektiert werden. Eine Zunahme der Expression lytischer Gene nach BZR-Stimulierung war nur in manchen Klonen in geringem Maße zu erkennen. **B:** In den 10 Klonen der 2525 LCLs konnten vor der Stimulierung des BZR nur unerhebliche Mengen von Transkripten der lytischen Gene detektiert werden, wohingegen eine Stimulierung des BZR die Transkription stark induzierte. Zur Kontrolle wurde in allen Klonen das zelluläre Gen für Cytochrom C analysiert, welches nicht auf BZR-Stimulierung reagiert. B95.8 ist eine LCL, welche zu etwa 10% kontinuierlich lytisch aktiv ist. Diese Zelllinie diente als Positivkontrolle für die Detektion lytischer EBV-Gene. DNA-Kontaminationen wurden mithilfe einer PCR-Reaktion ohne DNA-Matrize (H₂O) ausgeschlossen. BZLF1-Transkripte kommen in zwei Spleißvarianten vor, deren funktionelle Unterschiede bisher nicht genau bekannt sind. (IE: immediate early; E: early; L: late; EA-D: early antigen D; gp350: Glykoprotein 350 kDa)

Nachdem letztendlich nicht die Transkripte lytischer Gene die virale Replikation vermitteln, sondern diese Aufgabe den daraus entstehenden Proteinen zukommt, wurde stellvertretend für alle lytischen EBV-Gene die Expression von BZLF1 auch auf Proteinebene untersucht (Abb. 4-14).

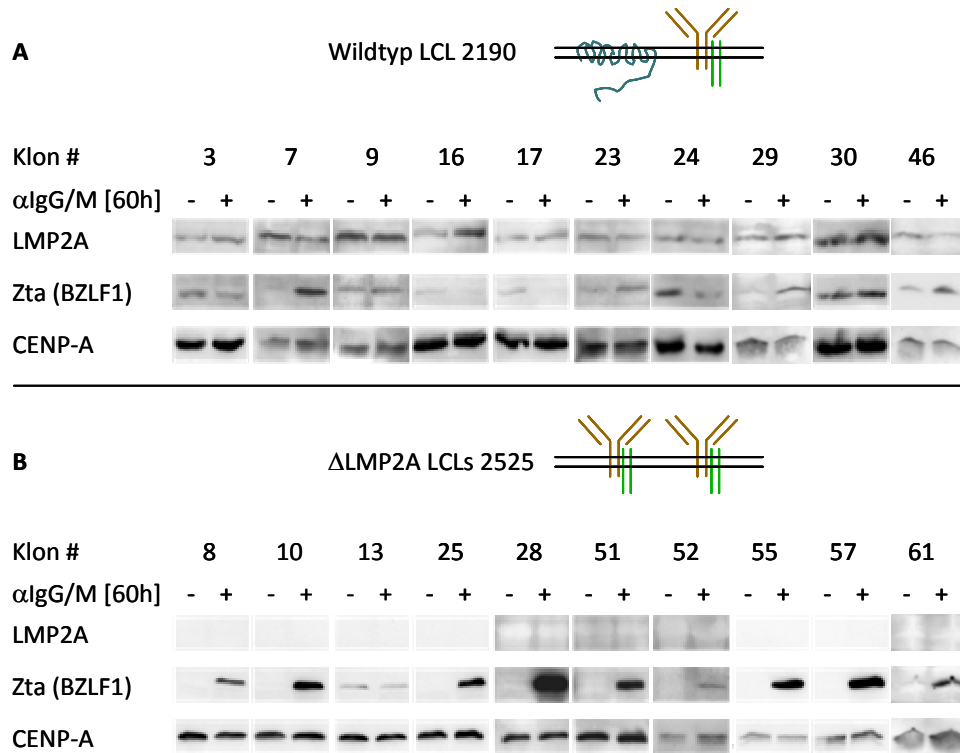


Abb. 4-14: Zta (BZLF1) Expression, in LMP2A-positiven und -negativen LCLs vor und nach BZR-Stimulierung auf Proteinebene.

Die Expression des Zta-Proteins, das von BZLF1 kodiert wird, spiegelt die Resultate der Genregulierung auf transkriptioneller Ebene wider (vgl. Abb. 4-13). **A:** 2190 LCLs exprimieren Zta auch im uninduzierten Zustand, eine wesentliche Zunahme der Zta-Proteinmenge nach Stimulierung des BZR konnte nicht detektiert werden. **B:** 2525 LCLs exprimieren nur in Ausnahmefällen minimale Mengen an Zta, Stimulierung des BZR bewirkt jedoch mit Ausnahme von Klon #13 in allen Klonen einen deutlichen Anstieg der Zta-Expression. Das Protein CENP-A (Centromere protein A) diente als Ladekontrolle.

Hierfür wurde in 2190 und 2525 LCLs der BZR für 60 Stunden stimuliert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und die Proteinkonzentration der Zelllysate mittels Bradford-Assay (siehe Abschnitt 3.4.1) bestimmt. Dadurch konnte von den Lysaten einer Zelllinie vor und nach Stimulierung jeweils die gleiche Proteinmenge für eine Westernblotanalyse eingesetzt werden, so dass ein quantitativer Vergleich der beiden Proben möglich war. Das Resultat dieses Experiments (Abb. 4-14) spiegelt die Ergebnisse der semiquantitativen RT-PCR (Abb. 4-13) wider. So war Zta, das Genprodukt von BZLF1, in allen 2190 LCLs bereits vor der Stimulierung des BZR vorhanden, wenn auch z.T. in sehr geringen Mengen (Abb. 4-14 A). Die Aktivierung des BZR bewirkte wiederum nur in manchen Klonen eine leichte Zunahme der Proteinmenge. In 2525 LCLs wurden vor BZR-Stimulierung keine oder nur geringe Mengen an Zta detektiert, während die Proteinsynthese nach Rezeptorstimulierung, mit Ausnahme von Klon #13, deutlich aktiviert war (Abb. 4-14 B).

Die Ergebnisse aus Abb. 4-13 und Abb. 4-14 liefern wertvolle Erkenntnisse über die Rolle von LMP2A und dem BZR für die Expression lytischer Gene und die damit verbundene Induktion des lytischen Zyklus von EBV. Dennoch gibt es sowohl innerhalb der Gruppe der 2190 LCLs als auch innerhalb der Gruppe der 2525 LCLs klonale Unterschiede. So ist beispielsweise die klonale LCL 2525.13 auch ohne LMP2A und die Stimulierung des BZR in der Lage, lytische EBV-Gene zu exprimieren. Aus diesem Grund sollte ein abschließendes Experiment zeigen, dass LMP2A tatsächlich ursächlich an der Expression von BZLF1, dem Schlüsselgen für die Induktion des lytischen Zyklus von EBV, beteiligt ist.

4.5.2 Die Expression lytischer Gene ist eine direkte Folge der Expression von LMP2A

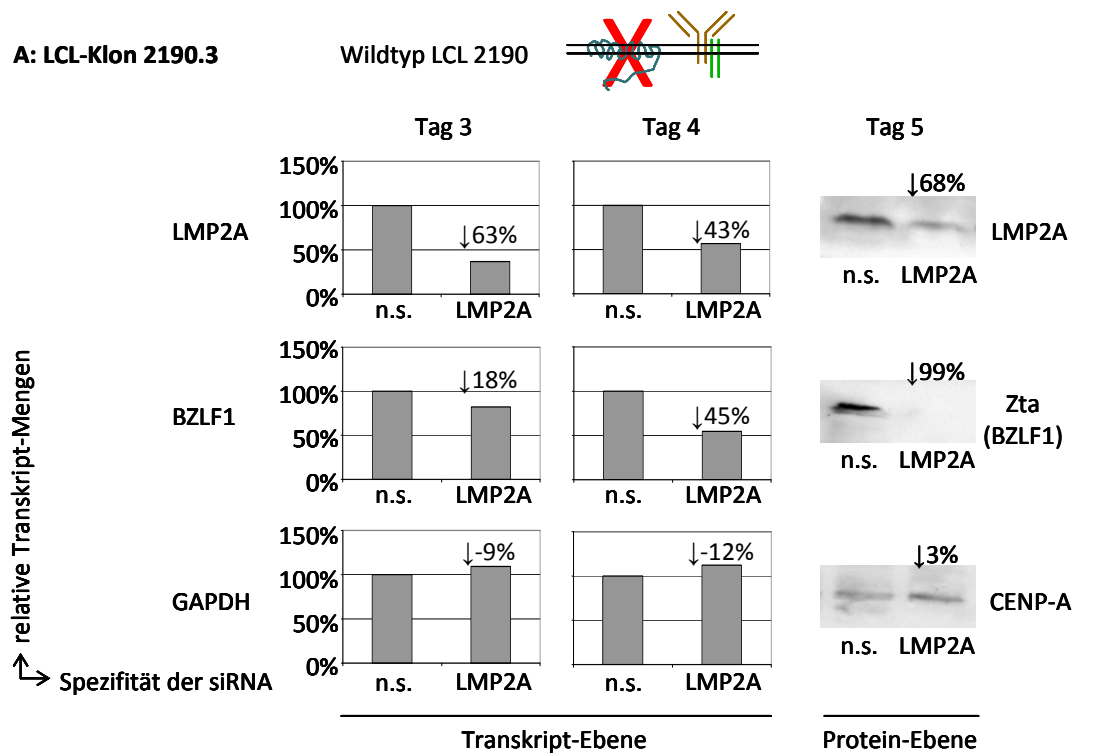
Die Ergebnisse der Experimente des letzten Abschnitts weisen darauf hin, dass die Expression von LMP2A und BZLF1 direkt korrelieren. Es lag nahe zu vermuten, dass das konstitutive LMP2A-Signal das BZLF1-Gen direkt reguliert. Um diese Hypothese zu untersuchen, wurde versucht die Expression von LMP2A in 2190 LCLs mittels RNAi zu reduzieren um eine mögliche Koregulierung, d.h. einen Verlust von Zta, zu detektieren.

Ein gewöhnlicher siRNA-vermittelter Knockdown von LMP2A ist aufgrund der schlechten Transfizierbarkeit von LCLs nicht durchführbar. Die Firma Thermo Scientific Dharmacon bietet für solche Zellen ein speziell entwickeltes siRNA-Format an, die so genannte Accell™ siRNA. Accell™ siRNAs sind mit Modifikationen versehen, welche eine Transfektion überflüssig machen. Die modifizierten, kleinen Accell™ siRNA-Moleküle können die Barriere der Zellmembran ohne weitere Hilfe überwinden. Über die Natur dieser Modifikationen gibt Thermo Scientific Dharmacon keine Auskunft, jedoch ist in der Literatur beschrieben, wie siRNAs durch die Verknüpfung mit kleinen Peptiden oder einfachen Molekülen, wie z.B. Cholesterin, ein Eindringen in die Zelle ermöglicht wird (SOUTSCHEK et al. 2004; JUDGE et al. 2005). Der Unterschied von einem Accell™ siRNA Experiment zu einem gewöhnlichen siRNA-Experiment liegt in der Praxis darin, dass die Accell™ siRNA volle drei Tage benötigt, um in die Zelle einzudringen und dort einen effizienten Knockdown zu bewirken. In diesen drei Tagen werden die Zellen ohne Serum kultiviert. Zunächst mussten also optimierte Zellkulturbedingungen hinsichtlich Zelldichte und Kulturvolumen bestimmt werden. Außerdem musste überprüft werden, ob diese Kulturbedingungen einen Einfluss auf die Expression von LMP2A oder BZLF1 haben. In einem nächsten Schritt wurde die benötigte

Menge an Accell™ siRNA pro Experiment ermittelt. Hierfür wurde mithilfe einer Kontroll-siRNA, deren Funktionalität von Thermo Scientific Dharmacon garantiert wird, die Transkription des zellulären Gens GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) inhibiert. Anhand einer Konzentrationsreihe der Kontroll-siRNA konnte diejenige Konzentration bestimmt werden, welche einen maximalen Knockdown ohne toxische Nebenwirkungen zur Folge hat.

Nachdem alle Vorversuche positiv verliefen und die Versuchsparameter für einen Accell™ siRNA-vermittelten Knockdown in LCLs optimiert waren, wurde von Thermo Scientific Dharmacon ein so genannter Accell siRNA SMARTpool für einen Knockdown von LMP2A entworfen und hergestellt. Ein SMARTpool besteht aus vier verschiedenen siRNAs, welche in diesem Fall alle gegen das erste Exon von LMP2A gerichtet waren. Der Vorteil dieses Verfahrens besteht darin, dass mögliche unspezifische Effekte, welche durch die Bindung einer siRNA an ein beliebiges Transkript entstehen, reduziert werden. Die Konzentration jedes der vier siRNA-Moleküle eines SMARTpools ist relativ gering, in ihrer Summe können die vier Moleküle jedoch spezifisch und effektiv den Knockdown ihres gemeinsamen Zielgens bewirken. Die Wahrscheinlichkeit eines gemeinsamen unspezifischen Zielgens ist dagegen minimal. Als adäquate Negativ-Kontrolle wird in diesem Fall ein von Thermo Scientific Dharmacon getesteter, völlig unspezifischer Accell™ siRNA SMARTpool zur Verfügung gestellt, der keine Auswirkung auf die Genexpression hat. Der Vergleich von 2190 LCLs, die mit spezifischer siRNA gegen LMP2A behandelt wurden, mit solchen 2190 LCLs, die mit unspezifischer siRNA behandelt wurden, lässt somit eindeutig die spezifischen Effekte der LMP2A-siRNA auf die Expressionshöhe des LMP2A und der nachgeschaltet regulierten Zielgene erkennen.

Zunächst wurde der Knockdown von LMP2A in der klonalen 2190 LCL #3 getestet (Abb. 4-15 A). Hierfür wurden die Zellen nach Zugabe der Accell™ siRNA drei, vier oder fünf Tage lang kultiviert, wobei nach 72 Stunden das serumfreie Medium durch normales LCL-Medium ersetzt wurde. Aus Zellen, die nach drei oder vier Tagen geerntet wurden, wurde RNA isoliert, um die Expression von LMP2A und BZLF1 mittels quantitativer RT-PCR auf Transkriptebene zu detektieren (siehe Abschnitt 3.5).



B: 10 LCL-Klone 2190

Klon #	3	7	9	(16)	17	23	24	29	30	46	Knockdown Mittelwerte
siRNA	n.s. L	n.s. L	n.s. L	n.s. L	n.s. L	n.s. L	n.s. L	n.s. L	n.s. L	n.s. L	
LMP2A	68%	56%	75%	(-52%)	57%	69%	93%	59%	85%	49%	Ø = 67,83% ±14,5%
Zta (BZLF1)	99%	74%	68%	(30%)	45%	84%	58%	92%	55%	68%	Ø = 71,29% ±21,2%
CENP-A	3%	35%	15%	(4%)	20%	11%	-32%	36%	8%	37%	Ø = 14,68% ±19,9%

Abb. 4-15: Ein Knockdown von LMP2A mittels RNAi führt zur Reduktion der BZLF1 Expression.

A: Anhand des 2190 LCL-Klons Nr. 3 wurde der zeitliche Verlauf der RNAi-Effekte untersucht. Relative Transkriptmengen von LMP2A, BZLF1 und dem zellulären Gen GAPDH wurden drei bzw. vier Tage nach der Behandlung mit Accell™ siRNA (siehe Text: Abschnitt 4.5.2) mittels qRT-PCR untersucht. An Tag fünf wurden RNAi-Effekte auf Proteinebene untersucht. Die siRNAs waren gegen das erste Exon von LMP2A gerichtet oder dienten als unspezifische Negativkontrolle (n.s.). Ein Knockdown von LMP2A konnte an Tag drei auf transkriptioneller Ebene detektiert werden (63 % Verlust). An Tag vier war der RNAi-Effekt rückläufig (43 % Verlust). BZLF1 folgte den Expressionsniveaus von LMP2A zeitlich verzögert (18 % Verlust an Tag drei, 45 % Verlust an Tag vier). Die Expression von GAPDH blieb wie erwartet konstant. Alle Ergebnisse der qRT-PCR-Analyse wurden anhand der Transkriptmengen des Referenzgens Cytochrom C normalisiert. Für die Analyse der RNAi-Effekte auf Proteinebene erwies sich Tag fünf als geeignet. Hier konnte ein Knockdown von LMP2A noch deutlich detektiert werden (68 % Verlust) und die Effekte auf die Expression von BZLF1 waren maximal (99 % Verlust). CENP-A diente wiederum als Ladekontrolle (vgl. Abb. 4-14). **B:** Für weitere neun 2190 LCL-Klone wurden die RNAi-Effekte lediglich auf Proteinebene analysiert. Mit Ausnahme von Klon Nr. 16, welcher nicht zugänglich für die Behandlung mit Accell™ siRNA war, hatte ein Knockdown von LMP2A in allen Klone die Reduktion der Expression von BZLF1 zur Folge, während CENP-A konstant exprimiert wurde. Die densitometrische Quantifizierung der Proteinbanden zeigte, dass trotz großer Variabilität in der Effizienz des LMP2A-Knockdown eine Verringerung der LMP2A-Expression die Reduktion der BZLF1-Expression zur Folge hatte. Bei der Berechnung der Mittelwerte und Standardabweichungen wurde Klon Nr. 16 nicht berücksichtigt. (GAPDH: Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, CENP-A: Centromere protein A)

Bezüglich der Reduktion der Expressionshöhen von LMP2A und BZLF1 auf Proteinebene erwies sich eine Inkubationszeit von fünf Tagen nach Zugabe von siRNA als optimal. Hierfür wurden die Zellen lysiert und wie auf Seite 98 beschrieben mittels Westernblot analysiert. Abb. 4-15 A zeigt den zeitlichen Verlauf der Reaktion der klonalen LCL 2190.3 auf die Behandlung mit LMP2A-spezifischer Accell™ siRNA. Drei Tage nach Zugabe der siRNA konnte bereits ein Verlust der Menge an LMP2A-Transkripten von 63 % detektiert werden. Dieser Knockdown-Effekt auf Transkriptebene war an Tag vier bereits rückläufig. Eine Reaktion auf Proteinebene trat wie erwartet mit zeitlicher Verzögerung ein, so dass auch fünf Tage nach der Zugabe von Accell™ siRNA die Proteinmenge von LMP2A noch um 68 % reduziert war. Einen ähnlichen Verlauf, jedoch mit einer Verzögerung von etwa einem Tag, zeigten die Transkript- und Proteinmengen von BZLF1 bzw. Zta. Der Verlust von BZLF1 war eine spezifische Reaktion der Zelle auf die LMP2A-siRNA, da die Expressionsniveaus des zellulären GAPDH-Gens bzw. des Histons CENP-A nicht auf die spezifische siRNA gegen LMP2A reagierten.

In allen weiteren klonalen 2190 LCLs wurden die Effekte des LMP2A-Knockdown lediglich fünf Tage nach Zugabe der siRNA im Westernblot untersucht (Abb. 4-15 B). Mit Ausnahme von Klon #16 bewirkte eine Behandlung der Zellen mit spezifischer siRNA gegen LMP2A in allen Klonen einen mehr oder weniger starken Knockdown desselben. Ebenso war in diesen Klonen auch ein Verlust von Zta als spezifische Reaktion auf die Reduktion von LMP2A zu detektieren, während die Expressionsstärke des Histons CENP-A unverändert blieb.

Mit diesem Experiment gelang der Nachweis eines korrelativen und wahrscheinlich sogar kausalen Zusammenhangs zwischen der Expression von LMP2A und der Expression von BZLF1. Da die Expression von BZLF1 in latent infizierten Zellen als virales Schaltelement gilt, das den Wechsel von der Latenz in die lytische Phase von EBV einleitet, kann daraus geschlossen werden, dass die konstitutive Expression von LMP2A, wenn auch auf niedrigem Niveau (vgl. Abb. 4-13 und Abb. 4-14), die lytische Reaktivierung von EBV induziert.

4.5.3 Schlussfolgerung aus den Analysen zur Induktion des lytischen Zyklus

Die Ergebnisse der in Abschnitt 4.5 beschriebenen Experimente belegen die Fähigkeit von LMP2A, die Transkription lytischer EBV-Gene zu induzieren. Die Experimente zeigen auch, dass LMP2A in latent infizierten LCLs tatsächlich die kontinuierliche Expression lytischer Gene bewirkt. Eine weitere Möglichkeit der lytischen Reaktivierung von EBV geht aus den in Abb. 4-13 und Abb. 4-14 dargestellten Ergebnissen hervor: In latent infizierten B-Zellen, die kein LMP2A exprimieren, wird durch Stimulierung des BZR die lytische Phase von EBV induziert. *In vivo* entspricht diese Situation etwa latent infizierten Gedächtnis-B-Zellen (vgl. Abb. 5-2).

5 Diskussion

5.1 Die Rolle von LMP2A bei der Transformation primärer B-Zellen *in vitro*

EBV transformiert primäre humane B-Zellen *in vitro* zu lymphoblastoiden Zelllinien (LCLs). Während des Transformationsprozesses werden neun virale Proteine exprimiert (vgl. Tabelle 1-1, Latenz III), deren Funktionen nur teilweise bekannt sind. Das EBV-Protein LMP2A ist für die Etablierung von LCLs nicht essenziell. Der erste Teil meiner Arbeit zeigt, dass LMP2A dennoch eine bedeutende Rolle während des Transformationsprozesses übernimmt: LMP2A ermöglicht die Transformation BZR-negativer Keimzentrums-B-Zellen und erhöht damit die Anzahl EBV-infizierter Zellen in seinem Wirt.

Dieses Erkenntnis wurde mit einem einfachen experimentellen Ansatz gewonnen. Aus Adenoiden wurde eine gemischte Population BZR-positiver und -negativer B-Zellen präpariert. Durch Infektion mit Wildtyp-EBV oder Δ LMP2A-EBV wurden aus diesen B-Zellen 61 klonale LCLs etabliert. Eine Untersuchung der Oberflächenexpression des BZR in diesen Zelllinien zeigte, dass die BZR-negative Subpopulation der adenoidalen B-Zellen nur dann überlebt, wenn sie mit Wildtyp-EBV, aber nicht mit Δ LMP2A-EBV infiziert wurde. LCLs, die aus einer Infektion mit Δ LMP2A-EBV hervorgehen, sind daher immer BZR-positiv. LMP2A ist also in der Lage, die Signale eines BZR zu ersetzen, die auch bei der Etablierung von LCLs eine überlebenswichtige Rolle in diesem Modellsystem spielen.

Das Resultat dieser Experimente steht im Einklang mit der Literatur. Es ist bekannt, dass EBV - mit und ohne LMP2A - primäre B-Zellen *in vitro* transformieren kann (LONGNECKER et al. 1992; LONGNECKER et al. 1993; SPECK et al. 1999). Ebenso wurde gezeigt, dass EBV BZR-negative, pro-apoptotische Keimzentrums-B-Zellen *in vitro* vor der Apoptose schützen und zu LCLs transformieren kann (BECHTEL et al. 2005; CHAGANTI et al. 2005; MANCAO et al. 2005). Diese Schutzfunktion wird durch LMP2A vermittelt (MANCAO and HAMMERSCHMIDT 2007).

Die Reproduzierbarkeit dieser veröffentlichten Ergebnisse in einer statistisch belastbaren Anzahl klonaler LCLs unterstützt die Vermutung, dass LMP2A den BZR nachahmt und dessen Expression entbehrlich macht. Im zweiten Teil meiner Arbeit wurde auf molekularer Ebene detailliert untersucht, worauf die Imitation des BZR durch LMP2A basiert.

5.2 LMP2A imitiert und dominiert den BZR

LMP2A kann in LCLs die Funktion des BZR ersetzen. Wie LMP2A diese Aufgabe erfüllt, wurde im zweiten Teil meiner Arbeit auf molekularer Ebene systematisch untersucht. Aus den Ergebnissen dieser Untersuchungen leiten sich zwei grundsätzliche Aussagen ab:

1. LMP2A-vermittelte Signale entsprechen den Signalen des BZR. LMP2A imitiert den BZR hinsichtlich der Signaltransduktion und der Regulierung der Genexpression.
2. LMP2A beeinträchtigt die Funktion des BZR. Durch seine konstitutive Aktivität dominiert es die Signale des BZR.

Die erste dieser beiden Aussagen resultiert aus dem Vergleich von LMP2A und dem BZR in separaten Zelllinien. In Abwesenheit von wtLMP2A verhält sich eine induzierbare Variante von LMP2A so wie der BZR (vgl. 2525 LCL und 3696 LCL in Abschnitt 4). Die Antikörpervermittelte Stimulierung beider Moleküle bewirkt die Aktivierung der gleichen Signalmediatoren (siehe 4.3.1), den Einstrom von Ca^{2+} -Ionen in das Zytoplasma (siehe 4.3.2) sowie eine ähnliche Regulierung der Expression zellulärer Gene (siehe 4.4.3). Geringe Unterschiede treten lediglich hinsichtlich der Signalstärke und der Aktivierungskinetik auf. Ebenso wie der BZR ist das induzierbare LMP2A-Protein auch in der Lage, unabhängig von einer Induktion tonische Signale zu generieren. Es ermöglicht so das Überleben von LCLs, die weder den BZR noch wtLMP2A exprimieren (3696 LCL, vgl. Abb. 4-5). Die bekannte Funktion des BZR, den lytischen Zyklus von EBV einzuleiten und damit das Virus zu reaktivieren, stellt eine weitere Gemeinsamkeit von LMP2A und dem BZR dar. Mithilfe eines siRNA-vermittelten Knockdown des wtLMP2A konnte ein kausaler Zusammenhang zwischen der Expression von LMP2A und der Expression des initialen lytischen Gens BZLF1 hergestellt werden (siehe 4.5.2).

Der Vergleich von BZR und wtLMP2A innerhalb einer Zelle demonstrierte die Unterschiede der beiden Moleküle. Im Gegensatz zum BZR ist LMP2A konstitutiv aktiv. Daraus resultiert ein dauerhaft erhöhtes Aktivierungsniveau der gemeinsamen Signalmediatoren von LMP2A und dem BZR. Die Stärke der LMP2A-vermittelten Signale liegt dabei meist zwischen den tonischen und induzierten Signalen des BZR (vgl. Abb. 4-6 und Abb. 4-13). Eine Stimulierung des BZR führt prinzipiell selbst in Gegenwart von LMP2A zur Induktion der

Signaltransduktion. Aufgrund des durch LMP2A vermittelten dauerhaft aktivierten Zustandes reagiert die Zelle jedoch nicht oder nur eingeschränkt auf diese zusätzlichen Signale. Dies wird am Beispiel des zytosolischen Calcium-Einstroms deutlich. Sowohl LMP2A als auch der BZR sind prinzipiell in der Lage, den Einstrom von Ca^{2+} -Ionen in das Zytosol zu induzieren. Nach einem induzierten Einstrom von Ca^{2+} -Ionen in das Zytosol benötigt die Zelle eine Erholungsphase, in der die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration sinkt und entleerte intrazelluläre Calciumspeicher aufgefüllt werden. Wird diese Erholungsphase vor einer weiteren Stimulierung nicht eingehalten, reagiert die Zelle nicht mit einem erneuten Einstrom von Ca^{2+} -Ionen (LAZARUS et al. 1990). Folglich kann die Zelle in Anwesenheit der konstitutiven Signale von LMP2A auf ein zusätzliches Signal des BZR nicht mit der Mobilisierung von Ca^{2+} -Ionen reagieren. Vermutlich kann auch keine dauerhafte Erhöhung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration als Folge der konstitutiven Aktivität von LMP2A eintreten. Da freie Ca^{2+} -Ionen schwer lösliche Komplexe mit anorganischem Phosphat ausbilden können (KRAUSS 2008), wäre eine andauernde massive Erhöhung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration möglicherweise toxisch. Ob sich aufgrund der kontinuierlichen Stimulierung durch LMP2A dennoch eine erhöhte Gleichgewichtskonzentration zytosolischer Ca^{2+} -Ionen einstellt ist nicht bekannt. Einen Hinweis liefert jedoch die Tatsache, dass die Aktivität Calcium-abhängiger Signalwege wie z.B. PKC β /Ras/ERK (vgl. Abb. 1-7) in LMP2A-positiven LCLs konstitutiv erhöht ist.

Die Dominanz der konstitutiven Signale von LMP2A gegenüber dem BZR wirkt sich auch auf die Regulierung der Expression viraler Gene aus. In Abwesenheit von LMP2A folgt auf die Stimulierung des BZR die starke Induktion lytischer Gene von EBV. In Anwesenheit von LMP2A werden diese Gene auf niedrigerem Niveau konstitutiv exprimiert. Die Stimulierung des BZR erhöht die Expressionsrate kaum (Abb. 4-13 und Abb. 4-14).

Die Ergebnisse meiner Arbeit beleuchten die kontrovers diskutierten Eigenschaften von LMP2A aus einem neuen Blickwinkel. LMP2A kann nicht nur die essenzielle Funktion des BZR ersetzen (CALDWELL et al. 1998; MANCAO and HAMMERSCHMIDT 2007), es imitiert ihn auch auf molekularer Ebene. Bei simultaner Expression beider Moleküle dominiert LMP2A den BZR. Diese Dominanz ist eine logische Folge der konstitutiven Aktivität des viralen Proteins. Es existiert kein aktiver Blockademechanismus von LMP2A gegenüber dem BZR, wie er oft unterstellt wurde (MILLER et al. 1993; MILLER et al. 1994a; MILLER et al. 1994b; MILLER et al.

1995; DYKSTRA et al. 2001). Weder die BZR-vermittelte Phosphorylierung von Signalmediatoren oder der Einstrom von Ca^{2+} -Ionen noch die Induktion des lytischen Zyklus wird von LMP2A aktiv inhibiert. LMP2A bewirkt selbst die konstitutive Aktivierung aller genannten charakteristischen Ziele des BZR. Eine betroffene Zelle ist in diesem Zustand nur bedingt fähig, auf zusätzliche Signale zu reagieren. Anders ausgedrückt: Eine LMP2A-positive B-Zelle ist von der Antigenstimulierung bzw. den tonischen Signalen eines hoch exprimierten BZR entkoppelt und damit autark. Sie erscheint inert gegenüber externen Signalen.

5.3 Die Rolle von BZR und LMP2A bei der Aktivierung von NFκB-Transkriptionsfaktoren

Es ist bekannt, dass die Familie der NFκB-Transkriptionsfaktoren ein Ziel der Signaltransduktion durch den BZR darstellt. Deshalb wurde auch hier überprüft, ob LMP2A diese Funktion des BZR imitiert. Wider Erwarten bewirkte in meinen Experimenten weder der BZR noch LMP2A eine detektierbare Aktivierung des NFκB-Signalweges in LCLs. Eine mögliche Ursache ist die Expression und Aktivität des viralen Proteins LMP1. Es aktiviert NFκB in LCLs konstitutiv. Um mögliche störende Auswirkungen von LMP1 zu umgehen, wurde der BZR in EBV-negativen, primären humanen B-Zellen stimuliert. Eine Aktivierung von NFκB konnte jedoch auch hier nicht detektiert werden. Lediglich die humane B-Zell-Lymphom-Zelllinie SUDHL6 reagierte mit der Aktivierung von NFκB schwach auf eine Stimulierung des BZR.

Eine genaue Betrachtung der publizierten Daten über die Aktivierung von NFκB in B-Zellen ergibt das folgende Bild:

Die BZR-vermittelte Aktivierung von NFκB: Erkenntnisse über die BZR-vermittelte Aktivierung von NFκB basieren hauptsächlich auf Untersuchungen in murinen B-Zellen oder aviären DT40 B-Zellen (Referenzen, siehe Abb. 5-1). Jedoch wurde bis heute nicht gezeigt, dass „gesunde“ primäre humane B-Zellen auf dieselbe Art und Weise reagieren.

Die BZR-vermittelte Formierung des CBM-Komplexes: Die aktuellen Erkenntnisse über die Formierung des CBM-Komplexes nach Antigenrezeptor-Stimulierung basieren größtenteils auf der Untersuchung des T-Zell-Rezeptors. Aufgrund diverser Parallelen zwischen der Signaltransduktion durch TZR und BZR sowie einem direkten Hinweis auf die Existenz des

CBM-Komplexes in der DT40 B-Zelllinie aus dem Huhn (SHINOHARA et al. 2005; SHINOHARA et al. 2007), wurden diese Erkenntnisse jedoch verallgemeinert. Man geht davon aus, dass die Aktivierung von NF κ B und die Formierung des CBM-Komplexes charakteristisch für die Signaltransduktion durch Antigenrezeptoren im Allgemeinen sind (siehe z.B. RAWLINGS et al. 2006 und die enthaltenen Literaturangaben).

Die Abfolge einzelner Aktivierungsschritte des NF κ B-Signalwegs: Nach aktuellem Erkenntnisstand sollten die verschiedenen Aktivierungsschritte des NF κ B-Signaltransduktionswegs in geordneter, hierarchischer Reihenfolge ablaufen (Abb. 1-8). So muss der CBM-Komplex an der Zytoplasmamembran formiert sein, bevor IKK aktiviert wird. Die IKK Aktivierung wiederum ist Voraussetzung für die Phosphorylierung und Degradation von I κ B α . Erst wenn I κ B α degradiert ist, werden NF κ B-Transkriptionsfaktoren frei und translozieren in den Nukleus, wo sie DNA binden und die Transkription von Zielgenen regulieren können. Diese Vorstellung trifft zu für die Stimulierung von B- und T-Zellen mit PMA und Ionomycin (P/I), sowie für die Stimulierung des TZR in T-Zellen und des Fc ϵ RI- und CD40-Rezeptors in B-Zellen (Abb. 5-1). In murinen B-Zellen führt die Stimulierung des CD40-Rezeptors jedoch im Vergleich zum Fc ϵ RI-Rezeptor erst mit einer Verzögerung von etwa 20-30 min zur Degradation von I κ B α (Su et al. 2002). DT40 B-Zellen aus dem Huhn reagieren auch auf die Stimulierung des BZR mit einer Aktivierung von NF κ B nach dem beschriebenen Schema. Die Stimulierung des BZR in murinen B-Zellen hingegen hat zwar die Aktivierung von NF κ B zur Folge, bei genauerer Betrachtung fallen jedoch Unstimmigkeiten in der Abfolge der Aktivierung auf (Abb. 5-1). IKK und die Komponenten des CBM-Komplexes sind bereits nach fünf Minuten in lipid rafts der Zytoplasmamembran lokalisiert. IKK wird daraufhin aktiviert und phosphoryliert I κ B α . Erst etwa eine Stunde nachdem die Phosphorylierung von I κ B α vorübergehend detektiert wurde, ist in Gegenwart des Proteinsynthese-Hemmers Cycloheximid eine Degradation von I κ B α zu erkennen. Diese ist anfangs nur sehr schwach und erreicht nach etwa vier Stunden ihr Maximum. Weshalb zwischen der Aktivierung von IKK und der Degradation von I κ B α bis zu vier Stunden vergehen, bzw. was in dieser Zeit möglicherweise noch geschieht, ist unklar. Auch die Feststellung, dass bereits etwa eine Stunde vor Beginn der Degradation von I κ B α NF κ B-Transkriptionsfaktoren im Nukleus an DNA binden, ist widersprüchlich und lässt sich nicht mit der bekannten Theorie zur Schrittfolge der NF κ B-Aktivierung in Deckung bringen.

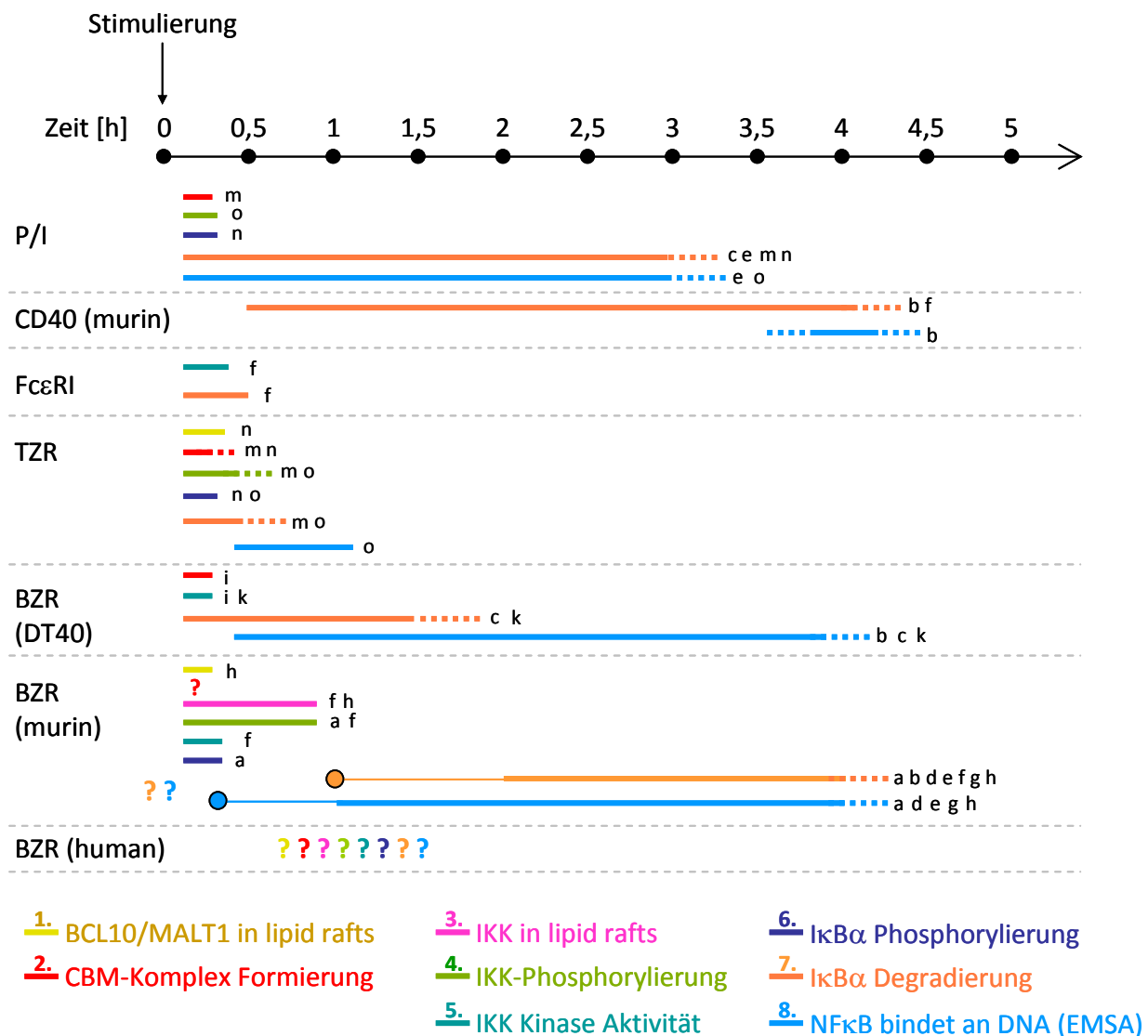


Abb. 5-1: Kinetik der NFκB-Aktivierung in unterschiedlichen Systemen.

Diese Grafik fasst einige publizierte Ergebnisse der NFκB-Aktivierung in Folge unterschiedlicher Stimuli zusammen. Die verschiedenen Aktivierungsschritte des NFκB-Signaltransduktionswegs sind farblich markiert und in der Legende in ihrer Abfolge nummeriert. Beginn und Dauer der einzelnen Aktivierungsschritte werden durch die Ausrichtung der farbigen Balken an einer Zeitachse verdeutlicht. Durchgezogene Linien spiegeln tatsächliche Resultate wider, gestrichelte Linien deuten an, dass weitere Zeitpunkte nicht untersucht wurden. Die Stimulierung von B- oder T-Zellen mit PMA/Ionomycin (P/I) gilt als Positivkontrolle für die Aktivierung von NFκB. Ähnliche Reaktionen bewirken die Stimulierung des CD40- und FcεRI-Rezeptors in B-Zellen sowie die Stimulierung des T-Zell-Rezeptors in T-Zellen. In aviären DT40-B-Zellen bewirkt auch die Stimulierung des BZR eine entsprechende Aktivierung von NFκB. In murinen B-Zellen stimmt die chronologische Abfolge der Aktivierungsschritte nicht durchgehend mit der Theorie des NFκB-Signaltransduktionswegs überein. Über die BZR-vermittelte Aktivierung von NFκB in primären humanen B-Zellen liegen bisher keine Informationen vor.

a: (PIATELLI et al. 2004); b: (BAJPAI et al. 2000); c: (PETRO et al. 2000); d: (TAN et al. 2001); e: (KRAPPMANN et al. 2001); f: (SU et al. 2002); g: (BONE and WILLIAMS 2001); h: (FERCH et al. 2007); i: (SHINOHARA et al. 2007); k: (SHINOHARA et al. 2005); m: (WEGENER et al. 2006); n: (GAIDE et al. 2002); o: (DUWEL et al. 2009)

Unterschiede in der NFκB-Aktivität IgM- und IgG-positiver muriner B-Zellen: Deutliche Unterschiede bestehen hinsichtlich der Aktivierung von NFκB in IgM- und IgG-positiven B-Zelllinien (DOERRE and CORLEY 1999). Während die Halbwertszeit von IκBα nach Cycloheximid-Behandlung in IgM-positiven B-Zellen durchschnittlich etwa 50 min beträgt, ist sie in IgG-positiven Zellen mit einem Wert von etwa 310 min extrem verlängert. Des Weiteren sind NFκB-Transkriptionsfaktoren in IgG-positiven B-Zellen konstitutiv im Nukleus lokalisiert (DOERRE and CORLEY 1999). Unterschiede zwischen IgM- und IgG-positiven Zellen könnten auch für die Ergebnisse meiner Arbeit von Bedeutung sein (Abb. 4-8). Eine durchflusszytometrische Analyse zeigte, dass die untersuchten 2525 LCLs durchweg IgG-positiv sind, während SUDHL6-Zellen einen BZR der Klasse IgM exprimieren (vgl. Abb. 4-8). Für das Resultat der Untersuchung primärer, humaner, adenoidaler B-Zellen sind diese Erkenntnisse jedoch von geringerer Bedeutung. In dieser B-Zellpopulation sollten sowohl IgM- als auch IgG-positive Zellen enthalten sein. Deren prozentualer Anteil wurde hier jedoch nicht ermittelt.

Abschließend ist zu erwähnen, dass eine Aktivierung von NFκB durch LMP2A in LCLs kaum von Bedeutung sein dürfte, da LMP2A in diesem Modellsystem immer in Kombination mit LMP1 exprimiert wird (Latenz III, Tabelle 1-1) und deshalb NFκB ohnehin konstitutiv aktiviert ist.

Die negativen Ergebnisse bezüglich der BZR- oder LMP2A-vermittelten Aktivierung von NFκB wirken sich nicht auf die allgemeine Aussage meiner Arbeit aus. Auch hier verhalten sich die beiden Membranproteine gleich.

5.4 Mögliche Funktionen von LMP2A und dem BZR *in vivo* - eine Hypothese

Welche Auswirkungen die Signale des BZR auf eine B-Zelle haben, hängt von dem Entwicklungsstadium der Zelle und der Stärke der Signale ab (Abb. 5-2 A, B). Während der frühen B-Zell-Entwicklung im Knochenmark sind die tonischen Signale des (Prä-)BZR, d.h. konstitutive Signale niederer bis mittlerer Stärke, essenziell für das Überleben und die Differenzierung unreifer B-Zellen. Antigen-vermittelte, induzierte Signale des BZR führen in diesem Stadium zum Tod der Zelle, da sie signalisieren, dass der BZR Antigene des eigenen Körpers erkennt. Auf diese Weise werden autoreaktive B-Zellen eliminiert. Das Überleben

reifer B-Zellen in der Peripherie ist ebenfalls von den tonischen Signalen ihres BZRs abhängig (KRAUS et al. 2004). Das Binden von Antigen und die damit verbundene Aktivierung des BZRs bewirkt hier jedoch die Proliferation der Zelle. Die Antigen-aktivierte B-Zelle differenziert während der Keimzentrumsreaktion zur Effektorzelle. In dieser Phase sind die tonischen Signale des BZRs nicht mehr ausreichend stark, um das Überleben der Zelle zu sichern. Eine veränderte Genexpression während der Keimzentrumsreaktion resultiert in einem proapoptotischen Phänotyp, der nur mithilfe der starken Überlebenssignale eines induzierten BZRs überwunden werden kann. Das Überleben von Gedächtnis-B-Zellen, die als Ergebnis der Differenzierungs- und Reifungsvorgänge der Keimzentrumsreaktion entstehen, wird wiederum durch die tonischen Signale des BZRs gesichert. Ein erneuter Kontakt mit Antigen bewirkt hier entweder die unmittelbare Differenzierung zur Plasmazelle oder den Wiedereintritt in eine weitere Keimzentrumsreaktion.

Erkenntnisse über die Auswirkungen der Signale von LMP2A auf B-Zellen in unterschiedlichen Entwicklungsstadien sind begrenzt (CALDWELL et al. 1998; CASOLA et al. 2004). Nachdem ich in meiner Arbeit zeigen konnte, dass LMP2A den BZR imitiert, kann das detaillierte Wissen über die Funktionen des BZRs auf LMP2A übertragen werden, um ein hypothetisches Modell der Funktionen von LMP2A *in vivo* zu erstellen (Abb. 5-2 C, D, E).

Im Verlauf einer EBV-Infektion in einem immunkompetenten Wirt (Abb. 5-2 C) werden BZR-positive, reife B-Zellen in sekundären lymphatischen Organen von EBV infiziert. Während der Entwicklung von B-Zellen im Knochenmark spielt LMP2A folglich keine Rolle. Infizierte, reife B-Zellen proliferieren bedingt durch die Expression der EBV-Gene der Latenz III (Tabelle 1-1). Die Reduzierung der viralen Genexpression auf die Proteine der Latenz II, LMP1 und LMP2A, induziert in infizierten Zellen eine Keimzentrums-ähnliche Reaktion, aus der sie als BZR-positive, latent infizierte Gedächtnis-B-Zellen hervorgehen. Ruhende, infizierte Gedächtnis-B-Zellen stellen jede Expression viraler Gene ein. Sie sind in diesem Zustand ebenso wie nicht-infizierte Gedächtnis-B-Zellen von den tonischen Signalen eines BZRs abhängig. In diesem Szenario könnte LMP2A die Aufgabe zukommen, die Anzahl der potenziell mit EBV infizierbaren B-Zellen um diejenigen Zellen zu erhöhen, deren BZR zwar exprimiert, aber während der Keimzentrumsreaktion nicht ausreichend stark aktiviert wird. LMP2A versorgt die Zellen zusammen mit LMP1 mit Signalen, die während der Keimzentrumsreaktion essenziell sind und sichern so das Überleben infizierter Zellen bis hin zum

Differenzierungsstadium der Gedächtnis-B-Zellen. Die Signalstärke von LMP2A bei einem mutations-bedingten Verlust des BZRs während der SHM scheint nicht ausreichend stark zu sein, um ein Überleben der Zelle während der Keimzentrumsreaktion zu sichern. Diese Vermutung beruht auf der Beobachtung, dass BZR-negative, EBV-infizierte Gedächtnis-B-Zellen *in vivo* im gesunden Wirt nie beobachtet wurden. Eine andere Erklärung für diese Beobachtung könnte sein, dass BZR-negative, LMP2A-positive B-Zellen die Keimzentrumsreaktion zwar überleben, im Anschluss jedoch verloren gehen, weil LMP2A in Gedächtnis-B-Zellen nicht exprimiert wird und der genuine BZR nicht mehr vorhanden ist. Der gegenwärtige Erkenntnisstand lässt diesbezüglich keine eindeutige Aussage zu.

In einer infizierten, langlebigen Gedächtnis-B-Zelle kann der Kontakt mit Antigen drei mögliche Reaktionen hervorrufen: den Wiedereintritt in die Keimzentrumsreaktion, die Differenzierung zur Plasmazelle oder die Induktion der lytischen Phase von EBV (vgl. Abschnitt 4.5).

Mausmodelle, in welchen LMP2A als Transgen bereits in frühen B-Zellen des Knochenmarks exprimiert wird (CALDWELL et al. 1998; CASOLA et al. 2004), zeigen, dass die Expressionsstärke von LMP2A Auswirkungen auf dessen Funktion hat. In den Experimenten von Caldwell et al. bewirkte schwach exprimiertes LMP2A die Differenzierung früher B-Zellen zu BZR-negativen, naiven, reifen B-Zellen (Abb. 5-2 D). Wurde LMP2A in Knochenmarks-B-Zellen jedoch stärker exprimiert, war die Anzahl BZR-negativer reifer B-Zellen in der Peripherie stark reduziert. Die Signale eines stark exprimierten LMP2A werden von der Zelle möglicherweise als Selbstantigen-Erkennung interpretiert und führen in die Apoptose (vgl. Abb. 5-2 B und E). Eine weitere mögliche Erklärung für die verminderte Anzahl reifer BZR-negativer B-Zellen in der Peripherie solcher Mäuse, die LMP2A stark exprimieren, liefern die Experimente von Casola et al. (CASOLA et al. 2004). Sie zeigen, dass unterschiedliche Expressionsstärken von LMP2A in unreifen Knochenmarks-B-Zellen unterschiedliche Differenzierungswege dieser Zellen einleiten. Hoch exprimiertes LMP2A bewirkte die Differenzierung zu peritonealen B-1 B-Zellen, die kaum in der Peripherie zu finden sind. Schwach exprimiertes LMP2A hingegen hatte die Differenzierung zu „gewöhnlichen“ folliculären B-Zellen oder Marginalzonen B-Zellen der Milz zur Folge. Diese beiden verwendeten artifiziellen Systeme spiegeln zwar nicht die Situation einer EBV-Infektion im Menschen wider, sie zeigen aber deutlich, dass

unterschiedliche Expressionsstärken von LMP2A unterschiedliche zelluläre Reaktionen hervorrufen können.

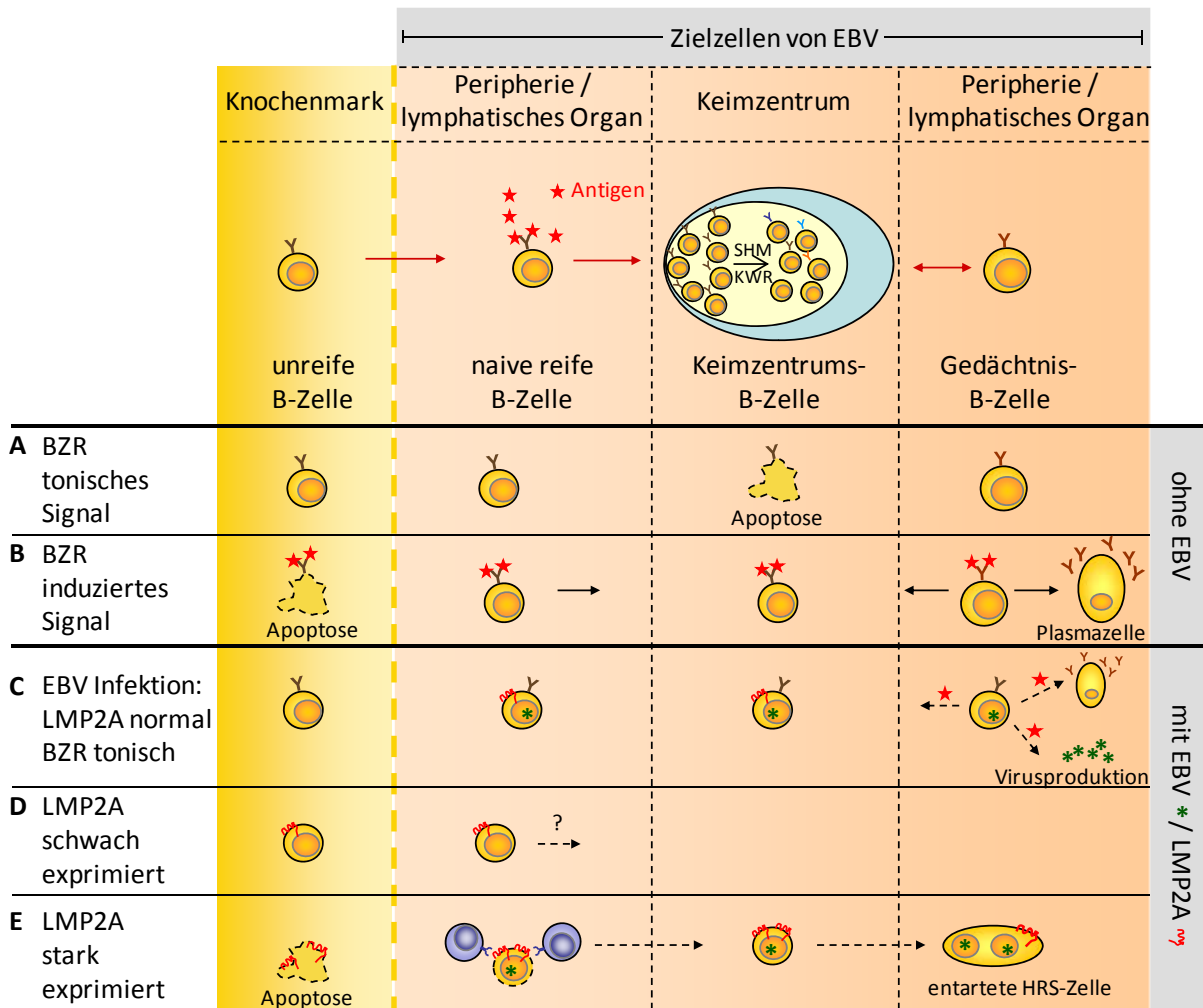


Abb. 5-2: Die Folgen der Signale von LMP2A und dem BZR in B-Zellen unterschiedlicher Entwicklungsstadien. A, B: In Abhängigkeit des Entwicklungsstadiums einer B-Zelle rufen tonische und induzierte Signale des BZR unterschiedliche zelluläre Reaktionen hervor. C: Während einer EBV-Infektion unterstützt LMP2A den BZR und sichert so das Überleben der B-Zelle während der Keimzentrumsreaktion. Auf diesem Weg gelangt EBV in das Kompartiment ruhender Gedächtnis-B-Zellen, wo es latent und unerkannt persistiert. Eine Antigen-vermittelte Reaktivierung infizierter Gedächtnis-B-Zellen kann neben den bekannten Reaktionen (direkte Differenzierung zur Plasmazelle oder Wiedereintritt in die Keimzentrumsreaktion) auch die lytische Phase von EBV induzieren. D, E: Unterschiedliche Signalstärken von LMP2A bewirken unterschiedliche zelluläre Reaktionen. Die Signale eines stark exprimierten LMP2A sind potenziell in der Lage B-Zellen auch in Abwesenheit des BZR zu führen. Sie könnten maßgeblich an dem Entartungsprozess von HRS-Zellen und der Entstehung von Hodgkin-Lymphomen beteiligt sein. In einem immunkompetenten Wirt würden B-Zellen, die LMP2A stark exprimieren jedoch bevorzugt von zytotoxischen T-Zellen (blau) erkannt und eliminiert. (Eine detailliertere Beschreibung liefert Kapitel 5.4; HRS-Zellen: Hodgkin-Reed-Sternberg Zellen; gelbe Zellen: B-Zellen; blaue Zellen: zytotoxische T-Zellen; rote Sterne: Antigen; grüne Sterne: EBV)

Eine Kombination der genannten Informationen liefert eine mögliche Erklärung für die Entstehung von EBV-assoziierten Hodgkin-Lymphomen in immunsupprimierten Patienten (Abb. 5-2 E). Dieser pathologische Vorgang unterscheidet sich deutlich von der physiologischen Regulierung der B-Zell-Differenzierung. Die malignen Zellen des Hodgkin-Lymphoms, so genannte Hodgkin-Reed-Sternberg (HRS) Zellen, sind transformierte Keimzentrums-B-Zellen. Alle HRS-Zellen, deren Ig-Gen während der Keimzentrumsreaktion zerstört wurde, sind EBV-positiv (Ralf Küppers 2009, bisher unveröffentlichte Ergebnisse). Aufgrund der Ergebnisse meiner Arbeit liegt die Vermutung nahe, dass das Überleben dieser BZR-negativen Keimzentrums-B-Zellen durch EBV bzw. LMP2A vermittelt wurde. Schwach exprimiertes LMP2A kann in Abwesenheit des BZRs jedoch keine ausreichend starken Überlebenssignale induzieren (Abb. 5-2 C). Um BZR-negative Keimzentrums-B-Zellen zu schützen, müsste LMP2A stark exprimiert werden, um so die induzierten Signale eines BZRs nachzuahmen. LMP2A ist immunogen. In einem immunkompetenten Patienten würde eine B-Zelle, die LMP2A stark exprimiert, deshalb bevorzugt von zytotoxischen T-Zellen eliminiert. Ist das Immunsystem des Patienten geschwächt, kann es nicht angemessen reagieren und die B-Zelle entgeht der Zerstörung. Nach einer erfolgreich durchlaufenen Keimzentrumsreaktion wird in diesen Zellen die Expression von LMP2A nicht eingestellt, da in Abwesenheit des BZRs das Überleben der Zellen nur gesichert werden kann, wenn LMP2A weiterhin exprimiert wird. Bedingt durch die Immunschwäche des Patienten werden diese langlebigen, LMP2A-positiven Zellen jedoch nicht vom Immunsystem erkannt und eliminiert. Die fortwährende, starke Expression von LMP2A könnte so die Entartung der B-Zelle zur HRS-Zelle einleiten oder zu ihrer Aufrechterhaltung im Tumor beitragen.

5.5 Die Rolle von LMP2A in Epithelzellen

Eine Infektion mit EBV wird mit der Entstehung unterschiedlicher maligner Erkrankungen assoziiert. Darunter sind nicht nur Lymphome, auch bei der Genese epithelialer Tumoren, wie z.B. dem Nasopharynxkarzinom (NPC) oder dem Magenkarzinom wird EBV eine wichtige Rolle zugesprochen. Es ist bekannt, dass EBV neben B-Zellen auch Epithelzellen infizieren kann, wenn auch mit geringerer Effizienz. In den malignen Epithelzellen genannter EBV-positiver Neoplasien wird LMP2A konstitutiv exprimiert. Es ist jedoch offensichtlich, dass die Funktion von LMP2A in diesem zellulären Hintergrund nicht die Nachahmung des B-Zell-Rezeptors sein kann.

LMP2A ist an der Transformation von Epithelzellen beteiligt und bietet betroffenen Zellen einen Wachstumsvorteil. Da LMP2A auch in Metastasen exprimiert wird, wird vermutet, dass seine Funktion für die Aufrechterhaltung des Tumorwachstums von Bedeutung ist.

Untersuchungen LMP2A-vermittelter Signaltransduktion in Epithelzellen demonstrieren Gemeinsamkeiten und Unterschiede der Aktivitäten von LMP2A in B-Zellen und Epithelzellen. Ein wichtiges gemeinsames Ziel von LMP2A in beiden Zelltypen ist der PI3K/AKT Signalweg, dessen Aktivierung anti-apoptotisch und proliferativ wirkt (vgl. Abb. 1-5). In Epithelzellen bewirkt die konstitutive Aktivität von AKT eine Deregulierung des Wnt-Signaltransduktionswegs¹¹ (MORRISON et al. 2003), die häufig in Tumoren detektiert wird. Die LMP2A-vermittelte, konstitutive Aktivierung der MAP-Kinasen ERK und JNK induziert in Epithelzellen die Expression von c-jun (CHEN et al. 2002), einem Transkriptionsfaktor der AP-1 Familie¹². Eine erhöhte Expression von c-jun wirkt wachstumsfördernd und blockiert die Differenzierung (SU et al. 1991).

Im Gegensatz zu den bekannten Signalmediatoren in B-Zellen konnte in Epithelzellen auch der Eingriff von LMP2A in die Regulierung der Transkriptionsfaktoren STAT¹³ und NFκB nachgewiesen werden (STEWART et al. 2004). Die Expression von LMP2A in EBV-positiven, NPC-ähnlichen Epithelzelllinien inhibiert die Sekretion von Interleukin 6 (IL-6). In Abwesenheit von IL-6 ist STAT nicht aktiv. Die STAT-regulierte Expression von LMP1 bleibt damit aus, weshalb auch NFκB nicht aktiviert wird. Der NFκB-Signaltransduktionsweg schafft ein Gleichgewicht zwischen Tumorgenese und anti-Tumor-Immunreaktionen. Eine Verschiebung dieses Gleichgewichts kann zur Entstehung von Tumoren führen.

Die Erkenntnisse über die Expression und Aktivität von LMP2A in Epithelzellen zeigen, dass LMP2A mehr sein kann als ein Imitat des BZRs. Ob LMP2A auch in B-Zellen zusätzliche wichtige Funktionen ausübt und damit die Entstehung von lymphoiden Tumoren begünstigt ist nicht bekannt und bedarf weiterer Untersuchungen.

¹¹ Wnt: engl. wingless / Int

¹² AP-1: engl. activator protein 1

¹³ STAT: engl. signal transducer and activator of transcription

5.6 Offene Fragen und Ausblick

Die Ergebnisse meiner Arbeit zeigen, wie LMP2A den BZR auf molekularer und funktionaler Ebene imitiert. Die offensichtlichste und wichtigste Aufgabe von LMP2A ist es, EBV-infizierte B-Zellen kontinuierlich mit BZR-ähnlichen Überlebenssignalen zu versorgen. So wird gewährleistet, dass EBV-infizierte, naive B-Zellen das Kompartiment der Gedächtnis-B-Zellen erreichen und EBV dort latent und unerkannt persistieren kann. Die Stärke LMP2A-vermittelter Signale ist für diese Funktion von Bedeutung.

Welche Stärke die Signale von LMP2A oder dem BZR erreichen müssen, um das Überleben von B-Zellen während der Keimzentrumsreaktion und die Differenzierung zu Gedächtnis-B-Zellen zu sichern, ist unklar und bedarf weiterführender Experimente. Zu diesem Zweck wurden zwei weitere maxiEBV-Konstrukte kloniert. In einem der beiden Konstrukte ersetzt ein Immunglobulin-Gen mit bekannter Antigenpezifität das LMP2A-Gen. Der B-Zell-Rezeptor mit diesem Immunglobulin kann durch Zugabe unterschiedlicher Mengen eines multivalenten Antigens unterschiedlich stark stimuliert werden. Das zweite Konstrukt wurde in ähnlicher Form bereits in meiner Arbeit verwendet. Es kodiert das chimäre, induzierbare LMP2A:CD69. Mit dem bisher verwendeten rekombinanten EBV-Genom ist es bis dato nicht gelungen, stabile, virusproduzierende HEK293-Zelllinien zu etablieren (vgl. Abschnitt 3.2.5). Quantitative Infektionsexperimente konnten deshalb bisher nicht durchgeführt werden. Das neu klonierte maxiEBV-Konstrukt trägt die Expressionskassette für LMP2A:CD69 nicht innerhalb des BALF1-Genlokus, sondern in dem endogenen Genlokus von LMP2A. Diese Maßnahme könnte die Etablierung stabiler, virusproduzierender Zelllinien ermöglichen, so dass die Herstellung infektiöser Viren für Infektionsexperimente mit primären B-Zellen möglich wird. Mithilfe dieser beiden maxiEBV-Konstrukte kann untersucht werden, wie sich unterschiedliche Signalstärken von LMP2A oder dem BZR in der frühen Phase einer EBV-Infektion auf die Reaktion der Zelle auswirken.

Sollten unterschiedliche Signalstärken tatsächlich unterschiedliche zelluläre Reaktionen hervorrufen, so stellt sich auch die Frage nach Faktoren, die die Signalstärke regulieren. Es wird vermutet, dass LMP2B an der Regulierung der Aktivität von LMP2A beteiligt ist (ROVEDO and LONGNECKER 2007). LMP2B ist LMP2A größtenteils identisch, es fehlt ihm jedoch der signaltransduzierende Aminoterminus von LMP2A. LMP2B kann aufgrund seiner Transmembrandomänen und dem Carboxyterminus mit LMP2A oligomerisieren. Die Dichte

von LMP2A-Molekülen in solchen heterooligomeren Clustern würde so durch LMP2B verringert und die Stärke der LMP2A-vermittelten Signale moduliert. Ob diese Vermutung zutrifft oder LMP2B andere, unbekannte Funktionen übernimmt ist bisher nicht geklärt. Eine LMP2B-Knockout EBV-Mutante oder LMP2B-spezifische RNAi-Ansätze könnten helfen, die Rolle von LMP2B näher zu bestimmen. Ein detailliertes Verständnis der Funktion und Regulierung von LMP2A wird Erkenntnisse liefern, die die Pathogenese EBV-assoziiertes, maligner Tumoren aufklären und Wege eröffnen, ursächlich gegen diese lebensbedrohlichen Erkrankungen vorzugehen.

6 Zusammenfassung

Das Epstein-Barr-Virus (EBV) ist ein äußerst erfolgreiches, weltweit verbreitetes humanes Herpesvirus. Es wird mit der Entstehung unterschiedlicher maligner Erkrankungen assoziiert und ist deshalb nach den Kriterien der WHO als Karzinogen eingestuft. *In vitro* infiziert EBV primäre humane B-Zellen und transformiert diese zu lymphoblastoiden Zelllinien.

B-Zellen sind ein wichtiger Bestandteil unseres Immunsystems. Ihr B-Zell-Rezeptor (BZR), bestehend aus einem membranständigen Immunglobulin und den Signaltransduktionsmodulen $Ig\alpha$ und $Ig\beta$, kann Antigene pathogener Organismen erkennen und so die Aktivierung von B-Zellen bewirken und ihre Differenzierung steuern. Aktivierte B-Zellen proliferieren und differenzieren in Keimzentren sekundärer lymphatischer Organe zu Effektor-B-Zellen. Während der Keimzentrumsreaktion wird der BZR einer Affinitätsreifung unterzogen, um seine Affinität zu einem vorhandenen Antigen zu optimieren. Dieser Prozess beruht auf der zufälligen Einführung von Mutationen in das Immunglobulingen und einer anschließenden Qualitätskontrolle des exprimierten BZR. Ein mutationsbedingter Verlust der BZR-Expression führt eine B-Zelle unmittelbar in die Apoptose.

Eine *in vitro* Infektion mit EBV sichert das Überleben BZR-negativer, pro-apoptotischer Keimzentrums-B-Zellen und bewirkt deren Transformation zu proliferierenden, lymphoblastoiden Zelllinien (LCLs). Das Latente Membranprotein 2A (LMP2A) von EBV ersetzt in diesen Zellen funktionell den fehlenden BZR. Aufgrund struktureller Homologien zwischen LMP2A und dem BZR wird angenommen, dass LMP2A die Überlebenssignale des BZR vermittelt.

Im Rahmen meiner Arbeit wurde ein systematischer Vergleich der beiden Moleküle, BZR und LMP2A, angestellt, um den molekularen Mechanismus zu identifizieren, der der funktionellen Homologie von LMP2A und dem BZR zugrunde liegt.

Um Signaltransduktionswege zu identifizieren, die von LMP2A aktiviert werden, wurde das konstitutiv aktive Wildtyp-LMP2A in LCLs durch eine induzierbare LMP2A-Variante ersetzt. Die Antikörper-vermittelte Quervernetzung dieses Proteins bewirkte die Aktivierung der Signalmediatoren, die auch durch die Stimulierung des BZR aktiviert werden. Die Phosphorylierung rezeptorproximaler und -distaler Enzyme, wie auch der Einstrom von Ca^{2+} -

Ionen in das Zytoplasma folgten auf die Stimulierung beider Moleküle. Die Aktivierung von NF κ B-Transkriptionsfaktoren konnte wider Erwarten weder durch den BZR noch durch LMP2A induziert werden.

Die simultane Expression von Wildtyp-LMP2A und dem BZR zeigte, dass die konstitutive Aktivität von LMP2A die Signaltransduktion des BZR beeinträchtigt. Sie ruft einen zellulären Zustand hervor, der in einigen Bereichen keine weitere Aktivierung zulässt. Aus diesem Grund sind Signale eines stimulierten BZR in Anwesenheit von LMP2A nur bedingt detektierbar. Der BZR wird von LMP2A dominiert.

Die weitreichenden Parallelen der Signaltransduktion durch LMP2A und den BZR ließen vermuten, dass sich die Aktivität beider Proteine auch in einer ähnlichen Regulierung der Expression zellulärer Gene niederschlägt. Diese Vermutung konnte anhand einer genomweiten Expressionsanalyse mittels cDNA-Microarray bestätigt werden.

Auch die Expression viraler Gene wird von LMP2A und dem BZR in ähnlicher Weise reguliert. Eine Stimulierung des BZR bewirkt bekanntlich die Expression lytischer EBV-Gene und induziert so den lytischen Replikationszyklus von EBV. Mit einer LMP2A-spezifischen siRNA-Strategie konnte die Korrelation zwischen der Aktivität von LMP2A und der Expression lytischer EBV-Gene aufgezeigt werden.

Zusammenfassend gilt, dass LMP2A auf molekularer Ebene den BZR imitiert. Bei simultaner Expression beider Moleküle dominiert die konstitutive Aktivität von LMP2A die Funktionen des BZR.

Meine Arbeit definiert die Funktion von LMP2A und beleuchtet seine Rolle in B-Zellen. Meine Ergebnisse weisen LMP2A als ein weiteres Protein des Epstein-Barr-Virus aus, das ein essenzielles zelluläres Protein nachahmt und damit einen wichtigen Beitrag für das Überleben und die Transformation infizierter Zellen leistet.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Abs.	Abschnitt
AgR	Antigenrezeptor
AKT/PKB	Proteinkinase B (AKT = PKB)
α	anti (bei Antikörperbeschreibungen in Bildunterschriften und Abbildungen)
AP-1	activator protein 1
APC	Allophycocyanin
APS	Ammonium Persulphate
APZ	Antigen-präsentierende Zelle
AS	Aminosäure
BAFF	B cell activating factor
BCAP	B cell adapter for PI3K
BCL10	B cell lymphoma 10
BLNK	B cell linker protein
BSA	bovine serum albumin
BTK	Bruton's Tyrosine Kinase
BZR	B-Zell-Rezeptor
CARMA	Caspase recruitment domain-containing membrane-associated guanylate kinase
CBM	CARMA/BCL10/MALT1
CD	cluster of differentiation
cDNA	complementary DNA
CENP-A	centromere protein A
CMV	Cytomegalovirus
Cre	causes recombination
DAG	Diacylglycerol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
E	early
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EBNA	Epstein-Barr Virus nuclear antigen
EBV	Epstein-Barr Virus
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
eGFP	enhanced GFP
Elk-1	ETS-like gene 1
EMSA	elektrophoretic mobility shift assay
engl.	englisch
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERK	extracellular signal regulated kinase
FBS	fetal bovine serum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	green fluorescent protein
GRU	Green Raji Units
HEK293	human embryonic kidney 293

Abkürzungsverzeichnis

HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HMGU	Helmholtz Zentrum München - Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt
HRP	horseradish peroxidase
HRS	Hodgkin-Reed-Sternberg
IE	immediate early
Ig	Immunglobulin
Ig _H	Immunglobulin heavy chain
Ig _L	Immunglobulin light chain
IκBα	Inhibitor of κBα
IKK	IκBα Kinase
IL-6	Interleukin 6
IM	infektiöse Mononukleose
IP ₃	Inositol-Triphosphat
IP ₃ R	IP ₃ -Rezeptor
ITAM	Immunrezeptor Tyrosin-basiertes Aktivierungsmotiv
JNK	c-jun N-terminal kinase
kDa	kilo Dalton
KWR	Klassenwechselrekombination
L	late
lat.	latein
LB	luria broth
LCL	lymphoblastoid cell line
LMP	latent membrane protein
MALT1	mucosa associated lymphoid tissue
MAPK	mitogen activated protein kinase
mCD69/CD69	murines CD69 (hier gleichzusetzen mit CD69)
MEK	MAP/ERK kinase
MFI	mean fluorescence intensity
MHC	major histocompatibility complex
mIg	membranständiges Immunglobulin
mRNA	messenger RNA
NaAz	Natriumazid
NEMO	NFκB essential modulator
NFAT	nuclear factor of activated T cells
NFκB	nuclear factor κB
NPC	nasopharyngeal carcinoma
P/I	PMA / Ionomycin
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PDK	protein kinase D
PE	Phycoerythrin
PEI	Polyethylenimin
PH	Pleckstrin homology
PI3K	Phosphatidylinositol-3'-Kinase
PIP ₂	Phosphatidylinositol-(4,5)-diphosphat
PIP ₃	Phosphatidylinositol-(3,4,5)-diphosphat
pITAM	phosphoryliertes ITAM

Abkürzungsverzeichnis

PKC β	Proteinkinase C β
PLC γ 2	Phospholipase C γ 2
PMA	phorbol 12-myristate 13-acetat
PTK	Protein-Tyrosin-Kinase
pTyr	phosphoryliertes Tyrosin
qRT-PCR	quantitative RT-PCR
RasGRP3	Ras G-nucleotide releasing protein 3
RIN	RNA Integritätsnummer
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA interference
rpm	rounds per minute
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	reverse Transkriptase PCR
S	Svedberg
SDS	sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	sds polyacrylamid gelelectrophoresis
SH2	src-homolgy 2
SHM	somatische Hypermutation
siRNA	small interfering RNA
Src	sarcoma
STAT	signal transducer and activator of transcription
SYK	spleen tyrosine kinase
TAK1	transforming growth factor β activated kinase 1
TEMED	Tetramethyldiamin
TR	terminal repeats
TZR	T-Zell-Rezeptor
U	enzyme unit
u.a.	unter anderem
UV	ultraviolett
V	Volt
vgl.	vergleiche
Vol%	Volumen %
WHO	world health organisation
wt	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

Literaturverzeichnis

- ALES-MARTINEZ, WARNER, et al. (1990). "Lymphoma models for B cell activation and tolerance. VIII. Cross-desensitization by sIgM and sIgD and its effects on growth regulation by anti-isotype antibodies." Cell Immunol **127**(2): 527-34.
- ALTMANN and HAMMERSCHMIDT (2005). "Epstein-Barr virus provides a new paradigm: a requirement for the immediate inhibition of apoptosis." PLoS Biol **3**(12): e404.
- ALTMANN, PICH, et al. (2006). "Transcriptional activation by EBV nuclear antigen 1 is essential for the expression of EBV's transforming genes." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(38): 14188-93.
- ANDERSON and LONGNECKER (2008). "EBV LMP2A provides a surrogate pre-B cell receptor signal through constitutive activation of the ERK/MAPK pathway." J Gen Virol **89**(Pt 7): 1563-8.
- BABCOCK, DECKER, et al. (1998). "EBV persistence in memory B cells in vivo." Immunity **9**(3): 395-404.
- BABCOCK, HOCHBERG, et al. (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**(4): 497-506.
- BABCOCK and THORLEY-LAWSON (2000). "Tonsillar memory B cells, latently infected with Epstein-Barr virus, express the restricted pattern of latent genes previously found only in Epstein-Barr virus-associated tumors." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(22): 12250-5.
- BAJPAI, ZHANG, et al. (2000). "Bruton's tyrosine kinase links the B cell receptor to nuclear factor kappaB activation." J Exp Med **191**(10): 1735-44.
- BATISTA and HARWOOD (2009). "The who, how and where of antigen presentation to B cells." Nat Rev Immunol **9**(1): 15-27.
- BEAUFILS, CHOQUET, et al. (1993). "The (YXXL/I)₂ signalling motif found in the cytoplasmic segments of the bovine leukaemia virus envelope protein and Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A can elicit early and late lymphocyte activation events." Embo J **12**(13): 5105-12.
- BECHTEL, KURTH, et al. (2005). "Transformation of BCR-deficient germinal-center B cells by EBV supports a major role of the virus in the pathogenesis of Hodgkin and posttransplantation lymphomas." Blood **106**(13): 4345-50.
- BONE and WILLIAMS (2001). "Antigen-receptor cross-linking and lipopolysaccharide trigger distinct phosphoinositide 3-kinase-dependent pathways to NF-kappa B activation in primary B cells." Int Immunol **13**(6): 807-16.
- BRYANT and PLOEGH (2004). "Class II MHC peptide loading by the professionals." Curr Opin Immunol **16**(1): 96-102.
- CALDWELL, WILSON, et al. (1998). "Epstein-Barr virus LMP2A drives B cell development and survival in the absence of normal B cell receptor signals." Immunity **9**(3): 405-11.
- CASOLA, OTIPOBY, et al. (2004). "B cell receptor signal strength determines B cell fate." Nat Immunol **5**(3): 317-27.
- CHAGANTI, BELL, et al. (2005). "Epstein-Barr virus infection in vitro can rescue germinal center B cells with inactivated immunoglobulin genes." Blood **106**(13): 4249-52.
- CHEN, LU, et al. (2002). "Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A regulates c-Jun protein through extracellular signal-regulated kinase." J Virol **76**(18): 9556-61.

- COORNAERT, BAENS, et al. (2008). "T cell antigen receptor stimulation induces MALT1 paracaspase-mediated cleavage of the NF-kappaB inhibitor A20." Nat Immunol **9**(3): 263-71.
- DELECLUSE, HILSENDEGEN, et al. (1998). "Propagation and recovery of intact, infectious Epstein-Barr virus from prokaryotic to human cells." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(14): 8245-50.
- DELECLUSE, PICH, et al. (1999). "A first-generation packaging cell line for Epstein-Barr virus-derived vectors." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(9): 5188-93.
- DEPOIL, FLEIRE, et al. (2008). "CD19 is essential for B cell activation by promoting B cell receptor-antigen microcluster formation in response to membrane-bound ligand." Nat Immunol **9**(1): 63-72.
- DOERRE and CORLEY (1999). "Constitutive nuclear translocation of NF-kappa B in B cells in the absence of I kappa B degradation." J Immunol **163**(1): 269-77.
- DUWEL, WELTEKE, et al. (2009). "A20 negatively regulates T cell receptor signaling to NF-kappaB by cleaving Malt1 ubiquitin chains." J Immunol **182**(12): 7718-28.
- DYKSTRA, LONGNECKER, et al. (2001). "Epstein-Barr virus coopts lipid rafts to block the signaling and antigen transport functions of the BCR." Immunity **14**(1): 57-67.
- EDRY and MELAMED (2004). "Receptor editing in positive and negative selection of B lymphopoiesis." J Immunol **173**(7): 4265-71.
- EHLIN-HENRIKSSON, GORDON, et al. (2003). "B-lymphocyte subpopulations are equally susceptible to Epstein-Barr virus infection, irrespective of immunoglobulin isotype expression." Immunology **108**(4): 427-30.
- ENGELS, MERCHANT, et al. (2001a). "Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A (LMP2A) employs the SLP-65 signaling module." J Exp Med **194**(3): 255-64.
- ENGELS, WOLLSCHIED, et al. (2001b). "Association of SLP-65/BLNK with the B cell antigen receptor through a non-ITAM tyrosine of Ig-alpha." Eur J Immunol **31**(7): 2126-34.
- EPSTEIN, LEVY, et al. (1978). "Biology of the human malignant lymphomas. IV. Functional characterization of ten diffuse histiocytic lymphoma cell lines." Cancer **42**(5): 2379-91.
- FASSNACHT, RÖSSING, et al. (1997). "Influence of non-essential amino acids on apoptotic and necrotic death of mouse hybridoma cells in batch cultures." Biotechnology Letters **19**(1): 35-38.
- FERCH, ZUM BUSCHENFELDE, et al. (2007). "MALT1 directs B cell receptor-induced canonical nuclear factor-kappaB signaling selectively to the c-Rel subunit." Nat Immunol **8**(9): 984-91.
- FRISAN, LEVITSKY, et al. (2001). Limiting Dilution Assay. Epstein-Barr-Virus Protocols. J. G. Wilson and G. H. May. **174**: 213-216.
- FRUEHLING and LONGNECKER (1997). "The immunoreceptor tyrosine-based activation motif of Epstein-Barr virus LMP2A is essential for blocking BCR-mediated signal transduction." Virology **235**(2): 241-51.
- FRUEHLING, SWART, et al. (1998). "Tyrosine 112 of latent membrane protein 2A is essential for protein tyrosine kinase loading and regulation of Epstein-Barr virus latency." J Virol **72**(10): 7796-806.
- FU, TURCK, et al. (1998). "BLNK: a central linker protein in B cell activation." Immunity **9**(1): 93-103.
- FUENTES-PANANA, BANNISH, et al. (2005). "Ig alpha/Ig beta complexes generate signals for B cell development independent of selective plasma membrane compartmentalization." J Immunol **174**(3): 1245-52.
- GAIDE, FAVIER, et al. (2002). "CARMA1 is a critical lipid raft-associated regulator of TCR-induced NF-kappa B activation." Nat Immunol **3**(9): 836-43.

- GHOSH, MAY, et al. (1998). "NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses." Annu Rev Immunol **16**: 225-60.
- GIRES, ZIMBER-STROBL, et al. (1997). "Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus mimics a constitutively active receptor molecule." Embo J **16**(20): 6131-40.
- GOLD, LAW, et al. (1990). "Stimulation of protein tyrosine phosphorylation by the B-lymphocyte antigen receptor." Nature **345**(6278): 810-3.
- GRAHAM, SMILEY, et al. (1977). "Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5." J Gen Virol **36**(1): 59-74.
- HAMMERSCHMIDT and SUGDEN (2004). "Epstein-Barr virus sustains Burkitt's lymphomas and Hodgkin's disease." Trends Mol Med **10**(7): 331-6.
- HAO and AUGUST (2005). "Actin depolymerization transduces the strength of B-cell receptor stimulation." Mol Biol Cell **16**(5): 2275-84.
- HARWOOD and BATISTA (2010). "Early events in B cell activation." Annu Rev Immunol **28**: 185-210.
- HECKMAN, MEHEW, et al. (2002). "NF-kappaB activates Bcl-2 expression in t(14;18) lymphoma cells." Oncogene **21**(24): 3898-908.
- HOCHBERG, MIDDELDORP, et al. (2004). "Demonstration of the Burkitt's lymphoma Epstein-Barr virus phenotype in dividing latently infected memory cells in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(1): 239-44.
- IKEDA, IKEDA, et al. (2001). "PY motifs of Epstein-Barr virus LMP2A regulate protein stability and phosphorylation of LMP2A-associated proteins." J Virol **75**(12): 5711-8.
- IKEDA and LONGNECKER (2009). "The c-Cbl proto-oncoprotein downregulates EBV LMP2A signaling." Virology **385**(1): 183-91.
- INABE, ISHIAI, et al. (2002). "Vav3 modulates B cell receptor responses by regulating phosphoinositide 3-kinase activation." J Exp Med **195**(2): 189-200.
- JANEWAY, TRAVERS, et al., Eds. (2005). Immunobiology, Garland Science
- JUDGE, SOOD, et al. (2005). "Sequence-dependent stimulation of the mammalian innate immune response by synthetic siRNA." Nat Biotechnol **23**(4): 457-62.
- KARIN and DELHASE (2000). "The I kappa B kinase (IKK) and NF-kappa B: key elements of proinflammatory signalling." Semin Immunol **12**(1): 85-98.
- KATZMAN and LONGNECKER (2004). "LMP2A does not require palmitoylation to localize to buoyant complexes or for function." J Virol **78**(20): 10878-87.
- KIESER (2008). "Pursuing different 'TRADDes': TRADD signaling induced by TNF-receptor 1 and the Epstein-Barr virus oncoprotein LMP1." Biol Chem **389**(10): 1261-71.
- KLEIN, TU, et al. (2003). "Gene expression dynamics during germinal center transit in B cells." Ann N Y Acad Sci **987**: 166-72.
- KRAPPMANN, PATKE, et al. (2001). "B-cell receptor- and phorbol ester-induced NF-kappaB and c-Jun N-terminal kinase activation in B cells requires novel protein kinase C's." Mol Cell Biol **21**(19): 6640-50.
- KRAUS, ALIMZHANOV, et al. (2004). "Survival of resting mature B lymphocytes depends on BCR signaling via the Igalpha/beta heterodimer." Cell **117**(6): 787-800.
- KRAUSS, Ed. (2008). Biochemistry of Signal Transduction and Regulation, Wiley-VCH.
- KULATHU, GROTHE, et al. (2009). "Autoinhibition and adapter function of Syk." Immunol Rev **232**(1): 286-99.
- KUROSAKI (1998). "Molecular dissection of B cell antigen receptor signaling (review)." Int J Mol Med **1**(3): 515-27.

- KUROSAKI and HIKIDA (2009). "Tyrosine kinases and their substrates in B lymphocytes." Immunol Rev **228**(1): 132-48.
- KUROSAKI, SHINOHARA, et al. (2010). "B cell signaling and fate decision." Annu Rev Immunol **28**: 21-55.
- KUSUMI, NAKADA, et al. (2005). "Paradigm shift of the plasma membrane concept from the two-dimensional continuum fluid to the partitioned fluid: high-speed single-molecule tracking of membrane molecules." Annu Rev Biophys Biomol Struct **34**: 351-78.
- LANGEL, JAIN, et al. (2008). "Multiple protein domains mediate interaction between Bcl10 and MALT1." J Biol Chem **283**(47): 32419-31.
- LAZARUS, MILLS, et al. (1990). "Antigen-induced Ca²⁺ signaling and desensitization in B cells." J Immunol **144**(11): 4147-55.
- LEE, ARSURA, et al. (1995). "Role of Rel-related factors in control of c-myc gene transcription in receptor-mediated apoptosis of the murine B cell WEHI 231 line." J Exp Med **181**(3): 1169-77.
- LING, HSIEH, et al. (1994). "EBNA-2 upregulation of Epstein-Barr virus latency promoters and the cellular CD23 promoter utilizes a common targeting intermediate, CBF1." J Virol **68**(9): 5375-83.
- LOBRY, LOPEZ, et al. (2007). "Negative feedback loop in T cell activation through I κ B kinase-induced phosphorylation and degradation of Bcl10." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(3): 908-13.
- LONGNECKER and KIEFF (1990). "A second Epstein-Barr virus membrane protein (LMP2) is expressed in latent infection and colocalizes with LMP1." J Virol **64**(5): 2319-26.
- LONGNECKER, MILLER, et al. (1992). "The only domain which distinguishes Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A (LMP2A) from LMP2B is dispensable for lymphocyte infection and growth transformation in vitro; LMP2A is therefore nonessential." J Virol **66**(11): 6461-9.
- LONGNECKER, MILLER, et al. (1993). "The last seven transmembrane and carboxy-terminal cytoplasmic domains of Epstein-Barr virus latent membrane protein 2 (LMP2) are dispensable for lymphocyte infection and growth transformation in vitro." J Virol **67**(4): 2006-13.
- LUCAS, YONEZUMI, et al. (2001). "Bcl10 and MALT1, independent targets of chromosomal translocation in malt lymphoma, cooperate in a novel NF- κ B signaling pathway." J Biol Chem **276**(22): 19012-9.
- MANCAO, ALTMANN, et al. (2005). "Rescue of "crippled" germinal center B cells from apoptosis by Epstein-Barr virus." Blood **106**(13): 4339-44.
- MANCAO and HAMMERSCHMIDT (2007). "Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A is a B-cell receptor mimic and essential for B-cell survival." Blood **110**(10): 3715-21.
- MATSKOVA, ERNBERG, et al. (2001). "C-terminal domain of the Epstein-Barr virus LMP2A membrane protein contains a clustering signal." J Virol **75**(22): 10941-9.
- MERCHANT and LONGNECKER (2001). "LMP2A survival and developmental signals are transmitted through Btk-dependent and Btk-independent pathways." Virology **291**(1): 46-54.
- MILLER, BURKHARDT, et al. (1995). "Integral membrane protein 2 of Epstein-Barr virus regulates reactivation from latency through dominant negative effects on protein-tyrosine kinases." Immunity **2**(2): 155-66.
- MILLER, LEE, et al. (1994a). "Epstein-Barr virus protein LMP2A regulates reactivation from latency by negatively regulating tyrosine kinases involved in slg-mediated signal transduction." Infect Agents Dis **3**(2-3): 128-36.

- MILLER, LEE, et al. (1994b). "An integral membrane protein (LMP2) blocks reactivation of Epstein-Barr virus from latency following surface immunoglobulin crosslinking." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(2): 772-6.
- MILLER, LONGNECKER, et al. (1993). "Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A blocks calcium mobilization in B lymphocytes." J Virol **67**(6): 3087-94.
- MILLER, SHOPE, et al. (1972). "Epstein-Barr virus: transformation, cytopathic changes, and viral antigens in squirrel monkey and marmoset leukocytes." Proc Natl Acad Sci U S A **69**(2): 383-7.
- MORRISON, KLINGELHUTZ, et al. (2003). "Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A activates beta-catenin signaling in epithelial cells." J Virol **77**(22): 12276-84.
- NAGASAWA (2006). "Microenvironmental niches in the bone marrow required for B-cell development." Nat Rev Immunol **6**(2): 107-16.
- PANOUSIS and ROWE (1997). "Epstein-Barr virus latent membrane protein 2 associates with and is a substrate for mitogen-activated protein kinase." J Virol **71**(6): 4752-60.
- PARK, SEO, et al. (2005). "Expression and characterization of N-terminal domain of Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A in Escherichia coli." Protein Expr Purif **41**(1): 9-17.
- PAUS, PHAN, et al. (2006). "Antigen recognition strength regulates the choice between extrafollicular plasma cell and germinal center B cell differentiation." J Exp Med **203**(4): 1081-91.
- PERKINS (2007). "Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(1): 49-62.
- PETRO, RAHMAN, et al. (2000). "Bruton's tyrosine kinase is required for activation of I kappa B kinase and nuclear factor kappa B in response to B cell receptor engagement." J Exp Med **191**(10): 1745-54.
- PFAFFL (2001). "A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR." Nucleic Acids Res **29**(9): e45.
- PIATELLI, WARDLE, et al. (2004). "Phosphatidylinositol 3-kinase-dependent mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase kinase 1/2 and NF-kappa B signaling pathways are required for B cell antigen receptor-mediated cyclin D2 induction in mature B cells." J Immunol **172**(5): 2753-62.
- POPE, HORNE, et al. (1968). "Transformation of foetal human leukocytes in vitro by filtrates of a human leukaemic cell line containing herpes-like virus." Int J Cancer **3**(6): 857-66.
- PORTIS and LONGNECKER (2004). "Epstein-Barr virus (EBV) LMP2A mediates B-lymphocyte survival through constitutive activation of the Ras/PI3K/Akt pathway." Oncogene **23**(53): 8619-28.
- PULVERTAFT (1964). "Cytology of Burkitt's Tumour (African Lymphoma)." Lancet **1**(7327): 238-40.
- PUTNEY (1986). "A model for receptor-regulated calcium entry." Cell Calcium **7**(1): 1-12.
- RAWLINGS, SOMMER, et al. (2006). "The CARMA1 signalosome links the signalling machinery of adaptive and innate immunity in lymphocytes." Nat Rev Immunol **6**(11): 799-812.
- RECHSTEINER, BERGER, et al. (2008). "Latent membrane protein 2B regulates susceptibility to induction of lytic Epstein-Barr virus infection." J Virol **82**(4): 1739-47.
- RETH (1989). "Antigen receptor tail clue." Nature **338**(6214): 383-4.
- ROVEDO and LONGNECKER (2007). "Epstein-barr virus latent membrane protein 2B (LMP2B) modulates LMP2A activity." J Virol **81**(1): 84-94.
- ROVEDO and LONGNECKER (2008). "Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A preferentially signals through the Src family kinase Lyn." J Virol **82**(17): 8520-8.

- RULAND, DUNCAN, et al. (2001). "Bcl10 is a positive regulator of antigen receptor-induced activation of NF-kappaB and neural tube closure." Cell **104**(1): 33-42.
- RULAND, DUNCAN, et al. (2003). "Differential requirement for Malt1 in T and B cell antigen receptor signaling." Immunity **19**(5): 749-58.
- RULAND and MAK (2003). "Transducing signals from antigen receptors to nuclear factor kappaB." Immunol Rev **193**: 93-100.
- SAIJO, MECKLENBRAUKER, et al. (2002). "Protein kinase C beta controls nuclear factor kappaB activation in B cells through selective regulation of the IkappaB kinase alpha." J Exp Med **195**(12): 1647-52.
- SAMPLE, LIEBOWITZ, et al. (1989). "Two related Epstein-Barr virus membrane proteins are encoded by separate genes." J Virol **63**(2): 933-7.
- SASAKI and KUROSAKI (2010). "Immobile BCRs: the safety on the signal trigger." Immunity **32**(2): 143-4.
- SCHAADT, BAIER, et al. (2005). "Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A mimics B-cell receptor-dependent virus reactivation." J Gen Virol **86**(Pt 3): 551-9.
- SHINOHARA, MAEDA, et al. (2007). "IkappaB kinase beta-induced phosphorylation of CARMA1 contributes to CARMA1 Bcl10 MALT1 complex formation in B cells." J Exp Med **204**(13): 3285-93.
- SHINOHARA, YASUDA, et al. (2005). "PKC beta regulates BCR-mediated IKK activation by facilitating the interaction between TAK1 and CARMA1." J Exp Med **202**(10): 1423-31.
- SINGER and NICOLSON (1972). "The fluid mosaic model of the structure of cell membranes." Science **175**(23): 720-31.
- SOHN, TOLAR, et al. (2006). "Fluorescence resonance energy transfer in living cells reveals dynamic membrane changes in the initiation of B cell signaling." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(21): 8143-8.
- SOMMER, GUO, et al. (2005). "Phosphorylation of the CARMA1 linker controls NF-kappaB activation." Immunity **23**(6): 561-74.
- SOUTSCHEK, AKINC, et al. (2004). "Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs." Nature **432**(7014): 173-8.
- SPECK, KLINE, et al. (1999). "Epstein-Barr virus lacking latent membrane protein 2 immortalizes B cells with efficiency indistinguishable from that of wild-type virus." J Gen Virol **80** (Pt 8): 2193-203.
- STEWART, DAWSON, et al. (2004). "Epstein-Barr virus-encoded LMP2A regulates viral and cellular gene expression by modulation of the NF-kappaB transcription factor pathway." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(44): 15730-5.
- SU, BOS, et al. (1991). "Jun inhibits myogenic differentiation." Oncogene **6**(10): 1759-66.
- SU, GUO, et al. (2002). "PKC-beta controls I kappa B kinase lipid raft recruitment and activation in response to BCR signaling." Nat Immunol **3**(8): 780-6.
- SUTHERLAND, HEATH, et al. (1996). "Differential activation of the ERK, JNK, and p38 mitogen-activated protein kinases by CD40 and the B cell antigen receptor." J Immunol **157**(8): 3381-90.
- SWART, RUF, et al. (2000). "Latent membrane protein 2A-mediated effects on the phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt pathway." J Virol **74**(22): 10838-45.
- TAKADA (1984). "Cross-linking of cell surface immunoglobulins induces Epstein-Barr virus in Burkitt lymphoma lines." Int J Cancer **33**(1): 27-32.
- TAN, WONG, et al. (2001). "The adaptor protein BLNK is required for b cell antigen receptor-induced activation of nuclear factor-kappa B and cell cycle entry and survival of B lymphocytes." J Biol Chem **276**(23): 20055-63.

- THOME (2004). "CARMA1, BCL-10 and MALT1 in lymphocyte development and activation." Nat Rev Immunol **4**(5): 348-59.
- THORLEY-LAWSON (2001). "Epstein-Barr virus: exploiting the immune system." Nat Rev Immunol **1**(1): 75-82.
- TOLAR, SOHN, et al. (2005). "The initiation of antigen-induced B cell antigen receptor signaling viewed in living cells by fluorescence resonance energy transfer." Nat Immunol **6**(11): 1168-76.
- TORDAI, FRANKLIN, et al. (1994). "Cross-linking of surface IgM stimulates the Ras/Raf-1/MEK/MAPK cascade in human B lymphocytes." J Biol Chem **269**(10): 7538-43.
- TOVEY, LENOIR, et al. (1978). "Activation of latent Epstein-Barr virus by antibody to human IgM." Nature **276**(5685): 270-2.
- TREANOR, DEPOIL, et al. (2010). "The membrane skeleton controls diffusion dynamics and signaling through the B cell receptor." Immunity **32**(2): 187-99.
- TSURUMI, FUJITA, et al. (2005). "Latent and lytic Epstein-Barr virus replication strategies." Rev Med Virol **15**(1): 3-15.
- UREN, O'ROURKE, et al. (2000). "Identification of paracaspases and metacaspases: two ancient families of caspase-like proteins, one of which plays a key role in MALT lymphoma." Mol Cell **6**(4): 961-7.
- VON ANDRIAN and MEMPEL (2003). "Homing and cellular traffic in lymph nodes." Nat Rev Immunol **3**(11): 867-78.
- WANG, GREGORY, et al. (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**(5): 2309-18.
- WEGENER, OECKINGHAUS, et al. (2006). "Essential role for I κ B kinase beta in remodeling Carma1-Bcl10-Malt1 complexes upon T cell activation." Mol Cell **23**(1): 13-23.
- WINBERG, MATSKOVA, et al. (2000). "Latent membrane protein 2A of Epstein-Barr virus binds WW domain E3 protein-ubiquitin ligases that ubiquitinate B-cell tyrosine kinases." Mol Cell Biol **20**(22): 8526-35.
- XU, HARDER, et al. (2005). "Lyn tyrosine kinase: accentuating the positive and the negative." Immunity **22**(1): 9-18.

Anhang

Der Anhang zur Dissertation von Stephanie Medele mit dem Thema:

**„Das Latente Membranprotein 2A des Epstein-Barr Virus
und der humane B-Zell-Rezeptor
- ein Vergleich - „**

befindet sich auf der beigelegten CD-ROM (in der vorliegenden Version ist der Anhang der Arbeit in Papierform beigelegt).

Der Anhang umfasst:

- eine Beschreibung der Durchführung des cDNA-Microarray-Experiments durch die Firma Roche NimbleGen, Inc, Madison USA.
- einen Bericht der Datenauswertung des cDNA-Microarray-Experiments, verfasst von der Firma MicroDiscovery GmbH, Berlin.
- eine Tabelle der 32 gemeinsam regulierten Gene von LMP2A und BZR
- eine Erklärung zu der Tabelle gemeinsam regulierter Gene

Auf genannter CD-ROM befinden sich drei weitere Dateien, die zusätzliche Informationen enthalten, aber kein direkter Bestandteil dieser Arbeit sind. Sie umfassen:

- eine Tabelle, in der alle 47634 Spots des cDNA-Microarrays nach ID, bzw. Position auf dem Array aufgelistet sind. Diese Tabelle beinhaltet auch eine Beschreibung jedes Spots und die errechneten Werte differenzieller Genexpression durch den BZR und LMP2A:CD69.
- zwei Tabellen, in welchen alle 25010 Gene des cDNA-Microarrays aufgelistet sind. Transkripte, die von mehreren Spots erkannt werden, wurden dabei zu einem Gen zusammengefasst. Die Werte differenzieller Genexpression durch den BZR und LMP2A:CD69 sind Mittelwerte aus den errechneten Werten einzelner Spots. Eine der beiden Tabellen ist absteigend sortiert nach der Stärke der Genexpressionserhöhung durch Stimulierung des BZR (vgl. Abb. 4-12, y-Achse [\log_2 Faktor]). Die zweite Tabelle ist absteigend sortiert nach der Stärke der Genexpressionserhöhung durch Stimulierung von LMP2A:CD69 (vgl. Abb. 4-12, x-Achse [\log_2 Faktor]).

A: Beschreibung der Durchführung des cDNA-Microarray-Experiments durch die Firma Roche NimbleGen, Inc, Madison USA

Diese Beschreibung kann als pdf-Datei unter nachfolgendem Link eingesehen werden, sie umfasst 64 Seiten.

https://www.roche-applied-science.com/publications/print_mat/NimbleChip_Expression_User_Guide_v2.pdf

B: Bericht der Datenauswertung des cDNA-Microarray-Experiments, verfasst von der Firma MicroDiscovery GmbH, Berlin

Dieser Bericht ist auf den nachfolgenden 19 Seiten abgedruckt.

C: Tabelle der 32 gemeinsam regulierten Gene von LMP2A und BZR

Im Anschluss an den Bericht (B) sind die 32 gemeinsam regulierten Gene tabellarisch aufgeführt. Die Tabelle umfasst 3 Seiten.

D: Erklärung zu der Tabelle gemeinsam regulierter Gene

Die letzte Seite des Anhangs beinhaltet eine Erklärung zur Tabelle (C).

GSF Nimblegene data analysis

Report

Analysis of microarray data of EVB infected lymphoblastoid cell lines derived from 12 different chips including two cell types and treatment vs. control

August 14, 2008

Contents

1	Overview and Data Quality Control	2
1.1	Overview	2
1.2	Data Quality	3
2	Statistical Analysis	6
2.1	Differential Analysis	6
2.2	Comparasion Between Cell Lines	10
3	Analysis Part 2	13
3.1	Cell line comparision	13
3.2	Pooling genes by description	13
3.3	Pathway Analysis	14

Chapter 1

Overview and Data Quality Control

In this chapter the data are briefly described and analysed for systematic errors. A suitable normalisation strategy is selected.

1.1 Overview

Data was handed over as a collection of 12 text files containing the raw data (directory *Raw_Data_Files/Calls_Files*) and 12 text files containing normalized data (directory *Processed_Data_Files/Normalized_Calls_Files*). Normalization was performed by Nimblegene using RMA algorithm. The experimental design was given in the file *SampleKey.txt*. The following two lymphoblastoid cell lines infected with EBV were analysed:

- mutant no. 2525 - will be called cell line 25
- mutant no. 3696.10 - will be called cell line 10

Each cell line can be in one of the two states: X-linked (stimulated) and not X-linked (control). For each cell line and state 3 repeat measurements were performed. The experimental setup and number of chips per group is shown in table 1.1.

		State	
		stimulated	control
Cell line	10	3	3
	25	3	3

Table 1.1: Experimental design and number of chips per group.

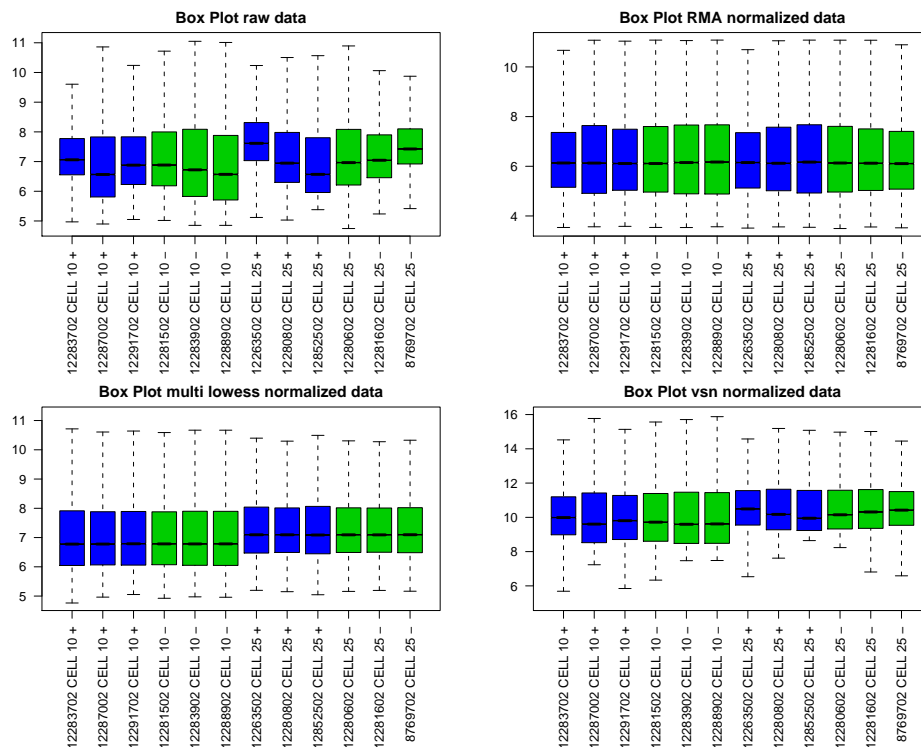


Figure 1.1: Boxplots of raw data (upper left), RMA normalized data (upper right), VSN normalized data (lower right) and MicroDiscovery multi lowest normalized data (lower left) – no outlier samples are present. The samples are ordered by cell line and state. The samples are colored by the state (green = control, blue = stimulation).

1.2 Data Quality

The first step was to look at the distribution of the signal intensity of the raw data and the given RMA normalised data (see upper part of figure 1.1). The RMA normalization included all chips and thus the normalization was done on both cell lines together. Since both cell lines are analysed separately normalization also can be performed on each cell line separately.

The data was normalized using a VSN (vs2-package of 'R') and multi-lowess normalization (developed by MicroDiscovery). The different cell lines were normalized separately. The boxplot after applying the two normalizations could be seen in the lower part of figure 1.1. The lowess normalized data give a very homogeneous result.

The signal-noise plot gives a visualisation of the error behaviour. Logarithmic transformation converts a multiplicative error into an additive error. The normalization strategies shall reduce systematic errors. The normalized data are expected to show an additive error resulting in an almost horizontal lowess fit in the signal-noise plot. The signal-noise plots of log raw data and the RMA normalized data for both cell lines are presented in the upper part of figure 1.2 and 1.3. The signal-noise plots after applying VSN and multi-lowess normalization are shown in the lower part of figure

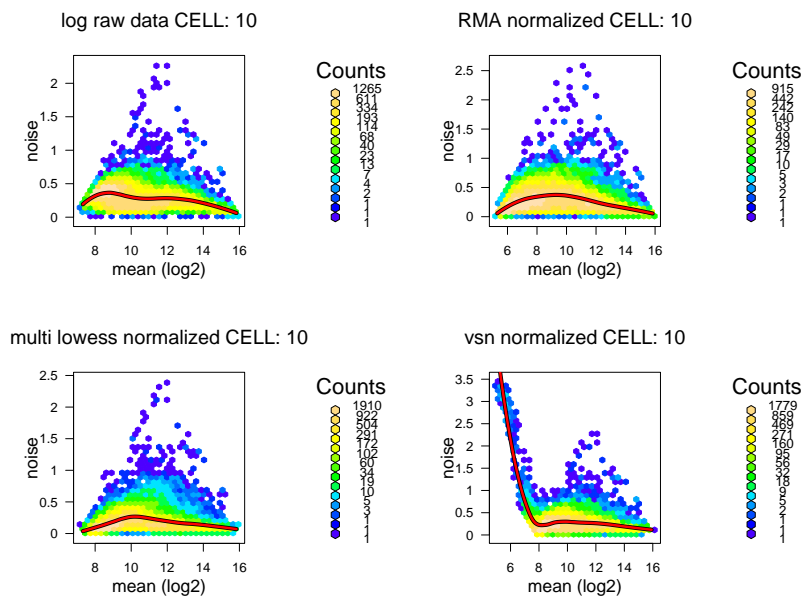


Figure 1.2: Signal-noise plots for cell line 10 of raw data (upper left), RMA normalized data (upper right), VSN normalized data (lower right) and Microdiscovery multi lowess normalized data (lower left). The red line is a lowess fit of the data. The corresponding plot for cell line 25 is shown in figure 1.3.

1.2 and 1.3. The normalization strategy in best agreement with an additive error model is multi-lowess normalization. The within cell lines mean error after lowess normalization was 17.8%. Hence the following data analysis steps are performed using the multi-lowess normalized data.

The correlation plot can be seen in figure 1.4. The two main groups reflect the two different cell lines. The within cell line groups reflect the treatment versus control chips. The average within cell line correlation was 0.98 whereas the average between cell line correlation was 0.94.

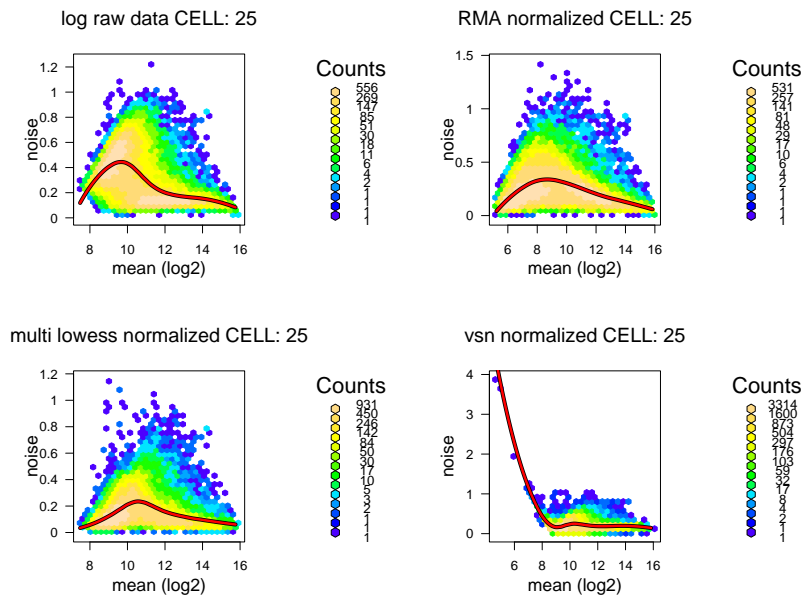


Figure 1.3: Signal-noise plots for cell line 10 of raw data (upper left), RMA normalized data (upper right), VSN normalized data (lower right) and MicroDiscovery multi lowess normalized data (lower left). The red line is a lowess fit to the data. The corresponding plot for cell line 10 is shown in figure 1.2.

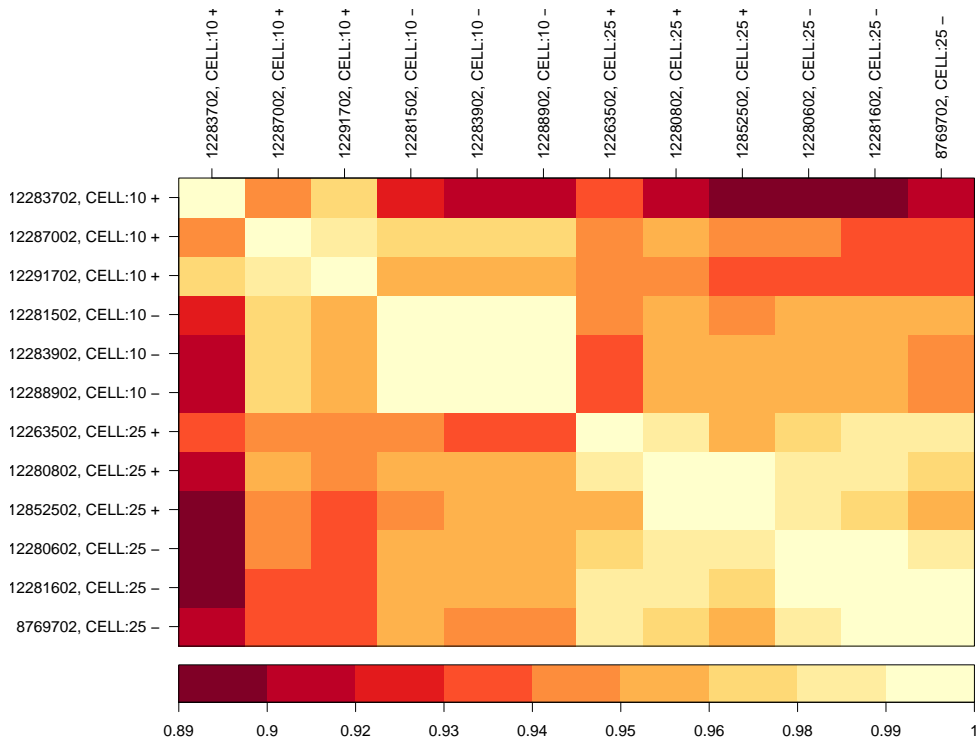


Figure 1.4: Correlation Plot of multi-lowess normalized data. The chips are ordered by cell line and treatment.

Chapter 2

Statistical Analysis

The statistical analysis comprises the identification of differentially expressed genes for stimulation versus control for each cell line separately. Afterwards the two results for each cell line are combined on the level of ratios looking for genes showing a similar profile of up- or down-regulation.

2.1 Differential Analysis

Goal of the analysis is the identification of genes that are differentially expressed regarding the stimulation versus control for each cell line. The two criteria, fold change and the t-test p-value, are used for differential analysis. Our experience shows that having only 3 samples for each group the fold change is a more reliable criterion to identify differential peaks than the t-test p-value.

2.1.1 Cell line 10

The volcano plot for cell line 10 is shown in figure 2.1. Looking at the t-test p-values there is just one significant result (when applying multiple testing correcting according to Bonferroni) whereas the number of genes showing a fold change of at least 2 is much higher (see table 2.2). The genes with the strongest fold-change are presented in table 2.1. Remarkably genes with same description do have a similar fold resulting in close proximity in the table. This underlines the data's good quality as well as the consistency of the used gene mapping and supports the reliability of these genes.

Table 2.1 Table of the 50 best genes (genes with best fold) of cell 10. Genes with the same descriptions were mapped to the same ensembl gene.

Name	Description	Fold (\log_2)	P Value
BC009288	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 2	6.2	0.00541
NM_006186	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 2	6.18	0.0025
BC066890	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 2	5.7	0.0186
D78579	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 3	5.62	0.00304
NM_006981	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 3	5.54	0.00169
U12767	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 3	5.5	0.00167
NM_002135	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1	5.39	0.0165
NM_173199	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 3	5.08	0.0531
NM_002923	regulator of G-protein signalling 2, 24kDa	4.84	0.0341
BC022791	FOS-like antigen 2	4.66	0.0444
BC002671	dual specificity phosphatase 4	4.54	0.00202
BC014565	dual specificity phosphatase 4	4.51	0.00092
NM_006528	tissue factor pathway inhibitor 2	4.27	0.0276
NM_001394	dual specificity phosphatase 4	4.1	0.00419
CR618383	full-length cDNA clone CS0DI040YH10 of Placenta Cot 25-normalized of Homo sapi	4.09	0.0398
AK092499	tissue factor pathway inhibitor 2	4.01	0.0467
NM_004430	early growth response 3	4.01	0.0333
BC042755	regulator of G-protein signalling 2, 24kDa	4.01	0.0785
NM_005261	GTP binding protein overexpressed in skeletal muscle	3.98	0.0655
NM_000169	galactosidase, alpha	3.74	0.000144
BC035625	early growth response 2 (Krox-20 homolog, Drosophila)	3.69	0.0101
AY766457	chemokine (C-C motif) ligand 4-like 2	3.68	0.00969
BC002689	galactosidase, alpha	3.66	0.00134
NM_173158	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1	3.64	0.11
BC015502	homer homolog 1 (Drosophila)	3.61	0.0663
BC104765	early growth response 3	3.59	0.0702
AY766458	chemokine (C-C motif) ligand 4-like 2	3.59	0.0138
BC104252	interleukin 10	3.58	0.00591
BC092445	chemokine (C-C motif) ligand 4-like 2	3.57	0.0144
NM_018555	zinc finger protein 331	3.56	0.00687
NM_000399	early growth response 2 (Krox-20 homolog, Drosophila)	3.51	0.00841
AY766453	chemokine (C-C motif) ligand 4-like 2	3.5	0.00922
NM_000572	interleukin 10	3.47	0.0071
BC107433	chemokine (C-C motif) ligand 4	3.46	0.015
BC060858	suppressor of cytokine signaling 3	3.46	0.0546
BC034689	UL16 binding protein 2	3.44	0.029
AB188491	OTU domain containing 1	3.43	0.00628
NM_002984	chemokine (C-C motif) ligand 4	3.4	0.0157
AY766456	chemokine (C-C motif) ligand 4-like 2	3.38	0.0188
NM_001001435	chemokine (C-C motif) ligand 4-like 1	3.37	0.0219
NM_005253	FOS-like antigen 2	3.37	0.0761
BC070310	chemokine (C-C motif) ligand 4-like 2	3.37	0.00991
BC009433	zinc finger protein 331	3.27	0.00122
NM_002616	period homolog 1 (Drosophila)	3.27	0.0535
AY766449	chemokine (C-C motif) ligand 4-like 2	3.26	0.0106
NM_003955	suppressor of cytokine signaling 3	3.15	0.022
BC096124	chemokine (C-C motif) ligand 18 (pulmonary and activation-regulated)	3.14	0.0546
BC104226	chemokine (C-C motif) ligand 4	3.1	0.0145
BC098152	retinoic acid early transcript 1G	3.1	0.0013
BC008358	THAP domain containing, apoptosis associated protein 2	3.08	0.00779

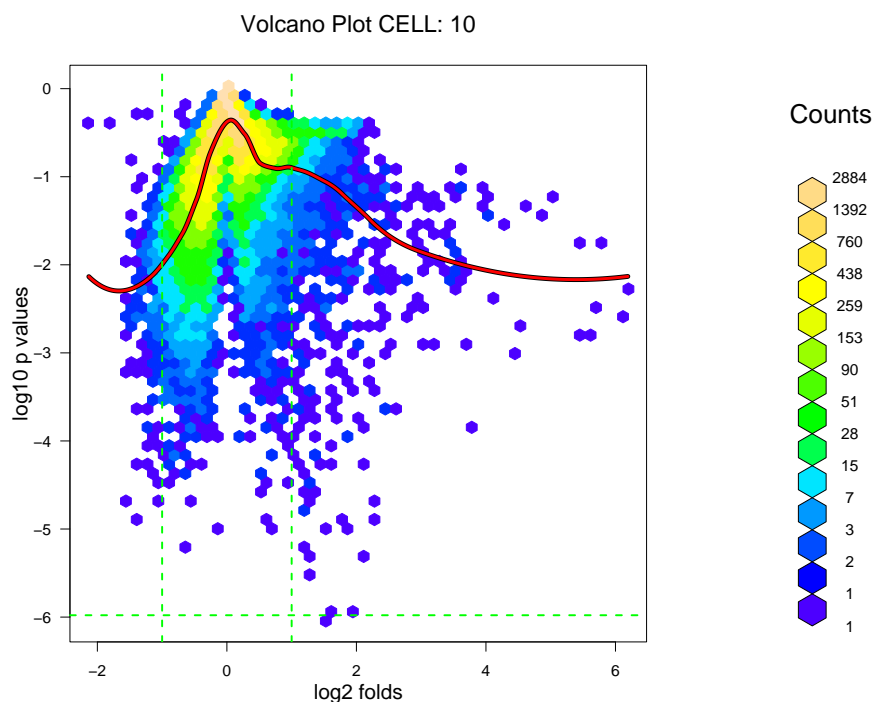


Figure 2.1: Volcano Plot for cell line 10. The red line shows a lowess fit. The green horizontal dashed line reflects the multiple testing corrected (according to Bonferroni) significance threshold of 0.05. The vertical dashed lines indicate 2 fold up or down regulation threshold. The equivalent plot for cell line 25 is shown in figure 2.2.

2.1.2 Cell line 25

Figure 2.2 shows the volcano plot for cell line 25. When looking at the t-test's p-value after multiple testing correction there is no significant result. The genes with the strongest fold changes are presented in table 2.3. Again genes with the same description are in close proximity within the table.

		Cell line	
		10	25
Fold change	> 2	1313	208
	< 0.5	271	4
P-value < 10 ⁻⁶		1	0

Table 2.2: Number of differentially expressed genes for each cell line by fold or by p-value.

Table 2.3 Table of the 50 best genes (genes with best fold) of cell 25. Genes with the same descriptions were mapped to the same ensembl gene.

Name	Description	Fold (\log_2)	P Value
D78579	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 3	2.57	0.0713
XM_064152	sarcalumenin	2.52	0.428
NM_000790	dopa decarboxylase (aromatic L-amino acid decarboxylase)	2.51	0.417
NM_004430	early growth response 3	2.5	0.0223
U12767	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 3	2.4	0.056
BX640720	zinc finger protein 498	2.39	0.413
NM_006981	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 3	2.38	0.0734
BC104765	early growth response 3	2.33	0.0262
BC001491	heme oxygenase (decycling) 1	2.14	0.00253
NM_021006	chemokine (C-C motif) ligand 3-like 1	2.1	0.000503
BC107710	chemokine (C-C motif) ligand 3-like 1	2.09	0.00233
BC103914	tetratricopeptide repeat domain 6	2.09	0.42
NM_001001437	chemokine (C-C motif) ligand 3-like 3	2.08	0.00171
BC071834	chemokine (C-C motif) ligand 3	2.07	0.00348
NM_030948	phosphatase and actin regulator 1	2.07	0.0363
BC007783	chemokine (C-C motif) ligand 3-like 3	2.06	0.0015
NM_001964	early growth response 1	2.05	0.0576
BC027888	chemokine (C-C motif) ligand 3-like 1	2.05	0.0126
AF130114	Homo sapiens clone FLB9131 PRO2459 mRNA, complete cds.	2.03	0.415
NM_178013	proline rich membrane anchor 1	2.03	0.428
NM_173199	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 3	1.99	0.163
NM_002133	heme oxygenase (decycling) 1	1.98	0.00462
BC101521	solute carrier family 25 (mitochondrial oxodicarboxylate carrier), member 21	1.98	0.413
BC101008	zinc finger protein 582	1.96	0.412
NM_002983	chemokine (C-C motif) ligand 3	1.96	0.00318
AL049365	family with sequence similarity 102, member A	1.95	0.0171
BC107433	chemokine (C-C motif) ligand 4	1.94	3.56e-05
NM_012323	v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog F (avian)	1.93	0.0349
NM_002984	chemokine (C-C motif) ligand 4	1.91	0.000122
BC015037	v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog F (avian)	1.91	0.0181
BC092445	chemokine (C-C motif) ligand 4-like 2	1.9	0.0108
NM_001001435	chemokine (C-C motif) ligand 4-like 1	1.89	0.00103
AY766448	chemokine (C-C motif) ligand 4	1.89	1.45e-05
NM_015714	G0/G1switch 2	1.88	0.0826
BC104226	chemokine (C-C motif) ligand 4	1.86	6.25e-05
AY766456	chemokine (C-C motif) ligand 4-like 2	1.85	9.58e-05
BC101526	phosphatase and actin regulator 1	1.85	0.054
AY766453	chemokine (C-C motif) ligand 4-like 2	1.84	0.000144
NM_001394	dual specificity phosphatase 4	1.83	0.0252
BC070310	chemokine (C-C motif) ligand 4-like 2	1.82	3.01e-05
AY766449	chemokine (C-C motif) ligand 4-like 2	1.79	0.000244
AB051520	phosphatase and actin regulator 1	1.79	0.0584
AY766457	chemokine (C-C motif) ligand 4-like 2	1.78	0.000569
NM_001035254	family with sequence similarity 102, member A	1.78	0.0525
BC107785	cytochrome P450, family 19, subfamily A, polypeptide 1	1.77	0.381
NM_020152	chromosome 21 open reading frame 7	1.75	0.433
NM_001838	chemokine (C-C motif) receptor 7	1.72	0.00011
BC014565	dual specificity phosphatase 4	1.72	0.0177
NM_001001852	pim-3 oncogene	1.7	2.36e-05
AY766458	chemokine (C-C motif) ligand 4-like 2	1.7	0.000222

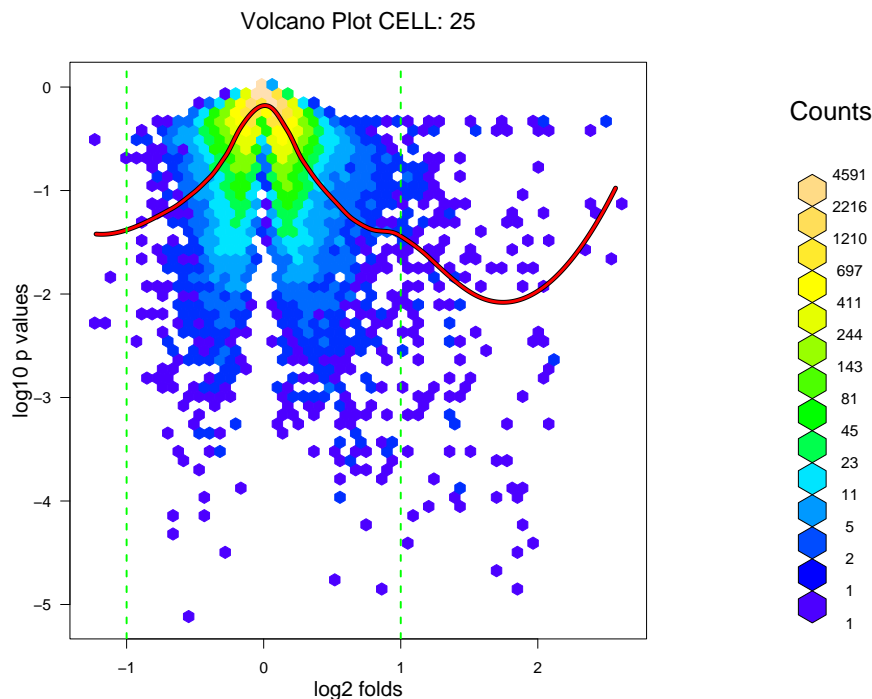


Figure 2.2: Volcano Plot for cell line 25. The red line shows a lowess fit. The vertical dashed lines indicate 2 fold up or down regulation threshold. The equivalent plot for cell line 10 is shown in figure 2.1.

2.2 Comparasion Between Cell Lines

When looking at the genes with the highest folds of cell line 10 (see table 2.1) and cell line 25 (see table 2.3) there are many genes overexpressed in both cell lines. The most striking ones are:

- nuclear receptor subfamily 4
- dual specificity protein phosphatase
- chemokine (C-C motif) ligand 4-like

This result gained by just looking at the tables motivates to look for all genes showing a similar up- or down-regulation in both cell lines. Figure 2.3 show the fold change for cell line 10 plotted versus fold change for cell line 25. The points are colored by the mean p-value of both cell lines. Obviously many genes show a similar upregulation whereas there is just one gene that is substantially down regulated in both cell lines. There are no genes showing an opposed regulation. The genes showing a similar up regulation for both cell lines are presented in table 2.5. The three previously stated genes could be found in this table.

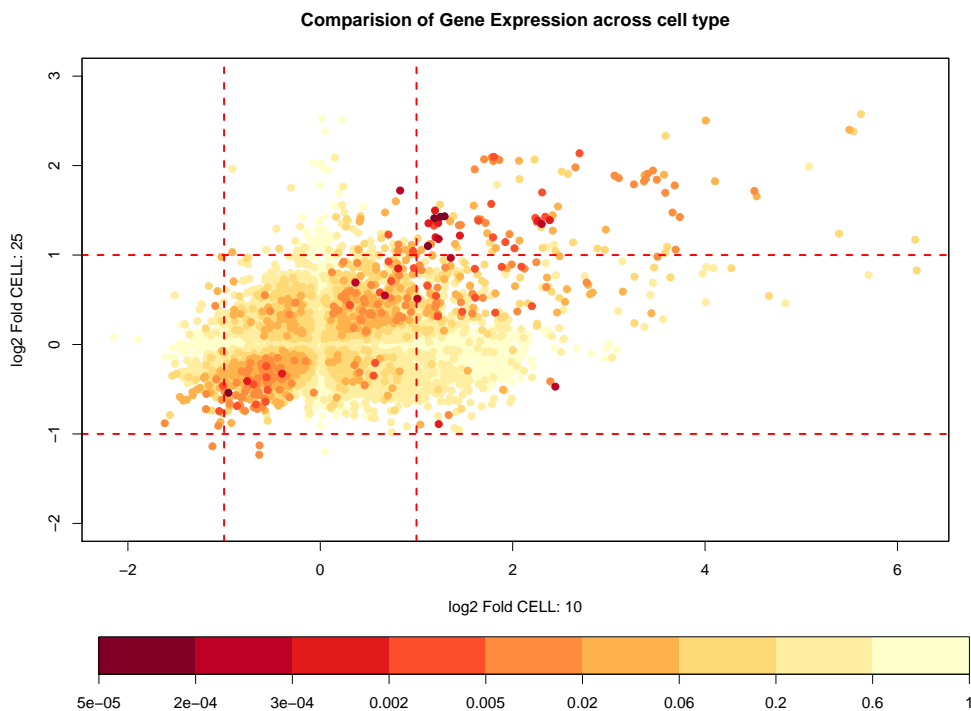


Figure 2.3: Fold of cell line 10 vs. fold of cell line 25. The points are colored by their mean p-value. The dotted lines reflecting the 2 fold threshold.

The question if both cell lines show a similar up regulation profile can be answered using the fisher test. Therefore the 2 contingency table is the following:

		Cell line 10: fold > 2	
		FALSE	TRUE
Cell line 25: fold > 2	FALSE	46212	1213
	TRUE	108	100

Table 2.4: 2 contingency table for fisher test

The p-value of the fisher test with this contingency table is $p = 10^{-16}$. Hence the different cell lines do have indeed a similar up-regulation profile.

Table 2.5 Genes showing a similar up-regulation for both cell lines.

Name	Description	Fold Cell 10 (\log_2)	Fold Cell 25 (\log_2)	P Value
NM.006186	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 2	6.18	1.17	0.0633
D78579	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 3	5.62	2.57	0.0372
NM.006981	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 3	5.54	2.38	0.0376
U12767	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 3	5.5	2.4	0.0288
NM.002135	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1	5.39	1.24	0.0752
NM.173199	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 3	5.08	1.99	0.108
BC002671	dual specificity phosphatase 4	4.54	1.66	0.0111
BC014565	dual specificity phosphatase 4	4.51	1.72	0.00933
NM.001394	dual specificity phosphatase 4	4.1	1.83	0.0147
NM.004430	early growth response 3	4.01	2.5	0.0278
NM.000169	galactosidase, alpha	3.74	1.42	0.00792
BC035625	early growth response 2 (Krox-20 homolog, Drosophila)	3.69	1.06	0.00544
AY766457	chemokine (C-C motif) ligand 4-like 2	3.68	1.78	0.00513
BC002689	galactosidase, alpha	3.66	1.48	0.00869
BC015502	homer homolog 1 (Drosophila)	3.61	1.09	0.0915
BC104765	early growth response 3	3.59	2.33	0.0482
AY766458	chemokine (C-C motif) ligand 4-like 2	3.59	1.7	0.00699
BC104252	interleukin 10	3.58	1.02	0.0348
BC092445	chemokine (C-C motif) ligand 4-like 2	3.57	1.9	0.0126
AY766453	chemokine (C-C motif) ligand 4-like 2	3.5	1.84	0.00468
BC107433	chemokine (C-C motif) ligand 4	3.46	1.94	0.00749
NM.002984	chemokine (C-C motif) ligand 4	3.4	1.91	0.00793
AY766456	chemokine (C-C motif) ligand 4-like 2	3.38	1.85	0.00945
NM.001001435	chemokine (C-C motif) ligand 4-like 1	3.37	1.89	0.0114
BC070310	chemokine (C-C motif) ligand 4-like 2	3.37	1.82	0.00497
AY766449	chemokine (C-C motif) ligand 4-like 2	3.26	1.79	0.00542
BC104226	chemokine (C-C motif) ligand 4	3.1	1.86	0.00728
NM.015714	G0/G1switch 2	3.07	1.88	0.0648
AY766448	chemokine (C-C motif) ligand 4	3.06	1.89	0.00509
AY766452	chemokine (C-C motif) ligand 4-like 2	2.97	1.28	0.0291
NM.172390	nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic,	2.96	1.06	0.0622
BC066971	chromosome 18 open reading frame 1	2.88	1.07	0.0413
BC001491	heme oxygenase (decycling) 1	2.69	2.14	0.00137
NM.002133	heme oxygenase (decycling) 1	2.65	1.98	0.00611
BC004490	v-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homo	2.63	1.14	0.081
BC015037	v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene ho	2.58	1.91	0.0499
NM.012323	v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene ho	2.51	1.93	0.0543
NM.172210	colony stimulating factor 1 (macrophage)	2.47	1.54	0.0208
BC074867	growth factor independent 1	2.44	1.05	0.0942
AY189940	homer homolog 1 (Drosophila)	2.43	1.12	0.137
NM.172211	colony stimulating factor 1 (macrophage)	2.42	1.44	0.0164
BC073983	early growth response 1	2.42	1.27	0.0141
AY007142	lymphocyte antigen 9	2.38	1.39	0.000805
NM.005252	v-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homo	2.35	1.09	0.205
NM.002348	lymphocyte antigen 9	2.34	1.43	0.00149
NM.005737	ADP-ribosylation factor-like 4C	2.31	1.08	0.0948
NM.001001852	pim-3 oncogene	2.31	1.7	0.00173
L42621	lymphocyte antigen 9	2.3	1.35	0.000171
NM.000757	colony stimulating factor 1 (macrophage)	2.3	1.31	0.042
AF244129	lymphocyte antigen 9	2.26	1.38	0.000624
BC027920	lymphocyte antigen 9	2.25	1.37	0.00176
BC062589	lymphocyte antigen 9	2.24	1.42	0.00201
NM.030948	phosphatase and actin regulator 1	2.23	2.07	0.0324
XM.933967	jumonji domain containing 3	2.07	1.16	0.0105
BC101526	phosphatase and actin regulator 1	2.07	1.85	0.0333
NM.001964	early growth response 1	2.07	2.05	0.0295
BC007771	dual specificity phosphatase 2	2.02	1.08	0.00243
XM.043272	jumonji domain containing 3	1.97	1.23	0.00948
NM.004418	dual specificity phosphatase 2	1.92	1.14	0.0018
BC007783	chemokine (C-C motif) ligand 3-like 3	1.86	2.06	0.0057
AB051520	phosphatase and actin regulator 1	1.83	1.79	0.106
NM.004155	serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin),	1.82	1.08	0.0304
NM.001001437	chemokine (C-C motif) ligand 3-like 3	1.82	2.08	0.00538
NM.021006	chemokine (C-C motif) ligand 3-like 1	1.8	2.1	0.00301
BC027888	chemokine (C-C motif) ligand 3-like 1	1.8	2.05	0.00978
NM.198565	leucine rich repeat containing 33	1.8	1.2	0.00143
NM.203411	transmembrane protein 88	1.79	1.04	0.0772
BC107710	chemokine (C-C motif) ligand 3-like 1	1.78	2.09	0.00449
NM.002166	inhibitor of DNA binding 2, dominant negative hel	1.78	1.57	0.00198

Chapter 3

Analysis Part 2

3.1 Cell line comparison

To compare the two cell lines in control state, the normalization has to be performed anew but this time for all samples together. The MicroDiscovery multi lowess normalization was identified as the best strategy for the first part of the analysis. That is why the repeated normalization is also performed using multi lowess normalization. The volcano plot of the controls of cell 10 and cell 25 is shown in figure 3.1. The number of genes showing a fold change of more than 2 is high (> 2000). This justifies our previous normalizing approach, performing the normalization separately for each cell line. In order to check consistency with the first part of this analysis the fold change analysis was performed again. There where no significant changes observed indicating that a common normalization also works fine.

The result table is delivered as: `AnalysisGSFCellLinesNotXLinked.xls`

3.2 Pooling genes by description

Performing differential analysis for each cell line we have observed that many genes with similar folds had the same gene description (see table 2.1 or 2.3). Hence when pooling the genes their folds should not be changed dramatically but their corresponding statistic may be improved significantly since more repeats are available. The plot of folds for cell 10 versus folds for cell 25 after pooling the genes is shown in figure 3.2. We can see that when pooling identical genes the range of fold change does not change whereas the p-value becomes much more significant (10^{-14} instead of 10^{-5}). Compare figure 2.3 for the unpooled result.

The result table is delivered as: `AnalysisGSFGenePoolingByDescription.xls`. This file also includes the mapping used for gene pooling.

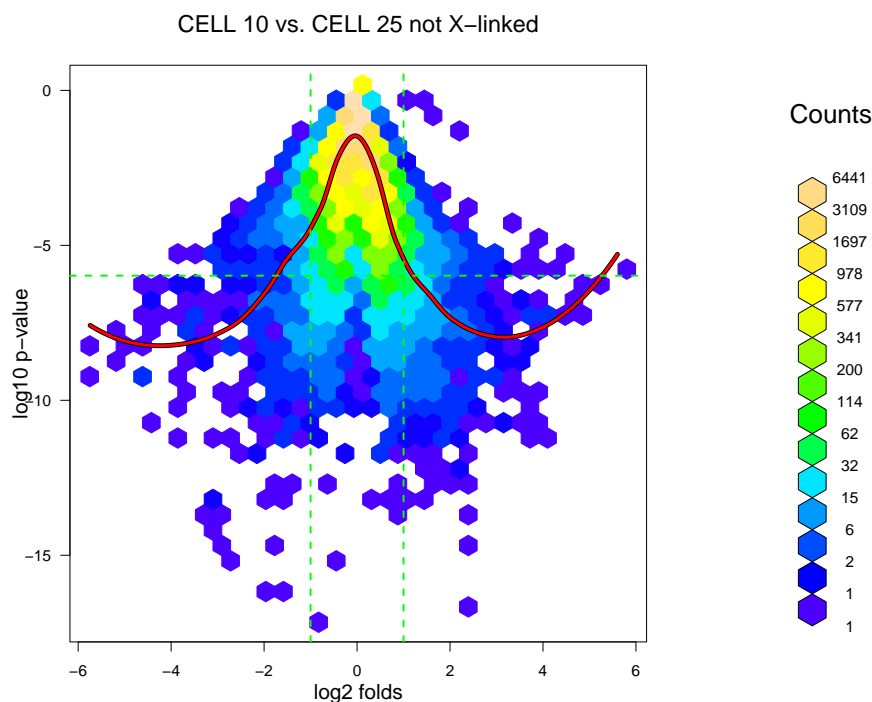


Figure 3.1: Volcano plot comparing control cell 10 and cell 25. The green horizontal dashed line reflects the multiple testing corrected (according to Bonferroni) significance threshold of 0.05. The vertical dashed lines indicate a 2 fold up or down regulation threshold.

3.3 Pathway Analysis

The goal of this analysis is to use biological meta knowledge defining groups of genes with similar biological function to identify significant biological processes. In order to compare the different cell lines a pathway analysis was performed for each cell line separately. Afterwards results are compared to identify biological functions being significant in a single or both cell lines. Two different biological pathway databases are examined (KEGG and Reactome). Since using unpooled genes would distort the pathway statistics, significant pathways are identified using the 250 pooled genes with the best fold change. The pooling was done similar as above, but based on ENSEMBL ids because these are needed for pathway analysis.

3.3.1 Kegg¹

KEGG PATHWAY is a collection of manually drawn pathway maps representing our knowledge on the molecular interaction and reaction networks.¹ This pathway mapping momentarily comprises 213 pathways for homo sapiens. The number of involved

¹<http://www.genome.jp/kegg/>

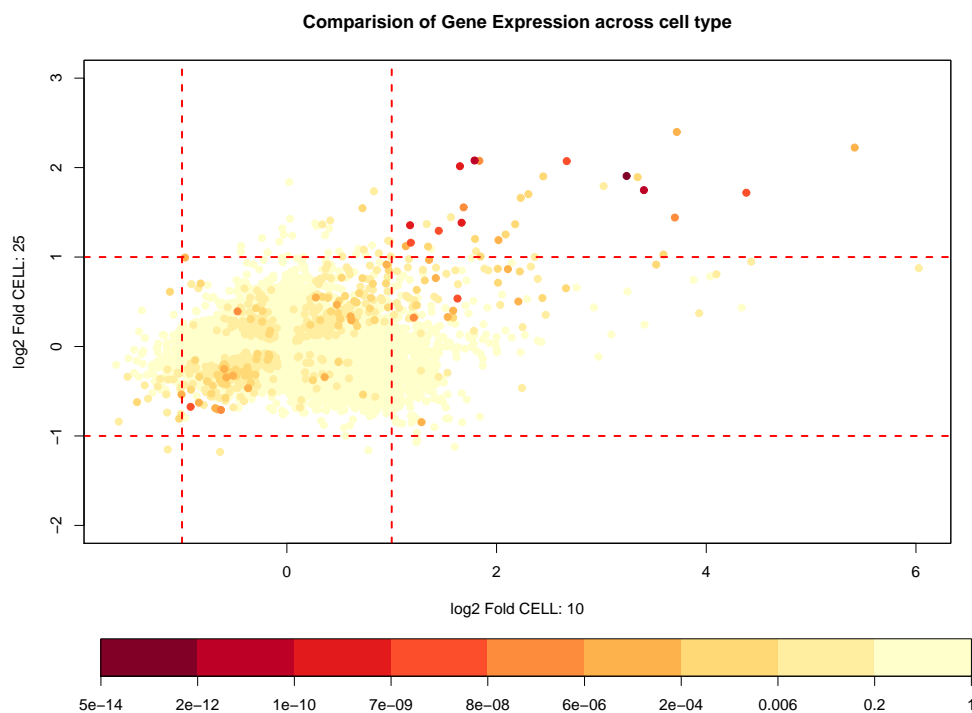


Figure 3.2: Fold of cell line 10 vs. fold of cell line 25. Genes are pooled by their description. Points are colored by their mean p-value. Dotted lines are reflecting a 2 fold threshold. The corresponding plot without pooling the genes is shown in figure 2.3.

genes for every pathway is large. The top scoring KEGG pathways for both cell lines are presented in table 3.1.

Result table is delivered as: AnalysisGSFPathwayAnalysisKEGG.xls

3.3.2 Reactome²

Reactome is a curated resource of core pathways and reactions in human biology². It contains more than 800 pathways whose number of annotated genes differs. Small pathways are included in bigger ones resulting in a tree-like pathway structure. The top scoring results for reactome pathways for both cell lines are shown in table 3.2.

The whole table is delivered as: AnalysisGSFPathwayAnalysisReactome.xls

²<http://www.reactome.org/>

Table 3.1 Significant Kegg pathways for both cell lines. The p-value is the result of a fisher test and the pFDR represents a multiple testing corrected p-value.

Pathway	P-Value Cell 10	pFDR Cell 10	P-Value Cell 25	pFDR Cell 25
Systemic lupus erythematosus	0.00121	0.0879	0.802	1
Toll-like receptor signaling pathway	0.00259	0.11	0.13	0.812
MAPK signaling pathway	0.00516	0.147	0.000959	0.0372
Graft-versus-host disease	0.0117	0.243	0.477	1
VEGF signaling pathway	0.0197	0.336	1	1
Prion disease	0.0201	0.289	0.00438	0.0941
Hematopoietic cell lineage	0.0275	0.34	0.798	1
T cell receptor signaling pathway	0.0326	0.358	0.0313	0.409
Glycosylphosphatidylinositol(GPI)-anchor biosynthesis	0.0359	0.348	1	1
Jak-STAT signaling pathway	0.0463	0.399	0.151	0.837
Regulation of autophagy	0.0592	0.493	1	1
Sphingolipid metabolism	0.0724	0.564	0.0278	0.457
Natural killer cell mediated cytotoxicity	0.0727	0.525	0.653	1
Porphyrin and chlorophyll metabolism	0.0769	0.492	0.477	1
Allograft rejection	0.0769	0.492	0.477	1
Fc epsilon RI signaling pathway	0.0784	0.472	0.756	1
Bladder cancer	0.0912	0.519	0.0389	0.462
Neurodegenerative Diseases	0.0961	0.512	0.173	0.888
Colorectal cancer	0.0967	0.49	0.462	1
Prostate cancer	0.0999	0.474	0.793	1
Cytokine-cytokine receptor interaction	0.11	0.511	0.00352	0.0955
Type I diabetes mellitus	0.111	0.501	0.555	1
Type II diabetes mellitus	0.127	0.536	0.0627	0.549
Glioma	0.188	0.645	0.317	1
Melanoma	0.205	0.662	0.342	1
Cell adhesion molecules (CAMs)	0.216	0.673	0.205	0.968
Leukocyte transendothelial migration	0.397	0.932	0.142	0.871
p53 signaling pathway	0.529	1	0.027	0.525
Glycan structures	0.558	1	0.126	0.822
Adipocytokine signaling pathway	0.599	1	0.048	0.503
TGF-beta signaling pathway	0.675	1	0.0856	0.672
Circadian rhythm	1	1	0.000223	0.0167
N-Glycan degradation	1	1	0.0505	0.498
Alkaloid biosynthesis II	1	1	0.0689	0.598

Table 3.2 Significant reactome pathways for both cell lines. The p-value is the result of a fisher test and the pFDR represents a multiple testing corrected p-value.

Pathway	P-Value Cell 10	pFDR Cell 10	P-Value Cell 25	pFDR Cell 25
Amino acid uptake across the plasma membrane	0.023	1	0.276	1
Synthesis of GPI-anchored proteins	0.0395	1	1	1
Intrinsic Pathway for Apoptosis	0.0432	1	0.37	1
Formation of apoptosome	0.0469	1	1	1
Fructose 6-phosphate and ATP react to form fructose 2,6-bisphosphate and ADP	0.0469	1	1	1
Activation, myristoylation of BID and translocation to mitochondria	0.062	1	1	1
PI3K/AKT signalling	0.0635	1	0.118	1
Post-translational protein modification	0.0724	1	1	1
Immunoregulatory interactions between a Lymphoid and a non-Lymphoid cell	0.0755	1	0.751	1
Activation of caspases through apoptosome-mediated cleavage	0.0769	1	1	1
AKT phosphorylates targets in the nucleus	0.0769	1	0.109	1
Cytochrome c-mediated apoptotic response	0.0769	1	1	1
Glucuronidation	0.0769	1	1	1
Neurophilin interactions with VEGF and VEGFR	0.0769	1	1	1
ERKs are inactivated	0.106	1	0.0133	1
ERK/MAPK targets	0.188	1	0.0395	1
TRKA signalling from the plasma membrane	0.223	1	0.367	1
Nuclear Events (kinase and transcription factor activation)	0.226	1	0.0564	1
Signalling by NGF	0.241	1	0.104	1
Metabolism of vitamins and cofactors	0.42	1	0.19	1
Metabolism of water-soluble vitamins and cofactors	0.42	1	0.19	1
Metabolism of folate and pterines	1	1	0.0133	1
Exocytosis of Dense granule	1	1	0.067	1
Reversible phosphorolysis of pyrimidine nucleosides	1	1	0.067	1

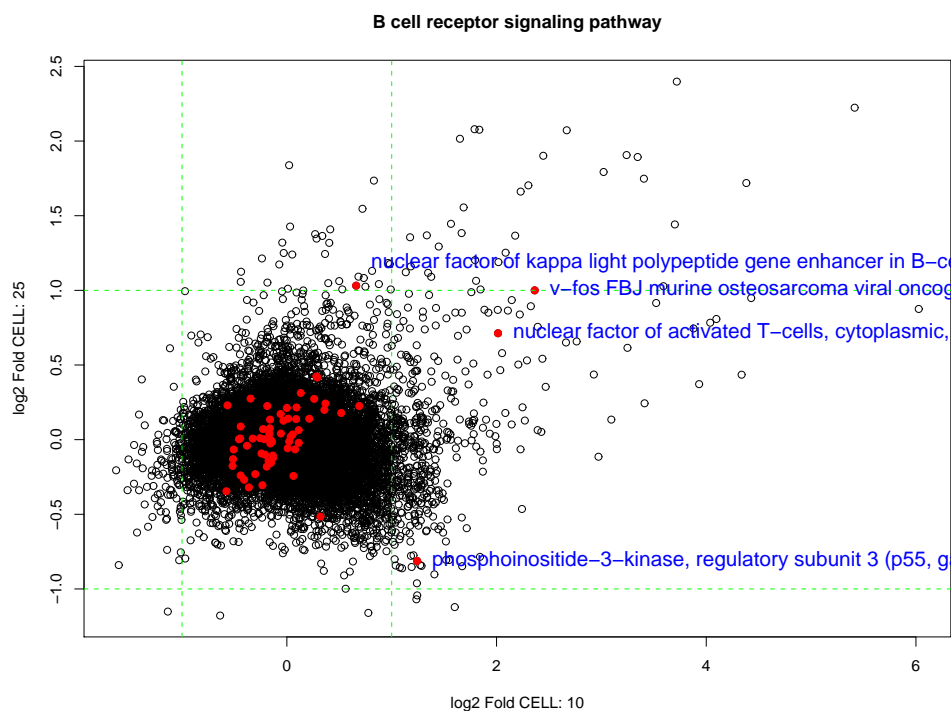


Figure 3.3: Fold of cell line 10 vs. fold of cell line 25. The genes belonging to the B cell receptor signaling pathway are colored red. The descriptions for genes having 2-fold change or higher for cell 10 or cell 25 are printed next to the points.

3.3.3 B cell receptor signaling pathway

For performing the pathway analysis the best 250 pooled genes were chosen as explained above. The B cell receptor signaling pathway is not among the top scoring pathway results. However it is very important regarding the experimental setup. Figure 3.3 shows the folds for cell 10 versus cell 25 for the genes pooled by there description (see figure 3.2). The members of the B cell receptor signaling pathway are colored red. The pathway genes with their folds and p-values are presented in table 3.3.

The table is delivered as `AnalysisGSFBCellPathway.xls`.

Table 3.3 Folds and p-values of B cell receptor signaling pathway genes.

Description	Fold Cell 10 (\log_2)	P-Value Cell 10	Fold Cell 25 (\log_2)	P-Value Cell 25
v-fos FBJ murine osteosarcoma viral onc	2.36	0.000929	1	0.0529
nuclear factor of activated T-cells, cy	2.01	4.11e-07	0.713	9.7e-05
phosphoinositide-3-kinase, regulatory s	1.24	0.0895	-0.812	0.21
mucosa associated lymphoid tissue lymph	0.691	0.329	0.226	0.699
nuclear factor of kappa light polypepti	0.661	0.228	1.03	0.041
nuclear factor of kappa light polypepti	0.518	2.66e-08	0.179	0.00553
nuclear factor of activated T-cells, cy	0.368	0.00842	0.242	2.26e-05
v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral onc	0.358	0.0245	0.199	0.176
ras-related C3 botulinum toxin substrat	0.32	0.331	-0.515	0.421
v-jun sarcoma virus 17 oncogene homolog	0.291	0.577	0.416	0.444
nuclear factor of kappa light polypepti	0.282	0.239	0.423	0.0882
CD72 molecule	0.261	0.125	0.273	0.336
CD81 molecule	0.214	0.276	0.14	0.311
B-cell linker	0.132	0.147	0.313	0.000553
interferon induced transmembrane protei	0.113	0.814	-0.0213	0.961
leukocyte immunoglobulin-like receptor,	0.113	0.732	0.0641	0.799
nuclear factor of kappa light polypepti	0.0918	0.194	0.216	0.0286
nuclear factor of activated T-cells, cy	0.0885	0.384	0.138	0.353
v-akt murine thymoma viral oncogene hom	0.0783	0.715	-0.065	0.9
phosphoinositide-3-kinase, catalytic, g	0.0629	0.939	-0.243	0.746
calcium binding protein P22	0.0552	0.537	0.0349	0.816
nuclear factor of kappa light polypepti	0.0358	0.67	0.0192	0.676
vav 3 oncogene	0.0214	0.642	-0.0127	0.892
v-yes-1 Yamaguchi sarcoma viral related	0.0122	0.954	0.141	0.493
v-akt murine thymoma viral oncogene hom	0.00766	0.988	-0.0578	0.89
v-Ha-ras Harvey rat sarcoma viral oncog	-9.77e-05	1	0.213	0.0917
B-cell CLL/lymphoma 10	-0.0325	0.685	0.127	0.191
protein phosphatase 3 (formerly 2B), re	-0.057	0.588	0.0408	0.626
nuclear factor of activated T-cells 5,	-0.0598	0.712	0.172	0.158
phosphoinositide-3-kinase, regulatory s	-0.133	0.154	-0.123	0.236
v-akt murine thymoma viral oncogene hom	-0.133	0.572	-0.106	0.124
CD19 molecule	-0.142	0.231	-0.015	0.879
Bruton agammaglobulinemia tyrosine kina	-0.151	0.0751	-0.155	0.0153
protein kinase C, beta 1	-0.152	0.772	-0.00275	0.995
CD79a molecule, immunoglobulin-associat	-0.158	0.0591	-0.0259	0.65
CD22 molecule	-0.16	0.0923	0.135	0.00993
conserved helix-loop-helix ubiquitous k	-0.162	0.0459	0.0758	0.204
caspase recruitment domain family, memb	-0.167	0.162	0.0396	0.699
ras-related C3 botulinum toxin substrat	-0.175	0.75	-0.142	0.758
protein phosphatase 3 (formerly 2B), ca	-0.187	0.0461	0.225	0.00694
ras-related C3 botulinum toxin substrat	-0.192	0.00524	-0.181	0.115
phospholipase C, gamma 2 (phosphatidyli	-0.208	0.0428	-0.101	0.0335
inhibitor of kappa light polypeptide ge	-0.215	0.395	0.00262	0.986
neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogen	-0.227	0.367	0.0705	0.0725
CD79b molecule, immunoglobulin-associat	-0.233	0.464	-0.305	0.434
complement component (3d/Epstein Barr v	-0.243	0.0185	-0.0927	0.229
glycogen synthase kinase 3 beta	-0.256	0.0414	0.00999	0.886
phosphoinositide-3-kinase, regulatory s	-0.301	0.355	-0.231	0.379
phosphoinositide-3-kinase, catalytic, a	-0.326	0.0124	0.00698	0.933
protein phosphatase 3 (formerly 2B), re	-0.346	0.121	0.275	0.19
Fc fragment of IgG, low affinity IIb, r	-0.362	0.0614	-0.32	0.0787
vav 1 oncogene	-0.38	0.000845	-0.0406	0.621
phosphoinositide-3-kinase, catalytic, d	-0.408	0.00709	-0.269	0.0387
inhibitor of kappa light polypeptide ge	-0.441	0.476	0.0881	0.854
RAS guanyl releasing protein 3 (calcium	-0.441	0.00249	-0.24	0.0164
vav 2 oncogene	-0.445	0.382	0.00822	0.981
protein phosphatase 3 (formerly 2B), ca	-0.457	0.364	0.00271	0.995
phosphoinositide-3-kinase, regulatory s	-0.507	0.419	-0.066	0.906
phosphoinositide-3-kinase, catalytic, b	-0.514	0.285	-0.13	0.791
nuclear factor of activated T-cells, cy	-0.518	0.00695	-0.176	0.313
protein phosphatase 3 (formerly 2B), ca	-0.567	0.0118	0.23	0.46
spleen tyrosine kinase	-0.577	4.23e-06	-0.346	1.27e-07

Kurzbeschreibung des Gens	IDs (Identifikationsnummern bei NCBI)
nuclear receptor subfamily 4, group A, member 3	D78579,NM_006981,NM_173199,U12767
dual specificity phosphatase 4	BC002671,BC014565,NM_001394
early growth response 3	BC104765,NM_004430
galactosidase, alpha	BC002689,NM_000169
early growth response 2 (Krox-20 homolog, Drosophila)	BC035625,NM_000399
chemokine (C-C motif) ligand 4-like 2	AY766449,AY766452,AY766453,AY766456,AY766457,AY766458,BC070310,BC092445
chemokine (C-C motif) ligand 4-like 1	NM_001001435
chemokine (C-C motif) ligand 4	AY766448,BC104226,BC107433,NM_002984
G0/G1switch 2	NM_015714
heme oxygenase (decycling) 1	BC001491,NM_002133
v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog F (avian)	BC015037,NM_012323
pim-3 oncogene	NM_001001852
early growth response 1	BC073983,NM_001964
colony stimulating factor 1 (macrophage)	NM_000757,NM_172210,NM_172211,NM_172212
lymphocyte antigen 9	AF244129,AK128573,AY007142,BC027920,BC062589,L42621,NM_001033667,NM_002348
jumonji domain containing 3	XM_043272,XM_933967
dual specificity phosphatase 2	AF331843,BC007771,NM_004418
chemokine (C-C motif) ligand 3-like 3	BC007783,NM_001001437
serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 9	NM_004155
leucine rich repeat containing 33	NM_198565
chemokine (C-C motif) ligand 3-like 1	BC027888,BC107710,NM_021006
inhibitor of DNA binding 2, dominant negative helix-loop-helix protein	BC030639,NM_002166
inhibitor of DNA binding 2B, dominant negative helix-loop-helix protein	NM_001039082,XM_930541,XM_935345,XM_935347
chemokine (C-C motif) ligand 3	BC071834,NM_002983
phosphatase and actin regulator 1	AB051520,BC047159,BC101526,NM_030948
Kruppel-like factor 10	BC095399,NM_001032282,NM_005655
tec protein tyrosine kinase	BC101711,NM_003215
prostaglandin E receptor 4 (subtype EP4)	BC101534,NM_000958
Homo sapiens cDNA FLJ34517 fis, clone HLUNG2006781.	AK091836
sequestosome 1	BC001874,BC017222,NM_003900
SLAM family member 7	BC027867,NM_021181
protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 15A	BC003067,NM_014330

log2(durchschnittlicher Fluoreszenzwert der 3 stimulierten 3696 LCL Proben)	log2(durchschnittlicher Fluoreszenzwert der 3 unstimulierten 3696 LCL Proben)	log2 (Faktor der Genexpressionsänderung nach LMP2A:CD69 Stimulierung) = (SpalteC - SpalteD)	P-Wert zu Spalte E
14,13164998	8,716386436	5,415263543	1,16155E-14
14,9218174	10,53967034	4,382147056	1,18459E-12
12,725019	9,006039975	3,718979028	2,02456E-05
14,70198666	11,00160063	3,700386029	1,56377E-12
13,0563803	9,465102255	3,591278044	2,25716E-08
14,80590037	11,40066719	3,405233176	1,40114E-21
15,35683563	12,0111885	3,345647134	0,001896638
15,42653987	12,18645944	3,240080438	5,30626E-18
11,38541417	8,364632422	3,020781744	0,004032175
13,41713881	10,74809167	2,669047143	1,49961E-09
11,87390501	9,4283962	2,44550881	0,000154632
13,45965592	11,15628156	2,303374357	0,000332584
13,78064235	11,55078221	2,229860136	1,01964E-08
12,32729	10,14980063	2,17748937	0,00014189
12,75411083	10,66785361	2,086257211	1,15567E-06
13,67406883	11,65610578	2,017963045	1,16004E-09
13,83317217	11,98639924	1,846772921	0,001413908
15,87184154	14,03615254	1,835688994	4,92869E-07
12,3302718	10,52558763	1,804684168	0,007622382
13,06076291	11,2663568	1,794406108	9,5553E-05
15,87010707	14,0801102	1,789996875	3,31277E-12
13,26343049	11,5776889	1,685741587	3,52326E-10
12,56868633	10,9021521	1,666534229	1,90159E-12
15,87228129	14,22174778	1,650533514	1,70119E-09
11,27973572	9,714629667	1,565106057	0,007306474
12,91474049	11,46649828	1,448242216	1,61779E-09
12,87036345	11,4937936	1,376569854	0,161664709
11,77537263	10,42825968	1,347112948	5,37028E-05
11,13693994	9,802249818	1,334690124	0,006616396
14,40667231	13,22481115	1,181861161	2,07107E-11
14,19339395	13,01823503	1,175158926	2,31436E-10
13,70311725	12,56916798	1,133949269	4,30101E-06

log2(durchschnittlicher Fluoreszenzwert der 3 stimulierten 2525 LCL Proben)	log2(durchschnittlicher Fluoreszenzwert der 3 unstimulierten 2525 LCL Proben)	log2 (Faktor der Genexpressionsänderung nach BZR Stimulierung) = (SpalteG - SpalteH)	P-Wert zu Spalte I
11,80630447	9,582792384	2,223512083	3,86538E-06
12,62753652	10,90861787	1,718918647	2,09955E-08
12,74912671	10,35088628	2,398240422	9,77237E-07
13,34088741	11,89940412	1,441483296	9,08746E-07
12,47509534	11,44732843	1,027766908	0,000342586
13,8351639	12,08722557	1,747938333	2,56025E-11
14,54103473	12,64795926	1,893075476	1,3906E-05
14,66911482	12,76298856	1,906126258	1,07859E-13
11,10322996	9,310359411	1,792870547	0,03702112
12,26632257	10,19406015	2,072262424	7,05243E-08
12,60974689	10,70832843	1,901418453	1,81876E-06
13,24262348	11,53926588	1,703357596	0,000418938
12,68088121	11,01945066	1,661430548	0,000257852
12,46637021	11,10001787	1,366352337	0,001344598
12,95014081	11,69782277	1,252318035	0,001081722
12,66721473	11,47803653	1,189178197	4,81309E-06
13,19253238	12,18646248	1,006069898	3,42934E-05
15,24420577	13,16842914	2,07577663	9,05476E-11
12,32937292	11,26546718	1,063905736	0,014306627
13,00065142	11,79819595	1,202455469	0,001176776
15,26831349	13,18901285	2,079300639	3,53782E-16
13,3602256	11,80478389	1,55544171	9,23475E-08
12,6612766	11,27770217	1,38357443	1,0702E-10
15,34587381	13,33061967	2,015254137	1,80658E-10
11,6933933	10,2477671	1,445626207	0,001657296
12,57387618	11,28036526	1,293510926	1,54337E-08
12,4866516	11,3959959	1,090655706	0,204184988
10,89020466	9,772797677	1,117406981	0,000475221
11,58196215	10,21356237	1,368399781	0,003423919
14,37839374	13,21794088	1,160452859	6,74587E-09
14,58109248	13,22554055	1,355551935	1,61717E-11
14,28485151	13,16342892	1,121422593	3,64375E-10

Erklärung zur Tabelle der 32 gemeinsam regulierten Gene von BZR und LMP2A:CD69

- Spalte A enthält eine kurze **Beschreibung** jedes Gens bzw. die Bezeichnung des Genprodukts.
- Spalte B enthält die **Identifikationsnummer** jedes Gens, mit der es z.B. in den Datenbanken des NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) gesucht werden kann.
- Spalte C enthält den durchschnittlichen Fluoreszenzwert jedes Gens, aus den drei Microarrays, auf die die cDNA-Proben **stimulierter** 3696 LCLs hybridisiert wurden. Dieser Wert errechnet sich als Durchschnittswert der Spots des Microarrays, welche Sequenzen des gleichen Gens erkennen.
- Spalte D enthält den durchschnittlichen Fluoreszenzwert jedes Gens, aus den drei Microarrays, auf die die cDNA-Proben **unstimulierter** 3696 LCLs hybridisiert wurden. Dieser Wert errechnet sich als Durchschnittswert der Spots des Microarrays, welche Sequenzen des gleichen Gens erkennen.
- Spalte E enthält den Logarithmus zur Basis 2 des Werts der **Genexpressionserhöhung** nach Stimulierung des LMP2A:CD69. Spalte E entspricht damit den Werten der X-Achse in Abb. 4-12. (Bsp.: 5,415 entspricht einer Expressionserhöhung um den Faktor $2^{5,415} = 42,67$)
- Spalte F enthält den **P-Wert** der Expressionserhöhung jedes Gens nach Stimulierung des LMP2A:CD69. Der P-Wert ist ein Maß der statistischen Signifikanz, je kleiner der P-Wert, desto signifikanter das Ergebnis.
- Die Spalten G bis J entsprechen den Spalten C bis F, jedoch enthalten sie die Werte der Proben der 2525 LCLs (also der Regulierung der Genexpression durch den BZR). Spalte I entspricht also den Werten der Y-Achse in Abb. 4-12.

Die Tabelle enthält alle 32 Gene aus Rechteck „a“ der Abb. 4-12. Sie sind absteigend sortiert, nach den Werten in Spalte E. Übertragen auf Abb. 4-12 bedeutet das, die Gene sind sortiert nach ihrem Erscheinen in „a“ von rechts nach links.

Die P-Werte aus Abb. 4-12 sind Durchschnittswerte aus den Spalten F und J.

Danksagung

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

Prof. Dr. Wolfgang Hammerschmidt für die hervorragende Betreuung und die vielen guten Ratschläge für die Wissenschaft und das Leben an sich.

Prof. Dr. Dirk Eick für die Bereitschaft die offizielle Betreuung meiner Arbeit zu übernehmen, sowie für hilfreiche Diskussionen und die schnelle Korrektur.

Dr. Christoph Mancao für die Einführung in die Welt des LMP2A und die ausgezeichnete und geduldige Betreuung während des ersten Jahres meiner Doktorarbeit.

Meiner Mitstreiterin im Zweierlabor, Lisa Steinbrück, für die angenehme Atmosphäre und viele gute Diskussionen. Christine Göbel und Daggy Pich für ihre Hilfe im Labor und die langjährige Erfahrung, von der wir alle profitieren. Dr. Markus Kalla für zahlreiche Diskussionen und ein offenes, geduldiges Ohr nach gescheiterten Experimenten. Und natürlich auch allen anderen „Hammerschmidt-Kinders“.... Anne, Eri, Markus, Martin, Montse und Romana, für schöne drei Jahre, stete Diskussions- und Hilfsbereitschaft und gute Zusammenarbeit. Und nicht zuletzt natürlich Rosie, die auch wirklich alles wieder gerade biegt.

Meiner Familie für ihre Unterstützung und viel Geduld.

Und Paul.