

**Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades  
der Fakultät für Chemie und Pharmazie  
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

**Identifizierung und Charakterisierung von Zielgenen des  
Epstein-Barr Virus nukleären Antigens 2 (EBNA2)**

**von**

**Martin Schlee**

**aus**

**Hildesheim**

**2003**

## **Erklärung**

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 13 Abs. 3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von Prof. Dr. Georg W. Bornkamm betreut.

## **Ehrenwörtliche Versicherung**

Diese Dissertation wurde selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt.

München, den 27.05.2003

(Martin Schlee)

Dissertation eingereicht am 28.05.2003

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Georg W. Bornkamm
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Horst Domdey

Mündliche Prüfung am 30.10.2003

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1	<b>Das Epstein-Barr Virus .....</b>	<b>1</b>
1.1.1	Verbreitung und Pathogenität .....	1
1.1.2	EBV-Infektion <i>in vivo</i> .....	1
1.1.3	EBNA2, Struktur und Mechanismus der Transaktivierung.....	5
1.2	<b>Fragestellung und Techniken .....</b>	<b>8</b>
1.3	<b>Die konditionale lymphoblastoide Zelllinie EREB2-5 und die konditionale Burkitt Lymphom Modell Zelllinie P493-6.....</b>	<b>10</b>
<b>2</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>12</b>
2.1	<b>Chemikalien, Enzyme, Geräte und Sonstiges.....</b>	<b>12</b>
2.2	<b>Proteinbiochemische Methoden.....</b>	<b>13</b>
2.2.1	Detektion und Identifizierung differentiell exprimierter Proteine .....	13
2.2.1.1	2D-Gelelektrophorese (2D-PAGE) .....	13
2.2.1.2	2D-Gel-Analyse und -Quantifizierung .....	17
2.2.1.3	Proteinidentifikation .....	18
2.2.1.4	„Peptide mass fingerprinting“ und Proteinidentifikation .....	20
2.2.2	Proteintransfer und immunologischer Nachweis von Protein (Westernblot) ...	22
2.2.2.1	Lysatpreparation für eindimensionales SDS-PAGE .....	22
2.2.2.2	Proteintransfer- und Nachweis .....	22
2.2.2.3	Strippen von Antikörper-beladenen Membranen.....	23
2.3	<b>RNA-Analyse-Methoden.....</b>	<b>24</b>
2.3.1	Nukleärer Run-On .....	24
2.3.2	<i>Real-Time</i> -PCR .....	25
2.3.2.1	Isolierung von Gesamt-RNA .....	27
2.3.2.2	Reverse Transkription von Gesamt-RNA.....	27
2.3.2.3	Lightcycler-PCR und Primer .....	28
2.3.3	Northernblot Analyse .....	30
2.3.3.1	Radioaktive Markierung von DNA Sonden.....	31
2.3.4	Hybridisierung von Microarrays mit FastTrack mRNA .....	31
2.3.4.1	Vorbereitung der Arrays: .....	31
2.3.4.2	mRNA-Färbung und Array-Hybridisierung .....	32

2.3.4.3	Scannen und Auswerten der Arrays .....	33
<b>2.4</b>	<b>Zellkultur.....</b>	<b>34</b>
<b>2.5</b>	<b>Elektroporation.....</b>	<b>34</b>
<b>2.6</b>	<b>Thymidininkorporationstest.....</b>	<b>35</b>
<b>2.7</b>	<b>MTT-Assay.....</b>	<b>35</b>
<b>2.8</b>	<b>Molekularbiologische Methoden .....</b>	<b>35</b>
2.8.1	Hydrolyse von Plasmid-DNA durch Restriktionsendonukleasen.....	35
2.8.2	Ligation von DNA-Fragmenten .....	35
2.8.3	Herstellung chemisch kompetenter <i>E.coli</i> (DH5a) und deren Transformation	36
2.8.4	Plasmidaufarbeitung.....	36
2.8.5	Klonierung von PINCO-M14 .....	37
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>38</b>
<b>3.1</b>	<b>2D-PAGE-Analyse von EREB2-5, P493-6 und EBV-infizierten</b>	
	<b>Adenoid-B-Zellen .....</b>	<b>38</b>
3.1.1	Zielgenidentifikation und -Klassifizierung.....	38
3.1.2	eIF-5A.....	45
3.1.2.1	Zwei Formen von eIF-5A werden durch EBNA2, Myc und IL4 hochreguliert .....	46
3.1.2.2	Charakterisierung posttranslatinaler Modifikationen .....	46
3.1.2.3	Haltbarkeit der Modifikationen.....	47
3.1.2.4	Biologische Relevanz der Modifikationen .....	47
<b>3.2</b>	<b>Nukleäre Run-On-Experimente .....</b>	<b>50</b>
3.2.1	Screening mit <i>Clontech</i> -Membran-Microarrays .....	50
3.2.2	Zielgenvalidierung mit Northern Blot und Lightcycler-PCR.....	52
<b>3.3</b>	<b>mRNA-Analyse von EBV- und MYC-vermittelter Proliferation auf</b>	
	<b>Lymphochips.....</b>	<b>61</b>
3.3.1	MYC- und EBV/EBNA2-induziert Gene sind proliferationsassoziiert .....	66
3.3.2	Von MYC und EBV/EBNA2 unterschiedlich regulierte Gene (TypII).....	68
3.3.2.1	EBV/EBNA2 induziert, MYC reprimiert NF $\kappa$ B-Zielgene.....	68
3.3.2.2	EBV/EBNA2 induziert selektiv das NF $\kappa$ B2(p100)-Gen.....	69
3.3.2.3	Abhängigkeit der MYC- sowie EBV/EBNA2-abhängigen Proliferation von NF $\kappa$ B.....	71

3.3.2.4	EBV/EBNA2 induziert SMAD7 und reprimiert das TGF $\beta$ -Zielgen TSC-22.....	72
3.3.2.5	EBV/EBNA2 reprimiert das B-Zell-Rezeptor-Signal.....	72
3.3.2.6	EBV/EBNA2 induziert T-Zell-Attraktoren .....	74
3.3.2.7	STAT1 ist in EBV-abhängig proliferierenden Zellen stärker exprimiert als in MYC-abhängig proliferierenden Zellen .....	74
3.3.3	Weitgehend unabhängig von MYC oder EBNA2 regulierte Gene (TypIII) ....	77
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>80</b>
<b>4.1</b>	<b>2D-PAGE-Analyse in EREB2-5, P493-6 und EBV-infizierten Adenoid-B-Zellen .....</b>	<b>80</b>
4.1.1	MYC-abhängige EBNA2-Zielproteine .....	80
4.1.2	MYC-unabhängige EBNA2-Zielproteine.....	82
4.1.3	eIF-5A.....	83
4.1.4	eIF-5A in EREB2-5-Zellen.....	86
4.1.5	Halbwertszeit von Proteinen in arretierten EREB2-5 .....	87
4.1.6	Bewertung der Methode .....	88
<b>4.2</b>	<b>Durch nukleäre Run-Ons ermittelte Zielgene von EBNA2 .....</b>	<b>88</b>
<b>4.3</b>	<b>mRNA-Analyse von EBV- und MYC-vermittelter Proliferation auf Lymphochips .....</b>	<b>90</b>
4.3.1	MYC- und EBV/EBNA2-induzierte Gene sind proliferationsassoziiert .....	90
4.3.2	LMP1 .....	91
4.3.3	NF $\kappa$ B .....	92
4.3.3.1	MYC reprimiert NF $\kappa$ B-Zielgene .....	96
4.3.3.2	EBV induziert das NF $\kappa$ B2-Gen .....	98
4.3.3.3	EBV/EBNA2 induziert antiapoptotische Moleküle .....	99
4.3.3.4	Abhängigkeit der MYC- sowie EBV/EBNA2-abhängigen Proliferation von NF $\kappa$ B.....	99
4.3.4	Interferonantwort und STAT-Proteine .....	100
4.3.4.1	STAT-Proteine .....	100
4.3.4.2	STAT1 als Mediator der Interferon-Antwort.....	100
4.3.4.3	Biologische Funktionen von TypI und TypII Interferonen .....	102
4.3.4.4	Vorangegangene Untersuchungen in EREB2-5 und P493-6 und neue Ergebnisse .....	103

4.3.5	T-Zellrekrutierung und B-Zellaktivierung durch EBNA2-Zielgene.....	107
4.3.6	TypIII-Gene .....	108
<b>4.4</b>	<b>Abschließender Vergleich der Methoden.....</b>	<b>109</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>111</b>
<b>6</b>	<b>Literatur.....</b>	<b>113</b>
<b>7</b>	<b>Abkürzungen .....</b>	<b>123</b>

## 1 Einleitung

### 1.1 Das Epstein-Barr Virus

#### 1.1.1 Verbreitung und Pathogenität

Das Epstein Barr Virus (EBV) ist ein ubiquitär vorkommendes B lymphotropes Herpesvirus, mit dem etwa 90% der erwachsenen Bevölkerung infiziert sind. Während die Infektion bei Kindern gewöhnlich ohne besondere Symptome verläuft, führt sie bei Jugendlichen und Erwachsenen häufig zur infektiösen Mononukleose mit Fieber, geschwollenen Lymphknoten und entzündeter Rachenschleimhaut. Diese Symptome werden durch eine starke Immunantwort sich stark vermehrender zytotoxischer T-Zellen hervorgerufen.

Bei fehlender oder geschwächter Immunantwort (AIDS-Patienten, immunsupprimierte Empfänger transplanterter Organe) kann es zu einer lymphoproliferativen Erkrankung kommen, bei der sich EBV-infizierte B-Lymphozyten ungehindert vermehren.

Außerdem ist EBV an der Entstehung weiterer maligner Tumorerkrankungen beteiligt. Dazu gehören das Burkitt Lymphom (BL), Morbus Hodgkin, bestimmte Formen von T-Zell-Lymphomen, sowie einige epitheliale Tumoren, wie das Nasopharynxkarzinom und einige Darmtumoren (Baumforth et al., 1999).

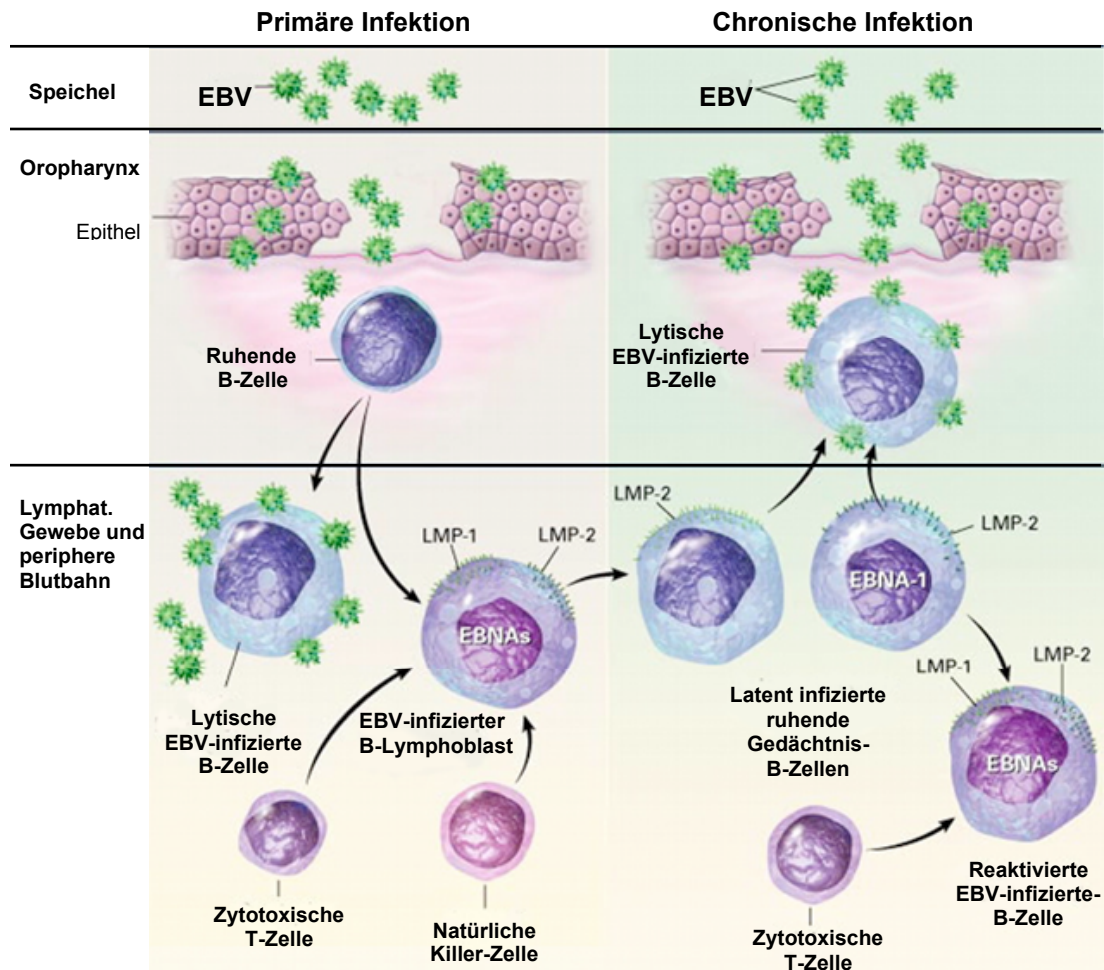
Das Virus besteht aus einer laminierten Membranhülle, in die ein ikosaedrisches Viruskapsid eingebettet ist, das das 180 kb lange lineare Virusgenom umschließt. Das Genom kodiert für ca. 80 Proteine und wird von repetitiven Sequenzen (terminal repeats, TR) flankiert.

#### 1.1.2 EBV-Infektion *in vivo*

Obwohl erste Untersuchungen vermuten ließen (Sixbey et al, 1984), dass EBV zuerst Epithelzellen der Schleimhäute im Rachenraum infiziert, um anschließend nach weiterer Vermehrung und Sezernierung B-Lymphozyten zu infizieren, legten spätere Beobachtungen (Anagnostopoulos et al, 1995, Niedobitek et al, 1997) nahe, dass primäre B-Zellen des Rachenraumes der Ort der primären Infektion sind (Abb.□, aus Cohen, 2000). Die primär infizierten Zellen bilden im sogenannten lytischen Zyklus Viruspartikel und setzen diese nach Autolyse frei, so dass weitere Zellen von Viren infiziert werden.

Das Virus bindet mit seinem Außenhüllprotein gp350/220 an das Oberflächenprotein CD21 (Complementrezeptor 2) und/oder andere Oberflächenmoleküle (Janz et al., 2000). Nach Endozytose verschmilzt die Virushülle mit der Vesikelmembran (Nemerow et al., 1984; Carel et al., 1990), so dass das Viruskapsid in das Zytoplasma und schließlich das lineare

Virusgenom in den Zellkern gelangt, wo nach ca. 36 h die Zirkularisierung zum episomal replizierenden Virusplasmid erfolgt (Hurley et al., 1988).



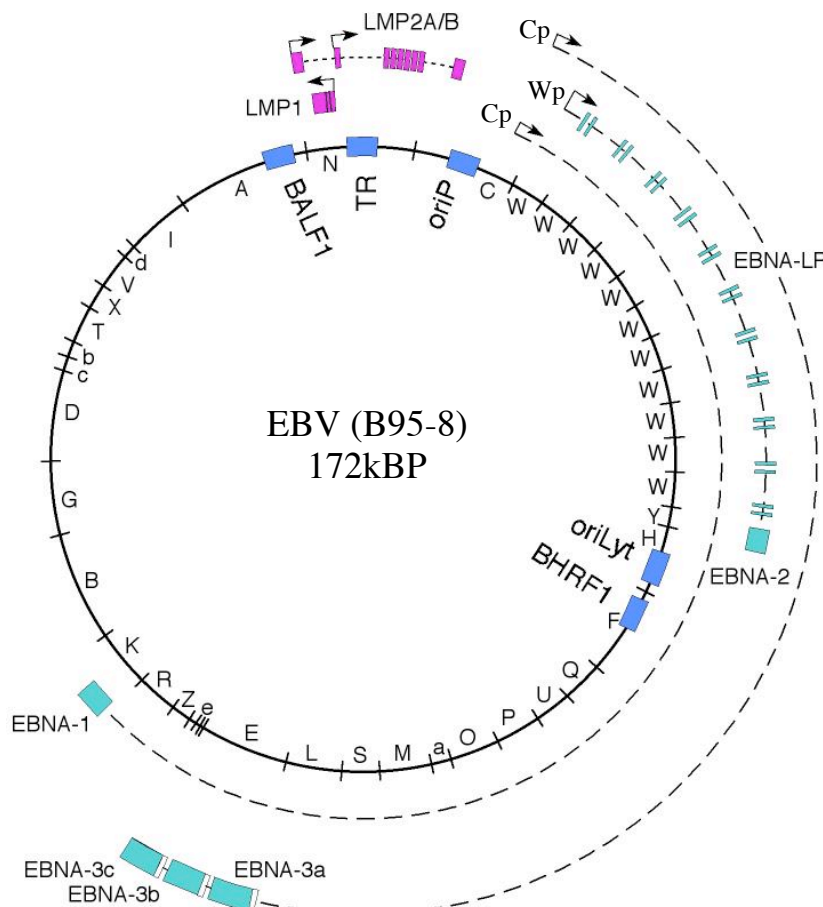
**Abb. 1:** EBV-Lebenszyklus (nach Cohen et al., 2000): Im Rachenraum infiziert EBV ruhende B-Zellen oder Epithelzellen, die dann weitere B-Zellen infizieren. Nach der primären Infektion produziert die B-Zelle dann entweder Viruspartikel (lytischer Zyklus) oder exprimiert als *B-Lymphoblast* die *latent* Gene (EBNAs, LMPs und EBERs). Diese B-Lymphoblasten werden von zytotoxischen T-Zellen oder Natürlichen Killerzellen eliminiert. Nach Abklingen der Primärinfektion persistiert EBV in Gedächtnis-B-Zellen des peripheren Blutes, die nur noch LMP2a und EBNA1 exprimieren, wobei die Reaktivierung zu B-Lymphoblasten möglich ist. Ebenso ist die Reaktivierung des lytischen Zyklus im Rachenraum möglich, wo es dann zur Ausschüttung von Viren kommt.

Die infizierte B-Zelle kann sich grundsätzlich in zwei verschiedene Richtungen weiterentwickeln: Entweder sie repliziert im lytischen Zyklus Viruspartikel oder aber es werden die Gene des Latenzprogrammes aktiviert. Das vom Wp-Promotor ausgehende für das Latenzprogramm initiale Transkript kodiert für die viralen Transkriptionsfaktoren EBNA-LP und EBNA2 (EBNA=“Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen“, LP=“leader



protein“). EBNA-LP unterstützt dabei die Funktion des für das Latenzprogramm essentiellen EBNA2. EBNA2 aktiviert die vom Cp-Promotor ausgehende Transkription einer primären RNA, die für die Transkriptionsfaktoren EBNA-LP, EBNA2, EBNA3a,b,c und für EBNA1 kodiert (Abb. 1). Letzteres ermöglicht die episomale Replikation des Virusgenoms. Desweiteren werden durch EBNA2 die Expression der latenten Membranproteine (LMP1, LMP2a,b) hochreguliert. Als spontan aggregierende konstitutiv aktive Signalmoleküle imitieren sie rezeptorvermittelte Signaltransduktion in B-Zellen. Dabei ähnelt LMP1 in Bezug auf die Wirkung auf B-Zellen und die involvierten Signalwege dem CD40-Rezeptor -CD40L-Ligand-Paar (Kilger et al., 1998, Gires et al., 1997) während LMP2a mit Signalen des B-Zell-Rezeptors interferiert (Frühling und Longnecker, 1997) und das B-Zell-Rezeptor-Signal ersetzen kann (Caldwell et al., 1998).

Zusammen mit zwei unabhängig von EBNA2 exprimierten RNA-Polymerase-III-Transkripten (EBER1 und EBERII) repräsentieren die genannten viralen Proteine das Expressionsmuster der sogenannten Latenz III. Die Funktion von EBERI/II liegt vermutlich in der Inhibition der Doppelstrang-RNA-abhängigen Protein Kinase „PKR“ (Yamamoto et al., 2000), was die Resistenz gegen Apoptose erhöht.



**Abb. 1:**  
Schematische Darstellung des zirkulären EBV-Genoms (B95-8 Stamm) und der latenten Gene (EBNA-1, -2, -LP, -3a, -3b, -3c, LMP1, LMP2A/B). Die EBV-Promotoren Cp und Wp wurden nach ihrer Lokalisation in den entsprechenden BamHI-Fragmenten des EBV-Genoms benannt. Weiterhin dargestellt wurden die Replikationsursprünge oriP und oriLyt und die terminalen Repetitionen (TR), an denen die Zirkularisierung erfolgt.

Desweiteren aktiviert EBNA2 eine Vielzahl zellulärer Gene der Wirtszelle wie die bisher bekannten direkten Zielgene *c-myc* (Kaiser et al., 1999), *CD21*, *CD23* (Cordier et al., 1990) und *EBI1/BRL2* (Burgstahler et al., 1995), *EGR-1*, *TNF $\alpha$*  und *ERF-1* (Dumont, Promotion 2001). Die Expression der genannten viralen Gene und der zellulären Zielgene, die noch nicht im umfassenden Maße bekannt sind, führt zur Immortalisierung der infizierten B-Zelle. Dies bedeutet, dass die immortalisierte Zelle ohne weitere Stimuli unbegrenzt *in vitro* (unter Standard-Zellkultur-Bedingungen) proliferieren kann. Bisher konnte gezeigt werden, dass für die Initiation der Immortalisierung die Expression von EBNA2, LMP1, EBNA-3a und -3c essentiell sind und für die Aufrechterhaltung der Immortalisierung EBNA2 und LMP1 benötigt werden (zusammengefaßt in Bornkamm und Hammerschmidt, 2001). Ob EBNA1, -2, -3 und LMP1 für die Immortalisierung ausreichen, wurde jedoch noch nicht untersucht.

Wie oben bereits angeklungen, provozieren die *in vivo* nach einer EBV-Infektion entstehenden B-Lymphoblasten in gesunden Personen eine starke Immunantwort, bei der die EBNA2-positiven Zellen durch *zytotoxische T-Zellen* (CTL) effizient eliminiert werden (zusammengefaßt in Khanna et al., 1995). Das EBV entkommt dieser Immunantwort, indem es in ruhenden *Gedächtnis*-B-Zellen persistiert. In diesen Zellen werden lediglich die viralen Gene *EBNA1*, *LMP2* und *EBER1/2* exprimiert, die offensichtlich keine Immunantwort provozieren. Die übrigen latenten Gene sind vermutlich aufgrund der Methylierung des Cp-promotors abgeschaltet. Nach Babcock et al. (2000) stammen diese *Gedächtnis*-B-Zellen aus der Differenzierung infizierter ursprünglich naiver B-Zellen. Ob diese ruhenden *Gedächtnis*-B-Zellen aus der Selektion durch CTLs oder aus einer EBV-kontrollierten Differenzierung hervorgehen, ist noch unverstanden. Aber die Tatsache, dass das Expressionsmuster einiger immunologischer Oberflächenmarker und zellzyklusrelevanter Gene in EBV-infizierten und immunologisch aktivierten B Zellen ähnlich ist (Kempkes et al., 1995, Hollyake et al., 1995) deutet eher auf eine Virus-kontrollierte Mimikri der B-Zell-Aktivierung durch die latenten Gene des EBV hin. Diese B-Zell-Aktivierung könnte die Voraussetzung bzw. die Initiation einer B-Zell-Reifung zur *Gedächtnis*-B-Zelle darstellen.

Das aus bisheriger Sicht für die Proliferation bedeutendste zelluläre Zielgen von EBNA2 ist das Protoonkogen *c-myc*. Trotz zahlreicher Studien ist die Funktion des Transkriptionsfaktors c-Myc in der gesunden Zelle nicht genau bekannt. c-Myc reguliert bzw. beeinflusst verschiedenste biologische Prozesse wie Zellzyklus, Wachstum, Proliferation und Apoptose. Beim oben genannten Burkitt Lymphom (BL) handelt es sich um einen B-Zelltumor, bei dem die Überexpression von c-Myc -verursacht durch die Translokation des *c-myc* Gens- zur

unkontrollierten Vermehrung von B-Zellen führt. So konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von c-Myc *in vitro* in ursprünglich EBV-immortalisierten Zellen ausreicht, um die Immortalisierung auch ohne EBNA2 oder LMP1 zu erhalten (Polack et al., 1996). Die unter c-Myc proliferierenden Zellen (BL-ähnlich) unterscheiden sich jedoch bezüglich Morphologie und Wachstum von den unter EBNA2/EBV-Kontrolle wachsenden LCLs. Ein auffälliger Unterschied ist beispielsweise, dass BLs und BL-ähnliche Zellen in Einzelzellsuspension wachsen, während LCLs zu starker Klumpenbildung neigen, was auf starke Wechselwirkung zwischen Oberflächenmolekülen in LCLs schließen lässt.

Aufgrund dieser Daten liegt es nahe, dass der Hauptbeitrag der EBNA2-vermittelten Proliferation vom EBNA2-Zielgen MYC geleistet wird, während die übrigen EBNA2 Zielgene für die EBV-kontrollierte B-Zell-Aktivierung und/oder Differenzierung verantwortlich sind. So sollten in den MYC- und EBV-kontrollierten Proliferationsprogrammen übereinstimmend regulierte Zielgene mit Proliferation assoziiert sein, während unterschiedlich regulierte Gene vermutlich in B-Zellkommunikation involviert sind. Allerdings wäre auch ein unterschiedlicher Mechanismus der Immortalisierung für beide Systeme denkbar.

### **1.1.3 EBNA2, Struktur und Mechanismus der Transaktivierung**

**(Übersichtsartikel Bornkamm und Hammerschmidt, 2001 und Kieff et al., 1996)**

EBNA2 wird durch das BYRF-1-Gen (*BamHI Y right open reading frame 1*) im EBV-Genom kodiert (Müller-Lantzsch et al., 1985). Sequenzunterschiede in diesem Gen sind für die *in vitro* Immortalisierungseffizienz des EBV entscheidend und charakterisieren die zwei unterschiedlichen Virustypen 1 und 2. Das in den Zelllinien dieser Arbeit exprimierte EBNA2 stammt aus dem EBV Typ 1 (B95-8-Prototyp) und setzt sich aus 487 Aminosäuren (AS) mit zwei Wiederholungsstrukturen, einem Polyprolin Strang (AS59-100) und einem Arginin-Glycin-Repetitionsbereich (AS341-356) zusammen. Die zwischen AS100 und AS341 liegende *Divergenzregion* enthält die größten Sequenzunterschiede zwischen EBNA2 des Typs 1 und des Typs 2 (Jijoye- und AG876-Prototyp, 443 AS).

Detaillierte Mutationsanalysen zeigten, dass für die Immortalisierung folgende Domänen von entscheidender Bedeutung sind:

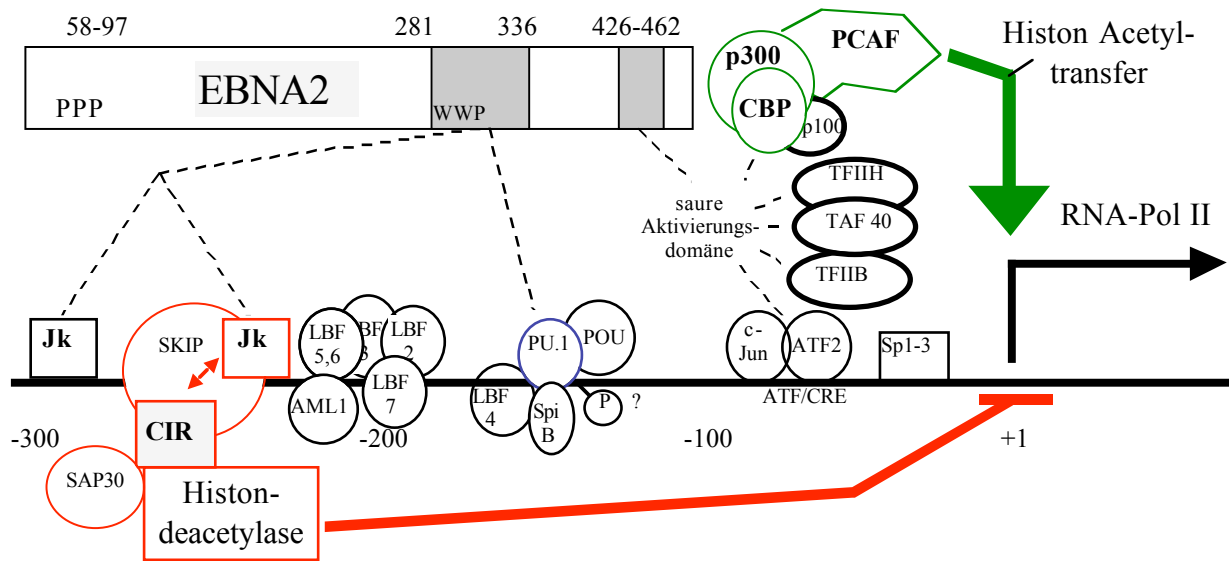
- Einige Proline des Polyprolinstranges und der benachbarten Region.
- Die Bindungsstelle für das Transkriptionsrepressor-Protein *RBP-j* (*recombination signal-binding Protein j*) und des Transkriptionsfaktors PU.1, AS 281-336,
- Die Transaktivierungsdomäne, AS 426-462

Zwei Kernlokalisierungsdomänen befinden sich in den Bereichen AS 248-382 und AS 478-485 (Ling et al., 1993).

Das im Zellkern lokalisierte EBNA2 bindet nicht direkt an DNA sondern an DNA-bindende Proteine wie RBP-j (Zimber-Strobl et al., 1993, 1994). In Abb. 3 ist dargestellt, wie man sich im Falle des Promotors des viralen LMP1 die Wirkung von EBNA2 als Transkriptionsfaktor vorstellen kann:

Der Transkriptionsrepressor RBP-j (auch CBF1=Cp-bindender Faktor genannt) bindet oder rekrutiert über *SKIP* (Zhou et al., 2000) den Korepressor *CIR* (=mit CBF1 interagierender Repressor; Hsieh et al., 1999). Dieser rekrutiert vermutlich über SAP30 Histon-Deacetylasen, die durch Histondeacetylierung zur Kondensation des Chromatins und somit zur Repression der Expression des entsprechenden Genes führen. Durch die Bindung von EBNA2 an RBP-j erfolgt vermutlich die Aufhebung der CIR- RBP-j-Wechselwirkung, was zu Inhibition der Histondeacetylierungsaktivität führt. Dabei muß jedoch erwähnt werden, dass speziell im LMP1-Promotor die Bedeutung von RBP-j für die Transaktivierung von LMP1 über EBNA2 in der Literatur unterschiedlich eingeschätzt wird. Laux und Mitarbeiter (Laux et al., 1994) halten die RBP-j-Bindungsstelle für essentiell, während dies von Sjöblom und Mitarbeitern (Sjöblom et al., 1995) nicht bestätigt wurde.

Gleichzeitig rekrutiert EBNA2 den CBP-p300-PCAF-Komplex (Wang et al., 2000). PCAF, eine Histonacetyltransferase, dekondensiert das Chromatin durch Acetylierung und macht das Gen dadurch für den RNA-PolIII-Komplex zugänglich. Die Bindung weiterer Transkriptionsfaktoren (TFIIH, TAF 40, TFIIB; Johannsen et al., 1995) führt schließlich zur Rekrutierung des RNA-PolIII-Transkriptionskomplexes. Ebenso tragen das Dimer c-Jun/ATF2 sowie Sp1 und Sp3 zur Transaktivierung bei (Sjöblom et al., 1998). Desweiteren wurden andere mit EBNA2 kooperierende Proteine gefunden (AML1, LBF2-7, Johannsen et al., 1995; POU, Sjöblom et al., 1995; PU.1, Laux et al., 1994), die auch in der LMP1-Promotorregion binden.



**Abb. 3:** Schematische Darstellung der EBNA2 vermittelten Transaktivierung des viralen LMP1-Gens (erweitert nach Kieff et al., 1996). Durch die Bindung (gestrichelte Linien) von EBNA2 (Zahlen bezeichnen Positionen der Aminosäuren) an RBP-jk (Jk) erfolgt vermutlich die Aufhebung der CIR- RBP-jk-Wechselwirkung, was zu Inhibition der Histondeacetylationsaktivität führt. Gleichzeitig rekrutiert EBNA2 den CBP-p300-PCAF-Komplex. PCAF dekondensiert das Chromatin durch Acetylierung und macht das Gen dadurch für den RNA-PolII-Komplex zugänglich. Die Bindung weiterer Transkriptionsfaktoren (TFIIH, TAF 40, TFIIB, p100) führt schließlich zur Rekrutierung des RNA-PolII-Transkriptionkomplexes. Weitere EBNA2 kooperierende Proteine (AML1, LBF2-7, POU, PU.1, c-Jun/ATF2, Sp1-3) binden entsprechend der Bezeichnungen (-300 bis +1) in der LMP1-Promotorregion.

Die Funktionalität von EBNA2 als Transkriptionsfaktor ist nur in einigen Zelltypen gegeben, wie z.B. B-Zellen. Inwieweit dies von der Expression oder Modifikation der genannten interagierenden Proteine abhängt, ist noch ungeklärt. Von PU.1 ist beispielsweise bekannt, dass es als Transkriptionsaktivator der Immunglobulin-Leichte-Ketten-Gene ausschließlich in B-Zellen und Makrophagen aktiv ist, was man sich mit der spezifischen Expression und Phosphorylierung von PU.1 erklärt (Pongubala et al., 1993). Desweiteren wird EBNA2 selbst an Threonin- oder Serinresten phosphoryliert und anderweitig posttranslational modifiziert, was eine aparente Migrationsänderung des Proteins von 10 kD gegenüber dem *in vitro* translatierten Protein ausmacht. Wie aus Ultrazentrifugations-Fraktionierungen von Kernextrakten hervorging, liegt EBNA2 zum Teil als tetramerer Komplex oder sogar als größerer Komplex vor (zusammengefaßt in Kieff et. al, 1996).

Alle viralen EBNA2-responsiven Promotoren haben RBP-jk-Bindungsstellen (GTGGGAA). RBP-jk ist das humane Homolog des "suppressor of hairless"(SuH) aus *Drosophila* und interagiert mit dem intrazellulären Teil des zellulären Membran-Rezeptors Notch (Notch-IC) bzw. vermittelt seine Funktion (Tamura et al., 1995). Zunächst ging man davon aus, dass die Wirkung von EBNA2 ebenfalls allgemein von RBP-jk abhängt, so dass man EBNA2 auch als

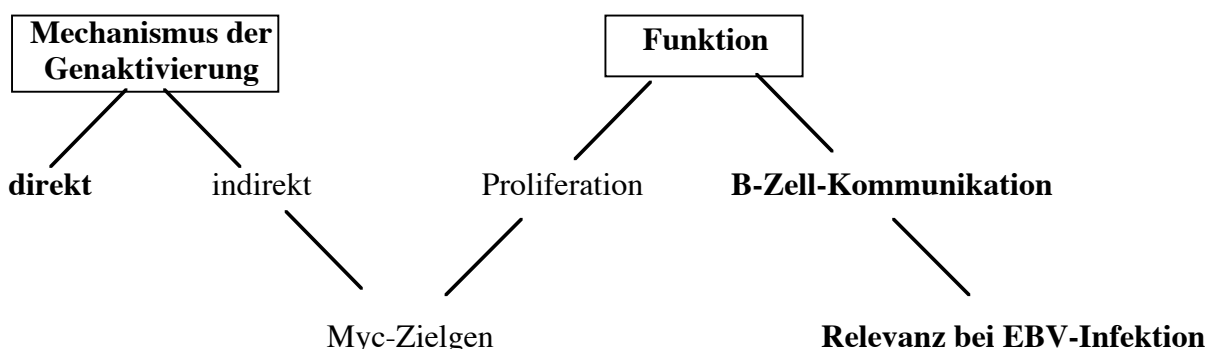
Homolog von Notch-IC bezeichnete. Notch ist ein wichtiger Regulator der Zelldifferenzierung. U. a. konnte gezeigt werden, dass eine konstitutiv aktive intrazelluläre Domäne von Notch1 (Maus) über RBP-j $\square$  die Differenzierung myeloischer Zellen reguliert (Schroeder und Just, 2000) und im lymphatischen System die T-Zell-Entwicklung unterstützt, die B-Zell-Entwicklung jedoch blockiert (Pui et al., 1999). So haben Notch und EBNA2 zum Teil übereinstimmende Zielgene (CD21 wird induziert, IgM reprimiert, Strobl et al., 2000), so dass das eine nur teilweise durch das andere substituiert werden kann (zusammengefaßt in Zimmer-Strobl und Strobl, 2001). Es gibt jedoch auch zelluläre direkte Zielgene von EBNA2, wie z.B. *c-myc*, deren Promotoren keinerlei RBP-j $\square$ -Bindungsstellen aufweisen und auch keine Notch-Zielgene sind.

## 1.2 Fragestellung und Techniken

Wie schon oben angedeutet, wirft das Modellsystem der EBV-Infektion von B-Zellen zwei interessante Fragestellungen auf:

1. Wie erreicht das Virus die Immortalisierung einer ruhenden B-Zelle?
2. Wie beeinflusst das Virus die B-Zellaktivierung und -Kommunikation?

In der ersten Frage wird die EBV-vermittelte Immortalisierung von B-Zellen als *in vitro* Modellsystem für die EBV-vermittelte Lymphomentstehung betrachtet, während man sich bei der zweiten Frage auf die *in vivo* Kommunikation der EBV-infizierten B-Zellen mit dem Immunsystem konzentriert. Um obige Fragen zu beantworten, wurde ein systematischer und umfassender Screen nach EBNA2-Zielproteinen und -genen durchgeführt. Diese wurden wie im folgenden Schema zusammengefaßt durch Zuhilfenahme weiter unten beschriebener Zellsysteme und Techniken klassifiziert.



**Schema 1:** Klassifizierung der EBNA2-Zielgene: EBNA2-Zielgene, die auch durch MYC allein reguliert werden, gehören zu den indirekten EBNA2-Zielgenen. Sie werden nach Abschnitt 1.1.2 als proliferationsassoziiert und wichtig für die B-Zellimmortalisierung erachtet. EBNA2-Zielgene, die in Zelllinien direkt durch EBNA2 und/oder unabhängig von MYC reguliert werden und sich auch in infizierten primären B-Zellen bestätigen lassen (fett gedruckt), sind nicht proliferationsassoziiert und sehr wahrscheinlich *in vivo* für die B-Zell-Kommunikation verantwortlich.

Wie schon oben angeklungen wurden zur Beantwortung der ersten Frage die durch MYC und EBNA2 in gleicher Weise regulierten Zielgene herangezogen, während zur Beantwortung der zweiten Frage direkte oder unterschiedlich regulierte Zielgene ermittelt wurden.

Mit Hilfe der nukleären Run-On-Technologie (Analyse von RNA-Primärtranskripten) wurden auf Transkriptionsebene direkte Zielgene von EBNA2 identifiziert und durch mRNA-Analysemethoden (RT-PCR oder Northernblot) bestätigt.

In der Vergangenheit wurden bereits mit der PCR-basierten cDNA-Substraktion (PCR-Select) EBNA2 Zielgene auf mRNA-Ebene identifiziert (Kaiser et al., 1999). Ebenso wurden mit Hilfe der DNA-Chip Technologie mRNA-Expressionsprofile von B-Zellen mit verschiedenen Stimuli erstellt (Übersichtsartikel Shaffer et al., 2001). Diese Ansätze haben den Vorteil, dass sehr große Mengen von Zielgenen schnell abgefragt werden können. Es wird jedoch nichts über die tatsächliche Änderung der Menge bzw. Funktionalität des Proteins ausgesagt, für das das Zielgen kodiert. Denn zwischen der mRNA-Expression eines Genes und der durch das Gen vermittelten Wirkung liegen mehrere Kontrollinstanzen. Sowohl die Halbwertszeit als auch die Translationseffizienz der mRNA hängen stark von der Struktur der mRNA ab und der Prozeß der Translation sowie die mRNA-Struktur kann durch RNA-bindende Proteine kontrolliert oder beeinflusst werden. Ebenso sind Proteine an der posttranslationalen kovalenten Modifikation (Kinasen, Phosphatasen, Acetylasen, Methylasen etc.) und auch an der Degradation von Proteinen (z.B. Proteasom) beteiligt. Diese Kontrolle der Proteinexpression durch Proteine bleibt in einem mRNA-Expressionsprofil einer Zelle unsichtbar. Untersuchungen in Hefe (Gygi et al, 1999) aber auch in tierischen Zellen zeigten (Lewis et al., 2000), dass die Änderung der mRNA-Menge häufig nicht mit der Änderung der Menge des zugehörigen Proteins korreliert. Gavioli et al. stellten fest (Gavioli et al., 2001), dass in Burkitt Lymphomen (BL) die Ubiquitin-Proteasom-abhängige Proteindegradation gegenüber LCLs (u.a. EREB2-5 oder P493-6 in +EBNA2-Situation, Beschreibung siehe unten) verändert ist. Diese Tatsache ließ es ratsam erscheinen, beim Vergleich von BL und LCL auch einen Proteom-Ansatz mit in die Untersuchungen einzubeziehen. Die einzige etablierte Methode, in relativ großem Ansatz ProteinExpressionsprofile quantitativ zu vergleichen, stellte zu Beginn der Doktorarbeit die zweidimensionale Gelelektrophorese (2D-PAGE) dar. Hier werden Proteine in der ersten Dimension nach ihrem isoelektrischen Punkt, in der 2. Dimension nach ihrer Größe aufgetrennt. Da jede bisher bekannte posttranslationale Modifikation (Phosphorylierung, Acetylierung, Methylierung, Glycosylierung etc.) entweder die Migrationsgeschwindigkeit oder die Ladung bzw. den isoelektrischen Punkt eines Proteins verändert, ist es prinzipiell möglich, jede Modifikation in einem 2D-Gel zu detektieren. Die

2D-Gelelektrophorese (2D-PAGE) erreicht jedoch nur bei sehr großem Aufwand (Verwendung sehr enger pH-Gradienten und Anreicherung der zu untersuchenden Proteine) die gleiche Sensitivität wie die Microarraytechnology. Außerdem ist sie bisher für die Analyse von Transmembranproteinen ungeeignet, da diese sehr stark in der ersten Dimension präzipitieren. Daher wurde zur Komplementierung des 2D-PAGE-Ansatzes und der Run-On-Technologie ebenfalls die **cDNA-Microarray-Chip-Technologie** benutzt.

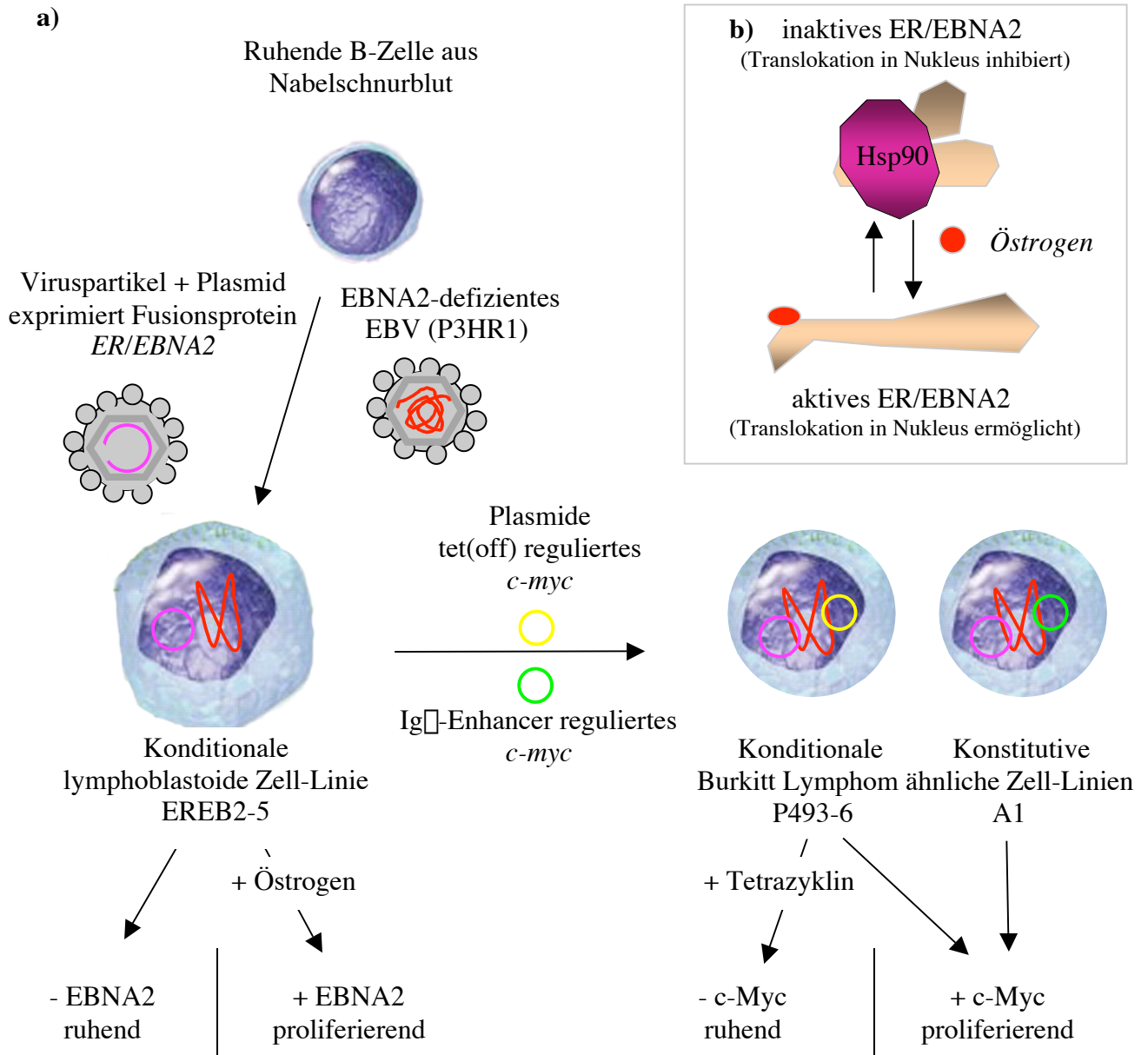
### **1.3 Die konditionale lymphoblastoide Zelllinie EREB2-5 und die konditionale Burkitt Lymphom Modell Zelllinie P493-6**

Um beide genannten Fragestellungen zu bearbeiten, wurden im wesentlichen zwei konditionale B-Zell-Systeme, die konditionale lymphoblastoide Zelllinie EREB2-5 (Kempkes et al., 1995) und die konditionale Burkitt Lymphom-ähnliche Zelllinie P493-6 (Pajic et al., 2000), benutzt. Die EREB2-5 Zelllinie wurde durch Infektion von B-Zellen aus Nabelschnurblut mit EBV-Partikeln erhalten (Abb. 1.4a). Ein Virus-Partikel enthielt das Virusgenom des P3HR1-Virus, von dem auf Grund einer Deletion kein funktionelles EBNA2 exprimiert werden kann. Das zweite Virus enthielt einen sogenannten *Mini-EBV-Vektor*, von dem aus unter der Kontrolle des Cp und Wp Promotors das Fusionsprotein *ER/EBNA2* (=Estrogenreceptor-EBNA2) exprimiert wird. Beim ER/EBNA2-Protein wurde N-terminal die Hormonbindedomäne des Östrogenrezeptors an EBNA2 fusioniert. Dies hat zur Folge, dass EBNA2 nur in Anwesenheit von Östrogen funktionell ist. In Abwesenheit von Östrogen bindet HSP90 an den Rezeptor, so dass die korrekte Faltung des Proteins (Briegel et al., 1996) und meistens auch die Translokation in den Zellkern (Francis et al., 1995) unterbunden wird (Abb. 1.4b). Wie durch Kempkes et al., (1995) gezeigt werden konnte, ist die Transaktivierung des viralen LMP2a-Promotors durch ER/EBNA2 mit der durch EBNA2(wt) vergleichbar. Die erhaltene Zelllinie EREB2-5 stellt eine konditionale B-lymphoblastoide Zelllinie (LCL) dar, die den oben beschriebenen B-Lymphoblasten sehr ähnlich sein sollte. Sie proliferiert nur in Gegenwart von Östrogen, und induziert nach Zugabe von Östrogen die Expression der EBV-Zielgene CD21 und CD23.

In die EREB2-5 Zelllinie wurde dann ein Vektor transfiziert, von dem aus unter der Kontrolle des Tet-off-Systems (Gossen und Bujard, 1992) c-Myc exprimiert wird (Abb. 1.4a). Die erhaltene Zelllinie P493-6 überexprimiert in Abwesenheit von Tetrazyklin c-Myc und ist in der Lage, ohne funktionelles EBNA2 zu proliferieren. P493-6 stellt somit ein konditionales Modellsystem für ein Burkitt Lymphom dar. Welchem Zelltypus diese beiden Zelllinien im nichtinduzierten Zustand entsprechen, ist noch nicht eingehend untersucht worden. Der



Theorie nach sollten beide Zell-Linien einer ruhenden B-Zelle gleichen. Dabei ist anzumerken, dass P493-6-Zellen im nichtinduzierten Zustand länger überleben als EREB2-5. Ob es sich bei diesem Phänomen um epigenetische Effekte oder Mutationen während des Selektionsprozesses von P493-6 handelt, oder ob eine geringe Basalexpression von Myc unter der Kontrolle des nicht ganz inaktiven tet-Promotors die Ursache dafür ist, ist noch ungeklärt.



**Abb. 4:** **a)** In B-Zellen aus Nabelschnurblut wurden über Koinfektion mit EBV-Partikeln ein EBNA2-defizientes EBV(P3H1) und ein Plasmid gebracht, das unter Cp-promotor-Kontrolle das Fusionsprotein ER/EBNA2 exprimiert. Die erhaltene Zelllinie ERE2-5 stellt eine Östrogen-abhängige konditionale LCL dar. ERE2-5 wurde mit einem Vektor transfiziert, der entweder unter Tetrazyklinkontrolle (tet-off) oder konstitutiv unter Kontrolle der Ig-Enhancerelemente MYC exprimiert. Die erhaltene Zelllinien P493-6 bzw. A1 überexprimieren in Abwesenheit von Tetrazyklin bzw. konstitutiv *c-Myc* und ähneln daher Burkitt Lymphomen. **b)** Das ER/EBNA2-Protein besteht aus EBNA2, das N-terminal mit der Hormonbindedomäne des Östrogenrezeptors fusioniert ist. In Abwesenheit von Östrogen bindet HSP90 an den Rezeptor, so dass die korrekte Faltung des Proteins und meistens auch die Translokation in den Zellkern unterbunden wird. In Gegenwart von Östrogen ist EBNA2 voll aktiv.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien, Enzyme, Geräte und Sonstiges

#### Amersham Pharmacia Biotech

ECL-Western Blotting Reagenzien, Filme, Hybond-C-Zellulosemembran,  $^{32}\text{P}$ -CTP,  $^{32}\text{P}$ -dCTP (3000 Ci/mmol),  $\alpha$ Bind® Plus Sepharose

#### Becton Dickinson GmbH, Heidelberg

Plastik-Reagenzgefäße 15 und 50 ml, Zellkulturflaschen, 6-Loch-Platten

#### Biochrom KG, Berlin

Newborn Calf Serum (Seromed®)

#### Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA

Bacto-Agar, Hefeextrakt, Trypton

#### Eastman Kodak Company, Rochester, N.Y., USA

Röntgenfilme XAR5, BIOMAX MS

#### Eppendorf Gerätebau, Hamburg

Tischzentrifuge 5415, Reaktionsgefäße verschiedener Größe, BioPhotometer

#### Genomed, Bad Oeynhausen

Maxi-Präparations-Kit für Plasmidpräparationen (Jetstar)

#### Gibco BRL, Life Technologies, Eggenstein

Amphotericin B (Fungizone), Fötale Kälberserum, HEPES, 1 Kb DNA-Leiter, L-Glutamin, Natrium-Pyruvat, Optimem I, Penicillin, Streptomycin, Trypsin-EDTA (1x), Trypton, Zellkulturmedium RPMI 1640 und DMEM

#### Hofer Scientific Instruments, San Francisco, USA

Mighty Small II Gel Elektrophorese Einheit

#### Nunc GmbH, Wiesbaden

Cryotubes 3 ml, Impfösen, Plastikpetrischalen, Zellkulturflaschen, Zellkulturschalen

#### PE Biosystems, Weiterstadt

PCR-Reaktionsgefäße

#### Roth, Karlsruhe

Natriumdodecylsulfat, Phenol, Roti-Block, Acrylamid

#### Stratagene, Heidelberg

Stratalinker

#### Tropix, Massachusetts, USA

Galacton $\square$ -Plus, Emerald $\square$ -Lösung

### Zeiss, Oberkochen

Axiovert 200 Fluoreszenzmikroskop mit hochauflösender Digital Videokamera (Hamamatsu)

Alle hier nicht aufgeführten Geräte oder Chemikalien werden im Methodenteil erwähnt oder wurden von Merck (Darmstadt) oder Sigma (München) erhalten.

## **2.2 Proteinbiochemische Methoden**

### **2.2.1 Detektion und Identifizierung differentiell exprimierter Proteine**

#### **2.2.1.1 2D-Gelelektrophorese (2D-PAGE)**

Zur qualitativen Trennung von geladenen Makromolekülen nach Masse und Ladung bedient man sich verschiedener Arten der Gel-Elektrophorese. Bei einer Gelelektrophorese bringt man die zu untersuchenden Moleküle in ein Polymer-Gel, über dem ein elektrisches Potential angelegt ist. Die Moleküle wandern dann gemäß ihrer Ladung zum Plus- oder Minuspol des elektrischen Feldes. Ihre Geschwindigkeit hängt dabei von ihrer Ladung und Größe (Stokescher Radius) ab, da lange Moleküle die engmaschig quervernetzte Gelmatrix nur langsamer durchqueren können als kurze.

In der 2D-Gelelektrophorese trennt man Proteine nacheinander nach jeweils nur einem Parameter, indem man zwei Methoden der Proteintrennung kombiniert:

1. Mit der **isoelektrischen Fokussierung** trennt man die Proteine nach ihrer Zusammensetzung hinsichtlich der geladenen (sauren und basischen) Seitenketten.
2. Mit der sich anschließenden **SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)** trennt man Proteine nach ihrer Größe.

Durch die Kombination erhält man ein Proteingel mit sehr hoher Auflösung, in dem Proteine als einzelne *Spots* sichtbar werden.

#### **Isoelektrische Fokussierung**

Hierbei läßt man die Proteine in einem Gel mit pH-Gradient wandern. In der vorliegenden Arbeit wurden dazu ausschließlich Gelstreifen verwendet, in denen der pH-Gradient im Polyacrylamidgel einpolymerisiert ist. Das saure Ende des Gels ist dabei zum Pluspol, das basische Ende zum Minuspol orientiert. Das Proteinlysate steht dann entweder an einer Stelle des vorgequollenen Gelstreifens (Plus-oder Minuspol oder beides) in Kontakt mit dem Gel, so dass die Proteine nach Anlegen einer Spannung in das Gel einwandern, oder der

trockene Gelstreifen wird direkt im Proteinlysate aufgequollen, so dass die Proteine gleichmäßig verteilt sind. Nach Anlegen einer Spannung wandern die Proteine entsprechend ihrer Netto-Ladung (es wird vorwiegend nichtionisches Detergenz verwendet) zum Plus- oder zum Minuspol entlang dem pH-Gradienten im Gel. Bei einem für jedes einzelne Protein spezifischen pH-Wert, dem sogenannten **Isoelektrischen Punkt (pI)**, wandert das Protein nicht mehr weiter, weil dort die Nettoladung des Proteins null ist. Es sind also entweder alle sauren bzw. basischen Seitenketten protoniert bzw. deprotoniert oder die positiven und negativen Ladungen eines Zwitterions heben sich gerade auf.

Der pI eines Proteins hängt von seiner Zusammensetzung bezüglich seiner als Base oder Säure wirksamen Aminosäureseitenketten ab. Dadurch wird es möglich, sehr sensitiv posttranslationale Modifikationen zu detektieren, die sich stark auf die Acidität von Aminosäureseitenketten auswirken. Dazu gehören die Phosphorylierung der Aminosäureseitenketten von Ser, Thr, Tyr, die Acetylierung oder Methylierung von Lys und für sezernierte oder membranständige Proteine die unterschiedliche Glycosylierung. Während die Phosphorylierung und Acetylierung den pI erniedrigt, wird er durch die Methylierung von Lys erhöht.

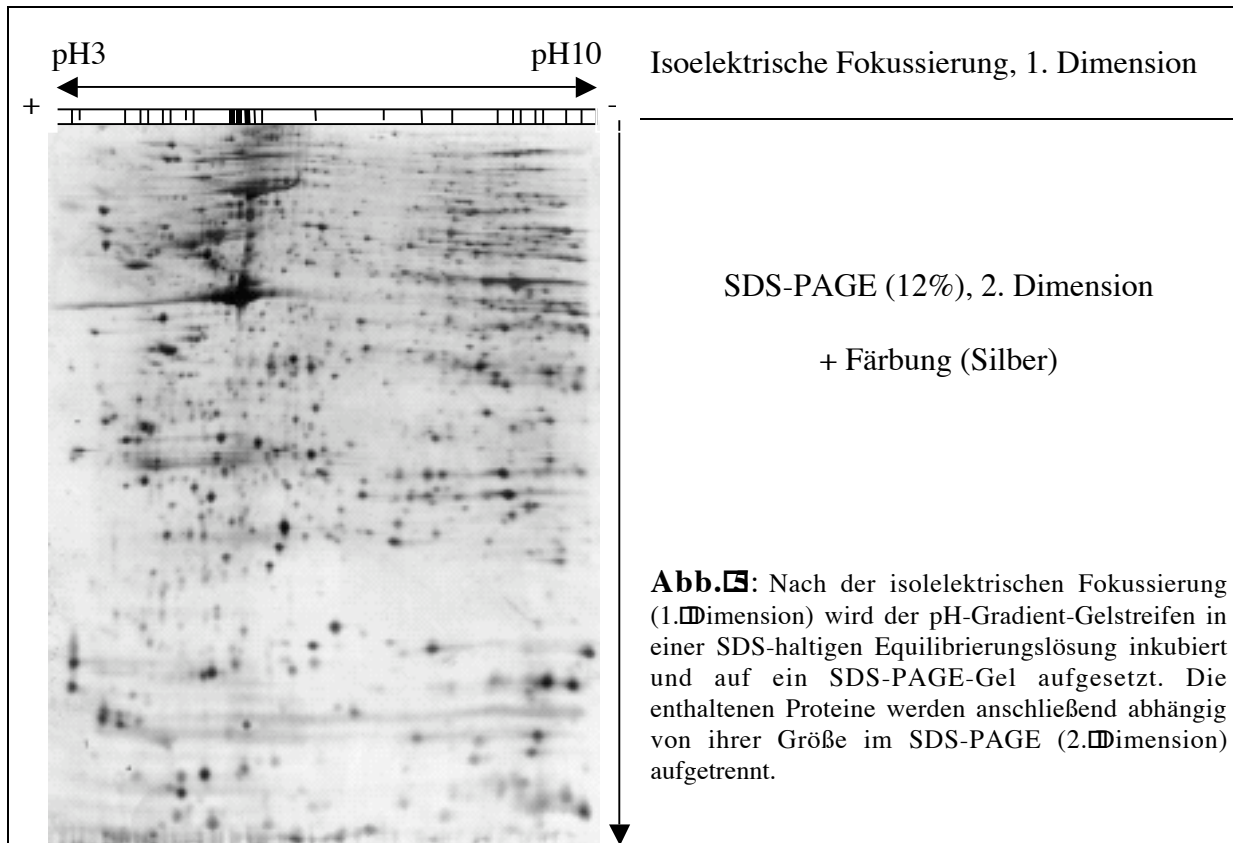
Das Auflösungsvermögen der IEF wird durch folgende Formel nach Svensson-Rilbe (Svensson, 1966; Rilbe, 1976) beschrieben:

$$\Delta pI = 3 \sqrt{\frac{D[d(pH)/dx]}{E[du/d(pH)]}}$$

$\Delta pI$  = Auflösungsvermögen,  
 D = Diffusionskoeffizient,  
 E = el. Feldstärke,  
 d(pH)/dx = pH-Gradient,  
 du/d(pH) = Mobilitätssteigerung  
 des Proteins am pI

$\Delta pI$  ist die minimale pI - Differenz, die nötig ist, um zwei Proteine voneinander zu unterscheiden. Heutzutage versucht man, die Auflösung durch Erhöhung der Feldstärke und durch den Einsatz von Gelstreifen mit einem niedrigen pH-Gradienten zu verbessern.

Nach der isoelektrischen Fokussierung (1. Dimension) wird der pH-Gradient-Gelstreifen in einer SDS-haltigen Equilibrierungslösung inkubiert und auf ein SDS-PAGE-Gel aufgesetzt. Die enthaltenen Proteine werden anschließend abhängig von ihrer Größe im SDS-PAGE (2. Dimension) aufgetrennt (Abb. 5).



### Durchführung

Ca.  $10^7$  Zellen wurden in 4 ml Cystein- und Methionin-freiem RPMI-Medium (Gibco) mit 10% dialysiertem FCS (Gibco) und gegebenenfalls stimulierenden Agenzien resuspendiert. Zwei Stunden vor der Zellernte wurden 0,125 mCi/ml Trans<sup>35</sup>S (>1000Ci/mmol, ICN), das einen Mix von radioaktivem <sup>35</sup>S-Cys und <sup>35</sup>S-Met enthält, hinzugefügt. Die Zellen wurden anschließend ein- bis zweimal mit 8 ml eiskaltem PBS (137 mM Natriumchlorid; 2,7 mM Kaliumchlorid; 4,3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1,4 mM KH<sub>2</sub>PO) einmal mit 1 ml halbkonzentriertem PBS gewaschen, dann bei Raumtemperatur in 400  $\mu$ l Lysepuffer (9 M Harnstoff (Amersham), 1% DTE (Merck), 4% CHAPS (SIGMA), 2,5 mM EDTA und 2,5 mM EGTA) lysiert. Die DNA des viskosen Lysates wurde in QIAshredder-Zentrifugations-Säulen (Qiagen) zerkleinert und/oder gegebenenfalls 50 min bei 50000rpm (Ti75-Rotor, *Sorvall*, 20°C) pelletiert. Die Isoelektrische Fokussierung erfolgte aus 370 ml Lysat, das 0,025% Bromphenolblau und 2 ml IPG buffer [pH 3–10] (Amersham) enthielt und wurde in einer IPGphor (Amersham) unter Einsatz von IEF-Streifen pH3–10 NL (Amersham) mit folgendem Spannungsprofil durchgeführt: 11 h 30V, 10 min bis 200V (Gradient), 30 min 200V, 30 min bis 500V (Gradient), 1h 500V, 2:30 h bis 2000V (Gradient), 1 h 2000V, 2:30 h bis 8000V (Gradient), 8000V bis 9000Vh erreicht waren. Die Stromstärke wurde auf 50 $\mu$ A pro Streifen begrenzt. Für Preparative Gele wurde das Lysat von ca.  $8 \times 10^7$  Zellen zu 2 x 400  $\mu$ l anodisch und

kathodisch in nach Westernmeyer et al. (1997) hergestellten mit Lysepuffer vorgequollene IEF-Streifen [pH4,5-6,5] eingebracht und in einer Multiphor (Amersham) aufgetrennt. Dabei wurden kathodisches Ende und anodisches Ende ca. 1cm breit ausgeschnitten. Für das SDS-PAGE wurden die Enden nach der IEF abgetrennt. Für die Multiphor wurde folgendes Spannungsprofil benutzt: in 10 sec auf 300V (Gradient), 3h 300V, 3h bis 600V (Gradient), 3h 600V, 7h bis 2000V (Gradient), 3h 2000V, 7h bis 3500V (Gradient), 3500V bis mindestens 170kVh erreicht waren.

Für die 2. Dimension wurden die Streifen in Equilibrierungspuffer (6 M Harnstoff, 2% SDS, 50mM Tris [pH 6.8], 29% Glycerin) inkubiert, zuerst 15 min mit zusätzlich 2% [=130 mM] DTE (reduzierend) und dann 5-15 min mit 2,5 % [=135 mM] Iodacetamid (Merck). Die so behandelten Streifen wurden auf ein SDS-Polyacrylamidgel (20x22x0,75mm; 12%) geladen, mit 0.5% Agarose (Gibco) abgedichtet und bei 15°C Wasserkühlung (BioRad Protean Ixi cell) 7h bei ca. 20 mA pro Gel laufen gelassen (*Laufpuffer*: 192 mM Glycin, 25 mM Tris, 0,1% SDS) und dann entweder Coomassie Blue oder mit Silber gefärbt (nach Blum et al., 1987):

### Coomassie-Färbung

Schritt	Lösung	Dauer (min)
1	Fixierer (50% Methanol, 12% Essigsäure)	15
2	0,4% Coomassie in Fixierer	15
3	Fixierer	ca. 30
4	Fixierer	ca. 30
5	Wasser	5

**Silber-Färbung** (nach Blum et al., 1987):

Schritt	Lösung	Dauer (min)
1	Fixierer (50% Methanol, 12% Essigsäure, 0,0185% Formaldehyd)	30
2	Fixierer	30
3	50% Ethanol	20
4	50% Ethanol	20
5	50% Ethanol	20
6	0,2 mg/ml Natriumthiosulfat	2
7	Wasser	1
8	Wasser	1
9	1 g/l Silbernitrat, 0,02775% Formaldehyd	15
10	Wasser	1
11	60 g/l Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , 0,0185% Formaldehyd, 5 µg/ml Natriumthiosulfat	1-20
12	Wasser	1
13	Fixierer	10
14	20% Ethanol, 2% Glycerin	>30

Silber-gefärbte Gele wurden in Cellophanfolie bei 70°C getrocknet, preparative Coomassie-Blue-gefärbte Gele wurden feucht in Saranfolie (Dow Chemical Company) aufbewahrt.

### 2.2.1.2 2D-Gel-Analyse und -Quantifizierung

Radioaktiv markierte Gele wurden 12-96h exponiert, die erhaltenen Röntgenfilme (X-OMAT, KODAK) mit 150µpi gescannt und die digitalen Bilder mit PDQUEST-Software (Bio-Rad) hinsichtlich differentiell regulierter Proteinspots analysiert.

Nach Substraktion des Hintergrundes („background subtraction“) wurde die Spot-Intensität als Millionstel der Summe dargestellt, die dem Integral aller detektierten Pixel-Intensitäten über der Fläche eines Spots geteilt durch die Summe der Pixelintensitäten aller erkannten Spots (*valid spots*) im Gel entspricht. Danach wurden Durchschnittsintensitäten, relative Werte und die Standardabweichung berechnet. Um die Daten in einem Diagramm darstellbar zu machen, wurde jeweils der höhere Vergleichsdurchschnittswert auf 1 normiert.

#### Beispiel:

Versuch 2, Gele MS101, MS102, MS103, MS104, MS105, MS106; betrachtet wird Spot 14a mit der Spotnummer SSP1116: Hier wurden je dreimal entweder EREB2-5-Zellen 3 Tage ohne Östrogen gehalten oder nach 3 Tagen ohne Östrogen 8h mit Östrogen inkubiert:

SSP	-EBNA2 a	-EBNA2 b	-EBNA2 c	8h+EBNA2 a	8h+EBNA2 b	8h+EBNA2 c	
	quantity/ppm	quantity/ppm	quantity/ppm	quantity/ppm	quantity/ppm	quantity/ppm	
1116	678,83	587,04	642,34	3751,99	5884,19	4972,28	
	<b>636</b>			<b>4869</b>			<b>Durchschnitt</b>
1116	0,14	0,12	0,13	0,77	1,21	1,02	normiert auf 1
	<b>0,13</b>			<b>1</b>			<b>normiert auf 1</b>
	<b>0,01</b>			<b>0,22</b>			<b>Standardabweichung</b>

In der finalen Tabelle wurden die normierten Durchschnittswerte aller Experimente berücksichtigt und eine Standardabweichung errechnet. Als EBNA2-Zielproteine wurden nur solche akzeptiert, bei denen sich die von den Fehlerbalken eingeschlossenen Bereiche nicht berühren. Im Vergleich EREB2-5 –EBNA2 zu 8h +EBNA2 wurden 4 Experimente mit 6 biologisch unterschiedlichen (Lysat von Zellen aus 6 unterschiedlichen Wells) Probengelen berücksichtigt, im Vergleich EREB2-5 –EBNA2 versus 24h IL4, 24h +EBNA2 wurden 2 Experimente mit 9 (3+3+3) biologisch unterschiedlichen Probengelen ausgewertet und im Vergleich P493-6 –Myc versus 8h +Myc wurden 2 Experimente mit je 6 biologisch unterschiedlichen Probengelen berücksichtigt (Gele in der beiliegenden CD).

### 2.2.1.3 Proteinidentifikation

#### Matrix-assistierte Laserdesorptions/Ionisations-Massenspektrometrie (MALDI-MS)

Die im 2D-Gel enthaltenen Proteine werden zur Identifizierung ausgeschnitten und mit einer Sequenz-spezifischen Protease (z.B. Trypsin, spaltet hinter Lys und Arg) verdaut. Die aus der Spaltung hervorgehenden Peptide werden in eine organische Farbstoff-Matrix eingebettet auf eine sogenannte *Targetplatte* aufgebracht. Im *MALDI-ToF*-Massenspektrometer werden die Kristalle aus Farbstoff und Peptid durch einen Laser vaporisiert, ohne zerstört zu werden. Die durch die Umgebungsbedingungen in der Gasphase einfach geladenen Peptide werden nun in einem starken elektrischen Feld beschleunigt, so dass idealerweise jedes Peptid die gleiche kinetische Energie erhält. Die trägeren schweren Peptide erfahren dabei gemäß der Gleichung

$$v = \sqrt{\frac{2 \cdot z \cdot e \cdot U}{m}}$$

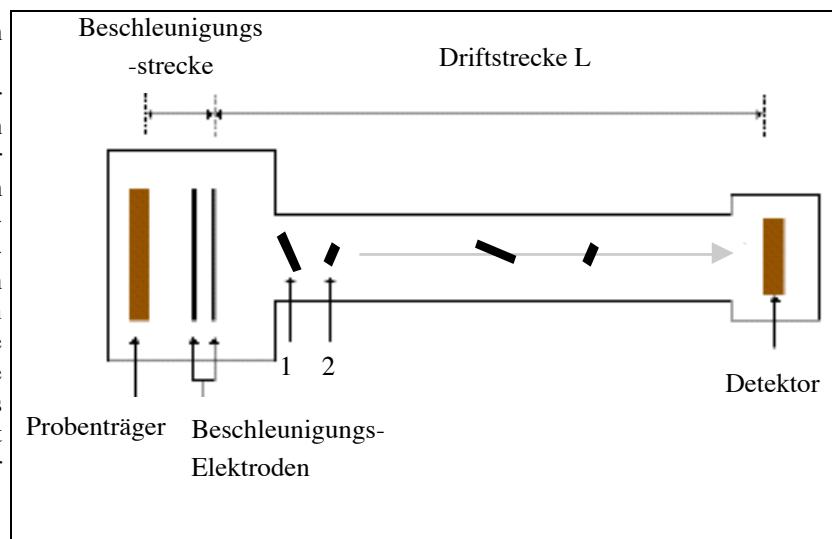
$v$  = Geschwindigkeit des Ions nach der Beschleunigungsstrecke  
 $z$  = Ladungszahl  
 $e$  = Elementarladung  
 $U$  = Beschleunigungsspannung  
 $m$  = Masse des Ions

eine geringere Beschleunigung als die leichteren Peptide. Im weiteren Verlauf der Messung detektiert das Gerät die Flugzeit der Peptide zum Detektor (ToF = *time of flight*). Mit der genannten Gleichung unter Einbeziehung der bekannten Driftstrecke  $L$  (Abb. 6) wird daraus die Peptidmasse/Ladung berechnet:

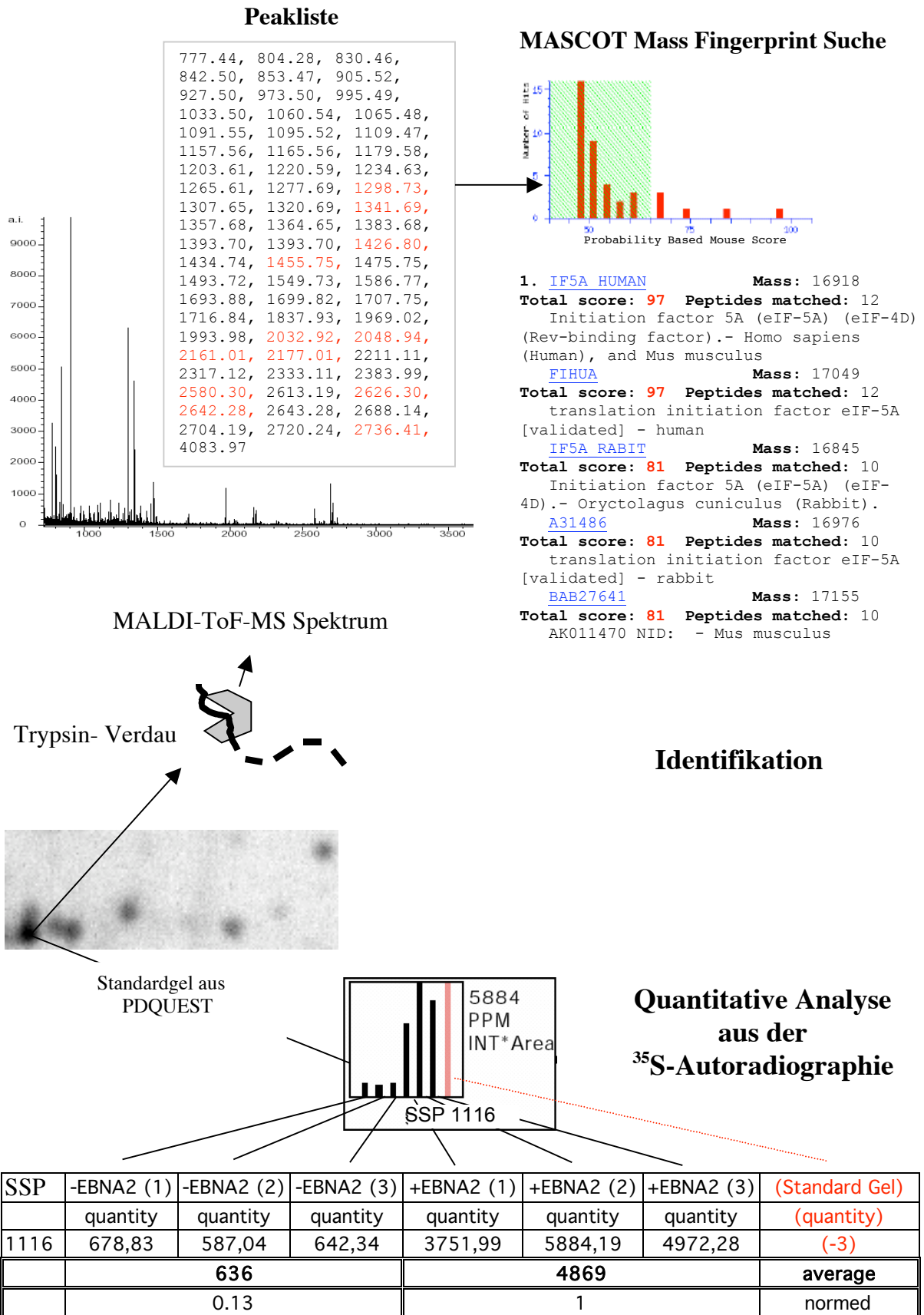
$$\frac{m}{z} = \frac{2 \cdot e \cdot U}{L^2} \cdot t^2$$

$t$  = Flugzeit zum Detektor  
 $e$  = Elementarladung  
 $U$  = Beschleunigungsspannung  
 $m$  = Masse des Ions  
 $z$  = Ladungszahl des Peptid-Ions (gewöhnlich = 1)

**Abb. 6:** Prinzip eines linearen Flugzeitmassenspektrometers. Zwei positiv geladene Ionen der Ladung  $q=ze$  und mit den Massen  $m_1$  und  $m_2$  werden nach ihrer Emission durch ein zwischen dem Probenträger und den Beschleunigungselektroden angelegtes elektrisches Feld beschleunigt. Nach Durchqueren des Feldes erlangen sie die gleiche kinetische Energie und durchlaufen anschließend eine feldfreie Driftstrecke, wobei das Quadrat ihrer Geschwindigkeit umgekehrt proportional zu ihrer jeweiligen Masse ist.







**Abb. 1:** Schematische Übersicht der Zielproteinidentifikation. Weitere Erläuterungen befinden sich im Text.

#### 2.2.1.4 „Peptide mass fingerprinting“ und Proteinidentifikation

Die Identifikation des Proteins erfolgt durch Abgleich der gemessenen Peptidmassen mit denen für das jeweilige Enzym theoretisch berechneten Peptidmassen für alle in einer Datenbank enthaltenen Proteinsequenzen. Voraussetzung dafür ist, dass das Protein sequenziert ist und in der Suchdatenbank eingetragen ist. Dem Wissenschaftler stehen dazu eine Vielzahl frei zugänglicher Proteinsequenzdatenbanken zur Verfügung.

#### Durchführung

##### Trypsin-Verdau

Die Proteinspots wurden aus einem fixierten Coomassie Blue gefärbten Gel ausgeschnitten, in silanisierte 500  $\mu$ l Eppendorfgefäße überführt und mit 100  $\mu$ l Wasser (Millipore) einmal 10min gewaschen. Nach kurzer Zentrifugation wurde das Wasser anschließend mit einer Pipette entfernt. Die Gelstücke wurden zweimal im Wechsel ca. 5-10min mit 50% Acetonitril, 50mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (frisch angesetzt) gewaschen und in 200 $\mu$ l 50mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ -Lösung mit 50 $\mu$ g Trypsin 5 bis 12 h bei 37°C verdaut. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf Gefäß überführt und die verbliebenen Gelstücke nochmal mit 300 $\mu$ l 70% Acetonitril für 10min bei RT inkubiert. Der Überstand wurde abgenommen, mit dem ersten Überstand vereinigt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und im Vakuum (Speedvac) getrocknet. Das erhaltene Lyophilisat wurde in 500 $\mu$ l Wasser gelöst und erneut getrocknet. Dieser Prozess wurde solange wiederholt bis keine Salzurückstände mehr sichtbar waren. Anschließend wurde das Lyophilisat bei -20°C gelagert.

Bei tryptischem Verdau von Proteinen aus Silbergelen hat es sich bewährt, die Gelstücke mit dem silbergefärbten Protein vor der oben beschriebenen Prozedur zu bleichen: Nach erstem Waschen in  $\text{H}_2\text{O}$  wurden die Gelstücke mit ca. 300 $\mu$ l frisch gemischter Bleichlösung (einTeil 30mM  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  + einTeil 100mM Natriumthiosulfat) versetzt, im Schüttler bis zur Entfärbung inkubiert (ca. 5min) und danach dreimal mit je 1000 $\mu$ l  $\text{H}_2\text{O}$  gewaschen (einmal kurz, dann zweimal je 5 min).

##### Massenspektrometrie

Das Lyophilisat aus dem Trypsinverdau wurde in 100 $\mu$ l Lösungsmittel (10% Acetonitril, 0,1% Ameisensäure) mit Ultraschall behandelt und anschließend 0,5 $\mu$ l dieser Lösung mit 0,5 $\mu$ l des DHB-Mixes vermischt. Aus dieser Mischung wurden dann sofort 0,5 $\mu$ l auf das *Anchor-Target* (Bruker) aufgebracht und nach Kristallisation im Flugzeitmassenspektrometer *Bruker Reflex III* der Firma Bruker Daltonik AG (Bremen) im Reflektormodus vermessen.

Es wurden ausschließlich positiv geladene Ionen analysiert und zur Verbesserung des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses typischerweise 100 oder 200 Einzelschussspektren aufsummiert. Die aufsummierten Spektren wurden anschließend mit der Software XMASS 5.01 (Bruker Daltonik AG, Bremen) prozessiert. Für die Massenbestimmung („*Peak Picking*“) wurde der in XMASS 5.01 verfügbare „*SNAP*“-Algorithmus verwendet. Die Kalibrierung erfolgte extern mit einem Peptid-Standard-Mix.

**DHB-Mix** 90% DHB (20µg/ml 2,5-Dihydroxybenzoesäure; 20% Acetonitril; 0,1% Trifluoressigsäure) und 10% HMB (2-Hydroxy-5-Methoxybenzoesäure; 20% Acetonitril; 0,1% Trifluoressigsäure; 20µg/ml).

Peptidstandard-Mix		
Peptid	Kat.No Sigma	Peptidmasse (kD) (protonierte Form, monoisotopisch)
Bradykinin, Fragment 1-7	B 1651	757,3998
Angiotensin 2 Acetat, human	A 9525	1046,542
Angiotensin 1 Acetat, human	A 9650	1296,6853
Substanz P	S 6883	1347,7361
Bombesin	B 4272	1619,823
ACTH (1-17)	A 2407	2093,0868
ACTH (18-39)	A 0673	2465,199
Somatostatin 28	S 6135	3147,4714
Insulin Kette B, oxidiert (Rind)	I 6383	3494,651

### Datenbanksuche

Mit der generierten Peptid-Peakliste wurden wie oben beschrieben durch *Peptide mass fingerprinting* die Proteine bestimmt. Dabei wurden mit dem Programm MSBiotools (*MASCOT*) alle Einträge von Säugerzellen der Datenbank MSDB („*nicht-identische Proteinsequenz-Datenbank*“ des Proteomics Department am Hammersmith-Kampus des Imperial College, London) mit den Peaklisten verglichen. Die Wahrscheinlichkeitsabschätzung erfolgte über den Wahrscheinlichkeits-basierten Mowse Score. Dabei ist der Score =  $-\lg(P)$  mit  $P$  als Wahrscheinlichkeit, dass es sich bei dem Suchergebnis um einen Zufall handelt. (Der Mowse-Algorithmus ist unter

[http://www.matrixscience.com/help/scoring\\_help.html#PBM](http://www.matrixscience.com/help/scoring_help.html#PBM))

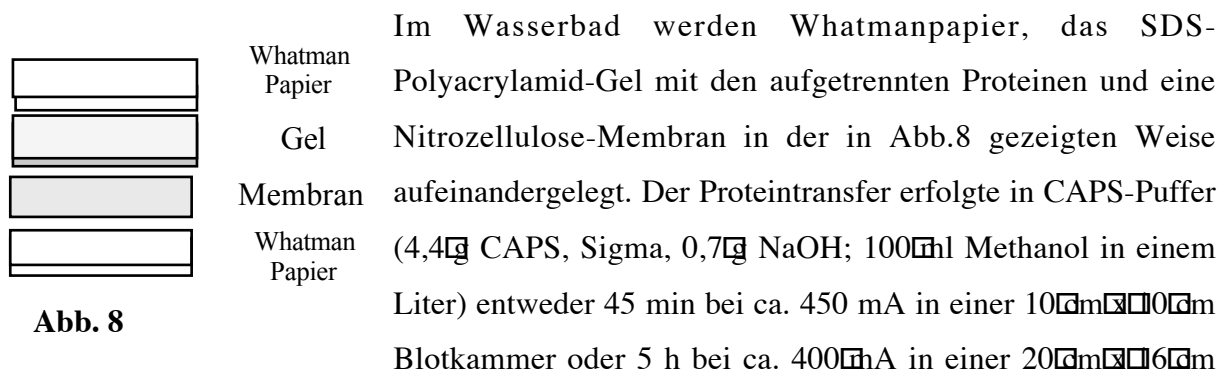
beschrieben.) Danach gelten Suchergebnisse mit Scores größer als 69 als signifikant ( $p < 0.05$ ). Der theoretische pI und das Molekulargewicht der gefundenen Proteine wurde ebenfalls der Datenbank MSDB entnommen.

## 2.2.2 Proteintransfer und immunologischer Nachweis von Protein (Westernblot)

### 2.2.2.1 Lysatpreparation für eindimensionales SDS-PAGE

$10^7$  B-Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und anschließend in 200  $\mu$ l Laemmli-Puffer (50 mM TRIS/HCl, pH7; 20% Glycerol; 2% SDS; 5%  $\beta$ -Mercaptoethanol; 0,02% Bromphenolblau) lysiert, mit Ultraschall behandelt (Schaumbildung!) und 5 min bei 95°C erhitzt. Dann wurden 15  $\mu$ l Lysat auf ein Gel aufgetragen (1,5 mm Dicke) und aufgetrennt. (**Sammelgel:** 250 mM TRIS/HCl, pH6.8; 0,1% SDS; 5% Acrylamid/Bisacrylamid 29:1; **Trenngel:** 375 mM TRIS/HCl, pH8.8; 0,1% SDS; 10% Acrylamid/Bisacrylamid 29:1; **Laufpuffer:** 192 mM Glycin, 25 mM TRIS, 1% SDS). Einstellungen am Ultraschallgerät (Cell Disruptor B15, Branson Sonic Power, Smithkline): *Output Control:* 6; Pulsed; 45% Duty Cycle.

### 2.2.2.2 Proteintransfer- und Nachweis



**Abb. 8**

Im Wasserbad werden Whatmanpapier, das SDS-Polyacrylamid-Gel mit den aufgetrennten Proteinen und eine Nitrozellulose-Membran in der in Abb.8 gezeigten Weise aufeinandergelegt. Der Proteintransfer erfolgte in CAPS-Puffer (4,4 g CAPS, Sigma, 0,7 g NaOH; 100 ml Methanol in einem Liter) entweder 45 min bei ca. 450 mA in einer 10 cm x 10 cm Blotkammer oder 5 h bei ca. 400 mA in einer 20 cm x 16 cm Blotkammer (2D-Western). Die proteinbeladene Membran wurde zur Kontrolle des Transfers mit Ponceau S (Sigma) 2 min gefärbt und mit Wasser oder PBST wieder entfärbt. Zur Absättigung freier Bindungsstellen der Nitrozellulose wurde diese 1 h bei RT oder über Nacht bei 4°C mit Blockpuffer (PBST mit 5% entfettetem Milchpulver oder *Rotiblock* (ROTH)) inkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem spezifisch bindenden ersten Antikörper im Blockpuffer für 1h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C. Daraufhin wurde die Membran dreimal 10 min mit 50 ml PBST gewaschen und nachfolgend ca. 1h in PBST mit einem spezifisch bindenden zweiten, Peroxidase-gekoppelten Antikörper . Danach wurde die Membran 3 mal 10 min mit 50 ml PBST gewaschen. Die Sichtbarmachung der Antikörperbindung erfolgte mit dem ECL-System (*ECL oder ECLAdvanced*, Amersham). Bei der ECL-Reaktion setzt die am Sekundäntikörper gebundene Meerrettich-Peroxidase (HRP)

unter Stickstoff-Freisetzung und Lichtemission das Reagenz Luminol mit Wasserstoffperoxid um. Die sich an den Antikörperbindungsstellen entwickelnde Chemilumineszenz wird durch ECL-Filme (Amersham) detektiert.

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Blocking	Bezugsquelle
MYC-Tag (9E10)	Maus	1:1000	5% Milch	Roche
pY701-STAT1	Kaninchen	1:500	1% Milch	Cell Signalling
pS727-STAT1	Kaninchen	1:1000	5% Milch	Upstate
STAT1(9H2)	Maus	1:1000	5% Milch	Cell Signalling
Phospho-eIF2 $\alpha$	Kaninchen	1:1000	5% Milch	Cell Signalling
eIF-5A	Kaninchen	1:5000	Rotiblock	Prof. J. Hauber
pT308-Akt	Kaninchen	1:1000	Rotiblock	Cell Signalling
anti-Kaninchen-IgG-HRP	Ziege	1:3300	5% Milch	BIORAD
anti-Maus-IgG-HRP	Ziege	1:5000	5% Milch	Sigma

### 2.2.2.3 Strippen von Antikörper-beladenen Membranen

Während des sogenannten *Strippens* der Membran wird nicht elektrotransferiertes, *auf* der Membran befindliches Protein (Block-Proteine, Antikörper) entfernt. Die mit Protein und Antikörpern beladene Membran wurde dazu 30 min bei 55°C in „Stripping-Puffer“ (100  $\mu$ M  $\beta$ -Mercaptoethanol, 2% SDS, 62,5 mM Tris/HCl, pH6,7) im Schüttelinkubator behandelt und anschließend mindestens dreimal 15 min in 50  $\mu$ l PBST gewaschen. Danach konnte erneut nach dem oben beschriebenen Verfahren eine immunologische Detektion durchgeführt werden.

## 2.3 RNA-Analyse-Methoden

### 2.3.1 Nukleärer Run-On

Zur Hybridisierung von cDNA-Filterarrays wurden Run-On-markierte RNAs eingesetzt. Die Isolierung der Zellkerne und die Durchführung der nukleären Run-On-Reaktion erfolgte in Anlehnung an Standardprotokolle (Schuhmacher et al., 2001). Bei dieser Methode werden Zellkerne isoliert und eingefroren. Dadurch werden RNA-Polymerase-Komplexe in dem Abschnitt eines Genes, in dem sie sich zum Zeitpunkt der Isolation befunden haben, fixiert. Nach dem Auftauen in Gegenwart von Nukleotid-haltigem Reaktionspuffer kommt es innerhalb dieser fixierten Transkriptionsblasen wieder zum Einbau von Nukleotiden. Durch Zugabe von [ $^{32}\text{P}$ ]-CTP können so Primärtranskripte radioaktiv markiert werden. Die Einbaurrate korreliert dann mit der Anzahl der aktiven Polymerasekomplexe innerhalb eines Genes und dies wiederum spiegelt die Promotoraktivität eines Genes wider.

#### Durchführung

Zur Präparation von Zellkernen wurden  $2 \times 10^7$ - $10^8$  Zellen abzentrifugiert (7 min, 300  $\times$  g, 4°C), das Zellsediment in 10-40 ml kaltem PBS gewaschen, erneut zentrifugiert und anschließend in 2-10 ml kaltem Lysepuffer 3-4 mal in einer Pipette auf –und abpipettiert, dann 5-15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellkerne durch Zentrifugation (7 min, ca. 470  $\times$  g, 4°C) pelletiert und mit einer 1 ml-Spitze (Gilsonpipette) in 100-500  $\mu$ l TMEG-Puffer resuspendiert, à 100  $\mu$ l (ca.  $2 \times 10^7$  Kerne) portioniert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei –80°C aufbewahrt. Zur Durchführung der Run-On-Reaktion wurden die Kerne auf Eis aufgetaut und mit 100  $\mu$ l Reaktionspuffer 15 min bei 28°C inkubiert. Anschließend wurde DNase I (50U, RNase frei, Roche Diagnostics) hinzugefügt und die Reaktionslösung 10 min bei Raumtemperatur inkubiert (zweimal). Im Anschluss folgte eine 60-minütige Inkubation mit Proteinase K (0.65  $\mu$ g/ $\mu$ l) bei 37°C. Nach der Isolierung der nukleären Transkripte über Sephadex G-50 Säulen wurde die radioaktiv markierte RNA in 5  $\mu$ l Churchpuffer gegeben und mit *Clontech Atlas Human Cancer 2-* oder *Hematology/Immunology*-Nylonmembranen (Clontech, <http://www.clontech.com>) für 36 h bei 65°C hybridisiert. Vorher wurden die Nylonmembranen 2-5 min in 80-90°C heißer 0.5% SDS-Lösung und anschließend mindestens zweimal 1h bei 65°C in Churchpuffer vorbehandelt. Nach der Hybridisierung wurden die Membranen sukzessive bei 65°C je zweimal mit 50  $\mu$ l Waschpuffer I-III gewaschen. Dann erfolgte 15 min Rnase A-Verdau in Puffer III bei

Raumtemperatur (final 200 µg/ml RNaseA). Abschließend wurden die Filter -nach erneuter Behandlung mit Waschpuffer III bis die gemessene Radioaktivität konstant blieb- in einer Filmkassette mit Intensivierungsschirm bei -80°C und Kodak Biomax MS Film exponiert.

<i>Lysepuffer</i>	10 mM Tris/HCl pH7,5; 3 mM MgCl <sub>2</sub> ; 10 mM NaCl; 0.5% (v/v) NP40
<i>TMEG Puffer</i>	50 mM Tris/HCl pH8.3; 5 mM MgCl <sub>2</sub> ; 0.1 mM EDTA/NaOH pH8.0; 40% (v/v) Glycerin
<i>Reaktionspuffer</i>	300 mM KCl; 5 mM MgCl <sub>2</sub> ; je 0.5 mM ATP, UTP, GTP und 100 µCi [ <sup>32</sup> P]-CTP (800 Ci/mmol, 10 <sup>6</sup> Ci/ml; Amersham Pharmacia Biotech)
<i>Churchpuffer</i>	0,5 M Natrium-Phosphat pH 7,1; 7% SDS; 1 mM EDTA
<i>Waschpuffer I</i>	1% SDS; 2xSSC
<i>Waschpuffer II</i>	0.5% SDS; 0,1xSSC
<i>Waschpuffer III</i>	2xSSC; 1 mM EDTA
2xSSC	300 mM NaCl, 30 mM Natriumcitrat

Die Auswertung der Autoradiographien erfolgte durch visuelle Abschätzung. Zur weiteren Verifizierung der Targets wurden Northern Blots oder Lightcycler-RT-PCR-Analysen durchgeführt.

### 2.3.2 Real-Time-PCR

Neben der mRNA-Analyse durch radioaktiven Northernblot wurde ebenfalls die Methode der reversen Transkription von mRNA mit anschließender Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) eingesetzt. Beim sogenannten *Lightcycler* (Roche) handelt es sich um eine PCR-Maschine, in der die PCR-Reaktion in Quarzkapillaren erfolgt und nach jedem einzelnen Zyklus die Inkorporation des Farbstoffes *SYBR Green I* in die sich vermehrende doppelsträngige DNA optisch (LASER) vermessen wird. Die Fluoreszenzzunahme entspricht dann der Zunahme an doppelsträngiger DNA. Durch die *online*-Detektion wird es möglich, jede einzelne PCR-Reaktion in ihrer exponentiellen Phase zu quantifizieren.

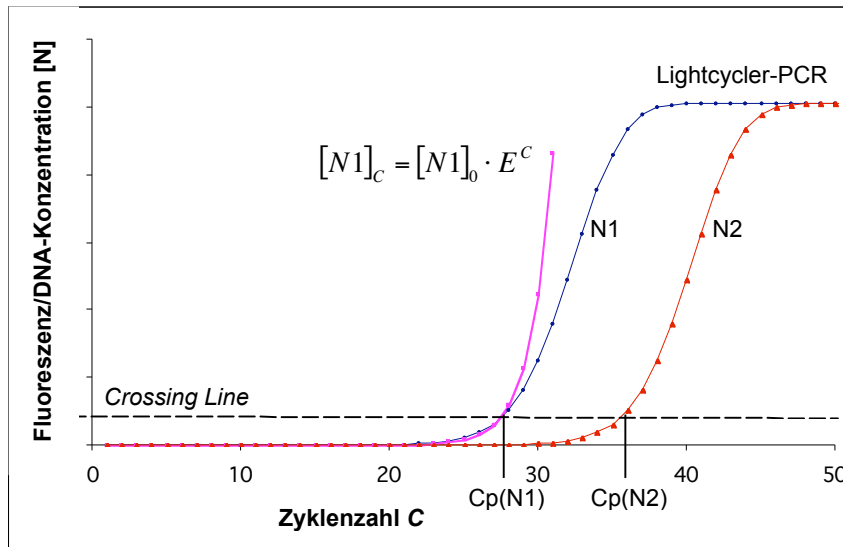
In der exponentiellen Phase vermehrt sich die DNA-Menge in jedem Zyklus um den gleichen Faktor E (ca. 2), weshalb sich die PCR hier nach einer Gleichung erster Ordnung verhält :

$$I \quad [N]_c = [N]_0 \cdot E^c$$

$[N]_c$  = Konzentration der DNA nach Zyklus C  
 $[N]_0$  = Konzentration der DNA vor Beginn der PCR  
 $C$  = Zyklenzahl  
 $E$  = *Effizienz* (Vermehrungsfaktor der DNA pro Zyklus)

Nach vielen PCR-Zyklen mit DNA-Vermehrung kommt die Reaktion in die Plateauphase, weil sich die Ausgangsstoffe (Primer, dNTPs etc.) verbrauchen. Hier steht die Fluoreszenz

nicht mehr in berechenbarer Abhängigkeit der Zyklenzahl und Ausgangsmenge der cDNA allein, sondern der Faktor E verändert sich (Abb.9).



**Abb.9:**

Diagramm Zyklenzahl gegen Fluoreszenz in einem Lightcycler-PCR-Experiment mit den Proben N1 und N2. Maßgeblich für den quantitativen Vergleich von N1 und N2 ist die Zyklenzahl am Crossingpunkt Cp, an dem die reale Lightcycler-PCR-Kurve noch der theoretischen Gleichung

$$[N1]_C = [N1]_0 \cdot E^C$$

folgt.

Bei der Lightcycler-Analyse bleibt man daher zur Analyse der Ursprungsmenge der eingesetzten Ziel-cDNA im logarithmischen Bereich. Dazu legt man willkürlich eine „Crossing Line“ in einen Bereich der Fluoreszenz, wo sich alle betrachteten PCR-Reaktionen noch im logarithmischen Bereich befinden. Der Schnittpunkt der sigmoiden *Fluoreszenz-versus-Zyklenzahl*-Kurve mit der Crossing-Line stellt den Crossingpunkt Cp dar. An diesem Punkt ist die Fluoreszenz und somit die Menge von amplifizierter DNA gleich. Daher gilt für 2 PCR-Reaktionen mit den cDNAs N1 und N2:

$$\text{II } [N1]_{Cp(N1)} = [N2]_{Cp(N2)} \quad [Nx]_{Cp(Nx)} = \text{Konzentration der DNA } Nx \text{ am Crossing Point der PCR von } Nx$$

Aus I ergeben sich für  $[N1]_{Cp(N1)}$  und  $[N2]_{Cp(N2)}$  die Gleichungen III und IV:

$$\text{III } [N1]_{Cp(N1)} = [N1]_0 \cdot E^{Cp(N1)} \quad [Nx]_0 = \text{Konzentration der DNA vor Beginn der PCR}$$

$$\text{IV } [N2]_{Cp(N2)} = [N2]_0 \cdot E^{Cp(N2)} \quad Cp(Nx) = \text{Crossing Point der PCR mit } Nx$$

Aus II folgt, dass III = IV, woraus sich die Relation zwischen  $[N1]_0$  und  $[N2]_0$  errechnen läßt.



$$V \quad \frac{[N1]_0}{[N2]_0} = \frac{E^{Cp(N2)}}{E^{Cp(N1)}} \equiv \text{Induktion}$$

Diese Relation wird in dieser Arbeit als Induktion von N (also eines beliebigen Gens) definiert, wobei  $[N1]_0$  der mRNA-Konzentration einer Zelle im nicht induzierten Zustand (z.B. EREB2-5 ohne EBNA2) entspricht.

E lässt sich für jedes Primerpaar aus der PCR einer Verdünnungsreihe aus Amplifikat von N ermitteln. Formt man Die Gleichung III bzw. IV um, erhält man

$$VI \quad Cp(Nx) = \frac{\lg[Nx]_0}{\lg E} + \frac{\lg[Nx]_{Cp(Nx)}}{\lg E}.$$

Trägt man dann  $Cp(Nx)$  für verschiedene  $[Nx]_0$  auf (PCRs aus Verdünnungsreihe), kann man die Steigung der Geraden ermitteln und daraus E berechnen (Gleichung VII):

$$VII \quad \text{Steigung} = \frac{1}{\lg E} \quad \square \quad E = 10^{\frac{1}{\text{Steigung}}}$$

## Durchführung

### 2.3.2.1 Isolierung von Gesamt-RNA

Aus humanen B-Zellen wurde Gesamt-RNA entweder durch Phenol-Chloroform-Extraktion (peqGold TriFast, Peqlab) oder durch das Rneasy Midi Kit-Säulensystem (Qiagen) gemäß Protokollen der Hersteller isoliert. Für Lightcycler-PCRs wurde ein Dnase I-Verdau durchgeführt, und die RNA erneut durch Phenol-Chloroform-Extraktion gereinigt.

(Dnase I-Verdau: 1  $\mu$ g GesamtRNA wurde mit 1U Dnase I (Roche) in 20 mM Tris/HCl pH8,3; 50 mM KCl; 10 mM MnCl<sub>2</sub> 30 Minuten bei 25°C und 5 min bei 75°C inkubiert.)

### 2.3.2.2 Reverse Transkription von Gesamt-RNA

1  $\mu$ g total-RNA wurde mit 100 ng Oligo-dT auf 6,25  $\mu$ l Gesamtvolumen gebracht und 5 min bei 65°C inkubiert. Anschließend wurden 3,75  $\mu$ l RT-Mix hinzugefügt. Die reverse Transkription erfolgte 55 min bei 37°C und wurde durch dreiminütiges Erhitzen auf 95°C beendet. Der RT-Ansatz wurde dann 1:10 mit Wasser verdünnt und direkt für die Lightcycler-PCR eingesetzt („cDNA“).

RT-Ansatz	(finale Konzentration im 10 $\mu$ l Ansatz)
RNA	100 ng/ $\mu$ l
oligo(dT) <sub>15</sub>	2 $\mu$ M
dNTP's	1 mM
<u>Puffer NX</u>	
KCl	60 mM
Tris-Cl pH 8,4	15 mM
MgCl <sub>2</sub>	3 mM
Tween 20	0,3%
$\beta$ -Mercaptoethanol	10 mM
Rnasin (Promega)	10 U
Mo-MLV RT (Promega)	100 U

### 2.3.2.3 Lightcycler-PCR und Primer

Die PCR-Reaktion erfolgte in einer Quarzkapillare im Lightcycler (Roche). Nach einem zehnminütigen Denaturierungsschritt bei 95°C zum Aufschmelzen der Wachskügelchen, in denen die Taq-DNA-Polymerase enthalten ist, erfolgten 45 Zyklen mit 1 Sekunde 95°C, 10 Sekunden Annealing, und ein Amplifikationsschritt bei 72°C. Die Annealingtemperatur und Amplifikationszeit variierten je nach Primerpaar (siehe Primertabelle). Die PCR wurde z.T. auch in 10  $\mu$ l Gesamtvolumen durchgeführt.

PCR-Reaktions-Gemisch	Volumen/ $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	12,4
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	1,6
Roche Mix	2
Primerpaar (10 $\mu$ M)	2
cDNA	2

Die Primer der folgenden Liste wurden freundlicherweise von Dr. Reinhard Mailhammer zur Verfügung gestellt.

Primerpaare Reinhard Mailhammer				
RM	Name Acc	OLIGO	Länge	Tm 3' Sequenz
154	MIP1	5' -PRIMER	24	65 CTCTGCATCACTTGCTGCTGACAC
155	M23452, M24110, M32337	3' -PRIMER	22	65 CACTCAGCTCCAGGTGCGCTGAC
AMPLIFIKATGRÖÙE : 212				
193	GAPDH	5' -PRIMER	22	70 GCACCACCAACTGCTTAGCACC
194	M33197	3' -PRIMER	21	70 GTCTGAGTGTGGCAGGGACTC
AMPLIFIKATGRÖÙE : 637				
441	CCR8	5' -PRIMER	21	65 CCTAAAGGTGAGGACGATCAG
442	X14768	3' -PRIMER	22	65 CCTAGGTAGTTGAAGATTGGC
AMPLIFIKATGRÖÙE : 558				

<b>Primerpaare Reinhard Mailhammer ff.</b>						
<b>RM</b>	<b>Name Acc</b>	<b>OLIGO</b>	<b>Länge</b>	<b>Tm</b>	<b>3' Sequenz</b>	
<b>451</b> <b>452</b>	<b>RANTES</b> M21121	5'-PRIMER 3'-PRIMER AMPLIFIKATGRÖßE : 370	20 20	65 65	CCTCTGCGCTCCTGCATCTG AACTGTGCTCGTCGGTTC	
<b>459</b> <b>460</b>	<b>CCR4</b> NM_005508	5'-PRIMER 3'-PRIMER AMPLIFIKATGRÖßE : 603	21 20	65 65	GGCTCAGGTCCATGACTGATG GCTCCACCAGGGTCTCTAGG	
<b>461</b> <b>462</b>	<b>CCR1</b> L10918,L09230	5'-PRIMER 3'-PRIMER AMPLIFIKATGRÖßE : 435	21 21	65 65	CCAGCATCTACCTCCTGAACC CCAACAAAGGCAATACCAGCC	
<b>463</b> <b>464</b>	<b>CXCR4</b> X71635	5'-PRIMER 3'-PRIMER AMPLIFIKATGRÖßE : 583	21 20	65 65	TCATCCTGGTCATGGGTACC GCCAACAGGCGAAGAAAGCC	
<b>469</b> <b>470</b>	<b>CCR6</b> Y12815	5'-PRIMER 3'-PRIMER AMPLIFIKATGRÖßE : 479	21 21	65 65	TGGACAAGTACCTGGAGATCG GCTCTCTGTTACCTGGAGTGC	
<b>471</b> <b>472</b>	<b>CCR7</b> L31581	5'-PRIMER 3'-PRIMER AMPLIFIKATGRÖßE : 447	20 21	65 65	CAGAGAGCGTCATGGACCTG GGAGCATGCCACTGAAGAAGC	
<b>475</b> <b>476</b>	<b>CCR6</b> U45984	5'-PRIMER 3'-PRIMER AMPLIFIKATGRÖßE : 363	20 22	65 65	CTACCGCTGCCTGTGAGCTG CAAAGAGGATGTCTGCAATGGC	
<b>477</b> <b>478</b>	<b>CCR2A</b> U80924	5'-PRIMER 3'-PRIMER AMPLIFIKATGRÖßE : 404	21 21	65 65	GCAGTGAGAGTCATCTTCACC CTAGGCTCCTCTTTGTCTCTG	
<b>477</b> <b>479</b>	<b>CCR2B</b> U80924	5'-PRIMER 3'-PRIMER AMPLIFIKATGRÖßE : 490	21 20	65 65	GCAGTGAGAGTCATCTTCACC ACACACAGCCCTGAGGTTCC	
<b>492</b> <b>493</b>	<b>CCXCR1</b> L36149	5'-PRIMER 3'-PRIMER AMPLIFIKATGRÖßE : 537	20 20	65 65	CCTCTCAGACCTGGTGTTCG GTCCGAAACAGCGTCTGCAG	
<b>498</b> <b>498</b>	<b>BLR1/CXCR5</b> X68149	5'-PRIMER 3'-PRIMER AMPLIFIKATGRÖßE : 450	21 20	65 65	TGGGAAGTGGACAGATGGAC GATGTGGATGGAGAGGAGGC	

*Tm* mit diesen Primern wurde in allen Lightcycler-PCRs als 65°C gewählt.

Alle Primer wurden von den Firmen MWG-Biotech oder Metabion synthetisiert.

<b>Primerpaare Martin Schlee</b>						
<b>MS</b>	<b>Name Acc</b>	<b>OLIGO</b>	<b>Start</b>	<b>Länge</b>	<b>Tm</b>	<b>gc% 3' Sequenz</b>
<b>1</b>	<b>her2</b> -4104-5 her2-4302-3	5'-PRIMER 3'-PRIMER AMPLIFIKATGRÖßE : 200	4104 4302	20 20	60 60	ctcggttgaagaggaacagc ctgaatgggtcgcttttggtt
<b>15</b>	<b>hCD75</b> -308-5 hCD75-1287-3 Acc: X54363	5'-PRIMER 3'-PRIMER AMPLIFIKATGRÖßE : 980 (Sonde)	308 1287	20 20	59.99 59.55	55.00 55.00 ctcggtcctgggtctttcttc tatccacctgggtcacacagc
<b>16</b>	<b>hPDE4B</b> -138-5 hPDE4B-1122-5 GI:14734707	5'-PRIMER 3'-PRIMER AMPLIFIKATGRÖßE : 985 (Sonde)	138 1122	20 20	60.13 60.30	60.00 50.00 ctggtggagagagctggaag agcagtttgaacccacagc
<b>17</b>	<b>hCXCR4</b> -16-5 hCXCR4-1014-3 GI:4503174	5'-PRIMER 3'-PRIMER AMPLIFIKATGRÖßE : 999 (Sonde)	16 1014	20 20	59.66 60.56	55.00 45.00 cagcaggtagcaaagtgacg aatttggctccaaggaagc
<b>18</b>	<b>EVI2A</b> -438-5 EVI2A-1426-3 GI:7657074	5'-PRIMER 3'-PRIMER AMPLIFIKATGRÖßE : 989 (Sonde)	438 1426	21 20	60.13 59.57	47.62 50.00 gcttgaacatctcacatcgt tggttgataagctggtgtgg
<b>24</b>	<b>hPDE4B</b> -229-5 hPDE4B-578-5 GI:14734707	5'-PRIMER 3'-PRIMER AMPLIFIKATGRÖßE : 350	229 578	20 20	59.86 59.30	55.00 45.00 cgttgactctgctatggaca tcatgagctgctgtttttc
<b>57</b>	<b>SDF1b</b> (445,Mailh.) <b>SDF1</b> -□-585-3 GI:1220363	5'-PRIMER 3'-PRIMER AMPLIFIKATGRÖßE : 390	196 585	20 20	67.11 65.38	60.00 60.00 tgccagagccaacgtcaagc tgcacaggtacagggcatgg
<b>63</b>	<b>ANX4</b> -76-5 ANX4-608-3 gi:178698 (1976bp)	5'-PRIMER 3'-PRIMER AMPLIFIKATGRÖßE : 533	76 608	20 20	67.08 66.42	60.00 65.00 ggccatggcaaccaaaggag cctgggcatctctgtctcag

Primerpaare Martin Schlee ff							
MS	Name Acc	OLIGO	Start	Länge	Tm	gc%	3' Sequenz
64	hGMFg-49-5 hGMFg-604-3 GI:18590578	5'-PRIMER 3'-PRIMER AMPLIFIKATGRÖÙE : 556	49 604	20 21	66.84 67.70	65.00 61.90	cggtccccacgcctagaaga ggggttccaagtccccagtca
65	hTPT1-30-5 hTPT1-567-3 NM_003295	5'-PRIMER 3'-PRIMER AMPLIFIKATGRÖÙE : 538,	30 567	20 20	67.80 66.09	65.00 65.00	cgctcgctccgagtttcagg ggggtcacaccatcctcaccg
66	GSTP1-144-5 GSTP1-691-3 GI:6552334	5'-PRIMER 3'-PRIMER AMPLIFIKATGRÖÙE : 548	144 691	20 20	66.65 67.00	60.00 70.00	tggcaggaggggctcactcaa ctgcctcccgtcagagtcc
67	MDChemok-60-5 MDChemok-614-3 GI:1931580	5'-PRIMER 3'-PRIMER AMPLIFIKATGRÖÙE : 555	60 614	20 20	67.51 66.88	55.00 60.00	tccttgctgtggcgcttcaa cacatgccaggcttgggaga
68	AF103803-296-5 AF103803-845-3	5'-PRIMER 3'-PRIMER AMPLIFIKATGRÖÙE : 550,	296 845	19 20	66.89 65.53	68.42 65.00	acccatccgggtcgaggag ggccccaggaggcctatata
70	hCD19-1374-5 hCD19-1870-3 NM_001770	5'-PRIMER RIGHT PRIMER AMPLIFIKATGRÖÙE : 497	1374 1870	20 20	59.60 60.16	55.00 50.00	ctccttctccaacgctgagt tggaaagtgcactggcatgt
71	NM23-135-5 NM23-595-3 X17620	5'-PRIMER 3'-PRIMER AMPLIFIKATGRÖÙE : 462	135 596	20 20	67.11 67.45	65.00 60.00	gcgggggtcttgtgggagaga cccattggaaggaggggaaa
72	EBNA2-34-5 EBNA2-224-3 gi:59074	5'-PRIMER 3'-PRIMER AMPLIFIKATGRÖÙE : 191	34 224	20 20	65.63 66.55	65.00 65.00	gccagagggctcccattctc ggttgctggagagggcaagg
74	c-myc (exon2) 696-5 c-myc (exon3) 931-3 D10493 CDS	5'-PRIMER 3'-PRIMER AMPLIFIKATGRÖÙE : 236	696 931	20 20	65.02 64.95	60.00 65.00	TCCGTCCTCGGATTCTCTGC CCAGTGGGCTGTGAGGAGGT
79	HHEX_265_5 HHEX_833_3 L16499 (1712)	5'-PRIMER 3'-PRIMER AMPLIFIKATGRÖÙE : 558	265 822	20 20	65.66 65.12	65.00 60.00	cagccttctcgcaccactcc cgccctcaatgtccacttcc
80	CD44_108_5 CD44_442_3 M59040 (1794)	5'-PRIMER 3'-PRIMER AMPLIFIKATGRÖÙE : 335	108 442	20 20	66.73 66.79	60.00 60.00	CCTGCCGCTTTGCAGGTGTA GGCATTGGGCAGGTCTGTA
81	ARHH_564_5 ARHH_1108_3 NM_004310 (1445)	5'-PRIMER 3'-PRIMER AMPLIFIKATGRÖÙE : 545	564 1108	20 20	65.05 65.42	60.00 65.00	acagcaggctgggaagatgc gtctcctggcctggttgacg
82	ETS1_850_5 ETS1_1409_3 J04101 1450	5'-PRIMER 3'-PRIMER AMPLIFIKATGRÖÙE : 560	850 1409	20 20	65.10 65.10	65.00 65.00	gtaaactcgggggcccaggac gtgcagctcctcagggtgt
83	EBI2_109_5 EBI2_635_3 L08177	5'-PRIMER 3'-PRIMER AMPLIFIKATGRÖÙE : 527	109 635	20 20	66.80 66.55	60.00 55.00	catcacagcacgcccaggat catgccccaaagcagaatcca
84	UDPNacEpi_1625-5 UDPNacEpi_2107-3 AJ238764 (3659)	5'-PRIMER 3'-PRIMER AMPLIFIKATGRÖÙE : 483	1625 2107	20 20	66.72 67.01	60.00 60.00	tggccaaggaaagggactgg gacaaggcctgctggcgaat

In Lightcycler-PCR-Reaktionen wurde die Amplifikationszeit bei 72°C aus dem Produkt aus Amplifikatgröße x 0,04 sec berechnet. Das Primerdesign und die Berechnung der Annealingtemperaturen  $T_m$  erfolgte mit dem Web-Interface des Programmes *Primer3* ([http://www-genome.wi.mit.edu/genome\\_software/other/primer3.html](http://www-genome.wi.mit.edu/genome_software/other/primer3.html)).

### 2.3.3 Northernblot Analyse

5-10 µg gesamtzelluläre RNA wurden in 20 µl RNA-Ladepuffer aufgenommen, 10 min bei 55°C erhitzt und in einem Formaldehyd-Agarosegel in 1xMOPS-Puffer bei 25°C ca. 16h aufgetrennt. Nach dem Lauf wurde die RNA über einer UV-Lampe (254 nm) sichtbar gemacht und fotografiert. Die Übertragung auf eine Nylonmembran (Hybond N+, Amersham) erfolgte als Saugtransfer in 10xSSC (Maniatis et al., 1989). Nach dem Saugtransfer (ca. 24 h)

wurde die RNA durch UV-Licht fixiert und mindestens zweimal 1h bei 65 °C in Churchpuffer (siehe Run-On) vorbehandelt. Nach ca. 16h Hybridisierung mit 5µl Churchpuffer inklusive radioaktiv markierter Sonde bei 65°C wurde die Membran wie ein Run-On-Array (Abschnitt 2.3.1) weiterbehandelt, ohne jedoch Puffer III zu benutzen.

10xMOPS	200µM Morphpropan Sulfonsäure (MOPS), 50µM Natriumacetat, 10µM EDTA (pH8,0 mit NaOH eingestellt)
Formaldehyd-Agarosegel	1% (w/v) Agarose, 1xMOPS, 6%(v/v) Formaldehyd, 0,025% (w/v) Bromphenolblau
RNA-Ladepuffer	50%(v/v) Formamid, 1xMOPS, 5,6% Formaldehyd
10xSSC	1,5M NaCl, 150µM Natriumcitrat

### 2.3.3.1 Radioaktive Markierung von DNA Sonden

Für die radioaktive Markierung einzelsträngiger DNA-Fragmente wurde eine von Feinberg und Vogelstein entwickelte Methode verwendet, bei der Hexanukleotide von zufälliger Sequenz an hitzedenaturierte, einzelsträngige DNA binden und als Startpunkte für die Polymerase-Aktivität des Klenow-Fragmentes dienen (Feinberg *et al.*, 1983). Die Markierung von 50 ng DNA wurde mit dem "random primed DNA labelling kit" der Firma Roche Diagnostics nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Abtrennung der nicht eingebauten Nukleotide erfolgte über eine Sephadex-G50 Säule (Nick Column, Amersham). Nach Hitzedenaturierung (5 min bei 95°C, 5 min Eis) konnte die markierte Sonde direkt zur Hybridisierungslösung (5 ml Churchpuffer) gegeben werden.

### 2.3.4 Hybridisierung von Microarrays mit FastTrack mRNA

Im Labor von Louis Staudt wurde der sogenannte Lymphochip entwickelt, der 12500 cDNA-Klone enthält, die eine besondere Gewichtung auf den Genen haben, die in B-Zell-Kommunikation und –Aktivierung involviert sind (Alizadeh *et al.*, 1999; 2000). Durch diese Spezialisierung bezüglich der ausgewählten Gene sind die Lymphochips den handelsüblichen *Affimetrix*-„whole Genom“-Arrays überlegen. So sind 10% der Lymphochip-Gene nicht auf den *Affimetrix*-Chips enthalten (Andreas Rosenwald, pers. Mitteilung). Bei den gespotteten Proben handelt es sich um PCR-Amplifikate der Inserts von cDNA-Plasmiden. Die Inserts stammen aus einer oligo-dT geprinten cDNA-Bank und haben demnach einen 3'-Bias.

#### 2.3.4.1 Vorbereitung der Arrays:

Die auf mit Poly-L-Lysin beschichtetem Glas „geprinteten“ DNA-Proben wurden zunächst im Dampf von kochendem 1xSSC kurz rehydriert und auf einer 70°C heißen Platte nicht länger,

als für die Trocknung (ca. 5 sec) nötig, belassen. Danach erfolgte im UV-Stratalinker (Stratagene) ein UV-Crosslink mit einer Gesamtenergie von 60000  $\mu\text{J}$ . Zur Absättigung der freien Lysinreste wurden die Platten 15 min in frisch hergestellter Succinic Anhydrid-Blocking Lösung (7,2  $\mu\text{l}$  Succinsäureanhydrid in 400  $\mu\text{l}$  Methyl-2-Pyrolidinon und 17,9 ml Borsäure, pH8,0) geschüttelt, 2 min in 100°C heißem Wasser denaturiert, in 95% Alkohol gewaschen und 2 min in einer Zentrifuge (ca. 1400 g) getrocknet.

#### 2.3.4.2 mRNA-Färbung und Array-Hybridisierung

Pro Array wurden ca. 3  $\mu\text{g}$  mRNA (Aufreinigung mit dem FastTrack-Kit der Firma Roche nach Herstellerangaben) in 22  $\mu\text{l}$  Volumen eingesetzt. Die Konzentrationsbestimmung der RNA erfolgte über Abschätzung der EtBr-Fluoreszenz in einem Agarosegel.

Zur reversen Transkription wurde zunächst Wasser vorgelegt (22  $\mu\text{l}$ -mRNA-Volumen), dann 17  $\mu\text{l}$  „RT-Mix“, die mRNA und danach 3  $\mu\text{l}$  Cy3-dUTP oder Cy5-dUTP hinzugegeben. Nach fünfminütigem Erhitzen bei 65°C wurden 2  $\mu\text{l}$  Superscript-Enzym hinzugegeben, 1 min bei 42°C inkubiert und ein zweites mal 2  $\mu\text{l}$  Superscript-Enzym hinzugegeben und 1 min inkubiert. Gestoppt wurde die Reaktion durch Zugabe von 5  $\mu\text{l}$  500 mM EDTA, die RNA hydrolysierte nach Zugabe von 10  $\mu\text{l}$  1M NaOH und Inkubation für 10-20 min bei 65°C und wurde durch 25  $\mu\text{l}$  1M Tris-HCl(pH7,5) neutralisiert.

#### Probenaufreinigung

Zur Volumenkonzentrierung und Reinigung der Probe wurde der Mix zusammen mit 390  $\mu\text{l}$  TE in Microm YM-30 Säulen zentrifugiert (exakt 7min bei 14000 rpm, damit die Säule nicht trockenläuft) erneut mit 450  $\mu\text{l}$  TE gewaschen und dann mit Blocking-TE versetzt und solange zentrifugiert, bis  $\leq 22 \mu\text{l}$  Volumen zurückblieben, und das Volumen auf 22  $\mu\text{l}$  aufgefüllt. Nach Zugabe von 4,25  $\mu\text{l}$  20% SSC und 0,75  $\mu\text{l}$  10% SDS wurde die Probe 2 min bei 100°C denaturiert und bei RT abgekühlt.

RT-Mix	Volumen/ $\mu\text{l}$ pro Ansatz
5x "first strand buffer"	8
oligo(dT) <sub>15</sub> (500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	2
20x low-dT/(dNTP) Mix	2
0,1M DTT	4
RNAsin	1

## Hybridisierung

Die Probe wurde in die Mitte des Glasarrays, der bereits in einer Hybridisierungskammer positioniert war, getropft und mit einem Deckglas luftblasenfrei abgedeckt. Nach Zugabe von zwei 25 $\mu$ l-Tropfen TE in die Kammer wurde diese verschlossen und 12-16h in ein 65°C Wasserbad gelegt. Nach der Hybridisierung wurden die Chips sukzessive in 2xSSC/0,1%SDS, 1xSSC, 0,5xSSC und 0,2xSSC gewaschen und sofort wie oben in der Zentrifuge getrocknet, um Schlierenbildung von Trocknungsrückständen zu vermeiden.

### 2.3.4.3 Scannen und Auswerten der Arrays

Die getrockneten Arrays wurden mit einem *Genepix*-Scanner (Axon Instruments, Union City, CA) in rot und grün gescannt, mit Gene-Pix Pro Software analysiert und Hand-editiert. Die Rohdaten wurden nach Mindestspotgröße (25 $\mu$ m) und Signalintensität extrahiert. Als hybridisierte Spots galten entweder eine Signalintensität von 50Rfu (relative fluorescence units) auf beiden Farbkanälen oder mindestens 500Rfu auf einem Kanal bei 65000 maximal möglichen Rfu. Alle Fluoreszenzen wurden auf die Gesamtfluoreszenz des Arrays normiert und log<sub>2</sub>-transformiert und als Excel-File zur Verfügung gestellt. Zur übersichtlichen Auswertung wurden die Daten im Programm *Eisen-Cluster* (Eisen et al., 1998), nach Expressionsmuster sortiert und im Programm *Treeview* (Eisen-Labor) dargestellt (grün = reprimiert oder log<sub>2</sub>-Ratio<0, schwarz=gleichbleibend oder log<sub>2</sub>-Ratio=0, rot=induziert oder log<sub>2</sub>-Ratio>0). Das Clustern erfolgte ausschließlich mit der Einstellung „Average Linkage“.

## Material

Superscript II Reverse Transcriptase	Invitrogen, Kat.Nr.. 18064-071
5x 1st Strand Buffer	
RNAsin	Roche, Kat.Nr. 799025
50x low dT-dNTPs, (25 $\mu$ M dA, dG und dC, 10 $\mu$ M dT)	NEN, Boston
Cy3-dUTP, Cy5-dUTP	NEN, Boston
Microcon YM-30 spin columns	Millipore, Kat-Nr. 42409
Human COT-1 DNA, 1 $\mu$ g/ $\mu$ l	Invitrogen, Nr. 15279011,
Yeast tRNA, 2 $\mu$ g/ $\mu$ l	Nr. R8759, Sigma,
Poly dA, 8 $\mu$ g/ $\mu$ l	Nr. 27.7922-01, Amersham
20xSSC	Gibco
Hybridisierungskammer	Corning Glass Works
Software TreeView	<a href="http://rana.lbl.gov/EisenSoftware.htm">http://rana.lbl.gov/EisenSoftware.htm</a>
Software Cluster	<a href="http://rana.lbl.gov/EisenSoftware.htm">http://rana.lbl.gov/EisenSoftware.htm</a>

## 2.4 Zellkultur

Alle B-Zellen wurden in RPMI (Gibco) 10% FCS, 2% Glutamat, 1% Pyruvat und 1% Pen/Strep (Gibco) gehalten (Kempkes et al., 1995, Pajic et al., 2000). P493-6 Zellen wurden unter 0,1  $\mu\text{g/ml}$  Tetrazyklin arretiert, während EREB2-5 durch zweimaliges Waschen mit Medium (im 2. Waschritt wurden die Zellen 20 min bei 37°C inkubiert) Östrogen entzogen wurde. Nach ca. 60h unter diesen arretierenden Bedingungen wurden P493-6 durch dreimaliges Waschen in Medium und EREB2-5 durch Zugabe von 2  $\mu\text{M}$  Östrogen reaktiviert. Für die 2D-Analyse wurden ca.  $10^7$  Zellen in 4ml Cystein- und Methionin-freiem RPMI-medium (Gibco) mit 10% dialysiertem FCS (Gibco) und gegebenenfalls stimulierenden Agenzien resuspendiert. Zur langfristigen Lagerung wurden die Zellen in FCS mit 10% (vol) DMSO in flüssigem Stickstoff gelagert.

Stimulanz/Reagenz	Konzentration
Östrogen (Sigma)	2 $\mu\text{M}$
Tetrazyklin (Sigma)	0,1 – 1 $\mu\text{g/ml}$
humanes IL4 (Strathman AG)	100-1000 U/ml (=5-50ng/ml)
Staphylococcus Aureus (denaturiert)	1,25 $\mu\text{g/ml}$
Diaminoheptan (Sigma)	25 $\mu\text{M}$
N1-Guanyl-1,7-Diaminoheptane (GC7)	5 $\mu\text{M}$
INF $\gamma$ (Gibco/Invitrogen)	50 U/ml
Rapamycin (Sigma)	0,1-10000 ng/ml
BAY 1170-85 (Sigma)	0,1 - 8 $\mu\text{M}$

## 2.5 Elektroporation

$10^7$  Zellen wurden einmal in RPMI ohne Supplement gewaschen und in 250-300  $\mu\text{l}$  RPMI ohne Supplement inklusive 20  $\mu\text{g}$  Plasmid-DNA 4 min bei RT inkubiert. Die Elektroporation erfolgte in einer 4 mm Cuvette (EQUIBIO) bei 250V und 950-1000  $\mu\text{s}$ . Anschließend wurde sofort 250  $\mu\text{l}$  FCS (RT) hinzugegeben, um den nach der Elektroporation entstandenen pH-Gradienten auszugleichen. Die Zellen wurden 2 Tage in RPMI 10-20% FCS regeneriert, um dann in Selektionsmedium (1  $\mu\text{g/ml}$  Puromycin in RPMI 10% FCS) selektioniert oder im Westernblot analysiert zu werden.



## 2.6 Thymidininkorporationstest

150  $\mu$ l Zellsuspension wurden in einer Zelldichte von  $5 \cdot 10^5$ /ml 4 $\square$  mit 10  $\mu$ Ci  $^3$ H $\square$ Thymidin inkubiert, mit Wasser lysiert und durch eine 96-Loch-Filtermembran gesaugt (Uni-Filterplatte-96, Packard Bioscience, Dreieich), auf der sich die DNA immobilisiert. Die Platte wurde unten abgedichtet (Back Seal, Packard Bioscience) und jedes Loch mit 25  $\mu$ l Scintillationsflüssigkeit versetzt, oben abgedichtet und in einem Scintillator (Micro Plate Scintillation Counter, Packard) vermessen. Jeder Messpunkt war als Triplikat vorhanden.

## 2.7 MTT-Assay

Zu 100  $\mu$ l Zellkulturvolumen wurden 10  $\mu$ l MTT (Thiazolylblau, 5mg/ml Wasser) gegeben, 4 $\square$  bei 37°C im Brutschrank inkubiert und dann weggefroren. Zur Messung wurden 200  $\mu$ l 10% SDS hinzugegeben und über Nacht im Brutschrank lysiert. Anschließend erfolgte die MTT-Messung im ELISA-Reader (OD550-690). Jeder Messpunkt war als Triplikat vorhanden.

## 2.8 Molekularbiologische Methoden

### 2.8.1 Hydrolyse von Plasmid-DNA durch Restriktionsendonukleasen (Fuchs und Blakesley, 1983)

Hierbei wurden 2  $\mu$ g Plasmid-DNA mit 2 - 3 U einer Restriktionsendonuklease in einem Gesamtvolumen von 10  $\mu$ l für mindestens 60-90 min inkubiert. Die Pufferbedingungen und Inkubationstemperatur wurden gemäß den Angaben der Hersteller eingestellt. Die Enzyme wurden gemäß den Angaben des Herstellers 15 min bei 65°C oder 20 min bei 85 °C denaturiert.

### 2.8.2 Ligation von DNA-Fragmenten

Für die Ligation von DNA-Fragmenten wurden dephosphorylierte Plasmid-DNA und Insert-DNA in einem Low-Melting-Agarosegel (Biozyme) aufgetrennt, die entsprechenden DNA-Banden auf einem UV-Illuminator (Herolab) aus dem Gel präpariert, bei 65°C geschmolzen und in mindestens doppeltem Volumen Wasser aufgenommen. Die DNA-Mengen wurden mit Hilfe des verwendeten DNA-Markers (Promega) abgeschätzt. 3  $\mu$ l Vektor-DNA wurden anschließend mit 15  $\mu$ l Insert-DNA und 2  $\mu$ l Ligationspuffer (Promega) versetzt (Gesamtvolumen 20,5  $\mu$ l). Die Ligation erfolgte durch Zugabe von 2U T4-DNA-Ligase (Promega) für 1h bei RT (kohäsive Enden).

### 2.8.3 Herstellung chemisch kompetenter *E.coli* (DH5a) und deren Transformation

Chemische Kompetenz von *E. coli* des Stammes DH5 $\alpha$  wurde den Bakterien vermittelt, indem 400 ml einer logarithmischen *E. coli*-Kultur einer OD<sub>600</sub> von ca. 0,43 15min auf Eis gekühlt und anschließend bei 4°C und 2800xg für 20 min zentrifugiert wurden. Das Bakterienpellet wurde in 50 ml Transformationspuffer 1 resuspendiert und bei 4°C und 2800xg erneut 10 min pelettiert. Das so erhaltene Pellet wurde in 10ml Transformationspuffer 2 aufgenommen, zu 200 $\mu$ l Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und dann bei -70°C gelagert.

#### Transformationspuffer 1

1,2 % w/v RbCl;  
0,99 % w/v MnCl<sub>2</sub> x 4 H<sub>2</sub>O;  
30mM Kaliumacetat;  
0,15 % w/v CaCl<sub>2</sub>,  
15 % v/v Glycerin,  
pH 5,8 (mit Eisessig eingestellt)  
(in wäßriger Lsg.)

#### Transformationspuffer 2

2 % v/v einer 0,5 M Lösung Mops, pH 6,8 (mit NaOH)  
0,12 % w/v RbCl  
1,1 % w/v CaCl<sub>2</sub>  
15 % v/v Glycerin  
(in wäßriger Lsg)

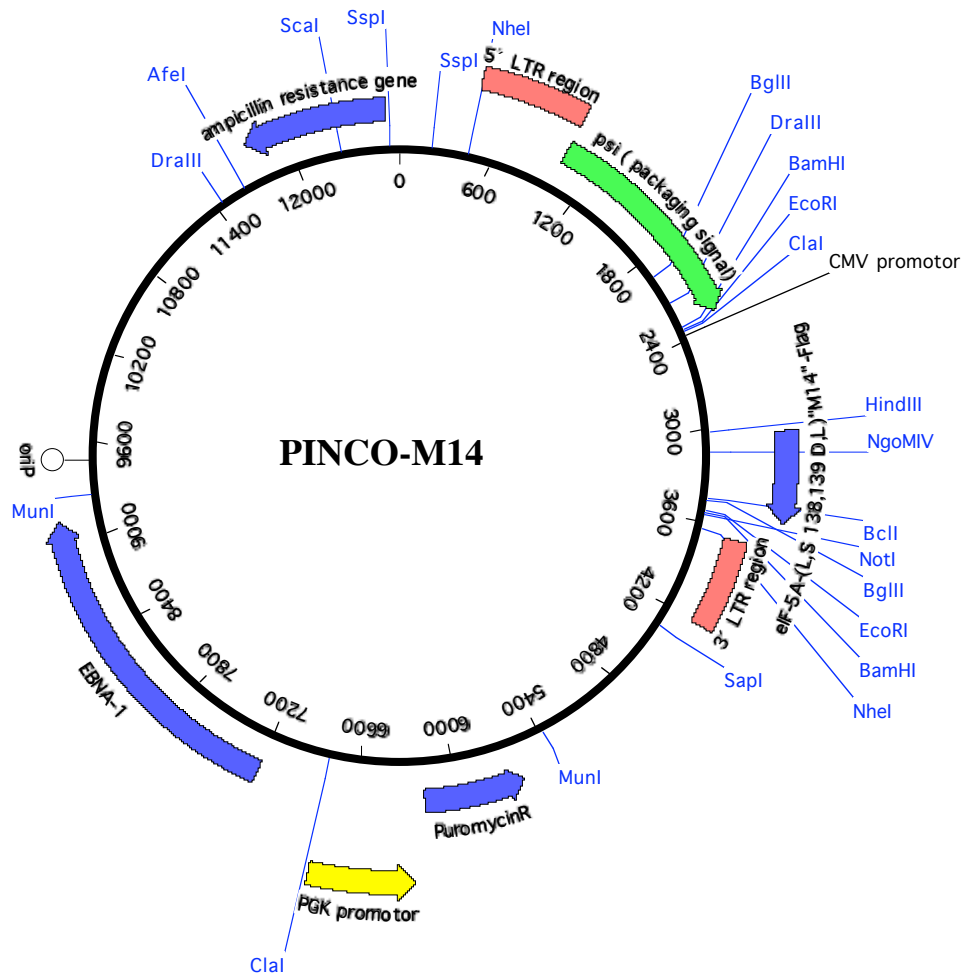
Zur Transformation wurden 100 $\mu$ l der auf Eis aufgetauten Zellen mit 10 $\mu$ l des Ligationsansatzes 30 min auf Eis und 2 min bei 42°C (Hitzeschock) inkubiert. Nach Zugabe von 1 ml LB-Medium erfolgte zur Regeneration der Bakterien 45 min Inkubation bei 37°C. Die Zellen wurden 2 min bei 7000 rpm abzentrifugiert und in 50 $\mu$ l LB-Medium (Gibco/Invitrogen) auf eine vorgewärmten LB-Platte (LB-Medium mit 1,2% Agar und geeignetem Antibiotikum) ausgestrichen. Nach 14h gewachsene Einzelkolonien wurden weitere 14h in 5 ml LB-Medium mit geeignetem Antibiotikum (z.B. 100 $\mu$ g/ml Ampicillin) unter Schütteln inkubiert und für die Analyse durch Zentrifugation (20000 x g) geerntet.

### 2.8.4 Plasmidaufarbeitung

Die präparative Plasmidaufarbeitung erfolgte mit Hilfe von DNA-Adsorptionssäulen entsprechend den Angaben des Herstellers (Genomed). Für Minipräparationen wurden dieselben Reagenzien benutzt, nur wurde statt der Abtrennung der Plasmid-DNA mit einer Säule eine Ethanol-fällung (70% Ethanol im Gesamtansatz) der DNA durchgeführt, das erhaltene Pellet mit 70% Ethanol gewaschen und in Wasser aufgenommen (zur längeren Aufbewahrung eingefroren).

### 2.8.5 Klonierung von PINCO-M14

In den retroviralen und in humanen Zellen episomal replizierenden Vektor PINCO (Grignani et al., 1998) wurde über HindIII/NotI eine für HIV-RNA dominant negative Mutante von eIF-5A "M14" kloniert, die zum Nachweis mit Antikörpern C-terminal mit einem FLAG-Tag fusioniert war (Bevec et al., 1996). In diesem mutierten eIF-5A ist Leu138 gegen Ser und Asp139 gegen Leu ausgetauscht.



**Abb. 10:** In den retroviralen und in humanen Zellen episomal replizierenden Vektor PINCO wurde über HindIII/NotI eine für HIV-RNA dominant negative Mutante von eIF-5A "M14" kloniert, die zum Nachweis mit Antikörpern C-terminal mit einem FLAG-Tag fusioniert war (Bevec et al., 1996). In diesem mutierten eIF-5A ist Leucin138 gegen Serin und Aspartat139 gegen Leucin ausgetauscht. Eingezeichnet sind ausschließlich Schnittstellen von Restriktionsenzymen, die einmal oder zweimal im Plasmid schneiden.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 2D-PAGE-Analyse von EREB2-5, P493-6 und EBV-infizierten Adenoid-B-Zellen

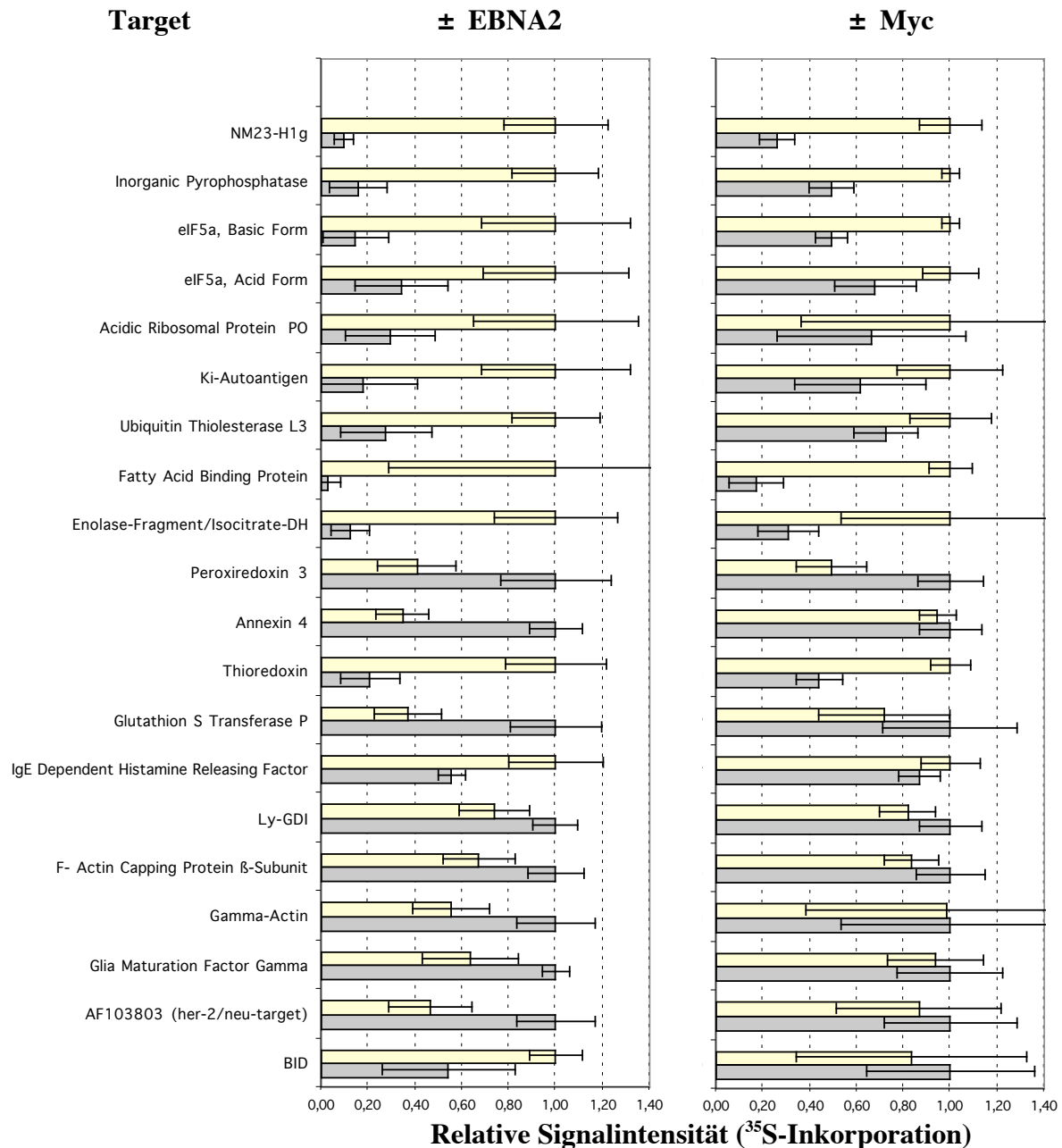
##### 3.1.1 Zielgenidentifikation und -Klassifizierung

Zur Identifikation von EBNA2-Targetproteinen wurden Lysate von EBNA2-Induktionskinetiken mit EREB2-5-Zellen im 2D-PAGE analysiert, quantifiziert und differentiell regulierte Proteine durch tryptischen Verdau und MALDI-ToF-MS mit der Fingerprintmethode identifiziert. Zum Herausfiltern von MYC-Zielgenen wurden gefundene Spots hinsichtlich ihrer Expression in MYC-Induktionskinetiken mit P493-6-Zellen untersucht. Um die Relevanz der gefundenen differentiell EBNA2-regulierten Proteine in Bezug auf die frühe Virusinfektion abschätzen zu können, wurden Adenoid-B-Zellen isoliert, mit EBV-Partikeln infiziert und 3 Tage nach Infektion analysiert.

Die in ihrer Expression durch EBNA2 regulierten Proteine sind in Abb. 1 dargestellt und in den Tabellen 1 und 2 zusammengefaßt. Abb. 2, 3 und 4 zeigen repräsentative Autoradiographien von 2D-Gelen <sup>35</sup>S-markierter Gesamt-Zell-Lysate aus den Versuchen mit EREB2-5, P493-6 und Adenoid-B-Zellen in den Situationen -/+ $\alpha$  Östrogen, +/- $\alpha$  Tetrazyklin und -/+ $\alpha$  Inkubation mit Epstein-Barr-Virus (B95.8-Stamm).

Es konnten 20 EBNA2-abhängige Proteine gefunden werden, von denen 12 induziert und 8 reprimiert waren. Die am stärksten induzierten Proteine finden sich in den Funktionsbereichen Nukleotidsynthese, Translation, Proteinabbau und Lipidstoffwechsel wieder. Weitere starke Regulation findet man im Bereich (oxidative) Stressantwort. Weniger stark aber eindeutig reguliert sind Proteine im Bereich Zytoskelett-Organisation, Immunologie und Signaltransduktion, wobei die genaue Funktion letzterer noch unklar ist. Die meisten stark induzierten Proteine bestätigen die Ergebnisse aus einem mRNA-Screen (*PCR-Select*: Kaiser et al., Promotion 1999). Tendenziell scheinen die meisten EBNA2-abhängigen Targets auch von MYC reguliert zu sein, wobei die Induktion durch EBNA2 stärker ist, als die durch MYC, was auch die Ergebnisse aus Thymidininkorporationsassays widerspiegeln (Abb. 5). Dies kann auf die dichtere Regulation des ER/EBNA2-Fusionsproteins im Vergleich zur Tetrazyklin-regulierten MYC-Transkription zurückgeführt werden. Als MYC-unabhängig reguliert können 4 oder 5 Targetproteine- Annexin IV,  $\beta$ -Actin, Glia-Maturations-Faktor (GFAP) der IgE-abhängige Histamin-Sezernierungsfaktor (HRF= IgE dependent histamine releasing factor) und möglicherweise das bisher nicht untersuchte Protein, das durch die cDNA AF103803 kodiert wird, angesehen werden.

In EBV-infizierten Adenoid-B-Zellen sind am stärksten und besten reproduzierbar NM23, hGMF und die Anorganische Pyrophosphatase reguliert. Während beim Vergleich der Zell-Linien keine Unterschiede im Silbergel detektiert werden konnten, waren die Unterschiede in silbergefärbten Gelen der infizierten und nicht infizierten Adenoid-B-Zellen genauso stark oder stärker zu sehen (Gele nicht gezeigt).



**Abb. 1** EBNA2- bzw. MYC-regulierte Zielproteine in EREB2-5 (links) - bzw. P493-6-Zellen (rechts). Die Quantifizierung erfolgte aus der 2D-Gel-Autoradiographie <sup>35</sup>S-markierter Gesamt-Zell-Lysate. Die Zielproteine sind nach (möglicher) Funktion geordnet (siehe dazu auch Tabelle 1). In den Zell-Linien EREB2-5 bzw. P493-6 wurde 8h EBNA2 bzw. 8h Myc induziert. Der obere helle Balken gibt den induzierten, der dunkle Balken den nicht induzierten (arretierten) Zustand wider. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung der mindestens zweimal als Triplikate durchgeführten Experimente.

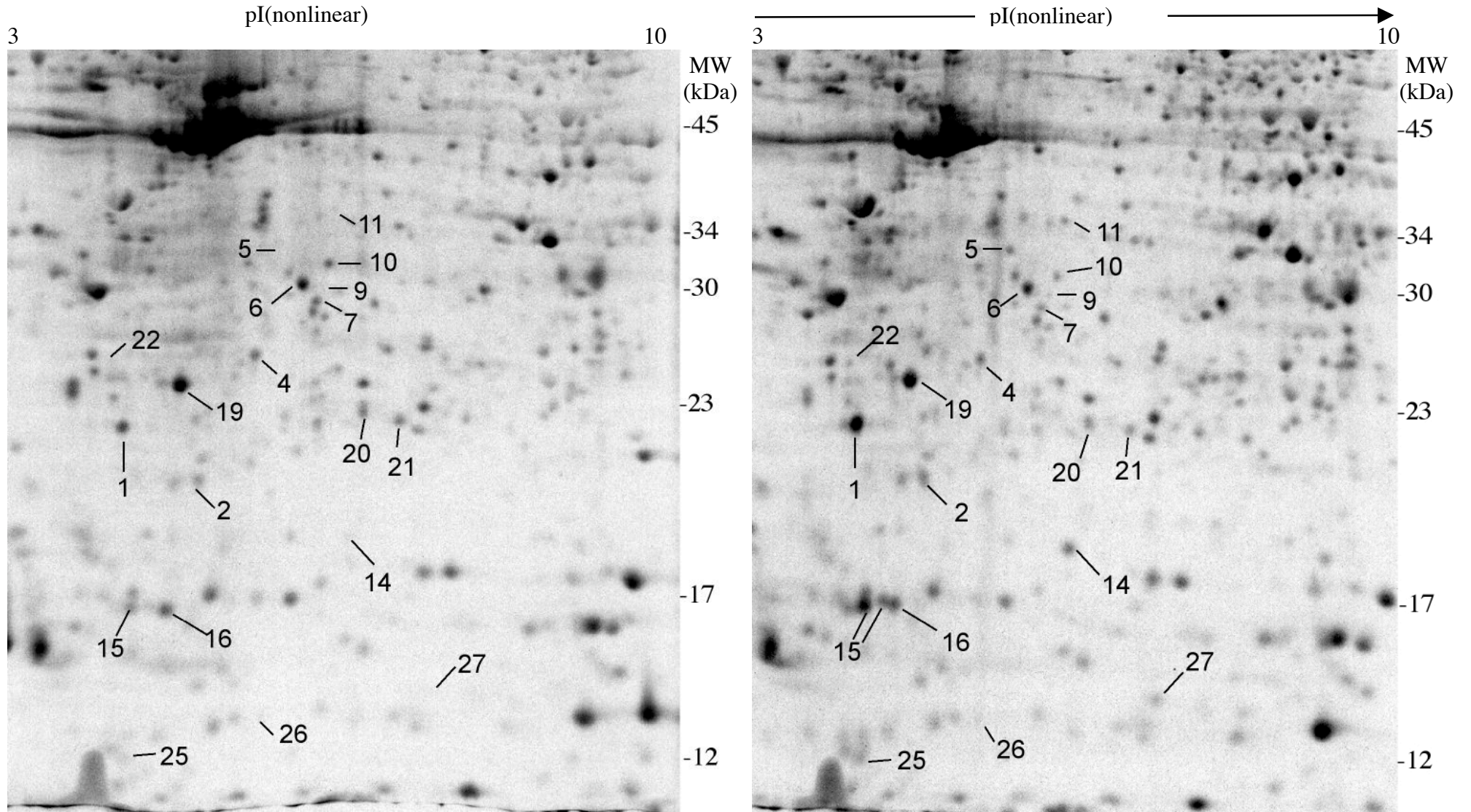


Abb. 2 EREb2-5 ohne Östrogen (- EBNA2)

EREb2-5 8h + Östrogen (+ EBNA2)

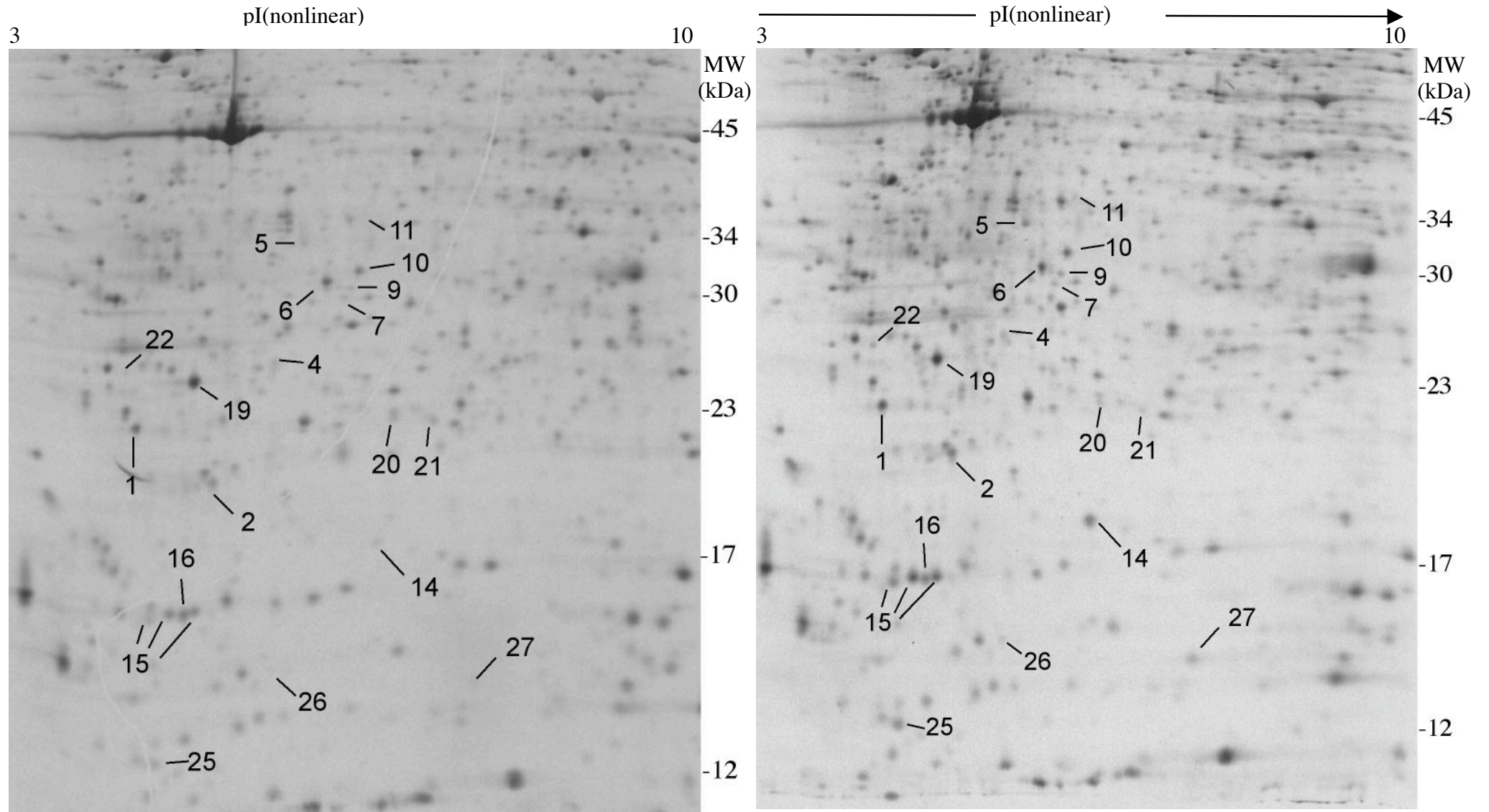


Abb. 13 P493-6 mit Tetrazyklin (- myc)

P493-6 8h ohne Tetrazyklin (+ myc)

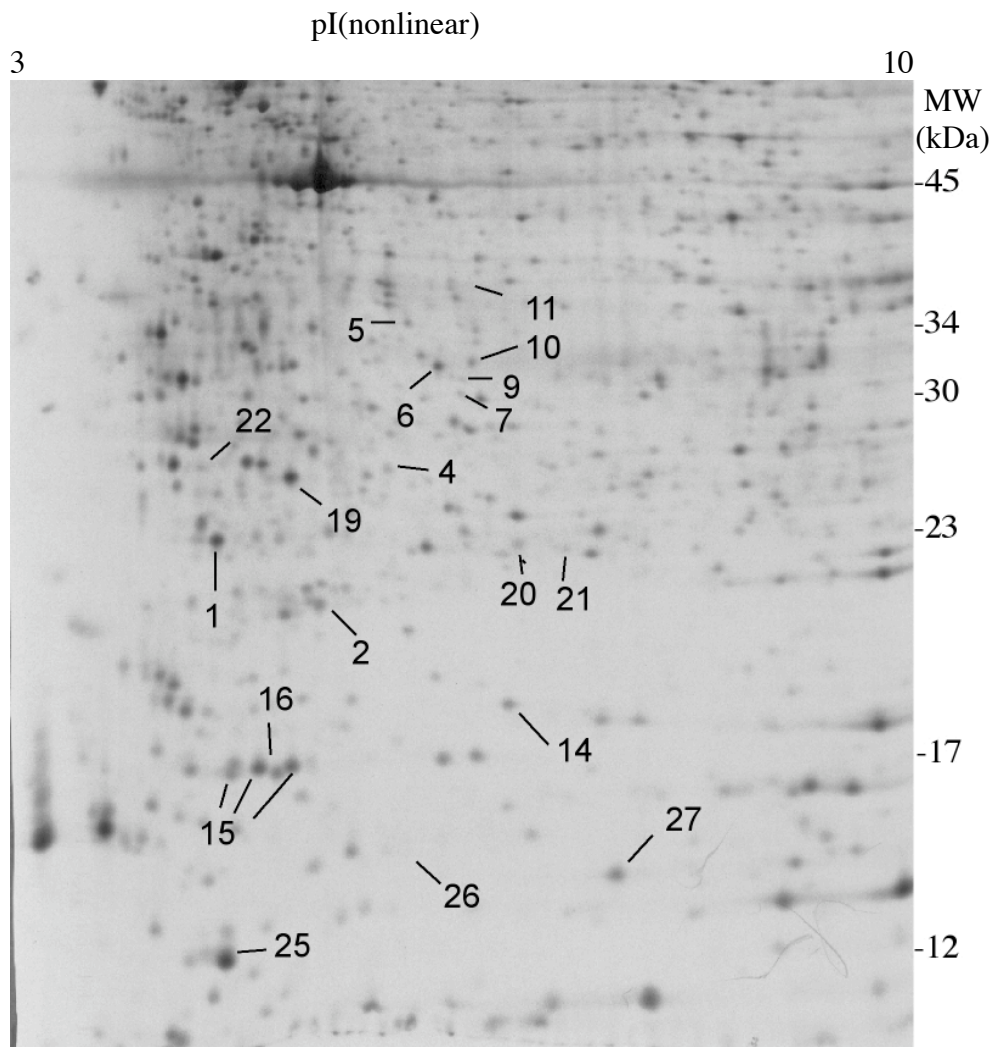
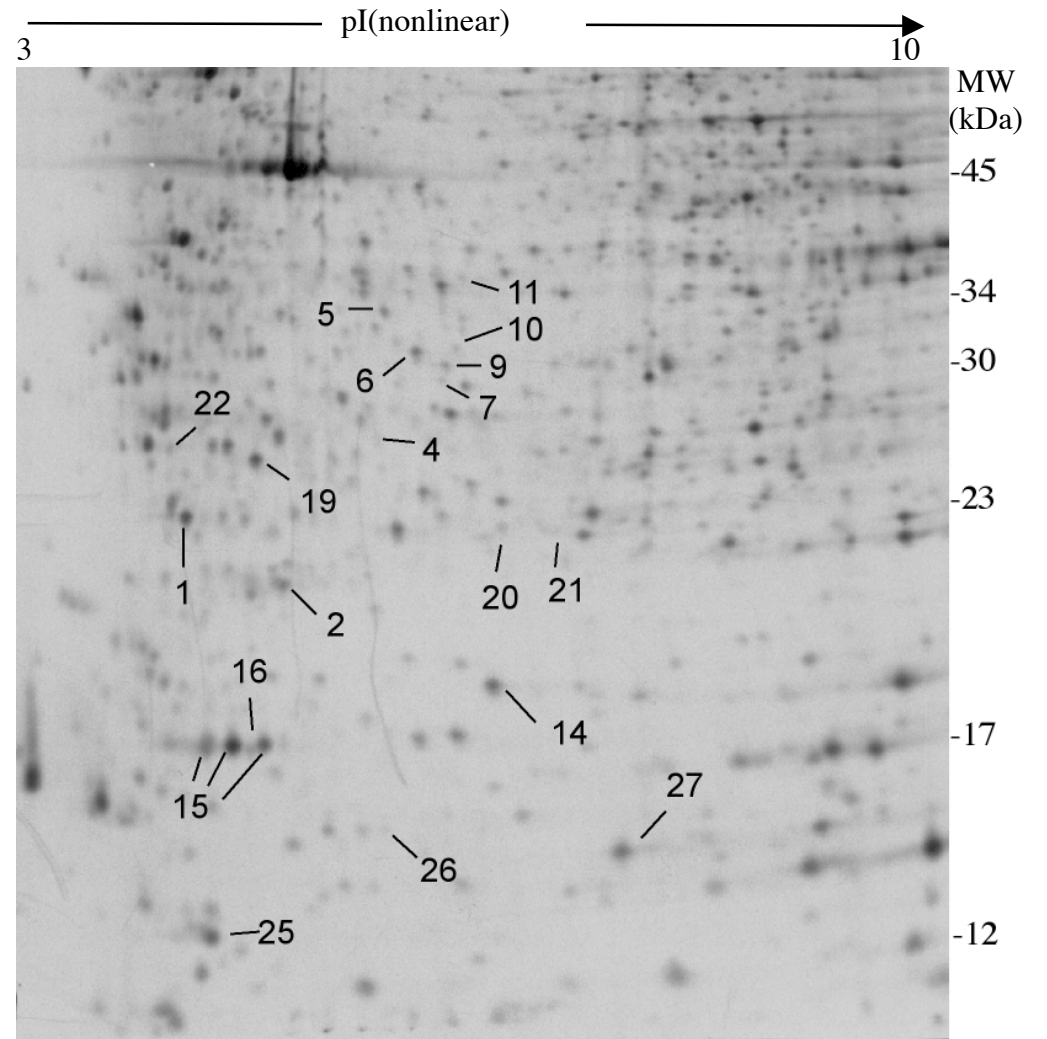


Abb. 4 Adenoid-B-Lymphozyten ohne EBV



Adenoid-B-Lymphozyten + EBV



## Ergebnisse

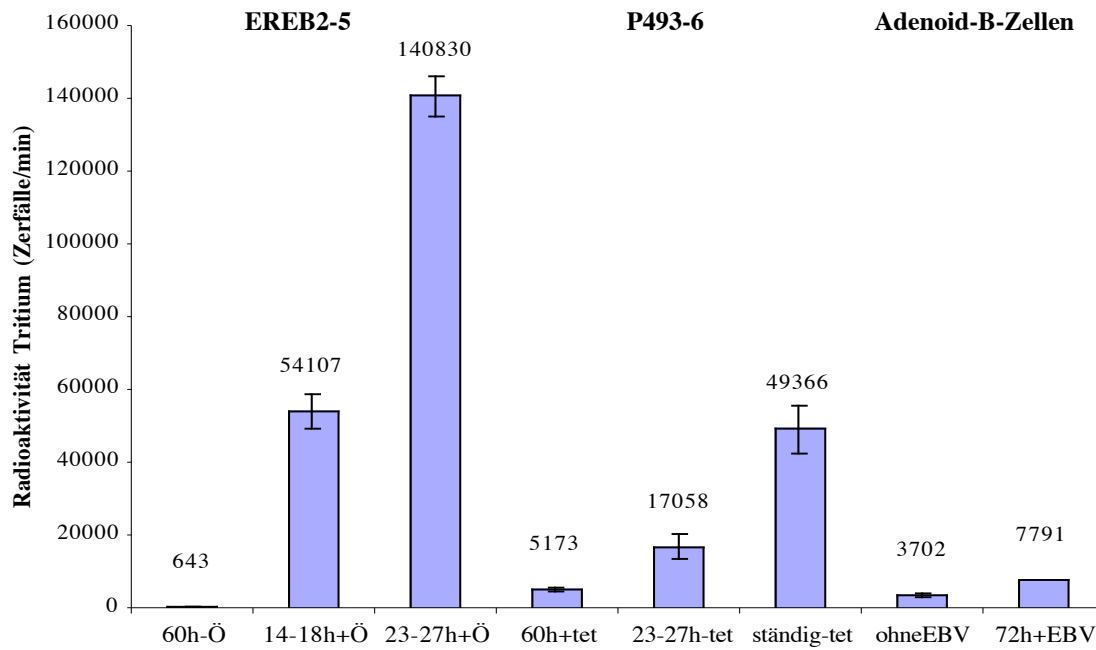
Spot-Nr.	Funktion	Locus	Name (englisch)	Induktion					
				EREB2-5 8h +EBNA2	P493-6 8 h +myc	EREB2-5 26 h IL4	EREB2-5 26 h EBNA2	Adenoid-B-Zellen 3 Tage EBV	Adenoid-B-Zellen 3 Tage EBV(Ag)
14	DNA-Metabolismus?	A33386	NM23-H1g	10,53*	3,86*	3,27	11,24	1,75	1,58
5	Nukleotid-Metabolismus	AAH01022	Inorganic Pyrophosphatase	6,40*	2,03*	1,08	1,97	1,42	1,89
15,1	mRNA-Transport	IF5A_HUMAN	eIF-5A, acid (nonhyposinylated)Form	2,93*	1,47	1,50	2,33	1,06	0,81
15,2	mRNA-Transport	IF5A_HUMAN	eIF-5A, basic (hyposinylated) Form	6,83	2,04	1,52	3,55	1,28	1,23
11	Protein-Anabolismus	R5HUPO	Acid Ribosomal Protein PO	3,39	1,51	1,93	4,95	2,43	1,13
22	Protein-Katabolismus	A40085	Ubiquitin Thiolesterase L3 (UCHL3)	3,64	1,38	1,82	3,71	1,32	0,97
9	Protein-Katabolismus	AAH01423	Ki Autoantigen (PA28[ $\square$ ])	5,64*	1,63	1,33	3,69	1,67	1,95
27	Lipidstoffwechsel	1B56	Fatty Acid Binding Protein	33,11*	5,79*	3,54	19,16	1,01	1,16
10	Stress-Antwort	ANX4_HUMAN	Annexin IV	0,35	0,94	0,77	0,38	0,54	0,76
20	RedOx-Status	GTP_HUMAN	Glutathion S Transferase P	0,37	0,72	0,36	0,32	n.d	n.d
21	RedOx-Status	Q96HK4	Peroxioredoxin 3	0,41	0,49	0,62	0,25	0,61	0,96
25	RedOx-Status	THIO_HUMAN	Thioredoxin	4,83*	2,27	2,50	4,01	0,56	0,75
1	Immunologie	S06590	IgE-dependent Histamine Releasing Factor	1,80	1,15	1,39	1,92	0,81	1,05
4	Zytoskelett	AAA51580	[ $\square$ ]Actin	0,55	0,98	1,17	0,80	1,34	0,79
6	Zytoskelett	CAPB_HUMAN	F- Actin Capping Protein $\beta$ -Subunit	0,67	0,84	1,01	0,73	0,83	0,84
19	Zytoskelett/Signaling	A47742	Ly-GDI	0,74	0,82	0,88	0,64	0,77	0,71
7	Signaling?	Q9UKY7 oder Q96IP9	AF103803 (Target mRNA of Her2/neu) "short" AF103803	0,47	0,87	0,87	0,65	0,76	0,92
16	Signaling?	GLMG_HUMAN	Glia Maturation Factor [ $\square$ ]	0,63	0,94	0,75	0,42	0,33	0,62
2	Apoptose	AAH09197	BID	1,85	0,83	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

**Tabelle 1: EBNA2-Target-Proteine** ausgewertet aus der 2D-Gel-Autoradiographie <sup>35</sup>S markierter Gesamt-Zell-Lysate oder aus Silber-gefärbten Gelen „(Ag)“. Die Induktion ist im Vergleich zum nichtinduzierten Zustand dargestellt. Im Vergleich EREB2-5 –EBNA2 versus 8h + EBNA2 wurden 4 Experimente mit 6 unterschiedlichen Probengelen berücksichtigt, im Vergleich EREB2-5 –EBNA2 versus 24h IL4, 24h +EBNA2 wurden 2 Experimente mit 9 (3+3+3) unterschiedlichen Probengelen ausgewertet, im Vergleich P493-6 –Myc versus 8h +Myc wurden 2 Experimente mit je 6 unterschiedlichen Probengelen berücksichtigt, im Vergleich Adenoid-B-Zellen wurden 3 Patienten analysiert. \* wurden in denselben Systemen auch in RNA-Analyse-Screens gefunden (Kaiser et al., 1999a/b, Schuhmacher et al., 2001)

## Ergebnisse

Spot-Nr.	Funktion	Locus	Name (englisch)	MW (theor.)	pI (theor.)	Mowse Score	Sequenz-Abdeckung (%)
1	Immunologie	S06590	IgE-Dependent Histamine Releasing Factor	19697	4,84	184	62
2	Apoptosis	AAH09197	BID	22152	5,27	103	75
4	Zytoskelett	AAA51580	□-Actin	26147	5,65	105	59
5	Nukleotid-Metabolismus	AAH01022	Inorganic Pyrophosphatase	33095	5,54	210	80
6	Zytoskelett	CAPB_HUMAN	F- Actin Capping Protein $\beta$ -Subunit	30952	5,36	197	65
7*	Signaling	Q9UKY7	AF103803 (Target mRNA von Her2/neu)	27318	6,06	92	56
		oder Q96IP9	"Short" AF103803	22066	5,68	98	68
9	Protein-Katabolismus	AAH01423	Ki Autoantigen (PA28□)	29602	5,69	126	60
10	Stress- Antwort	ANX4_HUMAN	Annexin IV	35957	5,85	149	50
11	Protein-Anabolism	R5HUPO	Acidic Ribosomal Protein PO	34423	5,71	175	43
14	DNA-Metabolism	A33386	NM23-H1g	17309	5,83	150	94
15,1	mRNA-Transport	IF5A_HUMAN	eIF-5A, acid (nonhypusinylated)Form	16918	5,08	95	78
15,2	mRNA-Transport	IF5A_HUMAN	eIF-5A, acid (hypusinylated)Form	16918	5,08	95	78
16	Signaling	GLMG_HUMAN	Glia Maturation Factor □	16961	5,18	96	51
19	Zytoskelett/Signaling	A47742	Ly-GDI	23031	5,1	142	73
20	RedOx-Status	GTP_HUMAN	Glutathion S Transferase P	23438	5,44	117	59
21	RedOx-Status	Q96HK4	Peroxiredoxin 3	28044	7,11	122	64
22	Protein-Katabolismus	A40085	Ubiquitin Thiolesterase L3	26337	4,84	137	61
25	RedOx-Status	THIO_HUMAN	Thioredoxin	11884	4,82	132	90
27	Lipidstoffwechsel	1B56	Fatty Acid Binding Protein	15295	6,54	170	75

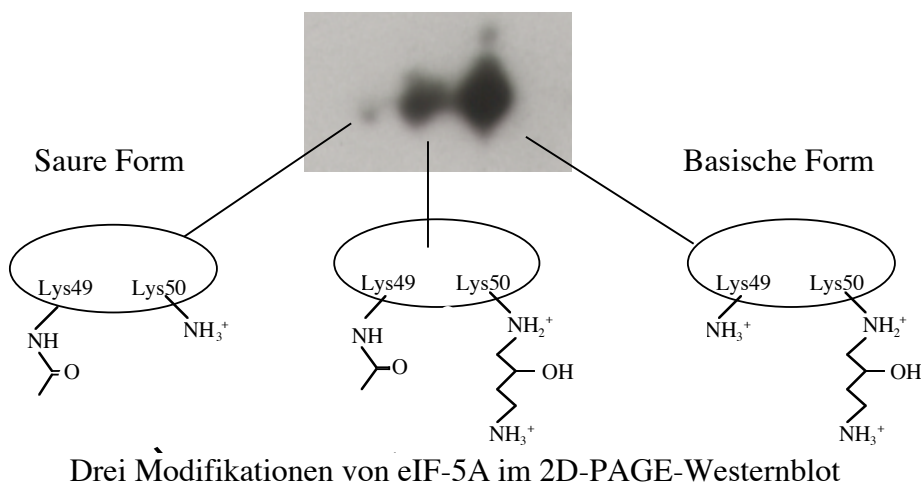
**Tabelle 2: EBNA2-Target-Proteine** identifiziert aus 2D-Gelen <sup>35</sup>S markierter Gesamt-Zell-Lysate. Die angegebenen theoretischen Werte für pI und Molekulargewicht (MW) stimmen tendentiell mit den beobachteten Werten überein. Die Sequenzabdeckung gibt wieder, welcher Anteil der bekannten Proteinsequenz als Peptide im MALDI-ToF-MS-Spektrum wiedergefunden wurde. Angegeben ist der Wahrscheinlichkeits-basierte Mowse Score. Suchergebnisse (Datenbank MSDB) mit Scores größer als 69 gelten als signifikant (p<0.05). \* bei Spot Nr. 7 ist vom Spektrum her offen, ob es sich um die kurze oder die lange Form von AF103803 handelt.



**Abb. 15** Thymidininkorporationsassay: Gemessen wurde der Einbau von  $^3\text{H}$ -Thymidin, ein Indikator für DNA-Replikation und somit Proliferation. EREB2-5 sind nach Zugabe von Östrogen (Ö) sowohl schneller als auch stärker aktiviert als P493-6 nach Entzug von Tetrazyklin (tet). Der Effekt 72h nach Infektion von Adenoid-B-Zellen mit EBV ist geringer.

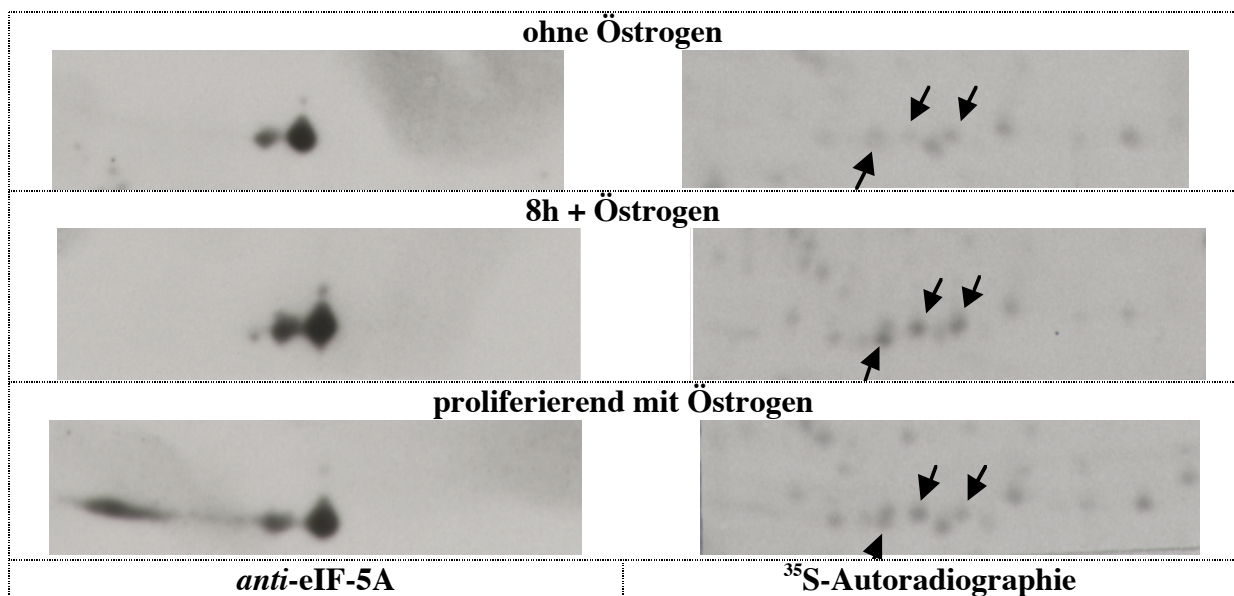
### 3.1.2 eIF-5A

Aus der Liste der EBV-Zielgene wurde eIF-5A für eine nähere Charakterisierung ausgewählt, da es das einzige Protein in dieser Arbeit darstellt, von dem eindeutig mehrere Modifikationen detektiert werden konnten, die sich hinsichtlich posttranslatiionaler Modifikationen unterscheiden (s.u., genaueres dazu in der Diskussion).



### 3.1.2.1 Zwei Formen von eIF-5A werden durch EBNA2, Myc und IL4 hochreguliert

In der 2D-Autoradiographie und durch MALDI-ToF-MS konnte eIF-5A als differentiell reguliertes Targetprotein von EBNA2, *c-myc* und IL4 identifiziert werden (Tabelle 1). Während die Identifikation im eindimensionalen Westernblot nicht klar ersichtlich war (Daten nicht gezeigt), so konnte im 2D-Westernblot von EREB2-5 die Zunahme der sauren Modifikation detektiert werden (Abb. 6). In der Autoradiographie zeigten sich innerhalb mehrerer Versuche, in denen EREB2-5 Zellen verschiedenen Alters und mit unterschiedlichen Seren kultiviert wurden, nur zwei Formen (die saure und die im 2D-PAGE benachbarte Form) reproduzierbar reguliert.

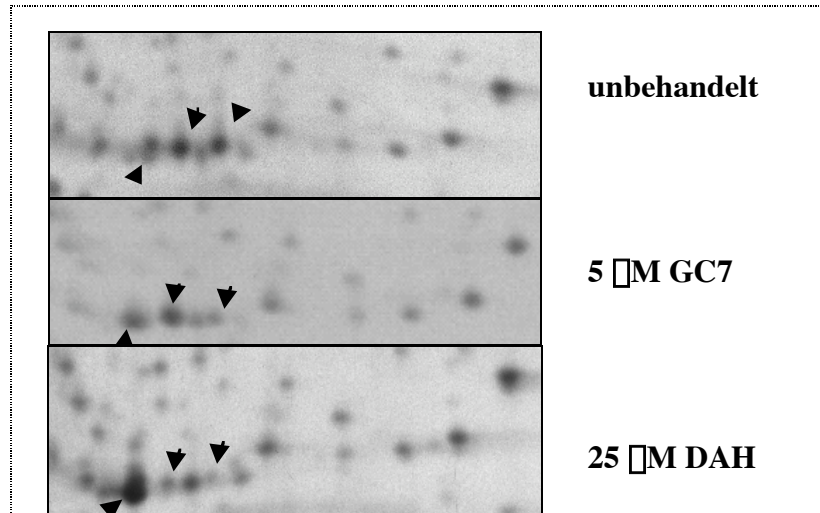


**Abb. 6:** 2D-Westernblot (links) versus <sup>35</sup>S-Autoradiographie (rechts) von EREB2-5 Totallysate ohne Östrogen, 8h mit Östrogen und ständig mit Östrogen expandiert. Alle drei Modifikationen von eIF-5A nehmen unter Einfluß von EBNA2 zu, was in der Autoradiographie (siehe Pfeile) deutlicher wird als im Westernblot.

### 3.1.2.2 Charakterisierung posttranslatiöner Modifikationen

Um herauszufinden, welche Proteinspots den hypusinylierten Formen entsprechen, wurden proliferierende EREB2-5 mit den gegenüber Spermidin kompetitiven Inhibitoren der Hypusinylierung 1,7-Diaminoheptan oder GC7 (N1-Guanyl-1,7-Diaminoheptan) inkubiert und im <sup>35</sup>S-2D-PAGE analysiert. Es zeigte sich eine Anreicherung der sauren Form und eine Verminderung der beiden basischeren Formen (Abb. 7).

**Abb. 7:**  $^{35}\text{S}$ -Autoradiographie vom Totallysat proliferierender EREB2-5 mit Östrogen. Oben: unbehandelt, Mitte: nach 5 Tagen Inkubation mit 5  $\mu\text{M}$  N1-Guanyl-1,7-Diaminoheptane (GC7), unten: nach 5 Tagen Inkubation mit 25  $\mu\text{M}$  Diaminoheptan (DAH).



Eine Acetylierung an Lys47 oder an anderer Stelle konnte jedoch nicht eindeutig im MALDI-ToF-MS nachgewiesen werden, noch hatte die Zugabe von Deacetylasehemmern wie Natriumbutyrat oder Trichostatin A Auswirkungen auf die Modifikationen von eIF-5A (Daten nicht gezeigt).

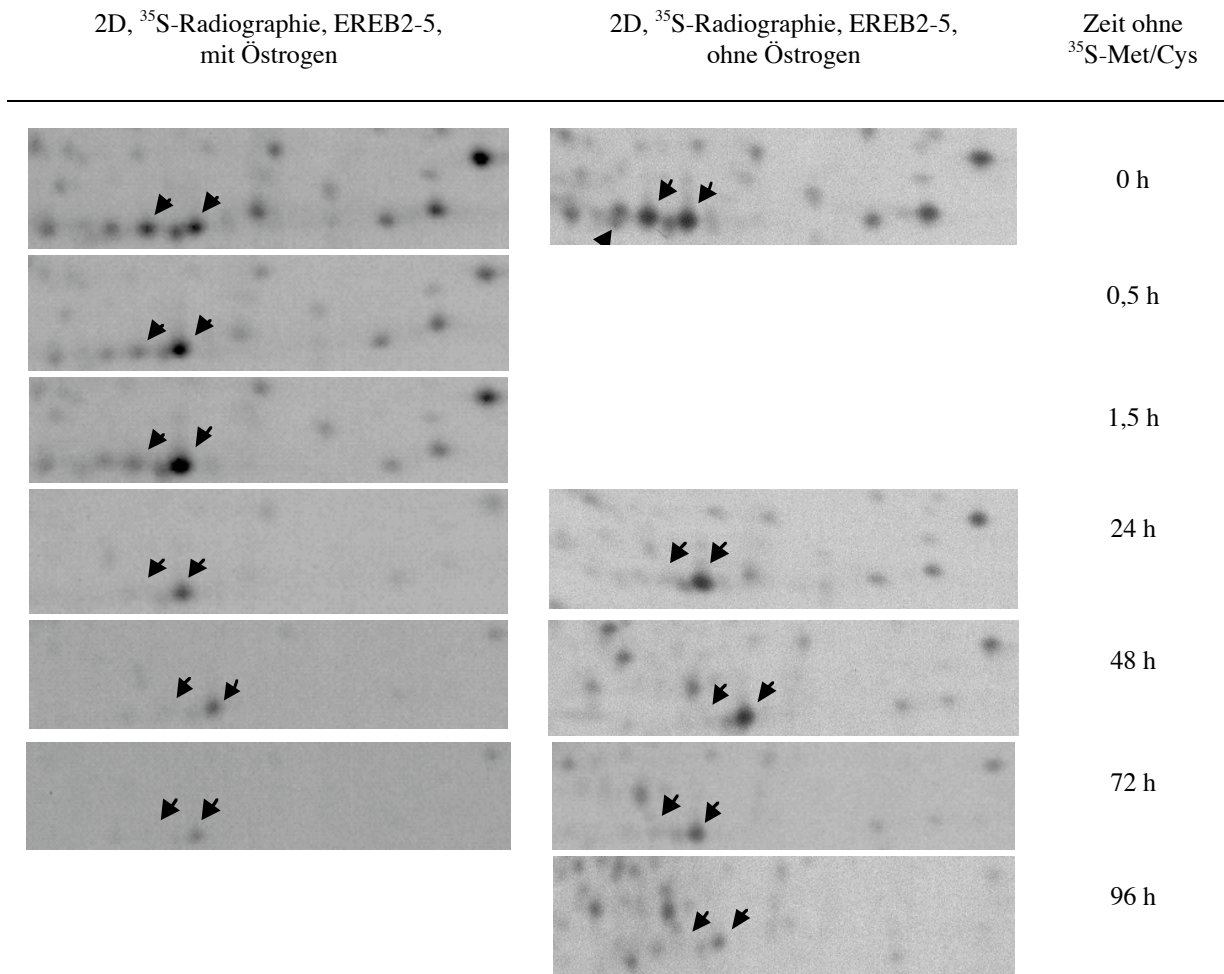
### 3.1.2.3 Haltbarkeit der Modifikationen

In einem Pulse-Chase Experiment wurden *in vivo*  $^{35}\text{S}$  metabolisch markierte Zellen anschließend in Medium mit nichtradioaktiven Aminosäuren gehalten. Während die saure und benachbarte Form schon nach 1/2 h Inkubation in nichtradioaktivem Medium deutlich in ihrer Radioaktivität abnahmen, wurde das Signal der basischen Form erst nach 24h schwächer (Abb. 8). Das gleiche Experiment in EREB2-5-Zellen ohne Östrogen zeigte dagegen erst eine Abnahme der basischen Modifikation nach 72h. Dieses Phänomen des geringeren Proteinabbaus in arretierten EREB2-5 gilt auch für andere Proteine und erklärt die Diskrepanz zwischen  $^{35}\text{S}$ -Signalen auf der einen Seite und Silberfärbung oder Westernblots auf der anderen Seite in EBNA2-Induktionskinetiken.

### 3.1.2.4 Biologische Relevanz der Modifikationen

Innerhalb der Doktorarbeit wurden EREB2-5 Zellen unterschiedlichen Alters und zwei verschiedene Seren („I“ und „II“) im Zellkulturmedium verwendet. In einer jungen EREB2-5 Linie, die mit Serum I kultiviert wurde, war jedoch die basische Form nicht immer präsent (vergl. Abb. 2 und Abb. 7), was bedeutet, dass zumindest diese eIF-5A-Form für das Überleben der Zellen nicht essentiell ist.

## Ergebnisse



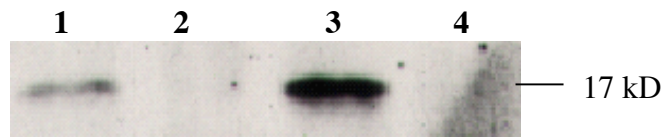
**Abb. 18:** „pulse-chase“

Unter Östrogen proliferierend (links) oder direkt nach Östrogenentzug (rechts) wurden EREB2-5 Zellen 4h *in vivo* <sup>35</sup>S-markiert und anschließend in für die angegebene Zeitspanne in Medium ohne radioaktive Aminosäuren gehalten. In der 2D-Autoradiographie der Totallysate zeigt sich, dass die basische Form von eIF-5A die stabilste der drei Formen ist. Nach Östrogenentzug ist der Proteinabbau geringer als mit Östrogen.

In der Arbeiten von Bevec et al. (1996) und Kruse et al.(2000) wurde eine Funktion von eIF-5A bei dem Transport von HIV-RNA und zellulärer RNA beschrieben.

Um die *in vivo* Relevanz von eIF-5A im Kontext des mRNA-Transportes in LCLs zu untersuchen, wurden eine leicht transfizierbare LCL-Linie "1.11" (immortalisiert mit *wt* B95.8, Falk Nimmerjahn) und die EBV-negative Burkitt Lymphom Zell-Linie DG75 mit dem episomalen Expressionsvektor PINCO (Nolan-Labor) transfiziert, der eine dominant negative, für Rev1/HIV transportdefiziente Mutante „M14“ unter der Kontrolle eines CMV-Promotors exprimiert. Nach Selektion mit Puromycin (1µg/ml) konnten stabil transfizierte Zellen erhalten werden, in deren Zell-Lysaten sich FLAG-getaggetes M14 nachweisen ließ (Abb. 19). Außerdem wurden mit dem GFP-exprimierenden Ursprungsvektor PINCO transfizierte, stabile Zell-Linien unter Puromycinselektion generiert. Lysate aus M14-transfizierten Zellen, GFP-Kontrollzellen und Wildtyp-Zellen wurden im 2D-PAGE analysiert. Es konnten jedoch

keine signifikanten Unterschiede im Proteinexpressionsmuster gefunden werden. Zusätzlich ergaben FACS-Messungen keine Unterschiede der CD83 Expression (Diana Dudziak, pers. Mitteilung). Die CD83 mRNA wurde als von eIF-5A transportierte mRNA publiziert (Kruse et al., 2000). Der fehlende Phänotyp der M14-Expression könnte auch auf eine zu schwache Expression von M14 in diesen Zellen zurückzuführen sein: M14 war im 2D-Gel in beiden Zell-Linien weder in der Silberfärbung noch in der <sup>35</sup>S-Autoradiographie als separater Proteinspot detektierbar.



**Abb. 19:** Anti-FLAG Western Blot stabiler B-Zell-Linien: 1: LCL(1.11) + PINCO-M14-FLAG; 2: LCL(1.11)+ PINCO-GFP; 3: BL(DG75)+PINCO-M14 FLAG; 4: BL(DG75) + PINCO-GFP. Stabile Zell-Linien exprimieren die FLAG-getaggte, transportdefiziente, negativ dominante Form von eIF-5A (M14-FLAG), wobei die LCL-Linie (immortalisiert mit EBV Typ B95.8) weniger M14 Protein exprimierte als die BL-Zell-Linie DG75.

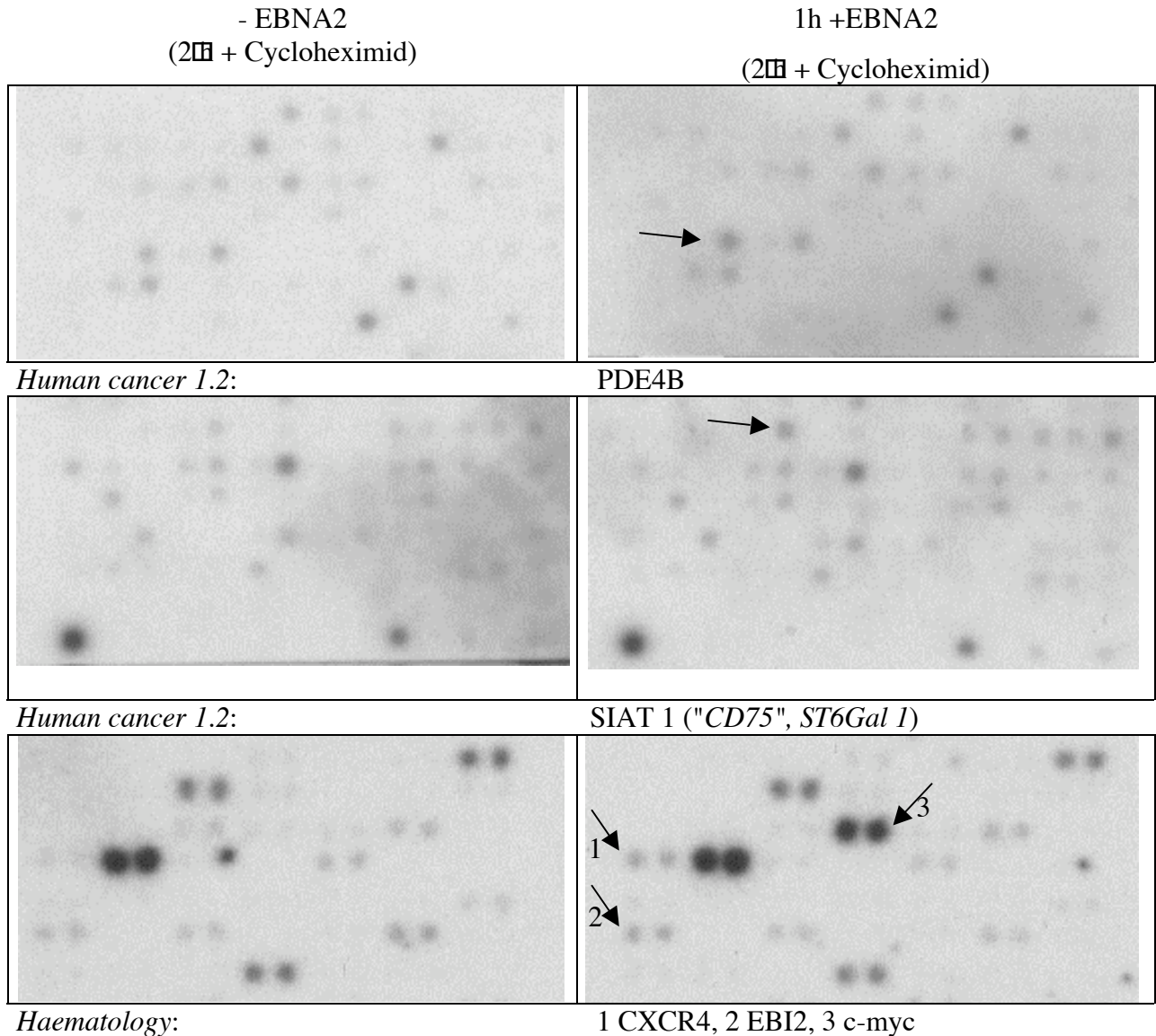
## 3.2 Nukleäre Run-On-Experimente

### 3.2.1 Screening mit *Clontech*-Membran-Microarrays

Da im Proteom-Ansatz EBNA2-Targetproteine erst frühestens 4-5h nach Östrogenzugabe detektierbar waren und 75% der gefundenen Targets ebenso durch MYC reguliert wurden, erschien es unwahrscheinlich, dass es sich bei den gefundenen Targets um direkte von EBNA2 induzierte Proteinmodifikationen oder Zielgene handelt. Deshalb wurde ebenfalls eine Methode angewandt, um sehr sensitiv und sehr früh die Wirkung von EBNA2 auf die Expression von Zielgenen untersuchen zu können.

Beim nukleären Run-On werden Zellkerne isoliert und eingefroren. Dadurch werden RNA-Polymerase-Komplexe in dem Abschnitt eines Genes, in dem sie sich zum Zeitpunkt der Isolation befunden haben, fixiert. Nach dem Auftauen bei 27°C in Gegenwart von Nukleotidhaltigem Reaktionspuffer kommt es innerhalb dieser fixierten Transkriptionsblasen wieder zum Einbau von Nukleotiden, so dass durch Zugabe von [ $^{32}$ P]-CTP Primärtranskripte radioaktiv markiert werden. Die Einbaurrate korreliert dann mit der Anzahl der Polymerasekomplexen innerhalb eines Genes und dies wiederum spiegelt die Promotoraktivität eines Genes wider. Dabei spielt die Stabilität einer mRNA keinerlei Rolle. Auf diese Weise können Unterschiede in der Promotoraktivität innerhalb weniger Minuten nach einem Stimulus detektiert werden. Da im verwendeten System (ERE2-5) nicht klar ist, welche Zeit Östrogen benötigt, um in die Zelle zu gelangen, wurden ERE2-5 Zellen ca. 16h ohne Östrogen gehalten, dann 1h mit 20nM Östrogen inkubiert und geerntet. Um direkte Zielgene eindeutig zu identifizieren, wurde zu ERE2-5-Zellen bereits 1h vor der Induktion mit Östrogen der Proteinsynthese-Inhibitor Cycloheximid gegeben. Kontrollzellen wurden entsprechend ohne Östrogen behandelt. Die markierten Primärtranskripte wurden mit Filterarrays der Firma *Clontech* hybridisiert. Auf die Filter waren cDNA-Sonden von Genen gespottet, denen im Bereich Immunologie (*Haematology*) oder Tumorentstehung (*Cancer* 2) besondere Bedeutung zukommt. Resultierende Autoradiographien wurden qualitativ ausgewertet und sind für die direkt induzierten Zielgene in Abb. 20 dargestellt.





**Abb. 20:** <sup>32</sup>P-Autoradiographien von Run-On-Hybridisierungen mit Arrays der Firma Clontech (Name des Produktes jeweils unter der Abbildung). EREB2-5-Zellen wurden 16h ohne Östrogen gehalten, dann zuerst 1h mit Cycloheximid und eine weitere Stunde mit 2 $\mu$ M Östrogen und Cycloheximid inkubiert ("mit Cycloheximid"). Die Kontrollen wurden entsprechend aber ohne Östrogen behandelt.

Entsprechend der These, dass EBV die Aktivierung von B-Zellen simuliert, lassen sich die meisten frühen identifizierten Zielgene funktionell dem Bereich Immunologie zuordnen (Tabelle 3). Sechs Gene (CXCR4, CCRD6, MIP1a, CD44, SIAT1 und CD22) sind dabei an Chemotaxis und Homing beteiligt. Weitere oder z.T. dieselben Zielgene (SIAT1, CD22, CD23 und B7.2) wurden als Regulatoren bzw. kostimulatorische Rezeptoren der B-Zellaktivierung beschrieben (siehe auch OMIM-Datenbank). CCRD6 und MIP1a einerseits, SIAT1 und CD22 andererseits stellen jeweils Rezeptor-Ligand-Paare dar.

## Ergebnisse

Induzierte Zielgene (1h EBNA2)		Accession	(Funktion)
2h mit Cycloheximid	Ohne Cycloheximid		
CXCR4	CXCR4*	D10924	(Chemokinrezeptor)
EBI2	EBI2**	L08177	(Chemokinrezeptor)
	CCRD6*	Y12815	(Chemokinrezeptor)
	MIP1□*	M23452	(Chemokin)
	ARHH*	NM_004310	(Ras-ähnliche GTPase)
B7.2	B7.2	L25259	(Kostimulatorischer Rezeptor)
CD23	CD23**	M15059	(Kostimulatorischer Rezeptor)
	CD22□/□*	X52785/X59350	(BCR-Signaling, Homing)
	CD44*	M59040	(Rezeptor, Homing)
SIAT1	SIAT1*	X62822	(Sialyltransferase, Homing)
PDE4B	PDE4B <sup>+</sup>	L12686	(Phosphodiesterase)
c-myc	c-myc**	V00568	(Transkriptionsfaktor,) (Transkriptionsfaktor, Onkogen, Differenzierungs- und Wachstumskontrolle )
	ETS1*	J04101	
	RUNX3**	Z35278	(Transkriptionsfaktor)
	HHEX*	L16499	(Transkriptionsfaktor)

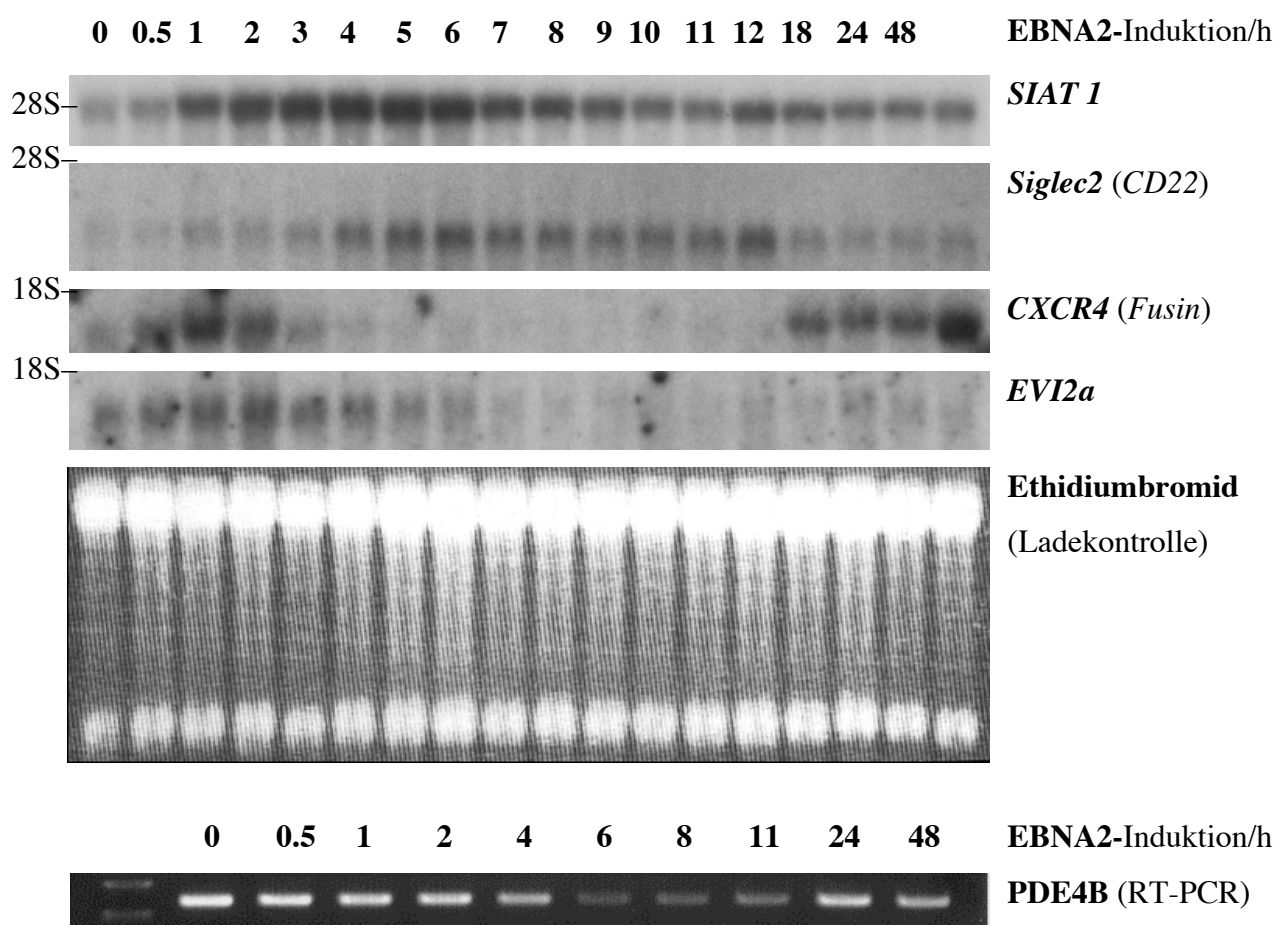
  

Reprimierte Zielgene (1h EBNA2)		Accession	(Funktion)
2h mit Cycloheximid	Ohne Cycloheximid		
EVI2a	EVI2a*	M55267	(Transmembranprotein?)
	ADA	P00813	(Adenosindeaminase)

**Tabelle 3:** Im nukleären Run-On-Experiment nachgewiesene Zielgene von EBNA2 in EREB2-5-Zellen. Die Zellen wurden 28h ohne Östrogen gehalten, dann 1h mit 2µM Östrogen ("ohne Cycloheximid") oder zuerst 1h mit Cycloheximid und eine weitere Stunde mit 2µM Östrogen und Cycloheximid inkubiert ("mit Cycloheximid"). Die Kontrollen wurden entsprechend aber ohne Östrogen behandelt. Mit Cycloheximid gefundene Targets sind primäre EBNA2-Targets. \*Bestätigung als entsprechend reguliertes Target im Northern Blot oder in der Real-Time-PCR. \*\*In der Literatur bestätigte Targets von EBNA2. <sup>+</sup> auf mRNA-Ebene nicht oder anders reguliert.

### 3.2.2 Zielgenvalidierung mit Northernblot und Lightcycler-PCR

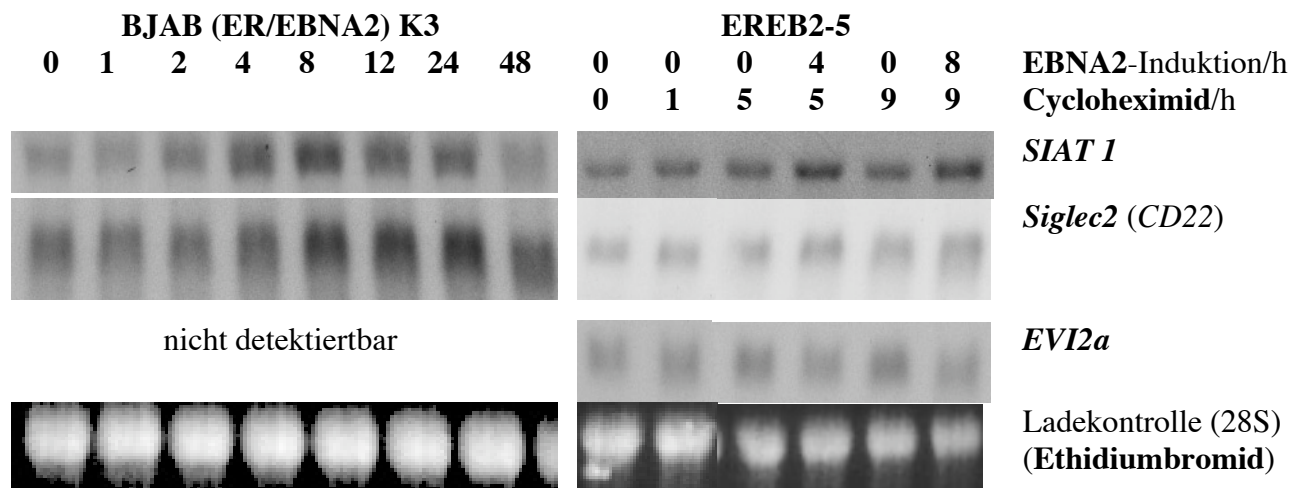
Zusätzlich wurde von allen im Run-On identifizierten frühen Zielgenen mRNA-Analysen (entweder Northernblots oder Real-Time-PCRs) mit Cycloheximid durchgeführt, um diese als direkte Zielgene zu bestätigen oder zu identifizieren. Dabei wurden EREB2-5-Zellen 1h mit Cycloheximid präinkubiert, anschließend 4h oder 8h mit Östrogen stimuliert und die Genexpression mit der jeweiligen unstimulierten Kontrolle verglichen (Abb. 2,23).



**Abb. 21:** Northernblot einer EBNA2-Induktionskinetik in EREB2-5-Zellen von im Run-On identifizierten primären oder frühen Zielgenen.

Zur weiteren Validierung der Zielgene wurden Induktionskinetiken der EBNA2-Gene in EREB2-5-Zellen durchgeführt (Abb. 21,24), die nicht mit Cycloheximid behandelt waren. Diese weitere Kontrolle in einer EBNA2-Induktionskinetik ist erforderlich, weil man im Run-On-Experiment lediglich Promotoraktivität nicht jedoch Polymeraseaktivität (Syntheserate), RNA-Prozessierung, -Transport und -Stabilität detektiert.

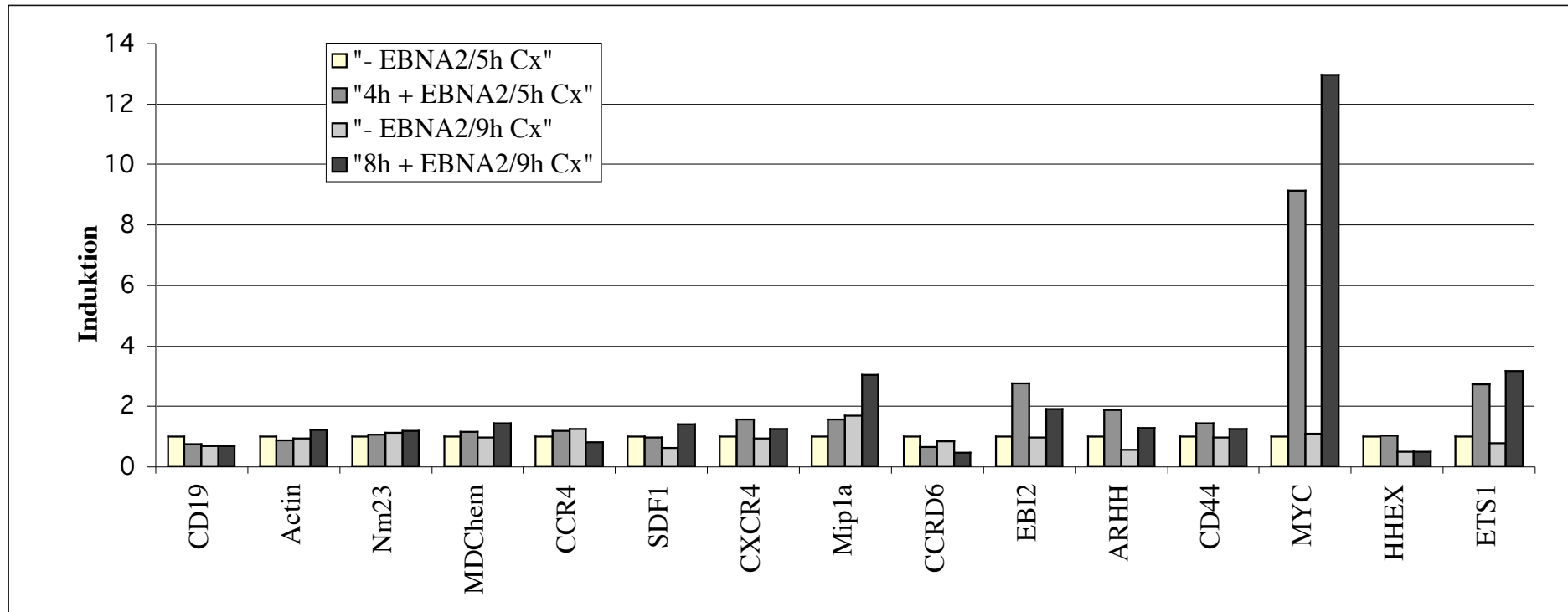
Die Induktionskinetiken aus EREB2-5-Zellen wurden durch Induktionskinetiken in einer weiteren Zell-Linie (BJAB-EREBNA2) ergänzt (Abb. 22, 24). In dieser Zell-Linie wird konstitutiv das ER-EBNA2-Fusionsprotein unter Selektion mit G418 exprimiert. Bei BJAB-Zellen handelt es sich um B-Zellen mit BL-ähnlichem Phänotyp (wie z.B. hohe Expression von c-myc), die jedoch nicht die für BLs charakteristische c-myc-Translokation aufweisen. Diese Zellen sind EBV-negativ und proliferieren unabhängig von EBNA2. Eine mit den übrigen Daten konforme EBNA2-abhängige Regulation eines Genes in diesem Zell-System gibt Aufschluß darüber, ob die Regulation ausschließlich einen EBNA2-Effekt darstellt, der unabhängig von den übrigen viralen Proteinen ist.



**Abb. 22:** Northern Blot EBNA2-Induktionskinetik in BJAB(ER-EBNA2) und EREB2-5-Zellen. EREB2-5-Zellen wurden vor der Induktion 1h mit Cycloheximid präinkubiert. Es wurden SIAT1-, Siglec2(a+b)- und EVI2a-Sonden verwendet.

Zusätzlich ist es wahrscheinlich, dass in diesem System durch EBNA2 regulierte Zielgene nicht zwingend für eine Proliferation von B-Zellen erforderlich sind, da die Zellen EBNA2-unabhängig proliferieren. Sind in diesem System bereits EBNA2-Zielgene im nichtinduzierten Zustand exprimiert (z.B. *c-myc*), handelt es sich vermutlich um Gene, die für die Proliferation erforderlich sind. Die Lightcycler-Daten wurden auf die ermittelte Menge an CD19-mRNA normiert. Nach FACS-Daten (Pajic et al., 2001, Markus Altmann, pers. Mitteilung) bleibt die CD19-Menge pro Zelle in Zellen mit und ohne EBNA2 oder EBV gleich, während Aktin und GAPDH nach einer Induktionsdauer von über 24h in EREB2-5 hochreguliert werden (Daten nicht gezeigt).

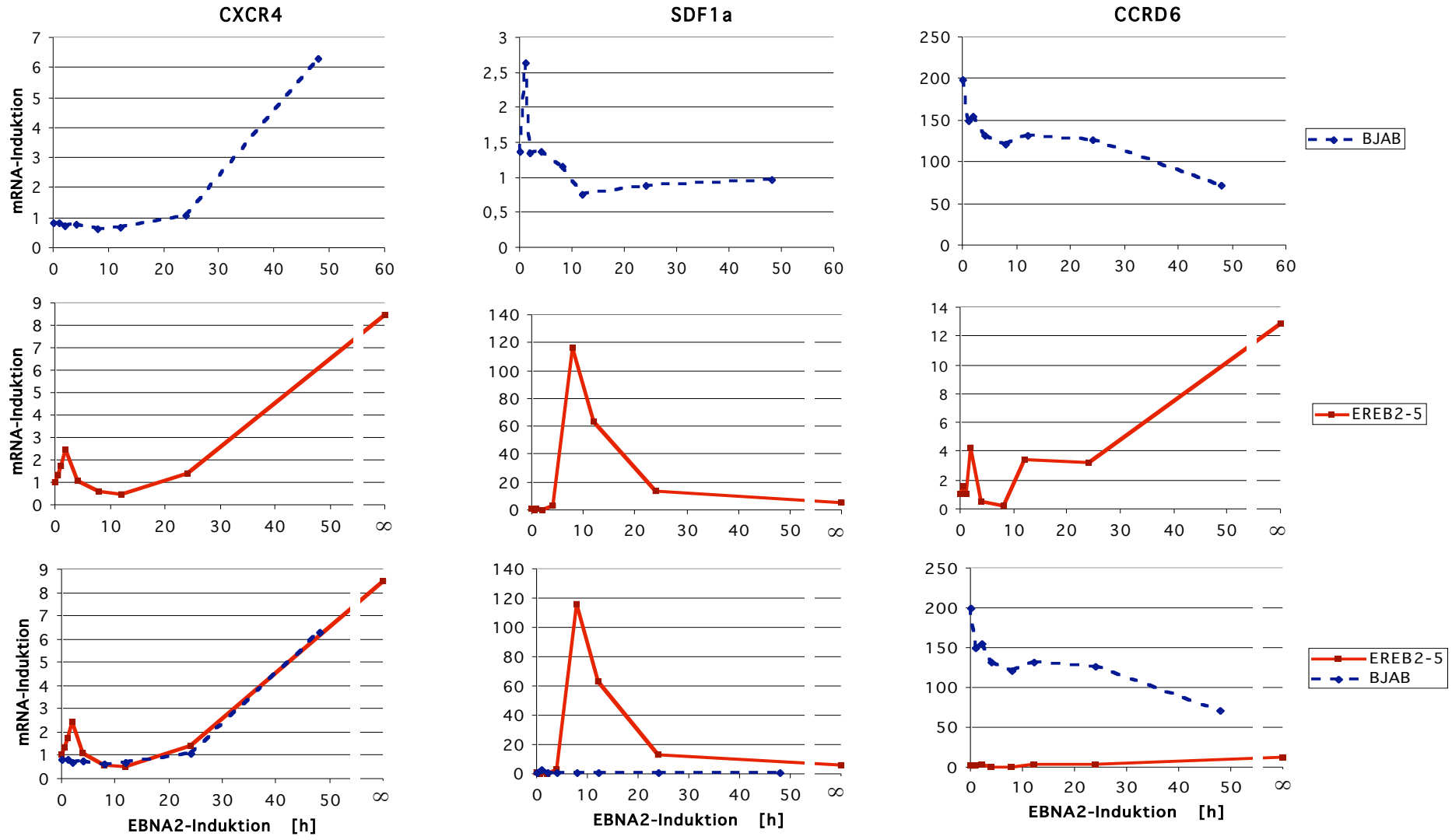
Neben den in der Run-On-Analyse gefundenen Genen wurden ebenfalls funktionell verwandte Gene wie korrespondierende Chemokine und Chemokinrezeptoren oder UDP-GalNac2-Epimerase (liegt im Sialylierungspathway der SIAT1) auf eine EBNA2-abhängige Regulation hin überprüft. Die UDP-GalNac2-Epimerase katalysiert einen essentiellen Schritt in der Sialylierungsreaktion von Gal-Resten. Die Ergebnisse aus den in den Diagrammen gezeigten Daten sind in Tabelle 4 zusammengefasst.



**Abb. 23:** Real-time-RT-PCR-Daten von EBNA2-Zielgenen. EREB2-5-Zellen wurden 1h mit Cycloheximid präinkubiert, anschließend 4h oder 8h mit Östrogen stimuliert und die Genexpression mit der jeweiligen unstimulierten Kontrolle verglichen. Die Daten wurden auf CD19-mRNA-Expression normiert.

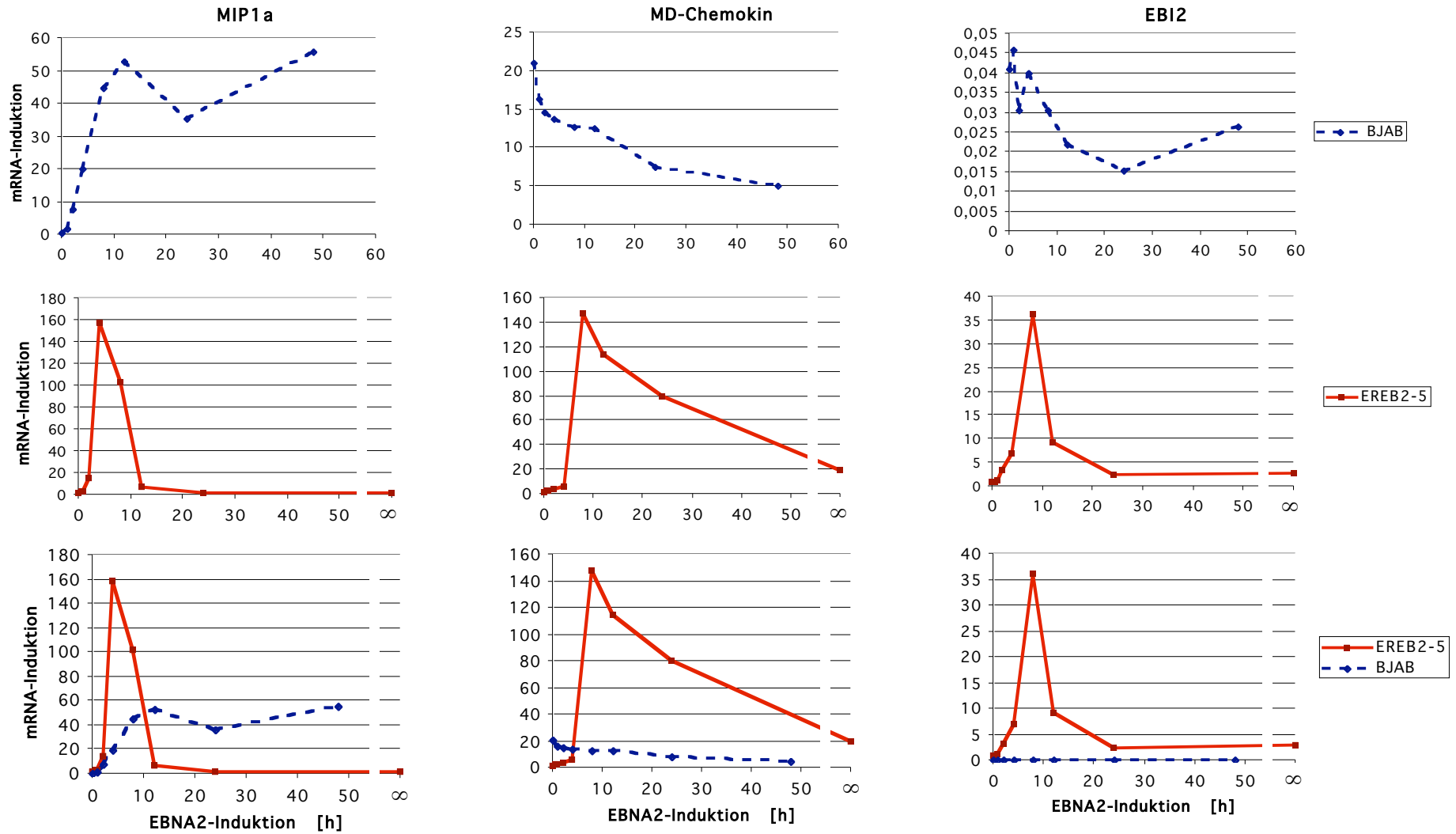
**Abb. 24:** mRNA-Induktionskinetiken von Genen nach Aktivierung von ER-EBNA2 durch Zugabe von Östrogen in EREB2-5 und BJAB-EREbNA2. Die mRNA-Quantifizierung erfolgte in Realtime-Lightcycler-RT-PCR. Induktionswerte (Y-Achse) sind gegen Zeit nach EBNA2-Aktivierung aufgetragen und stellen den Induktionsfaktor bezogen auf EREB2-5 im Östrogen-depletierten Zustand dar (dies gilt auch für die BJAB-Kinetiken). Alle mRNA-Werte wurden auf die Expression von CD19-mRNA normiert. Die EREB2-5-mRNA-Kinetik besteht aus den Zeitpunkten 0, 0.5, 1, 2, 4, 8, 12, 24 h nach EBNA2-Aktivierung zusammen mit ständig unter EBNA2 proliferierenden Zellen ( $\infty$ ). Die BJAB-EREbNA2-mRNA-Kinetik besteht aus den Zeitpunkten 0, 1, 2, 4, 8, 12, 24 und 48h nach EBNA2-Aktivierung.

# Ergebnisse



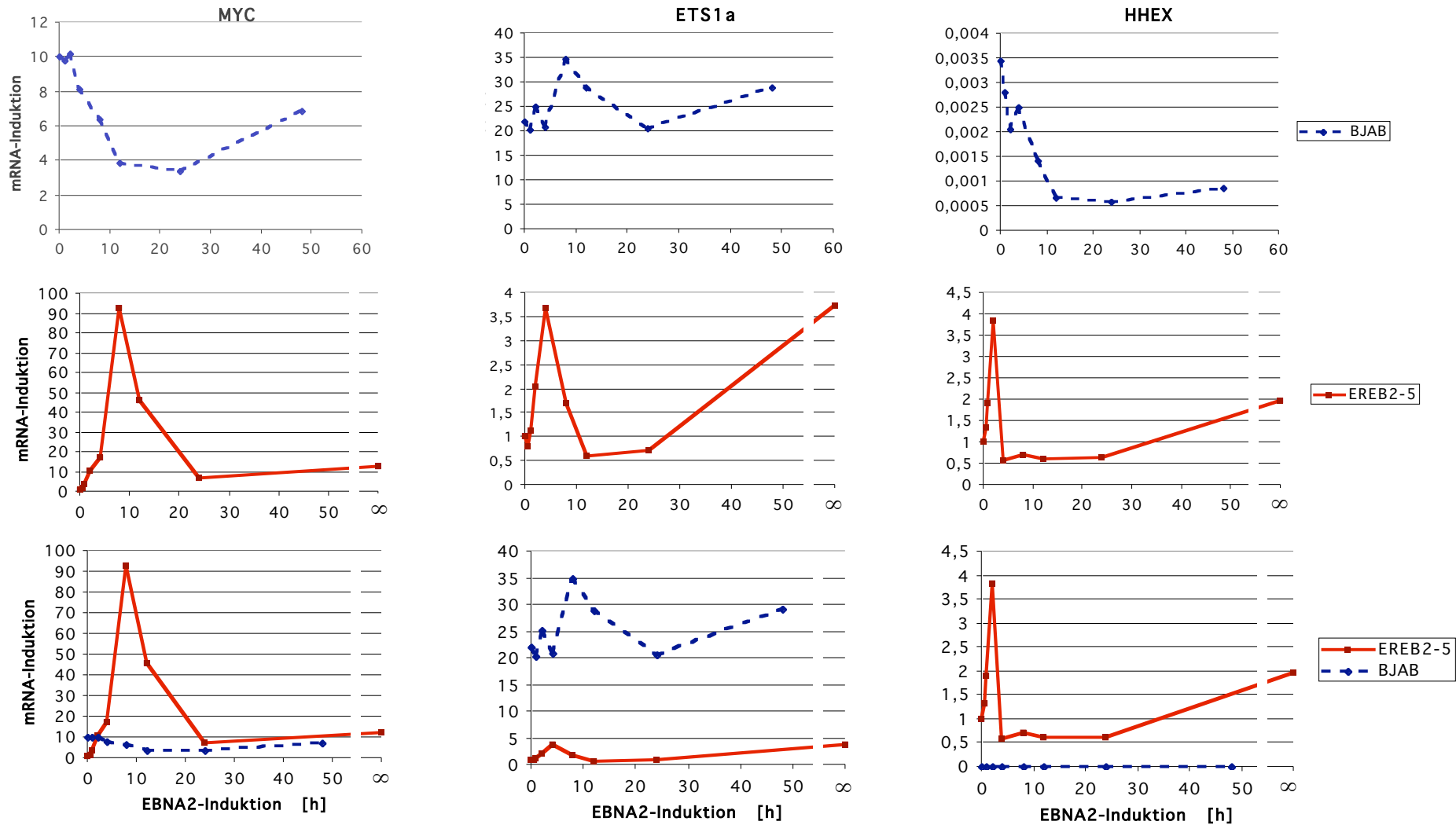
mRNA-Induktionskinetiken von Genen nach Aktivierung von ER-EBNA2 durch Zugabe von Östrogen in EREB2-5 und BJA2-EREBNA2, Legende s.o.

# Ergebnisse



mRNA-Induktionskinetiken von Genen nach Aktivierung von ER-EBNA2 durch Zugabe von Östrogen in EREB2-5 und BJAB-EREBA2, Legende s.o.

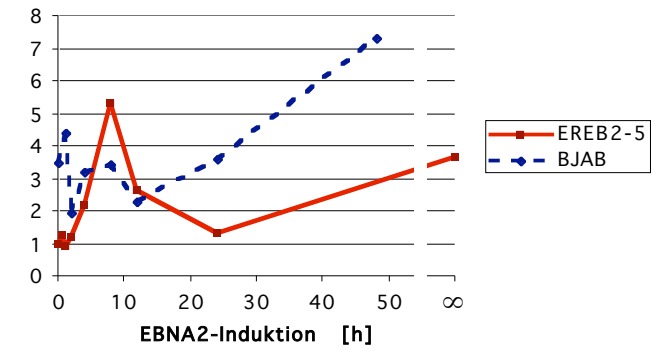
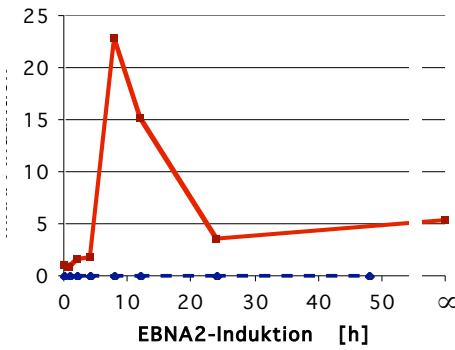
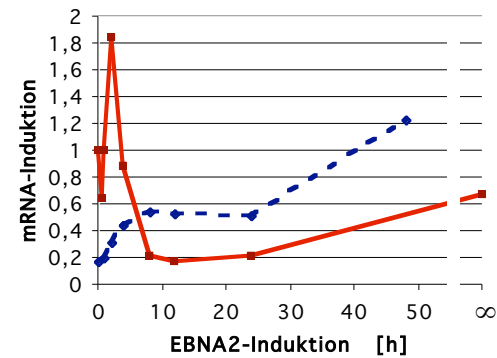
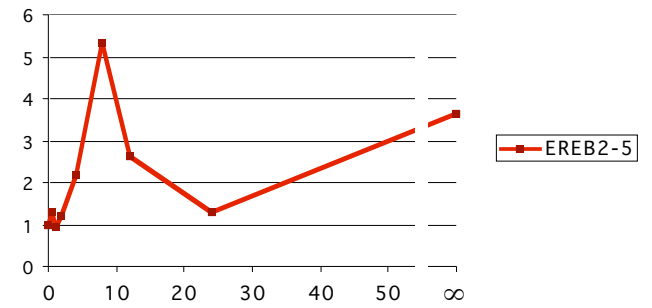
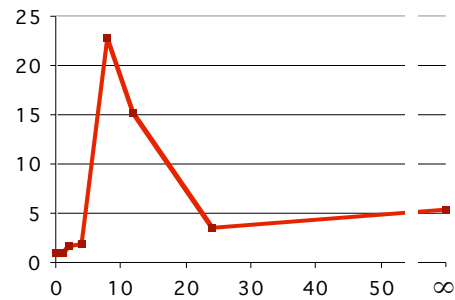
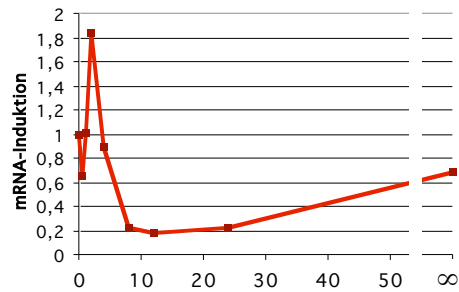
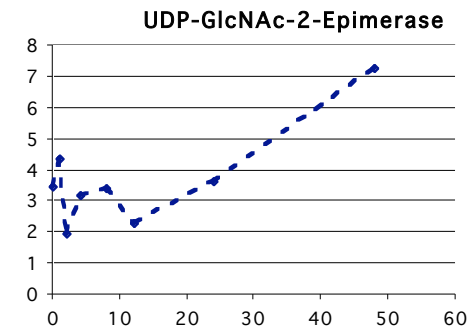
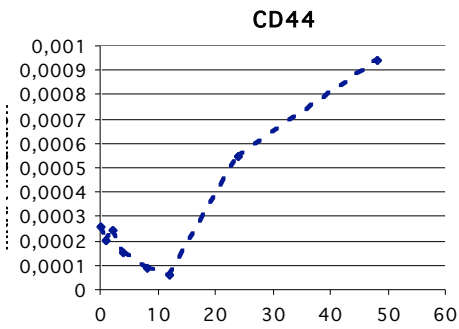
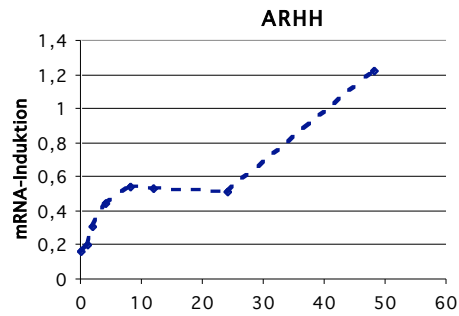
# Ergebnisse



mRNA-Induktionskinetiken von Genen nach Aktivierung von ER-EBNA2 durch Zugabe von Östrogen in EREB2-5 und BJAB-EREBA2, Legende s.o.



# Ergebnisse



mRNA-Induktionskinetiken von Genen nach Aktivierung von ER-EBNA2 durch Zugabe von Östrogen in EREB2-5 und BJAB-EREbNA2, Legende s. o.

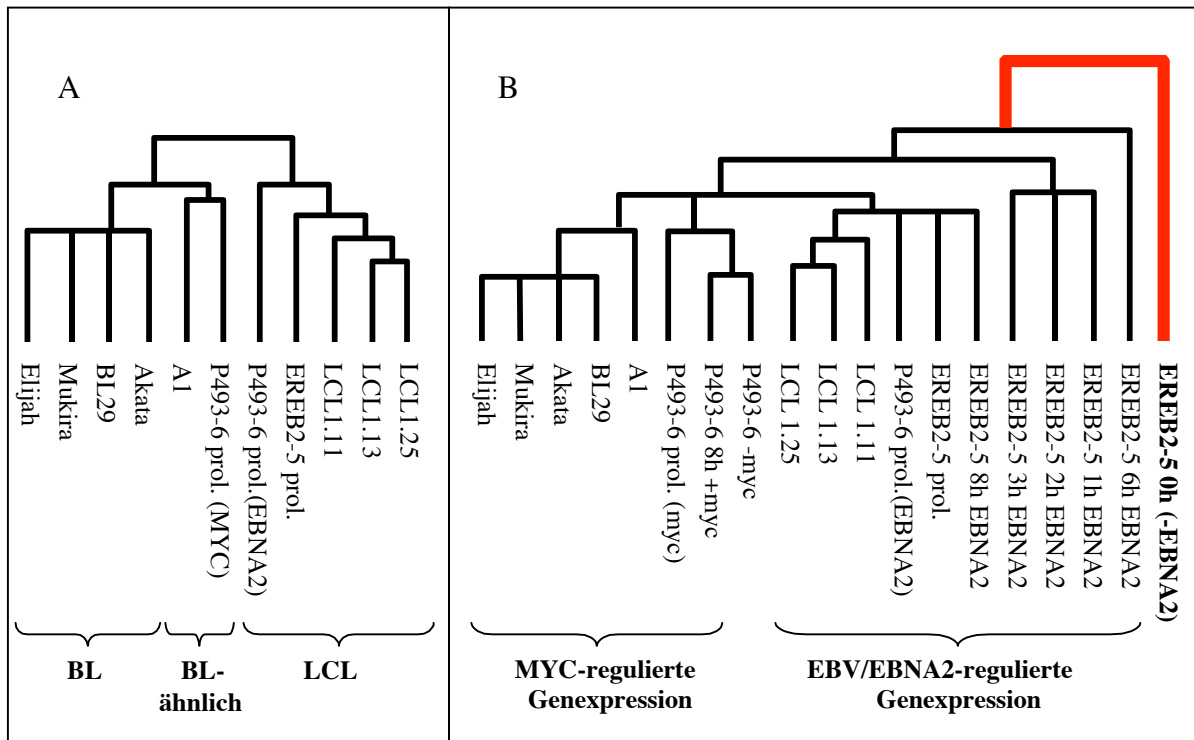
Gen	Acc	Run-On (EREB2-5)		mRNA (EREB2-5)		mRNA (BJAB-EREBNA2)	
		+Cx		+Cx	Kinetik	Kinetik	*Basis-expression
CXCR4**	D10924	++	++	=/+	+b	+	=
SDF1□**	1220363	n.d.	n.d.	+	+++	=	=
EBI2**	L08177	++	++	+	++	=	=
CCRD6	Y12815	n.d.	+	=/+	+b	=	++
MIP1□**	M23452	n.d.	+	+	++b	++	=
ARHH**	NM_004310	n.d.	+	+	+b	++	-
B7.2	L25259	=/+	=/+	x	x	x	x
CD23	M15059	+	+	x	x	x	x
CD22□/□	X52785/ X59350	n.d.	+	+	+	+	=
CD44	M59040	n.d.	+	=/+	++	+b	-
SIAT1**	X62822	+	+	+	++	++	=
PDE4B	L12686	n.d.	+	x	-b	x	x
c-myc	V00568	+++	+++	+++	+++	=	++
ETS1**	J04101	n.d.	+	++	+b	=	++
RUNX3	Z35278	n.d.	+	x	x	x	x
HHEX	L16499	n.d.	+	=	+b	-	--
EVI2a**	M55267	=	+	-	-b	n.d.	n.d.
ADA	P00813	n.d.	+	x	x	x	x
MDChemokin	1931580	x	x	=/+	++	-	++
CCR4	NM_005508	x	x	=/-	++	x	x
UDP-2-GalNac- Epimerase	AJ238764	x	x	=	+	=/+	=

**Tabelle 4:** Induktion von Genen durch EBNA2: +Cx = In diesem Versuch wurde mit dem Proteinsyntheseinhibitor Cycloheximid präinkubiert., K: Kinetik, "+":Induziertes Gen, "-":reprimiertes Gen, "=": nichtreguliertes Gen, "n.d.": Genexpression wurde im Versuch nicht detektiert, "x"= Gen wurde nicht analysiert, "b": Kinetik mit biphasischem Verlauf (Induktion ist nur transient oder innerhalb der Kinetik kommt es zur Regulation des Genes entgegengesetzt der Regulation am Ende der Kinetik). \*Die Basisexpression des Genes in BJAB-EREBNA2 ohne Östrogen im Vergleich zur Expression in EREB2-5 im Östrogen-depletierten (arretierten) Zustand. Sind Gene in BJAB-EREBNA2 ohne Östrogen bereits ähnlich reguliert wie in EREB2-5 nach Östrogenzugabe, so handelt es sich vermutlich um proliferationsassoziierte Gene.\*\*Nach Einschätzung des Autors erstmals in dieser Arbeit als direkt durch EBNA2-reguliertes Gen identifiziert.

### 3.3 mRNA-Analyse von EBV- und MYC-vermittelter Proliferation auf Lymphochips

Wie in Abschnitt 3.1.1 beschrieben, wurden im 2D-PAGE-Ansatz lediglich 6 Proteine identifiziert, deren Expression MYC-unabhängig in EREB2-5 durch EBNA2 reguliert wird. Es konnten jedoch weder gegensätzlich regulierte Zielproteine von MYC und EBNA2 gefunden werden, noch ließen sich die gefundenen MYC-unabhängigen Zielproteine eindeutig funktionell systematisieren. Im nachfolgend beschriebenen Experiment sollte daher als Komplementierung des 2D-PAGE-Ansatzes mit Hilfe von Microarrays das mRNA-Expressionsprofil von B-Zellen untersucht und verglichen werden, die entweder ausschließlich MYC-abhängig proliferieren oder durch EBV immortalisiert wurden. Dazu wurden mRNAs von MYC- und EBNA2-Induktionskinetiken der bereits beschriebenen B-Zelllinien EREB2-5 und P493-6 isoliert und nach reverser Transkription mit Fluoreszenzfarbstoff-markiertem dUTP mit sogenannten Lymphochips hybridisiert. Außerdem wurden mRNAs von drei verschiedenen *in vitro* EBV(B95-8)-transformierten LCLs und vier TypI EBV positiven BLs analysiert (Schema 3). BLs sind durch spezifische Chromosomentranslokationen charakterisiert, durch die das *c-myc*-Gen aktiviert ist. Dabei umfassen die bisher bekannten Fälle die Translokation des *c-myc*-Gens in den Immunglobulin-Schwere-Ketten-Locus, in den Immunglobulin-Leichte-Ketten- $\kappa$ -Locus oder in den Immunglobulin-Leichte-Ketten- $\lambda$ -Locus. Da das Burkitt Lymphom vom Keimzentrum eines Lymphknoten ausgeht, ist es wünschenswert, den Einfluss dieser Herkunft von MYC-abhängiger Regulation unterscheiden zu können. Deshalb wurde zusätzlich die mRNA einer *in vitro* etablierten Zelllinie A1 untersucht, die MYC-induziert proliferiert, aber ihren Ursprung nicht im Keimzentrum hat. In dieser Zelllinie wird das *c-myc*-Gen unter der Kontrolle des regulatorischen Elementes des Immunglobulin- $\kappa$ -Locus konstitutiv exprimiert (Polack et al., 1996) und in dieser Hinsicht der Phänotyp eines BL mit *c-myc*-Translokation nachgestellt. Während die LCLs die Wildtyp-Kontrolle für die induzierbaren EREB2-5-Zellen darstellen, können die BLs als *in vivo* Equivalent der *in vitro* etablierten MYC-überexprimierenden EREB2-5-Derivate (P493-6 und A1) angesehen werden. So konnte insgesamt EBV-vermittelte mit MYC-vermittelter Proliferation ("MYC-allein") verglichen werden, wobei hinzugefügt werden muss, dass EBNA2-vermittelte Proliferation MYC-abhängig ist, da *c-myc* ein primäres Zielgen von EBNA2 ist.

Mit der Hilfe des Programmes "Cluster" (Eisen et al., 1998) wurde aus den erhaltenen mRNA-Expressionsprofilen der Zelllinien ein "Stammbaum" erstellt, der die Verwandtschaft bzw. Ähnlichkeit der Expressionsprofile wiedergibt (Schema 2).



**Schema 2:** A) Das Clustern der mRNA-Expressionsprofile der MYC-abhängig und EBV/EBNA2-abhängig proliferierenden Zellen führt zu einem "Stammbaum", der die Herkunft/Verwandtschaft der Zelllinien bestätigt. B) Normiert man die Expression von Genen auf das Basisexpressionsniveau in arretierten EREB2-5 (0h) und führt dann das Clustern der mRNA-Expressionsprofile aller analysierten Zelllinien mit entsprechenden Kinetiken durch, erhält man ebenfalls einen Stammbaum, der Zell-Typus und -Zustand innerhalb einer Kinetik nachvollzieht.

Aus dem Clustern der Rohdaten der mRNA-Expressionsprofile der verwendeten Zelllinien resultiert ein Stammbaum, bei dem sich BLs, BL-ähnliche Zellen und LCLs in separaten Clustern wiederfinden (Schema 2A). Dabei bestätigt sich auch, dass der Verwandtschaftsgrad zwischen BL-ähnlichen Zellen und BLs größer ist als zwischen LCLs und BLs, was die entscheidende Rolle von MYC in BLs unterstreicht bzw. die Tauglichkeit der *in vitro* generierten Linien A1 und P493-6 als Modellsysteme für BLs unter Beweis stellt. Während die EBNA2-abhängig proliferierende Zelllinie P493-6 im LCL-Cluster lokalisiert ist, findet man die genetisch gleiche Zelllinie, die jedoch MYC-abhängig proliferiert, im "BL-ähnlich"-Cluster. Dies belegt, dass MYC und EBNA2 und keine epigenetischen Effekte die Expressionsmuster der Zellen bestimmen und dass die Zelllinie P493-6 von einer BL-ähnlichen Zelle in eine LCL reversibel umwandelbar ist.

Da MYC- mit EBNA2-abhängiger Proliferation verglichen werden sollte, wurde als Referenzwert für die Induktion eines Gens die Expression in arretierten EREB2-5 (mit nicht nachweisbarer MYC-Expression bzw. EBNA2-Aktivität) benutzt, d.h. mit Faktor 1 gleichgesetzt.

Werden die Expressionsprofile aller proliferierenden Zelllinien und Zellen innerhalb der Induktionskinetiken nach der Normierung auf den "EREB2-5 0h"-Wert geclustert (Programm

*Cluster*, Eisen et al., 1998), so erhält man einen Stammbaum der Zell-Typus und -Zustand innerhalb einer Kinetik weitgehend nachvollzieht (Schema B). In den folgenden Darstellungen der Expressionsprofile ist der "EREB2-5 0h"-Wert zentral angeordnet. Nach links schließen sich die MYC-Kinetik und die BLs an, während rechts die EBNA2-Kinetik und die LCLs angeordnet sind (Schema C).

In der rot-schwarz-grün-Darstellung (Programm Treeview) bekommt Faktor 1 die Farbe schwarz, Faktoren größer als 1 die Farbe rot und Faktoren kleiner als 1 die Farbe grün. Je heller die Farbe, desto größer die Abweichung von 1. Dabei sind die Intensitätssteigerungen in den folgenden Abbildungen so gewählt, dass Abstufungen von Faktor 0,1 bis Faktor 10 aus den Farben unterscheidbar sind:



Aufgrund der Menge der Daten können im Rahmen der Arbeit nicht alle Gene diskutiert werden. Schema C soll helfen, sich einen systematischen Überblick über die erhaltenen Genexpressionsmuster zu verschaffen, die auffällig sind und diskutiert werden sollen. Folgende Typen von Genen wurden aus den Expressionsprofilen definiert:

**TypI:** TypI-Gene sind in gleichem Maße von MYC und EBV/EBNA2 induziert bzw. reprimiert. Es handelt sich bei diesen Genen hauptsächlich um Proliferations-assoziierte Gene.

**TypII:** TypII-Gene sind *gegensätzlich* oder *unterschiedlich* stark durch MYC (allein) und durch EBV/EBNA2 induziert/reprimiert. Innerhalb dieser Gengruppe werden die Antworten auf die Frage "Wie beeinflusst das Virus die B-Zell-Aktivierung und -Kommunikation" erwartet. Bei TypII(++/+) bzw. TypII(--/-) Genen könnte es sich um Gene handeln, die durch MYC induziert bzw. reprimiert sind, da es sich bei MYC selbst um ein TypII(++/+)-Gen handelt, wie die Daten aus Arrays (Abb. 25) und Westernblots (Abb. 9) zeigen. In Analogie zu dieser Argumentation ist es wahrscheinlich, dass es sich bei TypII(=/+ bzw. TypII(=/-) um positiv oder negativ regulierte EBNA2- oder LMP1-Zielgene handelt, da das LMP1-Profil TypII(=/+ entspricht. (Die tragende Rolle des viralen TNF-Rezeptor-ähnlichen LMP1 wird in der Diskussion eingehender besprochen).

**TypIII:** TypIII-Gene zeichnen sich dadurch aus, dass sie nur geringfügig innerhalb der MYC-Kinetiken und EBNA2-Kinetiken reguliert werden, jedoch zwischen beiden Gruppen (MYC- und EBV/EBNA2-abhängige Proliferation) eine starke Differenz der Expression aufweisen, was auf MYC- bzw. EBNA2-unabhängige Mechanismen der Genregulation schließen lässt. Die Deregulation dieser Gene ist möglicherweise für die MYC-abhängige Proliferation essentiell und kann auf Mutationen oder epigenetische Effekte (z.B. Methylierung) zurückzuführen sein.

**TypIV:** Typ IV Gene sind unabhängig von MYC in BL-Zellen stärker oder schwächer exprimiert als in den übrigen Zellen. Bei diesen Genen handelt es sich vermutlich um Gene, die im Keimzentrum spezifisch exprimiert oder reprimiert sind. (Auf diese Gene wird im Rahmen dieser Arbeit nicht ausführlicher eingegangen.)

In Schema 3 geben die Vorzeichen in den Klammern hinter der Typbezeichnung den Trend der Regulation gemessen an "ERE2-5 0h" an: links der Trend für die Regulation in MYC-abhängig proliferierenden Zellen, rechts der Trend für die Regulation der EBV/EBNA2-abhängigen Proliferation. Zum Beispiel ist TypII(--/-) ein Gen, das in MYC-abhängig proliferierenden Zellen stärker reprimiert ist als in EBV/EBNA2-abhängig proliferierenden Zellen. TypII (-/+ ) ist ein Gen, das in MYC-abhängig proliferierenden Zellen reprimiert aber in EBV/EBNA2-abhängig proliferierenden Zellen induziert ist.

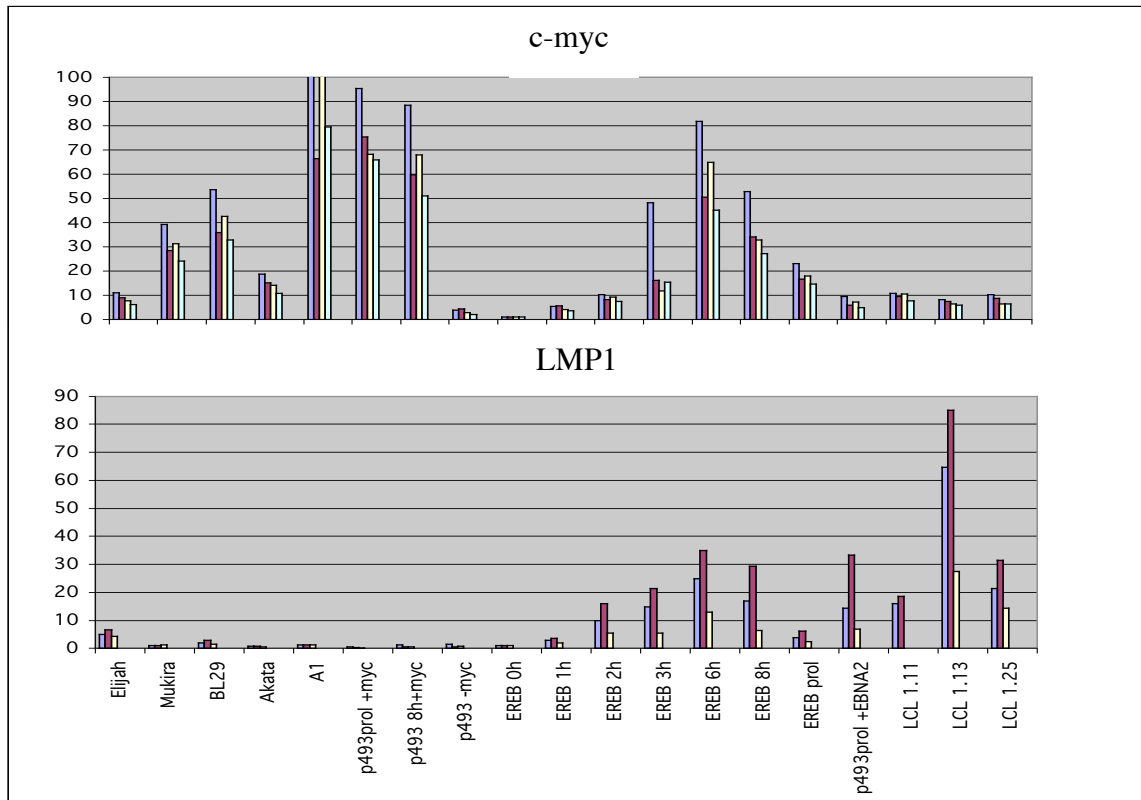
Innerhalb des Screenings wurden etwa 800 differentiell regulierte Gene detektiert. Die Expression von LMP1 (direktes virales Zielgen von EBNA2) und MYC (Abb. 25) bestätigt die erfolgreiche Induktion in beiden konditionalen Systemen (P493-6 bzw. ERE2-5). Arretierte P493-6 Zellen zeigen ein 4-fach höheres c-myc mRNA-Basisniveau als die parentale Zelllinie ERE2-5, was möglicherweise auf eine geringfügige Basisexpression des tet-off-Systems im Expressionskonstrukt zurückzuführen ist.

Mit Ausnahme der eher seltenen TypII(+ /++)- und Typ II(- /--)-Gene waren alle genannten Gengruppen in gleichem Maße vertreten.

Ergebnisse

Gen-Gruppe	MYC-abhängige Proliferation			arretiert	EBV/EBNA2-abhängige Proliferation					
	BL (Typ I = - EBNA2)	BL-ähnlich	Kinetik MYC	-MYC -EBNA2	Kinetik EBNA2					
					LCL (+EBNA2)					
Zelllinie	Elijah Mukira BL29 Akata	A1 P493-6 + MYC	P493-6 8h + MYC	P493-6 EREB2-5	EREB2-5 1h +EBNA2	EREB2-5 2h+ EBNA2	EREB2-5 3h +EBNA2	EREB2-5 6h +EBNA2	EREB2-5 8h +EBNA2	EREB2-5 + EBNA2 P493-6 + EBNA2 1.11 1.13 1.25
I(+)	Red	Red	Red	Black	Red	Red	Red	Red	Red	Red
I(-)	Green	Green	Green	Black	Green	Green	Green	Green	Green	Green
II(-)	Green	Green	Green	Black	Red	Red	Red	Red	Red	Red
II(+)	Red	Red	Red	Black	Red	Red	Red	Red	Red	Red
II(=)	Black	Black	Black	Black	Red	Red	Red	Red	Red	Red
II(=)	Black	Black	Black	Black	Green	Green	Green	Green	Green	Green
II(++)	Red	Red	Red	Black	Red	Red	Red	Red	Red	Red
II(--)	Green	Green	Green	Black	Green	Green	Green	Green	Green	Green
II(+++)	Red	Red	Red	Black	Red	Red	Red	Red	Red	Red
II(-/-)	Green	Green	Green	Black	Green	Green	Green	Green	Green	Green
III(+)	Red	Red	Red	Black	Black	Black	Black	Black	Black	Black
III(-)	Green	Green	Green	Black	Black	Black	Black	Black	Black	Black
IV(+)	Red	Black	Black	Black	Black	Black	Black	Black	Black	Black
IV(-)	Green	Black	Black	Black	Black	Black	Black	Black	Black	Black

**Schema 3:** Übersicht über verwendete Zelllinien (Burkitt Lymphome, *in vitro* etablierte BL-ähnliche Zelllinien und LCLs), MYC- und EBNA2-Kinetiken in den konditionalen Zelllinien P493-6 und EREB2-5 und entsprechende schematische mRNA-Expressionsmuster, wie man sie auf den Microarrays findet. EBV positive TypII BLs sollten außer EBNA1 keine latenten EBV-Proteine exprimieren. Klassifikationen der zu erwartenden Genexpressionsmuster sind in rot/schwarz/grün dargestellt (I bis IV). Grün = reprimiert, rot = hochreguliert und schwarz = nicht reguliert im Vergleich zu arretierten EREB2-5-Zellen. Je intensiver die Farbe, desto höher der beobachtete Unterschied. Für die Gruppennomenklatur gilt: "=" = nicht reguliert, "-" = reprimiert, "--" = stark reprimiert, "+" = induziert, "++" = stark induziert. In der Arrayanalyse wurden ca. 800 regulierte Gene detektiert, wobei alle Gruppen der dargestellten Expressionsmuster vorhanden waren. Auffällig war die geringe Präsenz von TypII(+++)- und TypII(-/-)- Genen. Typ IV-Gene werden unabhängig von MYC und EBNA2 reguliert. Vermutlich handelt es sich dabei um Gene, die spezifisch im Keimzentrum des Lymphknoten exprimiert werden.

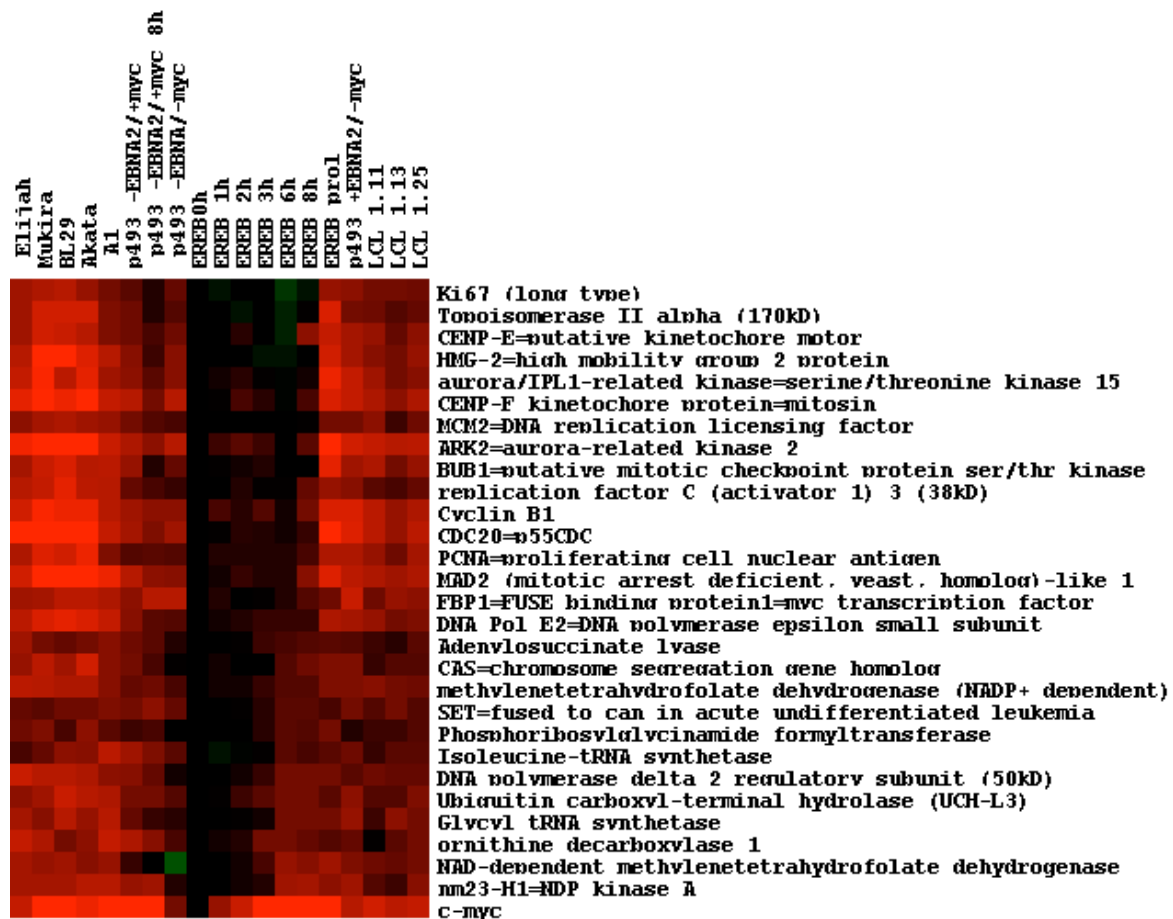


**Abb.25:** LMP1 (unten) und MYC (oben) mRNA Expressionsmuster. Jede Säule entspricht einer einzelnen hybridisierten Probe auf dem Microarray. Im Durchschnitt war jedes Gen dreimal auf dem Lymphochip vorhanden. Die Y-Werte entsprechen der Y-fachen Induktion im Vergleich zur Expression in arretierten EREB2-5-Zellen (ohne Östrogen = ohne funktionelles EBNA2). Die Expression von LMP1 (direktes virales Zielgen von EBNA2) und MYC bestätigt die erfolgreiche Induktion in beiden konditionalen Systemen (P493-6 bzw. EREB2-5). Arretierte P493-6 Zellen zeigen einen 4-fach höheres c-myc mRNA-Basisniveau als die parentale Zelllinie EREB2-5, was möglicherweise auf geringfügige Basisexpression des tet-off basierten Expressionskonstrukts zurückzuführen ist.

### 3.3.1 MYC- und EBV/EBNA2-induziert Gene sind proliferationsassoziiert

Die Analyse von Genen, die von MYC und EBV/EBNA2 induziert werden [TypI(+/+)], bestätigte das in Abschnitt 1.2 erhobene Postulat, dass in gleicher Weise von MYC und EBNA2 induzierte Gene entscheidend zur Proliferation der Zelle beitragen. In Abb.26 sind solche Gene exemplarisch aus dem Datensatz zusammengestellt: Bei fehlenden Zitaten wurde die Funktionen der in den folgenden Sätzen beschriebenen Gene der OMIM-Datenbank entnommen. Die früh in der MYC- bzw. EBNA2-Induktionskinetik induzierten Gene sind funktionell in die Bereiche Nukleotidsynthese (Methylentetrahydrofolat-Dehydrogenase, Phosphoribosylglycinamid-Formyltransferase, Adenylosuccinat-Lyase), Proteinbiosynthese (tRNA-Synthetasen) und -umsatz (Ubiquitin-Carboxyterminale Hydrolase, UCH-L3) und Polyaminsynthese (Ornithindecaboxylase) einzuordnen.





**Abb. 26:** Expressionsprofile von Genen, die von MYC und EBV/EBNA2 induziert werden [TypI(+/+)]. Alle hier gezeigten Gene sind essentiell für die Proliferation einer Zelle. Die früh in der MYC- bzw. EBNA2-Induktionskinetik induzierten Gene sind funktionell in die Bereiche Nucleotidsynthese, Proteinbiosynthese und -umsatz, Polyaminsynthese und Proteinumsatzkontrolle einzuordnen, während erst spät in der Kinetik oder erst in proliferierenden EREB2-5 induzierte Gene vorwiegend die Replikation, Chromosomenverteilung und Zellteilung kontrollieren. NM23-H1 und UCH-L3 wurden auch im Proteomansatz gefunden.

Die früh induzierten Gene NM23-H1 und SET sind zusammen mit Ape1 (nicht auf dem Array) und mit dem etwas später in der Kinetik induzierten HMG-2 Bestandteile des *SET-Komplexes* (Fan et al., 2003). Fan et al. diskutieren eine Funktion des SET-Komplexes als DNA-Reparatursystem und Transkriptionsaktivator als Antwort auf oxidativen Stress, der bei einem aktivierten Metabolismus einer Zelle entsteht. Ebenso ist die DNA-Polymerase-II- $\beta$ -Untereinheit unter der Kontrolle von PCNA in die Reparatur von DNA während der Replikation involviert. NM23-H1 und UCH-L3 wurden ebenfalls im 2D-PAGE-Proteomansatz detektiert und in den entsprechenden Kapiteln eingehender besprochen.

Später induzierte TypI(+/-)-Genprodukte wie Ark2, Aurora, CENP-E und CENP-F interagieren mit den chromosomalen Kinetochoren und sind dadurch an der Chromosomen-Separation und -Segregation beteiligt, CDC20 reguliert in Wechselwirkung mit MAD-Proteinen (u.a. MAD2) die Spindel-Formierung und damit die Initiation der Anaphase, BUB1 reguliert den Spindelaufbau und die Kinetochorlokalisierung, und Topoisomerase II  $\alpha$  bereitet

vermutlich durch Entspiralisierung von DNA die Replikation vor. FBP1 ist vermutlich an der Induktion von *c-myc* beteiligt. Neben den genannten für die Replikation und Mitose regulativen Molekülen ist Ki67 ein Marker für Zellen, die sich nicht in G0-Arrest befinden. Das Expressionsprofil von Ki67 untermauert, dass sich "EREB2-5 0h" tatsächlich bis 8h nach Induktion in G0 befinden und daher arretierte Zellen darstellen. Im Gegensatz dazu sind P493-6-Zellen auch nach Zugabe von Tetrazyklin Ki67-positiv. Diese letzten Befunde spiegeln sich in den Thymidin-Inkorporationsassays aus Abb. 5 wider. So kann anhand der erhobenen mRNA-Daten der Einstieg von EREB2-5 aus G0-Arrest in den Zellzyklus nachvollzogen werden.

### 3.3.2 Von MYC und EBV/EBNA2 unterschiedlich regulierte Gene (TypII)

Um die Kommunikation von EBV mit dem Immunsystem und damit die Mechanismen, die zur EBV-Persistenz in Gedächtnis-B-Zellen führen, besser verstehen zu können, sind die nicht-proliferationsassoziierten Zielgene von EBV/EBNA2 von besonderer Bedeutung. Dies sind, wie in der Einleitung diskutiert, vor allem diejenigen Gene, die von MYC anders als von EBV/EBNA2 reguliert werden. In Abb. 7A und B ist die Expression aller Gene aus dem Datensatz dargestellt, die weitgehend TypII(+/+), II(=/+), II(-/+) entsprechen. Einige nicht in die genannten Kategorien fallende Zielgene (z.B. MIP1) sind wegen ihrer Bedeutung für die Interpretation der Daten ebenfalls aufgeführt.

#### 3.3.2.1 EBV/EBNA2 induziert, MYC reprimiert NF- $\kappa$ B-Zielgene

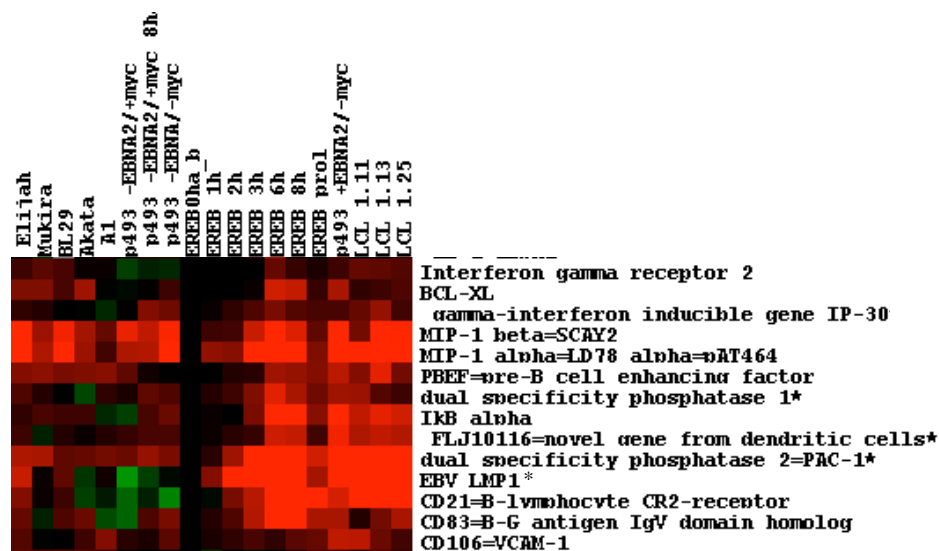
Die in Abb. 7A aufgeführten Gene folgen in ihrem Expressionsmuster weitgehend der Expression des viralen LMP1. Von CD83 ist bekannt, dass es von LMP1 induziert wird (Dudziak et al., *J Virol*, 2003, im Druck), CD21 gehört zu den ersten bekannten direkten EBNA2-Zielgenen. Weiter ist auffallend, dass die meisten in Abb. 7A und Abb. 7B aufgeführten Gene NF- $\kappa$ B-induzierte Gene darstellen (Übersichtsartikel Klier et al., 1999).

NF- $\kappa$ B-Proteine (Nukleärer Faktor  $\kappa$ B) sind Transkriptionsfaktoren, die eine zentrale Rolle in der Regulation der adaptiven und angeborenen Immunantwort spielen. Nicht aktivierte NF- $\kappa$ B-Protein-Dimere befinden sich aufgrund ihrer Assoziation an NF- $\kappa$ B-Inhibitoren (I $\kappa$ Bs) vorwiegend im Zytoplasma der Zelle, wo sie inaktiv sind. Nach Aktivierung von I $\kappa$ B-Kinasen (IKKs) werden I $\kappa$ Bs durch diese phosphoryliert, ubiquityliert und degradiert, so dass NF- $\kappa$ B-Dimere in den Kern migrieren und als Transkriptionsfaktoren aktiv werden.

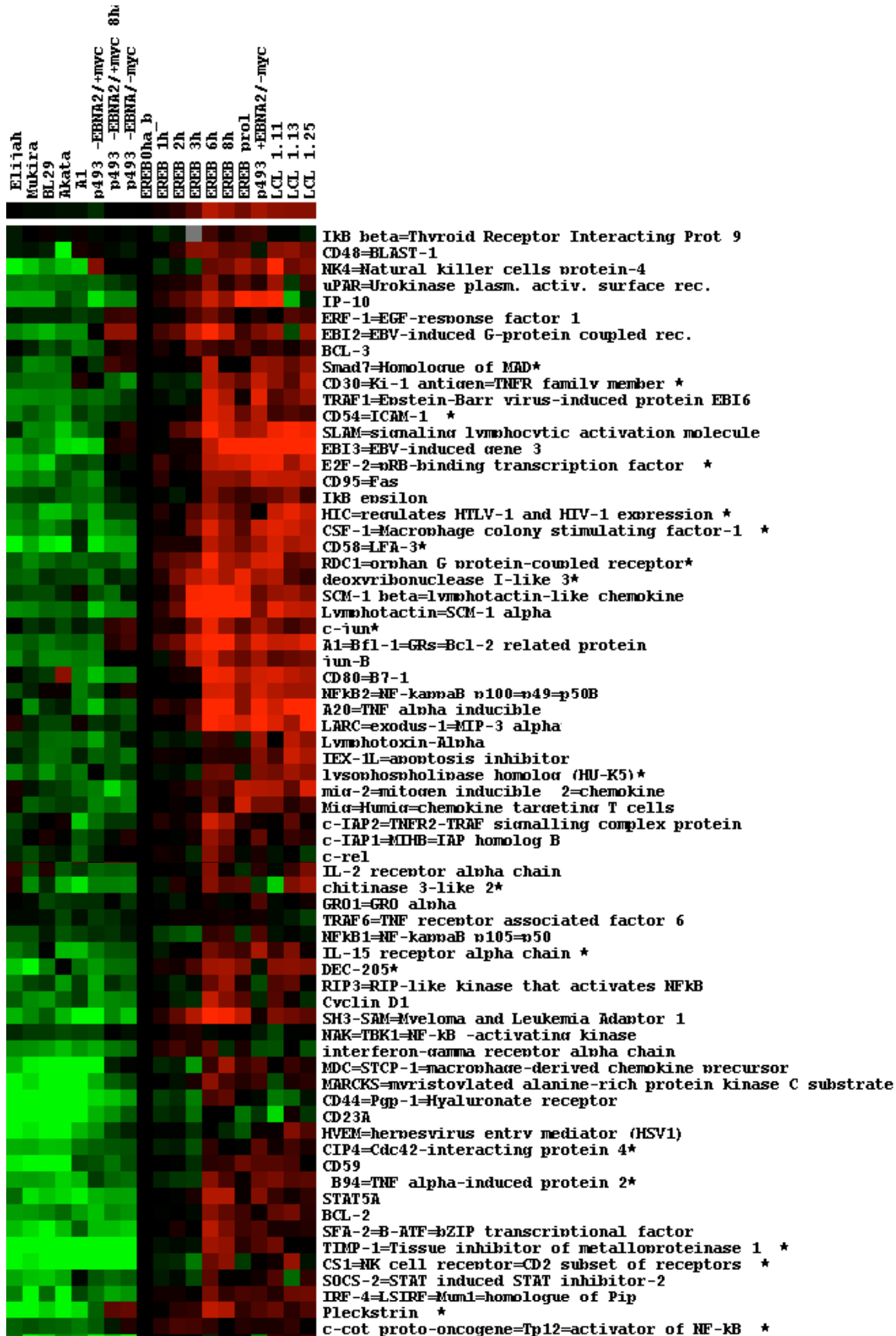
Die Tatsache, dass praktisch alle TypII(-/+)-Gene NF $\kappa$ B-Gene darstellen, legt den Schluss nahe, dass MYC den NF $\kappa$ B-Signalweg reprimiert, während EBV/EBNA2 den NF $\kappa$ B-Signalweg induziert. Dabei ist die NF $\kappa$ B-Induktion durch LMP1 bereits seit längerem bekannt, während es erst seit kurzem Hinweise auf einzelne NF $\kappa$ B-induzierte Gene gibt, die indirekt durch MYC reprimiert werden (You et al., 2002; Tanaka et al., 2002).

### 3.3.2.2 EBV/EBNA2 induziert selektiv das NF $\kappa$ B2(p100)-Gen

Interessant ist außerdem, dass EBV/EBNA2 selektiv den Vorläufer p100 von NF $\kappa$ B2 induziert (Abb. 7B), während p105, der Vorläufer von NF $\kappa$ B1, kaum induziert wird (Abb. 7B). Nach neueren Erkenntnissen gibt es neben dem oben beschriebenen Signalweg (kanonischer Weg) noch einen alternativen NF $\kappa$ B2-abhängigen aber I $\kappa$ B $\beta$ - und NF $\kappa$ B1-unabhängigen Signalweg (Senftleben et al., 2001). So könnte EBV über NF $\kappa$ B2 langfristig den alternativen Signalweg induzieren, ohne dass eine Induktion von I $\kappa$ B $\beta$  (Abb. 7A) die Aktivierung inhibiert. (Auf weitere Details zu NF $\kappa$ B-Signalwegen wird in der Diskussion eingegangen).



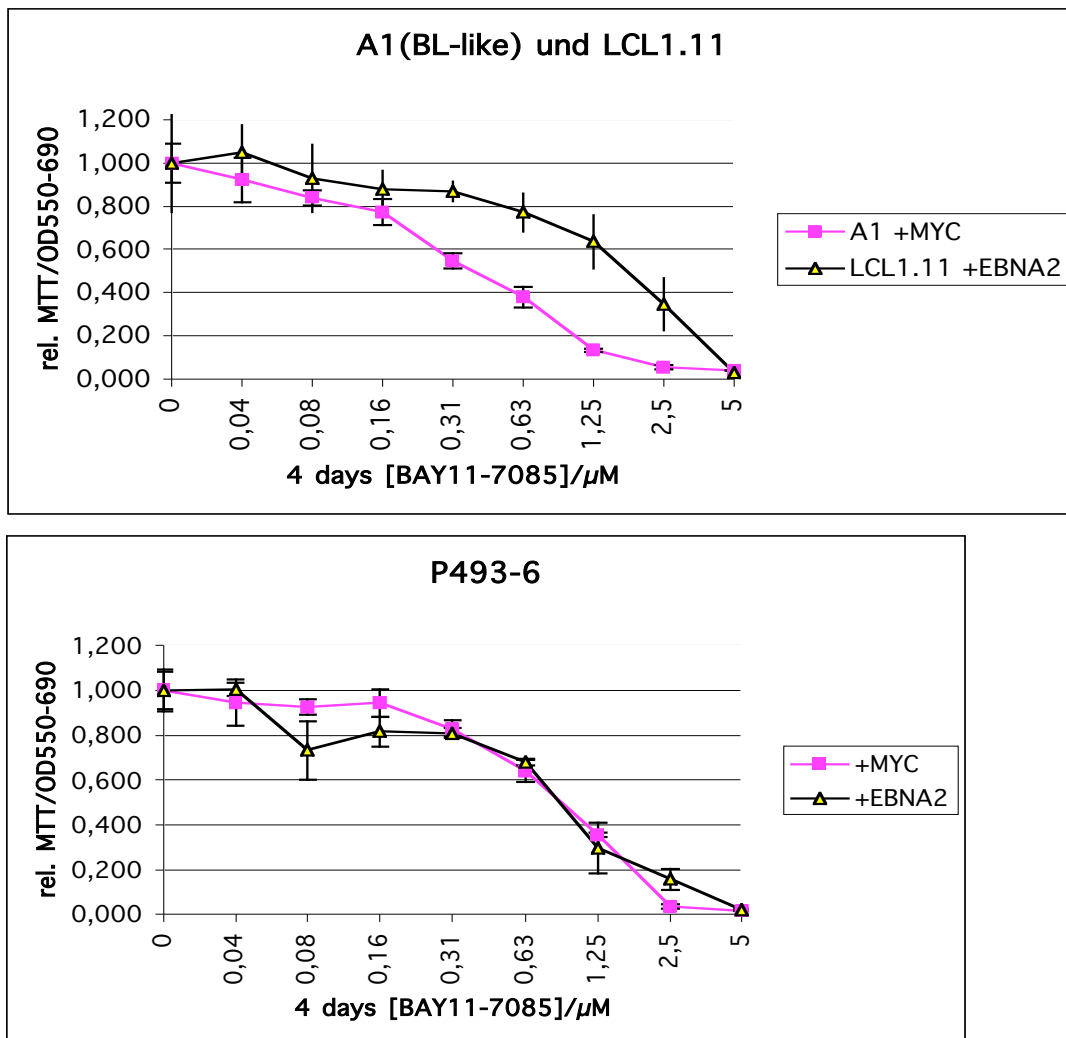
**Abb. 7A:** Expressionsprofile von Genen, die weitgehend zu den Gengruppen TypII(=+/+) und TypII(+/++) gehören. Die meisten aufgeführten Gene sind aus der Literatur als NF $\kappa$ B-Zielgene bekannt. Nur mit \* gekennzeichnete Gene sind bisher noch nicht als NF $\kappa$ B-Zielgene deklariert worden.



**Abb. 27B** Expressionsprofil von Genen, die weitgehend zur Gengruppen TypII(-/+) gehören. Die meisten aufgeführten Gene sind aus der Literatur als NF $\kappa$ B-Zielgene bekannt. Nur mit \* gekennzeichnete Gene sind bisher noch nicht als NF $\kappa$ B-Zielgene deklariert worden.

### 3.3.2.3 Abhängigkeit der MYC- sowie EBV/EBNA2-abhängigen Proliferation von NF $\kappa$ B

Da, wie aus Abb. 7A/B ersichtlich, der NF $\kappa$ B-Signalweg in LCLs viel stärker aktiviert ist als in BLs, lag die Vermutung nahe, dass BLs für ihre Proliferation weniger oder keine NF $\kappa$ B-Aktivität benötigen. Um die NF $\kappa$ B-Abhängigkeit der Proliferation von LCLs und BLs und konditionalen Linien zu untersuchen, wurde ein MTT-Überlebens-Assay mit BLs, LCLs und P493-6-Zellen in den Zuständen EBV-abhängiger Proliferation (+Östrogen, +Tetrazyklin) und MYC-abhängiger Proliferation durchgeführt, wobei der I $\kappa$ B-Phosphorylierungshemmstoff (E)-3-[(4-t-Butylphenyl-sulfonyl)-propennitril (BAY 11-7085) als NF $\kappa$ B-Inhibitor eingesetzt wurde.



**Diagramm 1:** LCLs und BL-ähnliche Zellen wurden 4 Tage mit unterschiedlichen Konzentrationen des I $\kappa$ B-Stabilisators BAY11-7085 inkubiert und die Stoffwechselaktivität durch MTT-Prozessierung gemessen. Dabei wurde die Stoffwechselaktivität unbehandelter Zellen auf 1 normiert.

Während A1-Zellen (BL-ähnliche Zelllinie) wesentlich sensitiver auf BAY11-7085 reagierten als LCL1.11-Zellen, war für P493- Zellen in den Zuständen +MYC oder +EBNA2 kaum ein Unterschied festzustellen (Diagramm A). Die P493-6-Zellen lagen in beiden Zuständen in ihrer Empfindlichkeit gegenüber BAY11-7085 zwischen A1- und LCL1.11-Zellen (Diagramm B). Insgesamt zeichnete sich sogar eine etwas stärkere Sensitivität der MYC-abhängig wachsenden Zellen im Vergleich zu den EBV-abhängig wachsenden Zellen gegenüber dem NF- $\kappa$ B-Inhibitor ab.

### 3.3.2.4 EBV/EBNA2 induziert SMAD7 und reprimiert das TGF $\beta$ -Zielgen TSC-22

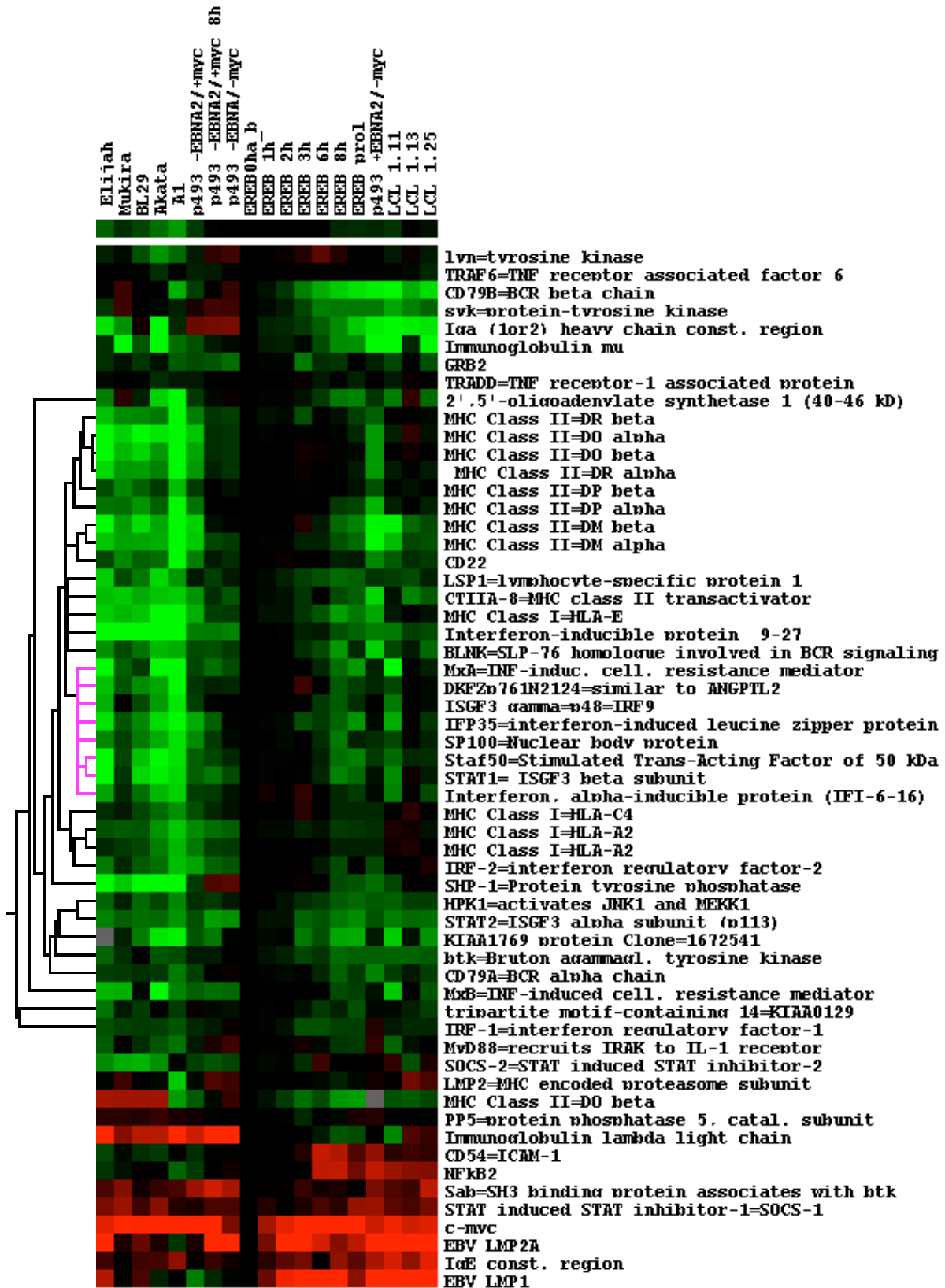
Die in Abb. 7C dargestellten Gene gehören zu TypII(+/-). Die Repression von TSC-22, das laut Literatur durch TGF $\beta$  induziert wird (OMIM), kann durch das in EBV/EBNA2-proliferierenden Zellen induzierte SMAD7 (TypII(-/+), Abb. 7B), einem Repressor des TGF $\beta$ -Signalweges (OMIM), bedingt sein.

### 3.3.2.5 EBV/EBNA2 reprimiert das B-Zell-Rezeptor-Signal

Auffallend in Abb. 7C ist die Häufung von Immunglobulin-Ketten, die offenbar, wie es schon von EBNA2 in Bezug auf die Ig $\mu$ -Kette bekannt ist (Jochner et al., 1996), durch EBV/EBNA2 reprimiert werden. Allerdings wird die IgE-konstante-Region induziert (Abb. 7D). In Abb. 7D befinden sich ausgewählte Gene des Typs II(-/-) inklusive weiterer Gene, die für die Diskussion der Daten in Bezug auf B-Zell-Signaltransduktion und Interferon-Antwort wichtig sind.



Abb. 7C Expressionsprofile von Genen, die weitgehend zur Gengruppe TypII(+/-) gehören.



**Abb. 7D:** Expressionsprofil von Genen, die in die Interferonantwort und in die BCR-Signaltransduktion involviert sind aber noch nicht in Abb. 7A-C vertreten sind. Interferon-regulierte Gene wurden nach Korrelation mit STAT1 ausgesucht. Im STAT1-Cluster (pink) befinden sich vor allem INF-regulierte Gene. Alle in die BCR-Signaltransduktion involvierten Gene werden durch EBV/EBNA2 reprimiert und fallen vorwiegend in die Gruppen II(+/-) (s. dazu auch Abb. 7C), II(=/-) oder II(-/-), während die STAT1-koregulierten Gene eher zur Gruppe II(-/-) gehören.

Aus den dort gezeigten Daten geht hervor, dass sowohl die B-Zell-Korezeptor-Ketten CD79B(besonders stark) und CD79A als auch die für die B-Zell-Rezeptor (BCR)-Signaltransduktion wichtige Kinase Syk durch EBV/EBNA2 reprimiert werden. Zusammengenommen können diese Befunde eine Einschränkung der adaptiven Immunantwort durch den BCR bedeuten. (Auf die biologische Bedeutung dieser Befunde wird in der Diskussion ausführlicher eingegangen.)

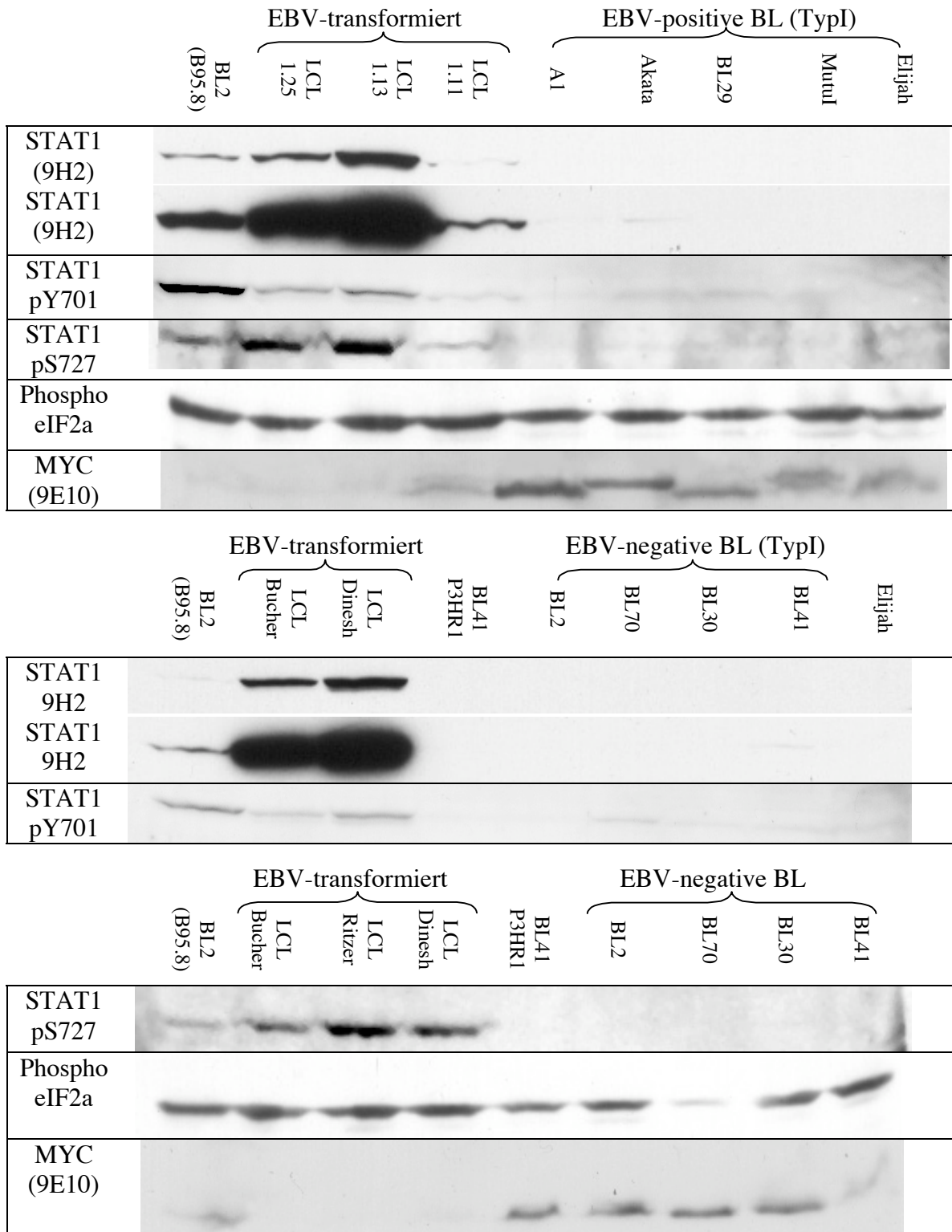
### **3.3.2.6 EBV/EBNA2 induziert T-Zell-Attraktoren**

Wie schon in den Run-On-Experimenten gezeigt, induziert EBNA2 eine Reihe von Chemokinen, die die Migration beeinflussen und chemotaktische Aktivität für T-Zellen besitzen (SDF1 $\square$ , MIP1 $\square$ ). Diese Beobachtung wurde durch EBNA2 Array-Daten bestätigt und ergänzt. Die in Abb. 27A und 27B durch EBV/EBNA2 induzierten Chemokine (MIP1 $\square/\square$ , IP10, Mig, Mig-2, LARC, Lymphotactin und SCM1 $\square$ ) zeichnen sich durch chemotaktische Aktivität besonders gegenüber T-Helferzellen aus.

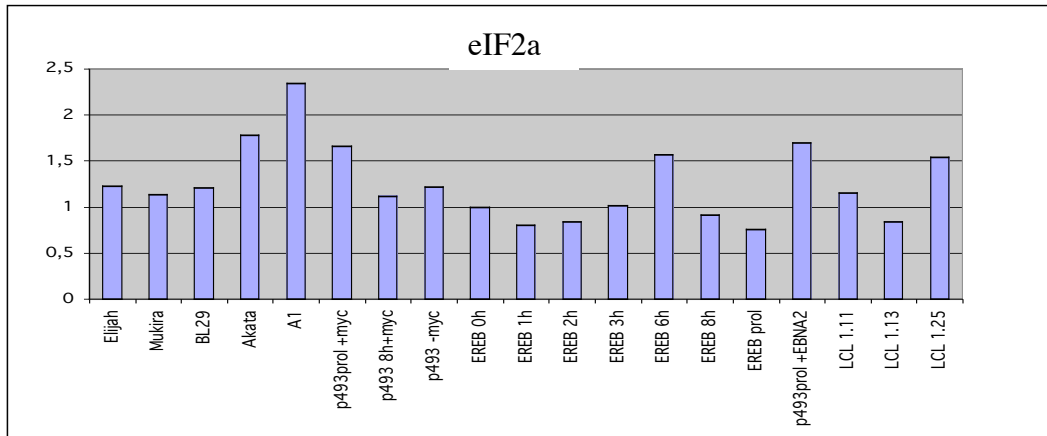
### **3.3.2.7 STAT1 ist in EBV-abhängig proliferierenden Zellen stärker exprimiert als in MYC-abhängig proliferierenden Zellen**

In früheren Arbeiten (Gavioli et al., 2001, Staeger et al., 2002) wurde festgestellt, dass das Immunproteasom in MYC-abhängig wachsenden, BL-ähnlichen B-Zellen (A1, P493-6 + MYC/EBNA2) und BLs weniger aktiv ist als in B-Zellen, die EBNA2-abhängig wachsen (LCLs, EREB2-5, P493-6 + EBNA2/-MYC). So sind, wie aus den genannten Untersuchungen hervorgeht, die IFN-induzierbaren katalytischen Untereinheiten Lmp2, Lmp7 und MECL-1 und die regulatorischen Untereinheiten PA28 $\square/\square$  in BLs gegenüber LCLs reprimiert. Dies hat eine geringere Immunogenität der BL-ähnlichen Zellen zur Folge, die sich in geringerer Antwort durch zytotoxische T-Zellen (CTL) und geringerer Stimulation der Proliferation von PBMCs (aus peripherem Blut gewonnene mononukleäre Zellen) äußerte. Bisher war jedoch der Mechanismus, wie diese offensichtlich den IFN-Signalweg betreffende Regulation erfolgen konnte, unklar. Aus Abb. 27D geht hervor, dass *STAT1* - der wichtigste intrazelluläre Mediator der IFN-Antwort (genauere Ausführungen dazu in der Diskussion) - in EREB2-5-Zellen, die arretiert sind, am stärksten exprimiert ist, also vermutlich negativ mit Proliferation korreliert. Außerdem fällt auf, dass von EBV/EBNA2 abhängig proliferierende Zellen STAT1 stärker exprimieren als Zellen, die MYC-abhängig proliferieren. Auf Grund des Musters der Expression [TypII(--/--)] kann man in STAT1 ein negativ reguliertes MYC-Zielgen vermuten (weitere Erläuterungen in der Diskussion).





**Abb. 29A:** Westernblotanalyse von EBV-konvertierten (BL2-B95.8) bzw.-transformierten Zellen (LCL) im Vergleich mit TypI-EBV-positiven und EBV-negativen Burkitt Lymphomen (BL). BL41P3HR1 ist eine ursprünglich EBV-negative Zelllinie, die mit EBNA2-defizientem EBV (P3HR1) infiziert wurde. Es wurde die Expression von STAT1-Protein (zwei Expositionszeiten mit anti-STAT1-Antikörper 9H2 dargestellt), von STAT1 mit Phosphorylierung von Tyr701 (STAT1pY701) bzw. Ser727 (STAT1pS727), von phosphoryliertem eIF2a (Phospho eIF2a) und von MYC untersucht. Die Phosphorylierung von eIF2a spiegelt das Maß für die Aktivität des PKR-Systems wider. In LCLs ist die STAT1-Proteinmenge stark erhöht im Vergleich zu BLs. Dagegen ist der Unterschied der Signalintensitäten des Tyr701-phosphorylierten STAT1 nicht so hoch. Die EBV-transformierte BL (BL2) zeigt einen wesentlich höheren Tyr701-Phosphorylierungsgrad als LCLs.



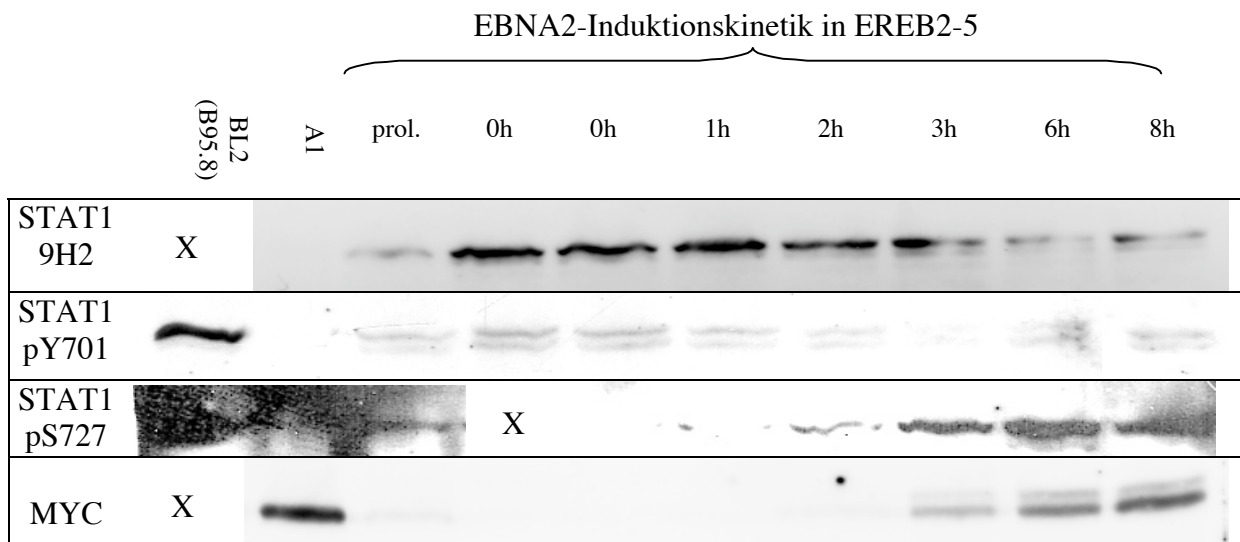
**Abb. 29B:** eIF2 $\alpha$ -mRNA-Expression

Westernblot-Daten, in denen noch weitere LCL- und auch EBV-negative BL-Linien miteinbezogen wurden, bestätigten die STAT1-mRNA-Ergebnisse (Abb. 29A). Die Differenz der im Westernblot sichtbar gemachten STAT1-Gesamtproteinmenge zwischen den beiden Zelltypen überschreitet sogar die Differenz in der mRNA-Expression. Aus Abb. 27D (Stammbaum in pink) geht hervor, dass STAT1 fast ausschließlich mit TypI-Interferon-relevanten bzw. -induzierten Genen koclustert, die nach Der et al. (1998) nicht durch IFN $\alpha$  induziert werden (MxA, SP100, IFI-6-16, ISGF3 $\beta$ , Staf50). Dies bedeutet, dass EBV primär den IFN $\alpha$ / $\beta$  (TypI-Interferon)- und nicht den IFN $\gamma$  (TypII-Interferon)-Signalweg aktiviert. Um herauszufinden, ob die Doppelstrang-abhängige Proteinkinase (PKR), ein wichtiges Zielprotein des IFN $\alpha$ / $\beta$ -Signalweges, aktiv ist, wurde ein Westernblot gegen Phospho-eIF2 $\alpha$ , das Produkt einer aktivierten PKR, durchgeführt. Der Anteil an phosphoryliertem eIF2 $\alpha$  ist tendenziell in LCLs zwar höher, es ergaben sich jedoch kaum signifikante Unterschiede zwischen den Zelllinien. Dabei wurde vorausgesetzt, dass eIF2 $\alpha$  als Bestandteil der Transkriptionsmaschinerie in jeder Zelllinie etwa gleich stark exprimiert ist, was zumindest auf mRNA-Ebene für die in der Array-Analyse miteinbezogenen Zellen gilt (Abb. 29B). Der IFN $\alpha$ / $\beta$ -Signalweg scheint demnach in LCLs nur teilweise aktiviert zu sein.

Funktionelles STAT1 wirkt als Homodimer oder in Komplexen mit anderen STAT-Proteinen oder Transkriptionsfaktoren. Da für die Funktionalität und die Wahl des Bindungspartners von STAT1 die Phosphorylierung von Tyr701 und Ser727 entscheidend ist (im Detail in der Diskussion beschrieben), wurde im Westernblot ebenfalls die Phosphorylierung von STAT1 untersucht (Abb. 29A). Während die STAT1-Menge mit phosphoryliertem Ser727 mit der STAT1-Gesamtproteinmenge korreliert, zeigt sich für an Tyr701 phosphoryliertem STAT1 ein komplett unterschiedliches Expressionsmuster. Zwar ist im Durchschnitt die Gesamtmenge an Phospho-Tyr701-STAT1 in LCLs immer noch tendenziell höher als in BLs, das Verhältnis

von Tyr701-phosphoryliertem STAT1 zu *nicht* Tyr-701-phosphoryliertem STAT1 ist jedoch in LCLs wesentlich geringer als in BLs, was man am deutlichsten beim Vergleich der Linien LCLBucher und BL70 erkennt (Abb. 29A). Beide Linien weisen fast identische Phospho-Tyr701-STAT1-Signale auf, man kann jedoch auch bei langer Exposition kein STAT1-Gesamtprotein in BL70 nachweisen, obwohl das Signal in der Linie LCLBucher schon im Plateaubereich liegt.

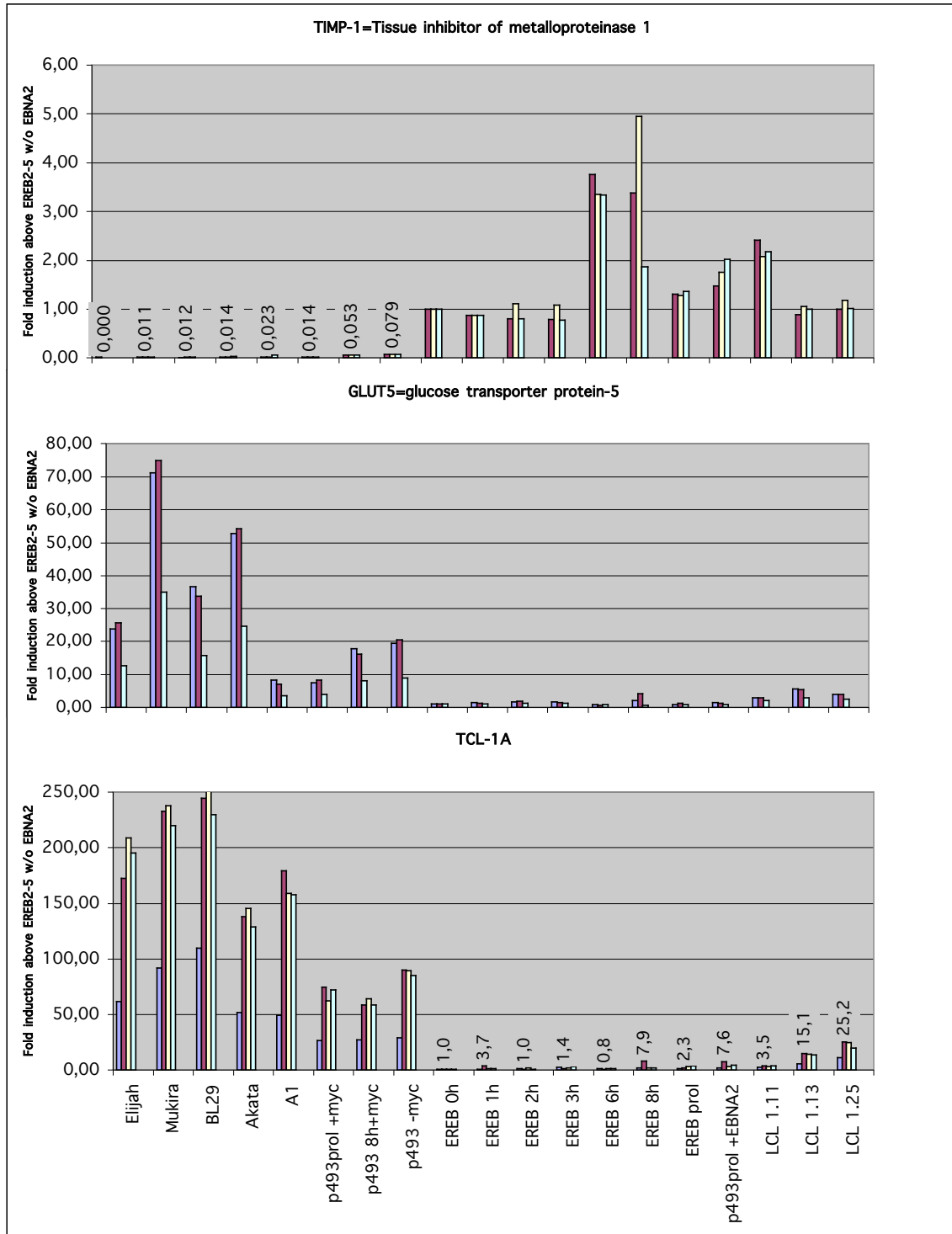
Ein Westernblot der EBNA2-Induktionskinetik in EREB2-5 zeigt eine Abnahme der STAT1-Gesamtprotein-Menge und STAT1(pTyr701)-Menge, mit einer geringfügig stärkeren Phosphorylierung nach 6 und 8 Stunden, möglicherweise induziert durch LMP1 (Gires et al., 1999). Klar induziert ist dagegen die Phosphorylierung von Ser727. Ob dies durch LMP1-aktivierte Serinkinasen wie JNK oder p38 erfolgt, wird Bestandteil von Folgeuntersuchungen sein.



**Abb. 30:** Westernblotanalyse von EBV-konvertierten BL2 (BL2-B95.8, A1 und EREB2-5 in einer EBNA2-Induktionskinetik mit Östrogen. Es wurde die Expression von STAT1-Protein (STAT19H2), von STAT1 mit Phosphorylierung von Tyr701 (STAT1pY701) und von STAT1 mit Phosphorylierung von Ser727 (STAT1pS727) und die Expression von MYC detektiert. STAT1(pTyr701)-Menge korreliert etwa mit der STAT1-Gesamtprotein-Menge, vielleicht mit einer geringfügig stärkeren Phosphorylierung beim 8h-Wert. Klar induziert erscheint dagegen die Phosphorylierung von Ser727.

### 3.3.3 Weitgehend unabhängig von MYC oder EBNA2 regulierte Gene (TypIII)

TypIII-Gene zeichnen sich dadurch aus, dass sich ihr Expressionsniveau in arretierten P493-6-Zellen stark von dem in arretierten EREB2-5-Zellen unterscheidet, es sich aber bei der MYC-Induktionskinetik in P493-Zellen nur geringfügig verändert. Die am stärksten in dieser Weise regulierten Gene sind TIMP-1, Glut5 und Tcl-1a, wobei TIMP-1 nur das erste Kriterium erfüllt (Abb. 31A).



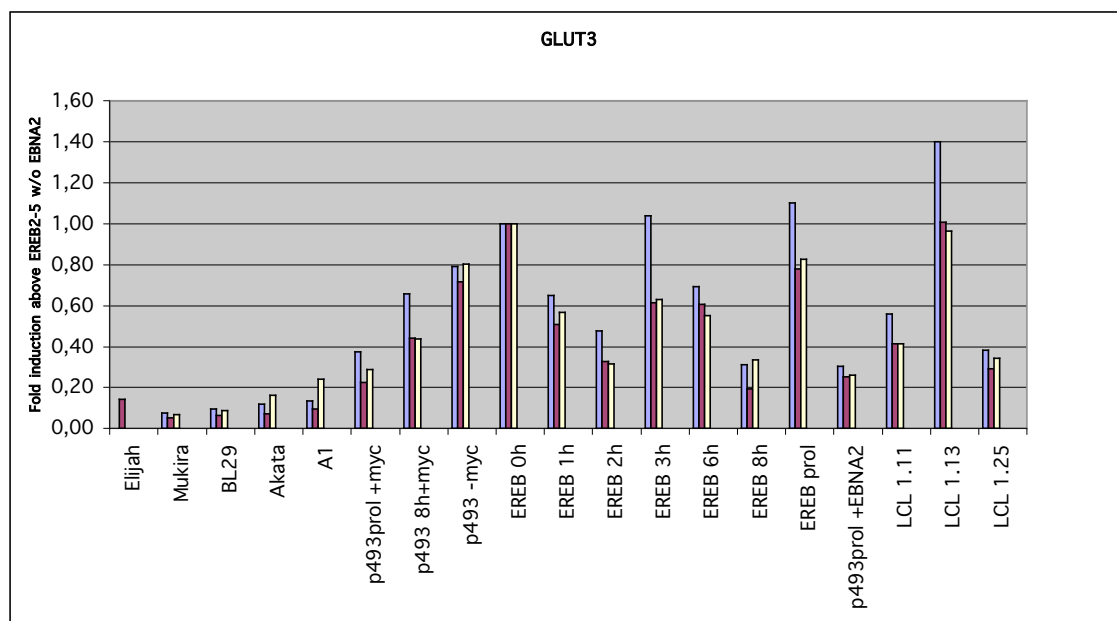
**Abb.31A** mRNA Expressionsmuster von TypIII-Genen, die vermutlich unabhängig von EBNA2- oder MYC-Expression reguliert sind. Jede Säule entspricht einer einzelnen hybridisierten Probe auf dem Microarray. Die Y-Werte entsprechen der Y-fachen Induktion im Vergleich zur Expression in arretierten EREB2-5-Zellen. Die am stärksten regulierten Gene dieser Gruppe sind Tc11a, Glut5 und TIMP1. TIMP1 und Tc11 unterscheiden sich in LCL und BLs um einen Faktor > 50.

**TIMP-1** ist ein Inhibitor von Matrixmetalloproteinasen (MMPs) auf der Oberfläche von Zellen und daher negativ mit Angiogenese und Tumor-Invasivität (Guedez et al., 2001) korreliert. **Glut5** ist ein spezifischer D-Fructose-Transporter (Jost und Thorens, 2001) und **Tcl-1a** ein Aktivator von Akt-Kinase und wurde als Onkogen beschrieben (Hoyer et al., 2002).

Der Unterschied zwischen LCLs und BLs beträgt bei TIMP-1 und Tcl-1a 50-100fach. Damit sind diese Gene innerhalb des Datensatzes die am stärksten unterschiedlich exprimierten in LCLs und BLs. Interessanterweise kann die Expression von Tcl-1a und des koregulierten Glut5 in P493-6 durch EBNA2 reprimiert werden, so dass diese Gene zwar weitgehend unabhängig von MYC aber offensichtlich abhängig von EBNA2 reguliert werden.

Wegen der potentiell Akt-aktivierenden Wirkung von Tcl-1a wurde ein Phospho- Thr308-Akt-Westernblot der oben genannten Zelllinien durchgeführt. Obwohl die detektierten Banden von EBV-positiven BLs stärker waren als in LCLs, konnte keine Bande mit der richtigen Masse von ca 60 kD also vermutlich kein Phospho-Thr308-Akt detektiert werden. Stattdessen fand sich eine Bande von 30kD, deren Spezifität nicht weiter überprüft wurde. Weitere Komponenten des Akt-Signalweges wie PTEN und Akt wurden innerhalb dieses Datensatzes auf mRNA-Ebene nicht nennenswert reguliert.

Interessanterweise war ein Fructosetransporter mit anderer Substratspezifität (Glut3) entgegengesetzt zu Glut5 reguliert (Abb. 31B).



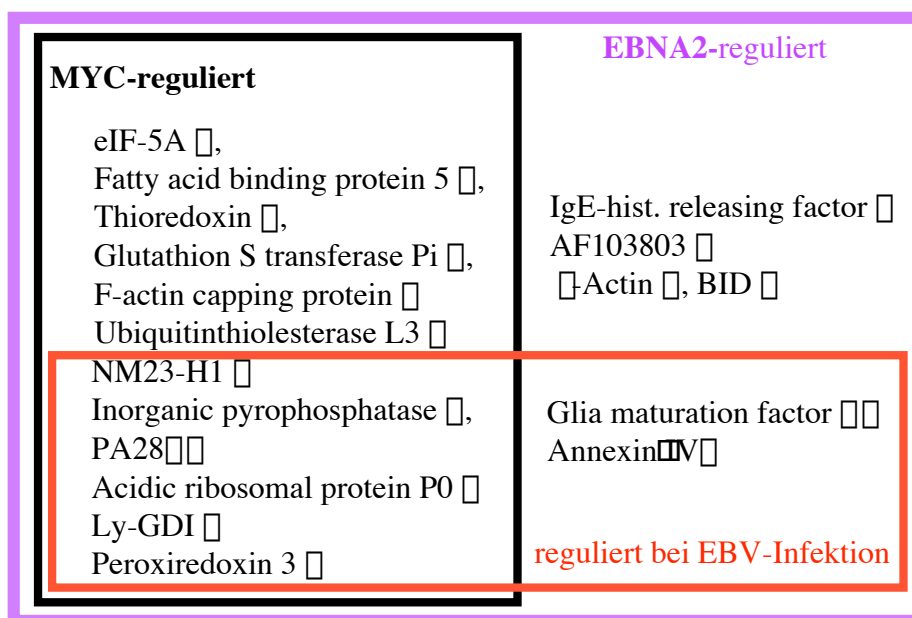
**Abb. 31B** mRNA Expressionsmuster von Glut3, einem Fructosetransporter mit anderer Spezifität als als Glut5

## 4 Diskussion

Um die Mechanismen EBV-vermittelter B-Zell-Immortalisierung und -Kommunikation besser zu verstehen, wurde in der vorliegenden Arbeit ein systematischer umfassender Screen nach EBV-Zielproteinen und -genen durchgeführt. Um EBV- und MYC-induzierte Zellproliferation miteinander vergleichen zu können, wurden verschiedene Zellsysteme benutzt, in denen EBNA2 oder MYC konditional oder konstitutiv exprimiert sind und die in ihrer Fähigkeit zur Proliferation von EBV/EBNA2 bzw. MYC abhängig sind. Die dazu eingesetzten Techniken bestanden in einer Proteomanalyse (2D-Gelelektrophorese mit Massenspektrometrischer Proteinidentifikation), Promotoraktivitätsanalyse (nukleärer Run-On) und einer umfassenden mRNA-Expressions-Analyse (DNA-Chip-Hybridisierung). In den folgenden Abschnitten soll der biologische Kontext der erhaltenen Daten erläutert und die biologische Relevanz diskutiert werden.

### 4.1 2D-PAGE-Analyse in EREB2-5, P493-6 und EBV-infizierten Adenoid-B-Zellen

Die identifizierten EBNA2-Zielproteine sind im folgendem Schema nach MYC-abhängig induzierten Proteinen und nach Zielproteinen, die in der EBV-Infektion eine Rolle spielen, klassifiziert dargestellt:



#### 4.1.1 MYC-abhängige EBNA2-Zielproteine

EBNA2 induziert vermutlich über den Zwischenschritt der MYC-Induktion in besonderem Maße Proteine, die mit dem allgemeinen Stoffwechsel und Wachstum in Verbindung zu bringen sind (Die Funktion von nicht mit Originalliteratur zitierten Targetproteinen wurde der

NCBI-OMIM-Datenbank entnommen): Die **Anorganische Pyrophosphatase (PPase: Inorganic Pyrophosphatase)** hydrolysiert Pyrophosphat, was die Synthese von Nukleotidpolymeren (DNA, RNA) thermodynamisch begünstigt. Die PPase wurde auch als in Adenocarcinomen induziertes Gen gefunden (Chen et al., 2002), möglicherweise als Konsequenz der c-Myc-Überexpression (Schleger et al., 2002). So könnte die Induktion von PPase eine Voraussetzung für schnelle Proliferation mit rascher DNA-Replikation sein. Das **saure ribosomale Protein P0** (Teil der 60S-Untereinheit des eukaryontischen Ribosomes) und vermutlich auch **eIF-5A** (genaueres dazu in späteren Textabschnitten) unterstützen die Translation von Proteinen. Die Proteine **Ubiquitin-Thiolesterase-L3** (UHC-L3, setzt C-terminal gekoppeltes Ubiquitin wieder frei) und **PA28 $\beta$**  (Proteasomaktivator für die trypsinähnliche *nicht* IFN- $\gamma$  induzierte Proteasomaktivität) unterstützen die Proteindegradation und somit den Proteinmetabolismus der Zelle (zusammengefaßt in Khan et al, 2001 und Wilk et al., 2000). Experimente in K-ras temperatursensitiven Zell-Linien und der Phenotyp von PA28 $\beta$  k.o. Mäusen deuten darauf hin, dass die Expression von PA28 $\beta$  mit der Transformation und mit der Kontrolle des Zellwachstums zusammenhängen könnte.

Desweiteren werden Proteine stark reguliert, die mit (oxidativem) Stress in Verbindung gebracht werden: Während **Thioredoxin** durch EBNA2 und durch MYC stark hochreguliert wird, werden **Peroxiredoxin $\beta$**  und **Glutathiontransferase $\beta$**  reprimiert. Dies deutet auf eine Umstellung im Redoxhaushalt der Zelle hin, die sich auf die Aktivität des Proteasoms, die Aktivität von Transkriptionsfaktoren und die Kontrolle der Apoptose auswirken kann (zusammengefaßt in Arrigo et al., 1999). Das zwischen Zytosol und Zellkern shuttlende Thioredoxin (Karimpour et al., 2002) vermittelt beispielsweise die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie AP1, NF- $\kappa$ B, Ref-1 und p53 (Arrigo et al., 1999). Die Repression des mitochondrialen Peroxiredoxin $\beta$  durch MYC steht im Gegensatz zur Identifikation von Peroxiredoxin $\beta$  als MYC-induziertes Target in Rattenfibroblasten (Wonsey et al., 2002). **NM23-H1** (=NDKa) wurde ursprünglich als Repressor der Tumor-Metastasierung beschrieben (Leone et al., 1991). Der andere Name NDKa rührt von seiner Nukleotiddiphosphatkinase-Aktivität her, deren Funktion jedoch noch ungeklärt ist. Da man NM23-H1 als stark induziert nach Expression von Myc findet (Schuhmacher et al., 2001), scheint es mit der Proliferation von Zellen zu korrelieren. In Abschnitt 4.3.1 wird eingehender auf NM23-H1 als Bestandteil eines durch metabolischen, oxidativen Stress induzierten DNA-Reparatursystems eingegangen. Im Zusammenhang mit EBV könnte NM23-H1 auch eine andere Funktion haben als ohne EBV. Subramanian und Mitarbeiter zeigten beispielsweise, dass das virale EBNA3C mit NM23-H1 interagiert und in BL-Zellen die Migrationsfähigkeit

unterdrückt (Subramanian et al., 2001a/b, 2002). Außerdem führte Überexpression von EBNA3C zu quantitativer Translokation von NM23-H1 aus dem Zytosol in den Zellkern. Interessanterweise bindet NM23-H2, ein zu 88% homologes von NM23-H1 an den *myc*-P1-Promoter und ermöglicht so eine effiziente P1- und P2-Transkriptionsinitiation *in vitro* (Postel et al., 1991). **LyGDI** ist ein Inhibitor der Zytoskelett-Formation (zusammengefaßt in der OMIM-Datenbank).

#### 4.1.2 MYC-unabhängige EBNA2-Zielproteine

Die mRNA „**AF103803**“ wurde als Her2/neu-induzierte mRNA kloniert (Oh et al., 1999). **Her-2** ist ein Mitglied der EGF-Rezeptorfamilie, das eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Brustkrebs spielt. Die RT-PCR-Analyse im *Lightcycler* ergab ebenfalls eine Repression von Her-2 durch EBNA2 in EREB2-5 (Daten nicht gezeigt), so dass zu vermuten ist, dass AF103803 über die Repression von Her-2 reprimiert wird. Das Genprodukt des AF103803-Gens wurde erstmals in dieser Arbeit identifiziert, seine Funktion ist jedoch unbekannt. Der IgE-abhängige Histamin-Sezernierungsfaktor (**HRF**=engl. **IgE dependent histamine releasing factor**) wurde von Kang et al. (2001) als sezernierter Wachstumsfaktor für Maus-B-Zellen identifiziert. Die Inkubation von Milz-B-Zellen mit löslichem HRF führte zu verstärkter Expression von MHC II-Molekülen, IL-1, IL-6, IL-10, CD22, CD69 und in Kombination mit Anti-CD40-Antikörper zu dramatischer Aktivierung von NF $\kappa$ B und verstärkter Proliferation. Dies könnte auch auf eine Rolle in der EBV-induzierten Immunantwort deuten.

Besonders interessant für die Fragestellung dieser Arbeit sind Annexin IV und hGMF $\square$  da diese Proteine MYC-unabhängig auch früh nach Infektion von B-Zellen mit EBV reguliert sind. **Annexin $\square$ IV** ist Mitglied einer Familie von Ca<sup>2+</sup>-abhängig Phospholipid-bindenden Proteinen. Die genaue Funktion ist bisher unklar. Es migriert bei Fas-induzierter Apoptose aus dem Zellkern in das Zytosol (Gerner et al., 2000). Man vermutet, dass Annexin $\square$ IV antiapoptotisch wirkt und durch Stress induziert wird, der offensichtlich beim Östrogenentzug im EREB-System mehr entsteht als im P493-6-System unter Tetrazyklin.

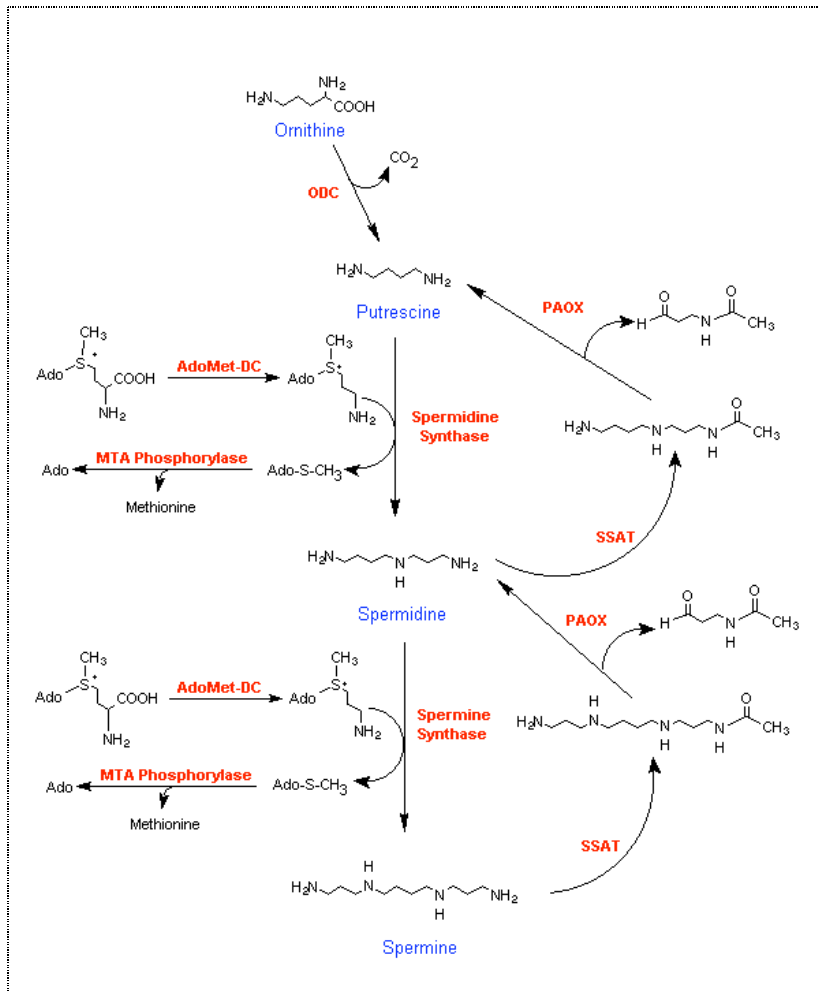
**hGMF $\square$** -cDNA wurde als Homolog von hGMF $\square$  kloniert (Asai et al., 1998). Über die Funktion von hGMF $\square$  existieren bisher noch keine Untersuchungen. Das Homologe hGMF $\square$  spielt in der MAP/ERK- und NF $\kappa$ B-Signaltransduktion eine Rolle (Lim und Zaheer, 1996, Lim et al., 2000). So wurde nach *in vitro* Phosphorylierung durch Proteinkinase A (PKA) eine inhibierende Wirkung auf ERK1/ERK2 und eine aktivierende Wirkung auf p38 MAPkinase in *in vitro* Kinase-Assays festgestellt. *In vivo*-Untersuchungen in C6-



Rattengliomazellen ergaben eine p38-abhängig stimulierte Aktivierung von NF $\kappa$ B durch Überexpression von GMF $\beta$ . Neueste Untersuchungen zeigten dass die Überexpression von hGMF $\beta$  in Astrozyten zur Sezernierung von GM-CSF führt und in Mikrogliazellen die MHC II und IL-1 $\beta$ -Expression induziert (Zaheer et al., 2002). Da Mikroglia und Astrozyten das Immunsystem des Gehirns darstellen, könnte man vermuten, dass auch hGMF $\beta$  eine immunorelevante Funktion besitzt. Ein weiteres Indiz hierfür ist seine spezifische Expression in Milz, Thymus und Testis (Asai, 2001). Erstaunlich in den in dieser Arbeit erhobenen Daten ist, dass hGMF $\beta$  in den infizierten Adenoid-B-Zellen, die nur zu ca. 55% mit EBV infiziert sind, (Tanja Krug, persönliche Mitteilung) eine Repression detektiert werden konnte, die mit Faktor 3 sogar stärker ist als in EREB2-5, was eine Bedeutung von hGMF $\beta$  für eine EBV-Infektion unterstreicht. Da eine dreifache Repression in zu nur 55% infizierten Zellen mathematisch unmöglich ist, spielen vermutlich auch lösliche Faktoren, die auch nicht infizierte Zellen erreichen, eine Rolle bei der Repression von GMF $\beta$ . Erwähnenswert ist auch, dass hGMF $\beta$  bisher in der Literatur noch nie in Zusammenhang mit dem hematopoetischen Immunsystem, Immortalisierung oder Tumorentstehung gebracht worden ist. Die Tatsache, dass in LCLs durch LMP1 der MAP-Kinase-p38 und der NF $\kappa$ B-Weg aktiviert sind, die Expression von GMF $\beta$  jedoch reprimiert wird, steht jedoch in gewissem Widerspruch. Daher erscheint eine andere modulatorische Funktion von GMF $\beta$  in B-Zellen wahrscheinlich.

#### **4.1.3 eIF-5A**

Polyamine scheinen eine wichtige Rolle bei der Regulation des Zellwachstums sowohl in gesunden als auch in Krebs-Zellen zu spielen (Übersichtsartikel Thomas und Thomas, 2001; Bachrach et al., 2001). Es wurde beispielsweise beschrieben, dass Putrescin (Abb. 32) die Transkription der Kinasen c-fos und c-jun stimuliert, während Spermidin die Synthese von c-Myc erhöht. Ein weiterer wichtiger Mechanismus, wie Polyamine die Proliferationsfähigkeit von Zellen beeinflussen können, dürfte die Aktivierung des eukaryontischen Translations-Initiations-Faktor 5a (eIF-5A) sein (Übersichtsartikel: Caraglia et al., 2001). Dabei wird in menschlichem eIF-5A Lysin an Position 50 durch Anlagerung einer Aminobutylgruppe und einer folgenden Oxidation in N<sup>6</sup>-(4-amino-2-hydroxybutyl)lysin (=Hypusin) umgewandelt (Abb. 33). Die dazu notwendigen Enzyme sind Desoxyhypusinsynthase und Desoxyhypusinoxidase.

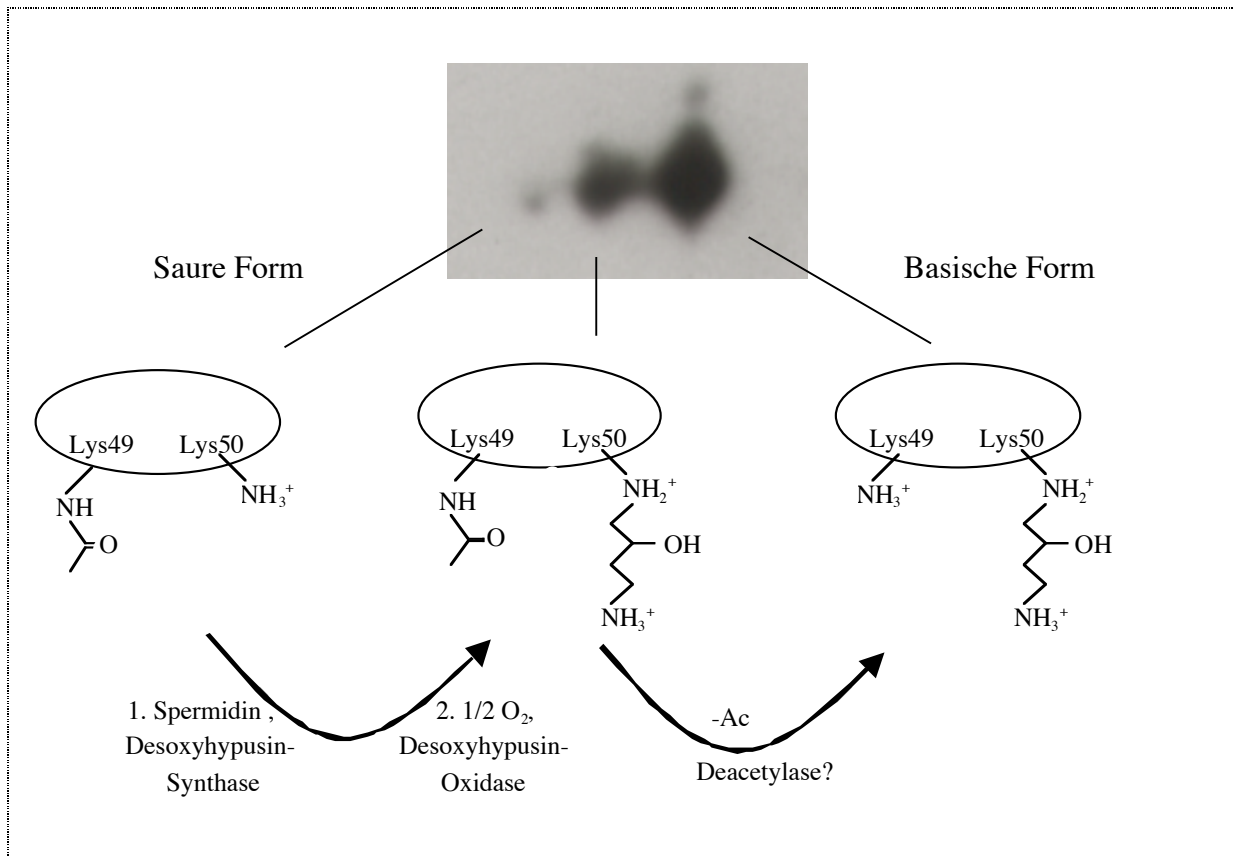


**Abb. 32:**

Biosynthese der Polyamine  
 Innerhalb des Harnstoffzyklus wird mit Hilfe der Arginase aus Arginin die Aminosäure Ornithin gebildet. Ornithin-Decarboxylase (ODC) katalysiert die Decarboxylierung zum ersten Polyamin Putrescine. Nach Anlagerung weiterer Aminogruppen entstehen Spermidin und Spermin (Aminopropyltransfer durch Spermidin-Synthase und Spermin-Synthase). Decarboxyliertes S-Adenosylmethionin dient dabei als Aminopropyl-donor. Die Enzyme S-Adenosyl-methionin-Decarboxylase (AdoMet-DC) und ODC stellen somit Schlüsselenzyme dar, deren Expression auf mehreren Ebenen kontrolliert wird. Spermidin ist ein essentielles Edukt für die posttranslationale Synthese der Aminosäure Hypusine, die Bestandteil von funktionellem eIF-5A ist (Abb. 33).  
 MTA=5'-Methylthioadenosyl  
 AdoMet= S-Adenosyl-methionin

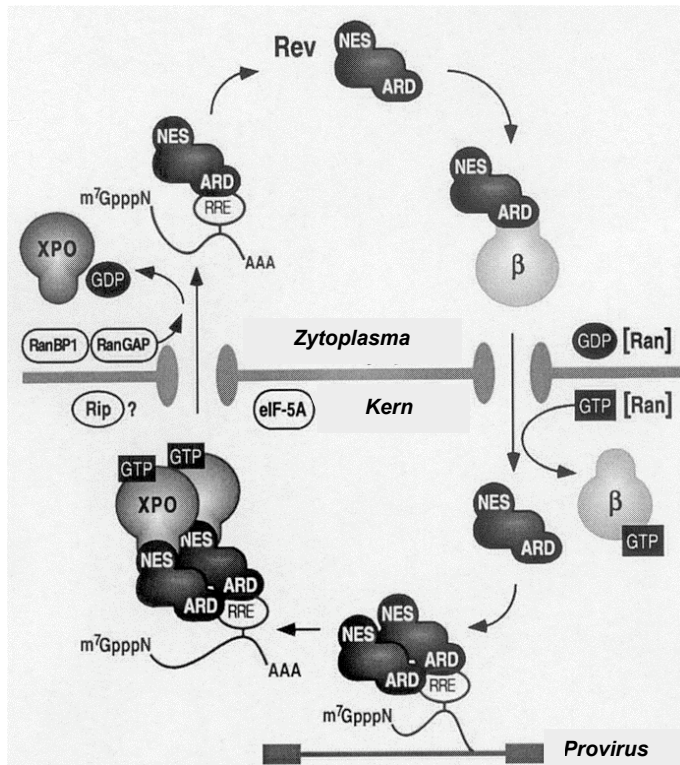
Das eIF-5A-Protein (ehemals eIF-4D) hat eine Masse von 18 kD und ist innerhalb der Eukaryonten (von Hefe bis Säugerzellen) hoch konserviert. Es stellt das zum heutigen Zeitpunkt einzig bekannte Protein mit Hypusinylierung dar. Bisher kennt man zwei biologische Prozesse, in die hypusinyliertes eIF-5A involviert ist:

**1. Translationsinitiation:** eIF3 und eIF1A binden an die kleine Untereinheit (40S) des Ribosoms, um einen 43S-Komplex zu bilden. Die Initiations-tRNA *Met-tRNA<sup>Met</sup>* und eIF2/GTP bilden den *ternären Komplex* und lagern sich an den 43S-Komplex an. Der 43S-Präinitiationskomplex bindet nun an eine mRNA mit 5'-gebundenen Initiationsfaktoren (eIF4E, eIF4G und die RNA-Helikase eIF4A). Die 40S-Untereinheit scannt die mRNA vom 5'-Ende her und stoppt schließlich am AUG-Kodon. Um die Bindung der großen (60S) Untereinheit des Ribosoms zu ermöglichen, muß nun der ternäre Komplex durch Hydrolyse von GTP zu GDP aufgelöst werden, was auch die Dissoziation der übrigen Initiationsfaktoren zur Folge hat. eIF-5A ist möglicherweise in den Prozess involviert, der die GTP-Hydrolyse forciert.



**Abb. 33:** 2D-Westernblot aus EREB2-5-Zell-Totallysat mit anti-eIF-5A Antikörper. Die Zuordnung der eIF-5A-Modifikationen erfolgt nach Klier und Mitarbeitern (Klier et al., 1995), die die Modifikationen in humanen Nierenzellfibroblasten (HeLa) charakterisierten. Diese Modifikationen wurden indirekt in dieser Arbeit durch den Einsatz von Inhibitoren der Hypusinylierung für EREB2-5-Zellen bestätigt. Zur Aktivierung von humanem eIF-5A wird Lysin an Position 50 durch Anlagerung einer Aminobutylgruppe aus Spermidin und einer anschließenden Oxidation in N6-(4-amino-2-hydroxybutyl)lysin (=Hypusin) umgewandelt. Die dazu notwendigen Enzyme sind 1. Desoxyhypusinsynthase und 2. Desoxyhypusinoxidase. Der Mechanismus und die Bedeutung der Acetylierung für die Funktion von eIF-5A ist noch unbekannt, scheint aber mit der Lokalisation in Verbindung zu stehen, da in der Kernfraktion von HeLa-Zellen nur die nicht acetylierte Form detektiert wurde (Klier et al., 1995).

**2. mRNA Export aus dem Zellkern:** eIF-5A wurde erstmals 1993 als Rev1-bindendes Protein identifiziert (Ruhl et al., 1993). Rev1 ist ein für den Kernexport der Virus-RNA von HIV essentielles Protein (Abb. 34). Bevec und Mitarbeiter (Bevec et al., 1996) konnten zeigen, dass eine Mutante von eIF-5A, die zwar an Rev1 bindet, aber nicht mehr exportfähig ist, die Virusvermehrung unterbinden kann. Weitere Exportproteine, die an eIF-5A binden und am eIF-5A-abhängigen Kerntransportmechanismus beteiligt sind, sind CRM1/Exportin1 (Rosorius et al., 1999) und Exportin 4 (Lipowsky et al. 2000).



**Abb.34** Rev-Kerntransport-Zyklus: (nach Pollard und Malim, 1998)  
 Rev bindet als Multimer im Zytoplasma über seine Arg-reiche Domäne (ARD) an Importin- $\beta$  ( $\beta$ ). Nach Kernimport und Freisetzung von Importin $\beta$  bindet Rev über die ARD an das *Rev Response Element* (RRE) der Virus-RNA und über das Kernexportsignal (NES) an Exportin $\alpha$  (XPO). Der Export des *Rev*-Virus-RNA-Komplexes ist mit der Hydrolyse von GTP verbunden. Funktionelles eIF-5A scheint für den Export essentiell zu sein, da eine negativ dominante transportdefiziente eIF-5A Mutante den Export von *Rev* verhindert und die Vermehrung von HIV stoppt (Bevec et al., 1996).

Die Lokalisation von eIF-5A sowohl im Zytoplasma (löslich oder mit dem Endoplasmatischem Retikulum assoziiert) (Shi et al., 1996) und an den Kernporen (Rosorius et al., 1999) bzw. in der Kernfraktion von HeLa-Zellen (Klier et al., 1995) spiegeln möglicherweise die Multifunktionalität von eIF-5A wider.

Welche der genannten Funktionen von eIF-5A *in vivo* eine oder die bedeutendere Rolle spielt und bei der Inhibition die letalen Folgen auslöst, ist ungewiß und wird kontrovers diskutiert. Die Deletion von eIF-5A ist in Hefe letal und die Inhibition der Hypusinylierung durch chemische Inhibitoren führt in einigen Tumorzell-Linien zum Wachstumsarrest (Tome et al., 1997; Nishimura et al., 2002). Die Tatsache, dass in Hefe das Eliminieren von eIF-5A zwar sofort zum Wachstumsarrest führt, aber die Proteinsyntheserate nur um 30% abnimmt, legt jedoch nahe, dass eIF-5A nicht generell essentiell für die Proteinsynthese ist (Kang und Hershey, 1994). Ebenso wenig scheint der mRNA-Transport für das Überleben jeder Zelle essentiell zu sein, weil die konstitutive Expression einer dominant negativen HIV-RNA-transportdefizienten Mutante von eIF-5A (M14) das Verhalten z.B. einer T-Zell-Linie (CEM T-Zellen) nicht beeinflusst (Prof. J. Hauber, pers. Mitteilung).

#### 4.1.4 eIF-5A in EREB2-5-Zellen

Aus den unter 3.1.2 beschriebenen Experimenten geht hervor, dass EBNA2 ebenso wie MYC die Expression von eIF-5A auch in seiner aktiven hypusinylierten Form induziert. Dieser

Befund komplementiert die Beobachtung, dass MYC die Transkription der Schlüsselenzyme der Spermidinsynthese (S-Adenosyl-Methionin-Decarboxylase, S-Adenosyl-Methionin-Synthase, S-Adenosylhomocysteinhydrolase, Methylthioadenosyl-Phosphorylase, ODC und Spermidinsynthase) drei- bis vierfach induziert (Schlosser et al., Schuhmacher et al., pers. Mitteilung). Die Konvergenz dieser Daten läßt es wahrscheinlich erscheinen, dass hypusinyliertes eIF-5A eine essentielle Rolle bei der EBNA2- und MYC-abhängigen Proliferation spielt. Die stabile Expression der für den HIV-RNA-Transport dominant negativen Form von eIF-5A M14 in BLs (DG75) oder LCLs (LCL1.11) und die Inkubation mit Hypusinylierungsinhibitoren von EREB2-5 oder P493-6 hatten jedoch keinen bzw. keinen reproduzierbaren Effekt auf das Wachstum oder die Proteinexpression dieser Zellen. Dies steht in Einklang mit der Tatsache, dass CEM-T-Zellen ebenfalls in ihrem Wachstum nicht durch die Expression von M14 inhibiert werden. Ebenfalls konnte weder mit Inhibitoren noch durch M14-Expression die Expression von CD83, dessen mRNA von eIF-5A aus dem Kern transportiert werden soll (Kruse et al., 2000), reprimiert werden (D.Dudziak, unpublizierte Daten). Ein Grund für das Scheitern der Versuche, eIF-5A in B-Zellen zu inhibieren, könnte allerdings die extrem hohe Expression und Halbwertszeit der basischen Form (Abb.□8) dieses Proteins darstellen. Möglicherweise genügen die verbleibenden nicht durch Inhibitoren erfassten hypusinylierten eIF-5A-Moleküle, um die essentielle Funktion von eIF-5A aufrechtzuerhalten. So ist in weiteren Versuchen entweder eine Optimierung des Expressionsplasmids und die Selektion von Zellen mit hoher Expression angeraten oder sogar ein genetischer Ansatz zur Inhibition der Hypusinylierung zu wählen.

Ein weiteres unerklärtes Phänomen bleibt die nur sporadisch auftretende Expression der basischen, langlebigen möglicherweise im Kern lokalisierten Form von eIF-5A.

#### **4.1.5 Halbwertszeit von Proteinen in arretierten EREB2-5**

Wie pulse-chase Versuche (Abb.□8) belegen, ist die Halbwertszeit mancher Proteine in arretierten EREB2-5-Zellen gegenüber proliferierenden EREB2-5-Zellen extrem verlängert. Dies erklärt, weshalb die Induktion des <sup>35</sup>S-Signals vieler Proteine (beispielweise eIF-5A und NM23) in EREB2-5/P493-6 nicht in der Silberfärbung oder im eindimensionalen Westernblot nachvollzogen werden konnte. So bietet das metabolische <sup>35</sup>S-Labeling von EREB2-5 in Bezug auf viele Proteine die einzige Möglichkeit, eine Induktion/Repression nachzuweisen. Dagegen war nach der Infektion von Adenoid-B-Zellen mit EBV die Induktion in der Silberfärbung vergleichbar mit der <sup>35</sup>S-Inkorporation, da diese Zellen direkt aus der Ruhephase kommen und niemals zuvor aktiviert waren.

#### 4.1.6 Bewertung der Methode

Im Vergleich zur Microarray-Analyse/Run-On-Analyse erscheint die Ausbeute interessanter Targetproteine bei gleichzeitig viel höherem arbeitstechnischem Aufwand eher gering. Eine Verbesserung der Targetausbeute könnte durch die Verwendung engerer pH-Gradienten oder Präfraktionierung der Lysate erhöht werden. Dennoch würde das Problem bestehen bleiben, dass Transmembranproteine durch die Methode bisher nicht erfasst werden können. Das Potential der Methode liegt in der Möglichkeit der Erfassung von Proteinmodifikationen (siehe eIF-5A) und von Proteinen, die bisher aufgrund geringer Popularität noch nicht auf Microarrays vorhanden sind (siehe GMF AF103803).

#### 4.2 Durch nukleäre Run-Ons ermittelte Zielgene von EBNA2

Die mit Hilfe der nukleären Run-On-Analyse neu gefundenen direkten oder frühen EBNA2-Zielgene kodieren Proteine, die vor allem in B-Zell-Homing (EBI2, SIAT1, CD22, CXCR4, SDF1 $\beta$ , CCRD6, MIP1 $\alpha$ , CD44) und –Signaling (CD22, B7.2, ARHH) involviert sind. Interessanterweise handelt es sich bei den Paaren SIAT1/CD22, CXCR4/SDF1 $\beta$ , CCRD6/MIP1 $\alpha$  um Rezeptoren mit dem jeweiligen Liganden, die hier durch EBNA2 koinduziert werden. Im Falle der Chemokinrezeptoren (CXCR4, CCRD6) könnte es sich dabei um autokrine zur eigenen Wachstumsstimulation der Zelle nötige Loops handeln (Lataillade et al., 2000). Auf der anderen Seite sind MIP1 $\alpha$  und SDF1 $\beta$  sehr effiziente Chemoattraktoren für T-Zellen (Baggiolini, 1998). Dieser Aspekt wird in Abschnitt 4.3.5 detaillierter diskutiert.

Im Falle von SIAT1 und CD22 bleibt eine Interpretation der Daten schwierig: SIAT1 ist als 2,6 $\alpha$ -Sialyltransferase zusammen mit der ebenfalls induzierten UDP-2-GalNac-Epimerase u.a. an der Generierung des Oberflächenantigens CD75 beteiligt (Keppler et al. 1992, Keppler et al., 1999), das wiederum der Ligand des Lectins CD22 ist. CD22 ist wahrscheinlich ein Modulator des B-Zell-Rezeptors (BCR), der bei Ligation mit dem BCR das Signaling inhibiert, aber bei Eigenquervernetzung das Signal vom BCR verstärkt (Yohannan et al., 1999). Die 2,6 $\alpha$ -Sialylierung des BCRs ist einerseits Voraussetzung der Bindung von CD22 an den BCR, andererseits kann es bei der Sialylierung anderer Substrate (wie z.B. CD75) zur Konkurrenz und Bindung von CD22 an andere Substrate kommen, was eine Inhibition aufheben würde. Welcher Effekt überwiegt und ob BCR-unabhängige Funktionen wie Zelladhäsion und B-Zell-Homing eine Rolle spielen, bleibt jedoch unklar.

Im Gegensatz zu den RNA-Daten konnte in FACS-Messungen auf EREB2-5-Zellen innerhalb einer EBNA2-Induktionskinetik keine Regulation von CD75 nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Dies kann aber theoretisch auch mit der Maskierung von CD75 durch andere Liganden oder CD22 zurückzuführen sein. Ebenso zeigten LCLs und BLs keinen Unterschied der CD75-Expression auf der Zelloberfläche.

Desweiteren wurden zwei Transkriptionsfaktoren (Ets1, HHEX) identifiziert, die -ähnlich wie MYC- in Proliferations- und Wachstumskontrolle involviert sind (OMIM-Datenbank).

Bei genauer Betrachtung der EBNA2-Induktionskinetiken der Chemokinrezeptoren im EREB2-5-System fällt auf, dass die Kinetiken der Chemokinrezeptoren biphasisch verlaufen: Das Maximum des jeweiligen Chemokines geht mit dem Minimum des korrespondierenden Rezeptors einher. Das Phänomen, dass die Bindung eines Chemokins zur Internalisierung des Rezeptors und somit zu seiner Depletion auf der Zelloberfläche führt, ist bereits für CXCR4 beschrieben (Förster et al., 1998). Dass aber die Bindung des Chemokins auch auf mRNA-Ebene regulierend eingreifen könnte, stellt ein noch nicht beschriebenes ebenfalls biologisch sinnvolles Phänomen dar, das einer eingehenderen Untersuchung bedarf.

Nach den mit der Run-On-Analyse erhobenen Daten scheint EBNA2 primär einerseits Transkriptionsfaktoren zu induzieren, die an der Kontrolle von Proliferation und Wachstum beteiligt sind, und andererseits die Expression vor allem von Chemokinrezeptoren und Chemokinen sowie Homingrezeptoren zu induzieren. Letztere sind vermutlich für eine EBNA2-induzierte B-Zell-Aktivierung wichtig, sowie für die damit verbundenen Phänomene der B-Zell-Migration, -Lokalisation und Rekrutierung von T-Zellen.

### **Bewertung der Methode**

Mit Hilfe der Run-On-Technologie konnten sehr sensitiv frühe und direkte Zielgene von EBNA2 detektiert werden. Es hat sich jedoch als unbedingt notwendig erwiesen, Run-On-Daten durch mRNA-Kinetiken zu bestätigen, da jede Kinetik unterschiedlich aussehen kann. Im Falle von PDE4B stehen die RT-PCR-Daten sogar im Gegensatz zu den Run-On-Daten, was auf zusätzliche komplexe Formen der Regulation der Expression auf der Ebene der RNA-Stabilität hinweist.

### 4.3 mRNA-Analyse von EBV- und MYC-vermittelter Proliferation auf Lymphochips

Da die Diskussion aller Daten den Rahmen der Doktorarbeit und die Geduld des Lesers sprengen würde, soll im Folgenden nur auf die Regulation einiger auffällig regulierter Gene mit den dazugehörigen Signalwegen eingegangen werden. Gene, die BL-spezifisch reguliert sind, werden nicht weiter besprochen, da sie nicht Ziel dieser Arbeit sind.

#### 4.3.1 MYC- und EBV/EBNA2-induzierte Gene sind proliferationsassoziiert

Ein unbestrittener Schlüsselfaktor in den beschriebenen Systemen ist das direkte zelluläre EBNA2-Zielgen *c-myc*. Wie bereits in der Einleitung beschrieben, handelt es sich bei *c-myc* um ein Onkogen, dessen Überexpression in B-Zellen zu deren Immortalisierung führen kann. So war anzunehmen, dass MYC alle für die Proliferation nötigen Faktoren in einer B-Zelle induziert und dass EBNA2 seine proliferationsfördernde Wirkung größtenteils über die Induktion von MYC vermittelt. Diese Annahme findet in den vorliegenden Daten ihre Bestätigung. Gene, die im vorliegenden Datensatz in gleichem Maße von MYC und EBV/EBNA2 induziert wurden [TypI(+/+)], waren vor allem in grundlegende Prozesse der Lebenserhaltung und Zellteilung wie Stoffwechsel, Polyaminstoffwechsel, Proteinmetabolismus, Nukleotidsynthese und Replikation involviert. Damit komplementieren die Arraydaten in diesem Punkt die aus dem Proteomansatz gewonnenen Daten bzw. weisen z.B. mit UCH-L3 und NM23-H1, die im 2D-PAGE als MYC-abhängig EBNA2-reguliert identifiziert worden waren, sogar Überschneidungen auf. Ein interessanter Punkt ist die Koregulation von NM23-H1 und SET, die gemeinsam mit dem etwas später in der EBNA2-Induktionskinetik induzierten HMG-2 den *SET-Komplex* bilden (Fan et al., 2003). Nach Meinung von Fan et al. ist der SET-Komplex ein DNA-Reparatursystem und Transkriptionsaktivator, der als Antwort auf oxidativen Stress induziert wird, der bei einem aktivierten Metabolismus einer Zelle entsteht. Aber auch weitere koregulierte Gene greifen in ihrer Funktion ineinander: Die später in der MYC- oder EBNA2-Induktionskinetik induzierte TypI(+/-)-Genprodukte wie Ark2, Aurora, CENP-E, CENP-F, CDC20, MAD2 und BUB1 sind an der Organisation der chromosomalen Kinetochoren und des Spindelapparates beteiligt und kontrollieren dadurch die Chromosomen-Separation und -Segregation der Anaphase.

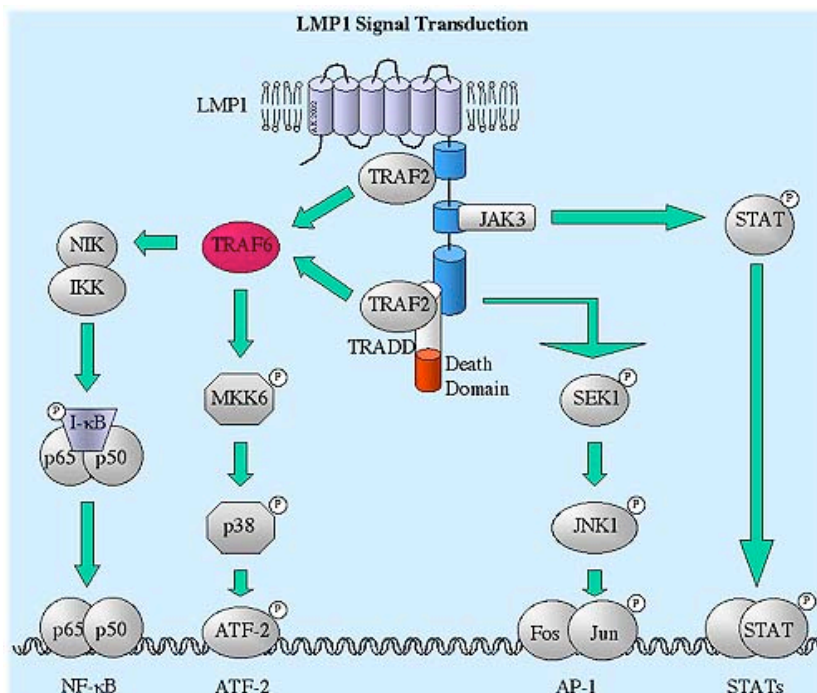
Das Expressionsprofil von Ki67 untermauert, dass sich "EREB2-5 0h" tatsächlich bis 8h nach Induktion in G0 befinden und daher arretierte Zellen darstellen. Im Gegensatz dazu sind P493-6-Zellen auch nach Zugabe von Tetrazyklin Ki67-positiv. Diese letzten Befunde spiegeln sich in den Thymidin-Inkorporationsassays aus Abb. 5 wider. So kann anhand der erhobenen mRNA-Daten der Einstieg von EREB2-5 aus G0-Arrest in den Zellzyklus



nachvollzogen werden. Insgesamt zeigt sich, dass man aus den erhobenen mRNA-Daten auf den Zustand von Zellen innerhalb des Zellzyklus schließen kann. Wie das Koclustern der gesamten Expressionsprofile der Zellen des vorliegenden Datensatzes zeigte (siehe Abschnitt 3.3) konnte man allein anhand dieser generierten Stammbäume, die die Ähnlichkeit der Expressionsprofile der Zelllinien widerspiegeln, Zellen der MYC- oder EBV/EBNA2-abhängigen Proliferation zuordnen. Die Gene die diese Unterschiede ausmachen [also *nicht* TypII(+/+)] bzw. bewirken, werden in den nach folgenden Abschnitten beschrieben.

### 4.3.2 LMP1

Das virale LMP1 ist als direktes EBNA2-Zielgen ein weiterer Schlüsselfaktor der EBV-vermittelten Proliferation. LMP1 ist ein transmembranes konstitutiv aktives Signalmolekül, das in seiner Wirkung auf B-Zellen einem stimulierten CD40-Rezeptor sehr ähnlich ist (Kilger et al. 1998, Ulrike Dirmeier Doktorarbeit, 2002), wobei die zytosolische Domäne eher der des TNF $\alpha$ -Rezeptors ähnelt (Abb.35). Es ist essentiell für die B-Zell-Immortalisierung durch EBV (Kilger et al., 1998), transformiert Nagerfibroblasten *in vitro* (Wang et al., 1985) und führt bei Expression in transgenen Mäusen –also ohne EBV-Hintergrund- zur Entwicklung von B-Zell-Lymphomen (Kulwicht et al., 1998). Die bisher bekannten Signalwege, über die LMP1-Funktion seine Funktion vermittelt, umfassen den NF $\kappa$ B-, JNK1/AP1, p38 MAPK- und den JAK/STAT-Signalweg (Übersichtsartikel Lam und Sugden, 2003), wobei letzterer für das Überleben der Zelle nicht von Bedeutung ist.



**Abb.35:** (Nach A.Kieser, Homepage) Das virale LMP1 vermittelt Überleben, Proliferation und Schutz vor Apoptose. Die bisher bekannten Signalwege umfassen den NF $\kappa$ B-, JNK1/AP1, p38 MAPK- und den JAK3/STAT-Signalweg, wobei letzterer für das Überleben der Zelle nicht von Bedeutung ist. Bekannte, an den Signalwegen beteiligte Faktoren sind als runde oder eckige Formen skizziert. (P) entspricht der phosphorylierten Form.

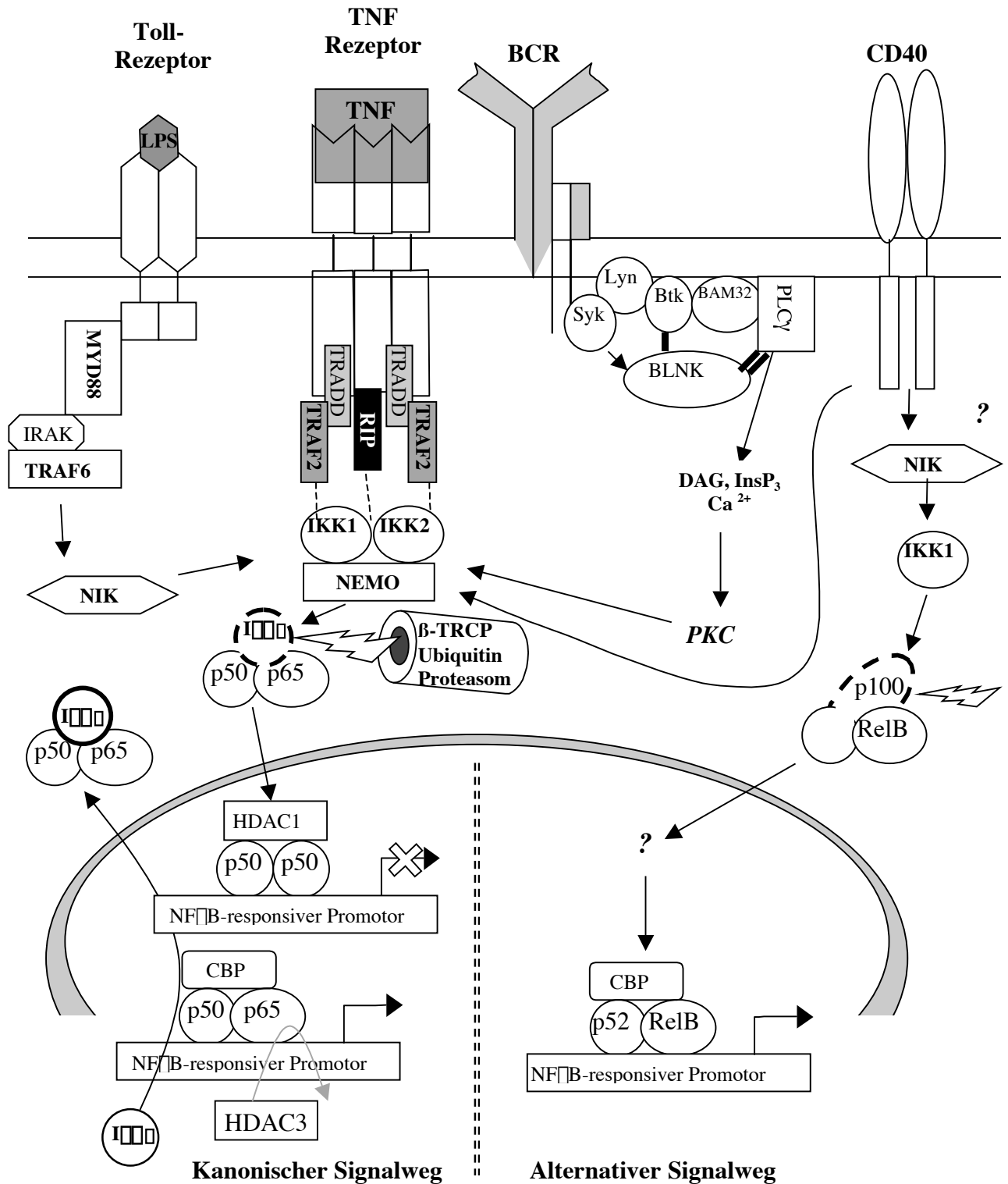
### 4.3.3 NF- $\kappa$ B

Da für aus der Literatur bekannte NF- $\kappa$ -Zielgene auffällige Expressionsmuster [TypIII(-/+)] gefunden wurden, soll im Folgenden auf NF- $\kappa$  (Nukleärer Faktor  $\kappa$ ) eingegangen werden (Übersichtsartikel Li und Verma, 2002; Caamano und Hunter, 2002, Niirou und Clark, 2002).

Die NF- $\kappa$ -Proteine sind Transkriptionsfaktoren, die eine zentrale Rolle in der Regulation der adaptiven und angeborenen Immunantwort spielen. Nicht aktivierte NF- $\kappa$ -Proteine befinden sich aufgrund ihrer Assoziation an NF- $\kappa$ -Inhibitoren (I $\kappa$ Bs) vorwiegend im Zytoplasma der Zelle, wo sie inaktiv sind. Nach Aktivierung von I $\kappa$ B-Kinasen (IKKs) im IKK-NEMO-Komplex werden I $\kappa$ Bs durch diese an Serinresten phosphoryliert, an Lysinresten ubiquitinyliert und durch das 26S Proteasom degradiert, so dass NF- $\kappa$ -Dimere in den Kern migrieren und dort nach Bindung an das NF- $\kappa$ -responsive Element eines Promotors als Transkriptionsfaktoren aktiv werden. Fast alle NF- $\kappa$ -Proteine können über ihre Rel-Homologie-Domäne (RHD) Hetero- und Homodimere bilden (Tabelle 5). Dabei gibt es NF- $\kappa$ -Proteine mit und ohne Transaktivator-domäne, so dass Heterodimere wie das ubiquitär exprimierte p65/p50-Dimer transkriptionell aktivierend wirken, während Homodimere der NF- $\kappa$ -Proteine (p50/p50) ohne Transaktivator-domäne als Transkriptionssinhibitoren wirken.

NF- $\kappa$ -Proteine	Eigenschaften, Besonderheiten
RelA(=p65), c-Rel, RelB	Haben Transaktivierungsdomäne. RelB bildet keine Homodimere. RelA wird ubiquitär, c-Rel und RelB werden nur in lymphoidem Gewebe exprimiert.
NF- $\kappa$ 1 (p50;p105)	Hat keine Transaktivierungsdomäne; ubiquitäre Expression
NF- $\kappa$ 2 (p52;p100)	Hat keine Transaktivierungsdomäne; Expression in lymphoidem Gewebe
<b>I<math>\kappa</math>B-Proteine</b>	
I $\kappa$ B $\beta$ , (I $\kappa$ B $\delta$ )	Vermitteln transiente NF- $\kappa$ -Antwort. Haben NES, Gene werden durch NF- $\kappa$ induziert, schnelle Phosphorylierung und Degradation induzierbar. I $\kappa$ B $\delta$ -K.O.-Mäuse haben keine schweren Immundefekte.
I $\kappa$ B $\alpha$	Hält persistente NF- $\kappa$ -Aktivierung aufrecht. Besitzt kein NES, maskiert beide NLS des gebundenen NF- $\kappa$ -Dimers und stabilisiert dadurch den Komplex im Zytoplasma oder im Kern (hier wirkt I $\kappa$ B $\alpha$ demnach als Transaktivierungsstabilisator). Das Gen wird nicht durch NF- $\kappa$ induziert. Keine schnelle Degradation induzierbar.
BCL-3	Besitzt keine NES aber Transaktivator-domäne ->Transaktivator!
p105, p100	Die nicht gespaltenen NF- $\kappa$ -Formen enthalten eine Anchyridomäne, so dass sie als I $\kappa$ B-ähnliche Proteine fungieren können.
<b>IKKs</b>	
IKK1(IKK $\alpha$ )	Wichtig für B-Zell-Reifung, Keratinozytenentwicklung, NIK-abhängige p100-Prozessierung
IKK2(IKK $\beta$ eta)	Wichtig für NF- $\kappa$ -Aktivierung durch IL-1, TNF und LPS
NEMO (IKK $\gamma$ )	Regulatorische Unterheit ohne katalytische Aktivität. Wichtig für NF- $\kappa$ -Aktivierung (NEMO-K.O.-Mäuse haben ähnlichen Phänotyp wie IKK1/IKK2-doppel-K.O.-Mäuse.

**Tabelle 5:** Komponenten des NF- $\kappa$ -Signalweges und ihre Eigenschaften.

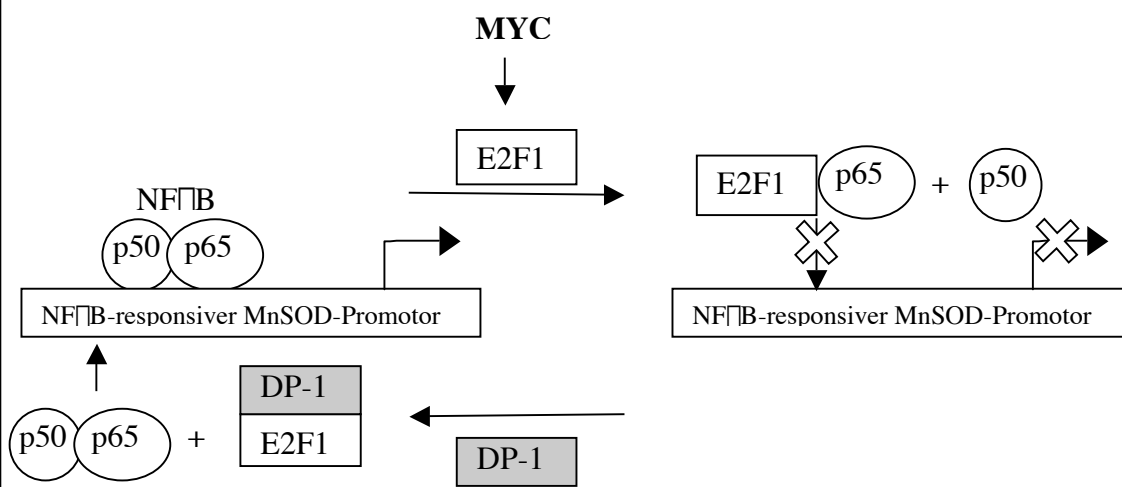


**Abb. 36:** Der Signalweg der induzierbaren NF-κB-Aktivierung erfolgt über die induzierte Degradation von IκB. Dabei wirken alle Signalwege auf IKKs ein, die IκB (kanonischer Signalweg) oder p100 (alternativer Signalweg) phosphorylieren. Dabei sind die meisten Zwischenschritte im alternativen Signalweg und ebenso die Frage, ob Unterschiede beim Transaktivierungsmechanismus bestehen, ungeklärt. DAG=Diacylglycerol; InsP<sub>3</sub> = Inositoltriphosphat; CBP=Histoacetyltransferase, HDAC=Histondeacetylase; BCR=B-Zell-Rezeptor; TNF=Tumor-Nekrose-Faktor; PLC=Phospholipase; PKC=Proteinkinase C; Syk, Lyn, Btk = Proteintyrosinkinasen; PLC=Phospholipase C; LPS=Lipopolysaccharide; NIK=NF-κB-induzierende Kinase; MYD88, IRAK, TRAF, TRADD, RIP, BLINK, BAM32, NEMO sind regulatorische Proteine ohne bekannte katalytische Aktivität.

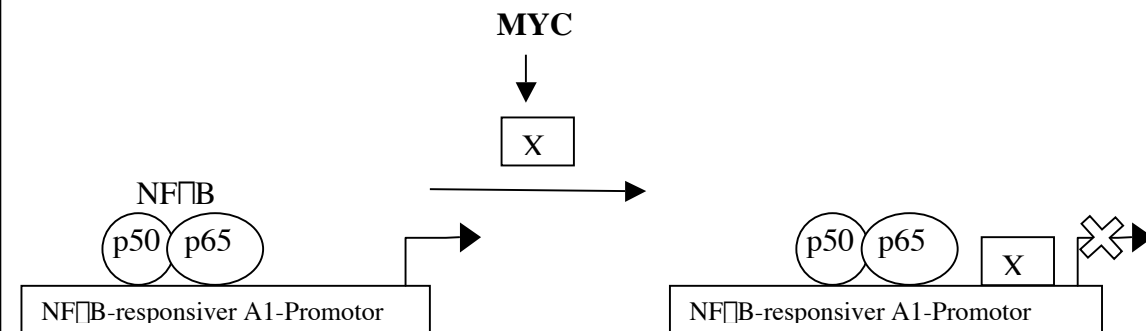
Alle NF $\kappa$ B-Proteine haben eine nukleäre Lokalisationssequenz (NLS), die für den Import des Komplexes in den Kern verantwortlich ist, während I $\kappa$ B $\alpha$  und I $\kappa$ B $\beta$  ein nukleäres Exportsignal (NES) haben, das den Export aus dem Zellkern favorisiert. Bei der Bindung von I $\kappa$ B $\alpha$  an ein NF $\kappa$ B-Dimer wird eine NLS des Dimers verdeckt. So entsteht ein dynamisches, energieaufwendiges Gleichgewicht zwischen Kernimport und Export, das durch Phosphorylierung und Degradation von I $\kappa$ B $\alpha$  innerhalb weniger Sekunden nach erfolgtem Stimulus in Richtung des Imports verschoben wird und zur Bindung von NF $\kappa$ B an sein Response-Element führt. Der p65/p50-Komplex rekrutiert dabei den Histonacetyltransferasekomplex CBP und verdrängt den zuvor gebundenen Repressor-Komplex aus p50-Dimer und Histondeacetylase1 (HDAC1) von der NF $\kappa$ B-Bindungsstelle. Die Histonacetylierung durch CBP führt schließlich zur Genaktivierung. Zum "Recycling" von NF $\kappa$ B wird vermutlich p65 durch HDAC3 deacetyliert, was die Bindung von I $\kappa$ B $\alpha$  an das p65/p50-Dimer verstärkt und zum Export aus dem Kern führt. Zur Aktivierung von NF $\kappa$ B trägt nicht nur die Degradation von I $\kappa$ B $\alpha$ , sondern auch die Serinphosphorylierung (durch NIK, PKC, CaseinkinaseIII, IKK2 etc.) und Acetylierung von p65 bei. Die initiale Aktivierung des NF $\kappa$ B-Signalweges (zusammengefasst in Pahl, 1999) erfolgt entweder durch eher unspezifische Stimuli wie oxidativer Stress und Giftstoffe oder durch die Aktivierung von Zelloberflächenrezeptoren durch pathogene Erreger oder körpereigene Botenstoffe. Zu den wichtigsten körpereigenen Rezeptoren gehören die Toll-Rezeptoren, die auf Lipopolysaccharide (LPS) reagieren, die Rezeptoren der TNF-Rezeptor-Familie (TNFR), der T-Zell-Rezeptor und indirekt der B-Zell-Rezeptor-Komplex (BCR). Die Signalwege mit den wichtigsten bekannten Signalmolekülen sind in Abb. 36 dargestellt. Nach neusten Erkenntnissen gibt es neben dem oben beschriebenen Signalweg (kanonischer Weg) noch einen *alternativen* NEMO-unabhängigen Weg (nicht-kanonischen Weg), bei dem NIK über IKK1 die Prozessierung von p100 zu p52 induziert (Senftleben et al., 2001). Rezeptoren, die diesen Signalweg auslösen können, sind nach bisherigen Erkenntnissen BAFF-R (B-Zell-Aktivierungsfaktorrezeptor), LT $\alpha$ R (Lymphotoxinrezeptor) und CD40 (Übersichtsartikel Pomerantz und Baltimore, 2002). Aufgrund der Ähnlichkeit des quervernetzten CD40-Rezeptors mit LMP1 (s.o), soll im folgenden Abschnitt auf die Untersuchungen im Zusammenhang mit CD40 eingegangen werden (Coope et al., 2002): Coope et al. zeigten, dass CD40 neben dem kanonischen auch den nicht-kanonischen Signalweg aktiviert. In diesem alternativen Weg bindet – anstelle von p65 – *RelB* an den **p52**-Vorläufer **p100**, der durch sein Ankyrindomäne gleichzeitig wie ein I $\kappa$ B fungiert. Durch Aktivierung von NIK-Kinase und IKK1 kommt es zur induzierten

Ubiquitin-vermittelten Prozessierung von p100 zu p52, so dass der NF $\kappa$ B-Komplex in den Kern migriert. Zusätzlich wurde gezeigt, dass im Gegensatz zur Aktivierung des kanonischen Signalweges für die vollständige Aktivierung des alternativen Signalweges offenbar eine durch CD40-induzierte Genexpression oder Translation erforderlich ist. Im Gegensatz zum LMP1-Signalweg, bei dem NIK IKK2 aktiviert (Sylla et al., 1998), wurde gezeigt, dass die Aktivierung des kanonischen Signalweges über CD40-Quervernetzung NIK-unabhängig erfolgt.

Modell nach Tanaka et al., 2002:



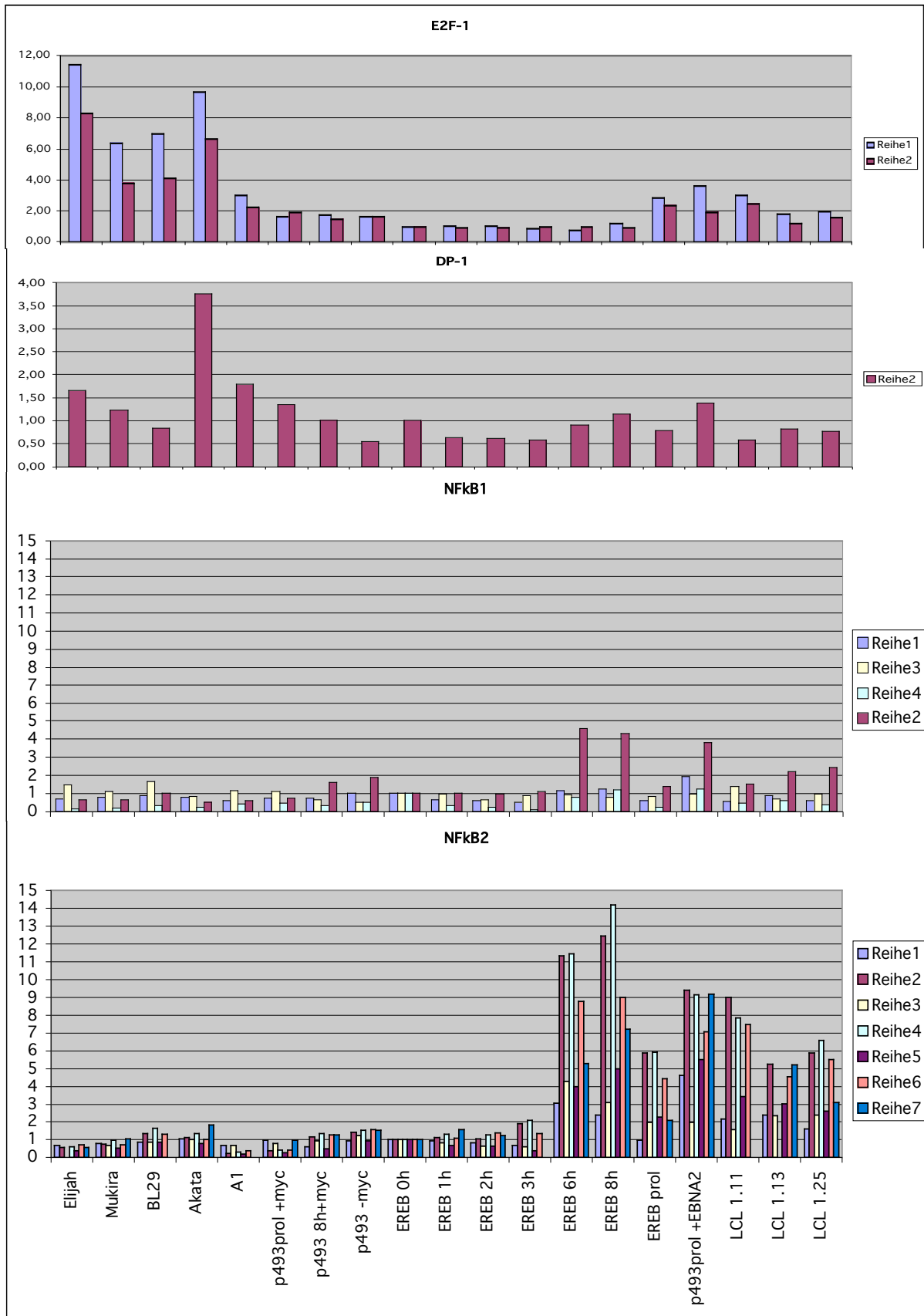
Modell nach You et al. (2002):



**Abb. 37:** In zwei unabhängig voneinander erschienenen Veröffentlichungen wurde gezeigt, dass MYC indirekt NF $\kappa$ B-Genaktivierung inhibiert. Dabei zeigten Tanaka et al., dass das MYC-Zielprotein E2F1 in Konkurrenz mit p50 an p65 bindet und somit die Bindung des NF $\kappa$ B-Komplexes an die DNA verhindert, während You et al. eine Inhibition der Transaktivierung bei vollständiger Bindung an das NF $\kappa$ B-Element des A1-Promotors feststellten. Letztere vermuteten als Transaktivierungsinhibitor ein bisher unbekanntes Zielgenprodukt (X) von MYC. In beiden Fällen inhibiert MYC dadurch antiapoptotische Signalwege. Überexpression von DP-1 kann E2F1 aus dem Komplex mit p65 sequestrieren und damit die NF $\kappa$ B-Aktivität wieder herstellen. MnSOD=Mangan-Superoxiddismutase, A1= Bcl-2-ähnliches Protein

#### 4.3.3.1 MYC reprimiert NF $\kappa$ B-Zielgene

Die in Abb. 7A/B dargestellten Expressionsprofile gehören zu TypII(-/+)- und TypII(+/+)-Genen: Induziert in den EBV-abhängig proliferierenden Zellen, reprimiert oder nicht so stark induziert in MYC-abhängig proliferierenden Zellen. Laut Literatur (Übersichtsartikel Pahl et al., 1999) handelt es sich bei den meisten dieser Gene um NF $\kappa$ B-Zielgene. Die Induktion von NF $\kappa$ B-Zielgenen in LCLs überrascht nicht, da in diesen Zellen LMP1 exprimiert ist, das konstitutiv NF $\kappa$ B aktiviert. Die Negativregulation in MYC-abhängig proliferierenden Zellen ist in Übereinstimmung mit aktuellen Arbeiten (You et al., 2002 bzw. Tanaka et al., 2002), in denen der Einfluss von Myc auf die Sensitivität von Fibroblasten in Bezug auf proapoptische Stimuli untersucht wurde. In beiden Arbeiten wurde durch Überexpression von MYC die NF $\kappa$ B-vermittelte Induktion antiapoptischer Gene wie das Bcl-2-verwandte A1 und das antioxidative Enzym Mn-Superoxiddismutase (MnSOD) inhibiert (Abb. 37). Dabei zeigten Tanaka et al. durch EMSA-Experimente, dass das MYC-Zielprotein E2F1 in Konkurrenz zu p50 an p65 bindet und somit die Bindung des NF $\kappa$ B-Komplexes an die DNA verhindert, während You et al. eine Inhibition der Transaktivierung bei vollständiger Bindung an das NF $\kappa$ B-Element des A1-Promotors feststellten. Letztere vermuteten als Transaktivierungsinhibitor ein bisher unbekanntes Zielgenprodukt von MYC. Die Konsequenz ist eine stärkere Apoptosesensitivität der MYC- oder E2F1-exprimierenden Zellen als Antwort auf TNF-Stimulation (You et al., 2002) oder auf oxidativen Stress (Tanaka et al., 2002). Im vorliegenden Datensatz ist die Expression von E2F1 in BL-Zelllinien von Patienten erhöht. Interessanterweise sind im Gegensatz zu Akata die Linien Elijah, Mukira und BL29 sehr anfällig für oxidativen Stress. Akata zeichnet sich hingegen durch vergleichsweise hohe Expression von DP-1 aus, welches E2F1 bindet und zumindest in MEFs (Maus-Embryofibroblasten) die NF $\kappa$ B-vermittelte MnSOD-Expression wieder herstellt (Tanaka et al., 2002). So scheinen die in Fibroblasten gemachten Beobachtung auf B-Zellen übertragbar zu sein. E2F1 ist jedoch nicht in MYC-überexprimierenden B-Zelllinien induziert, so dass vermutlich noch ein anderer MYC-abhängiger Mechanismus für die Repression von NF $\kappa$ B-Zielgenen existiert.



**Abb. 38:** Expressionsprofile von E2F-1, DP-1, NFκB1 und NFκB2. Jede Säule entspricht einer einzelnen hybridisierten Probe auf dem Microarray. Die Y-Werte entsprechen der Y-fachen Induktion im Vergleich zur Expression in arretierten EREB2-5-Zellen. (Ohne Östrogen = ohne funktionelles EBNA2). Die NFκB1-Daten sind inhomogen. Es zeichnet sich aber klar eine geringere Induktion als von NFκB2 ab.

#### 4.3.3.2 EBV induziert das NF $\kappa$ B2-Gen

Ein weiterer interessanter Aspekt ist die in EBNA2-abhängig wachsenden Zellen selektiv erhöhte Expression von NF $\kappa$ B2 während die Expression von NF $\kappa$ B1 weniger stark reguliert wird (Abb. 38). Im Gegensatz zu p105, das in Zellen konstitutiv zu p50 (NF $\kappa$ B1) prozessiert wird (Übersichtsartikel Pomerantz and Baltimore, 2002), benötigt die Prozessierung des NF $\kappa$ B2-Vorläufer p100 einen weiteren Stimulus wie z.B. die Aktivierung durch NIK und IKK1 (s.o.), so dass p100 zusammen mit RelB einen Komplex bildet, der unabhängig von I $\kappa$ B $\alpha$  aktivierbar ist. Wie ebenfalls aus den Expressionsprofilen hervorgeht, wird I $\kappa$ B $\alpha$ , das ebenfalls ein NF $\kappa$ B-Target ist, mit NF $\kappa$ B2 koreguliert, was bedeutet, dass der kanonische NF $\kappa$ B-Signalweg blockiert wird. Auf diese Weise könnte selektiv der alternative Signalweg aktiviert werden. Da eine Repression des alternativen Signalweges durch I $\kappa$ B $\alpha$  ausbleibt, erreicht EBV auf diese Weise möglicherweise eine konstitutive Aktivierung des NF $\kappa$ B-Signalweges. Dabei erfolgt die Aktivierung auf posttranslativaler Ebene in Analogie zu CD40 vermutlich durch LMP1. Ein Gegenargument zu letzterer These scheint die von Sylla et al. (1998) gewonnene Erkenntnis, dass die LMP1-abhängige NF $\kappa$ B-Aktivierung zu 80% durch die Überexpression einer dominant negativen Form von IKK2 inhibiert werden kann. Diese Daten beziehen sich jedoch lediglich auf transiente Experimente in 293-Zellen, wurden aber noch nicht in B-Zellen erhoben, die schon über einen längeren Zeitraum LMP1 exprimieren. In anderen Untersuchungen (Feuillard et al., 2000; Kahir-McFarland et al., 2000) wurde gezeigt, dass die Überexpression einer konstitutiv aktiven I $\kappa$ B $\alpha$ -Mutante, die nicht mehr IKK-abhängig degradierbar war, zu gesteigerter Apoptose von LCLs führte. Jedoch führte in beiden Arbeiten die Inhibition des kanonischen Signalweges nicht unmittelbar zur Apoptose der Zellen, wie man es bei einer vollständigen Blockierung des NF $\kappa$ B-Signalweges erwarten würde. Kahir-McFarland et al. konnten lediglich die Repression einiger bekannter NF $\kappa$ B-Zielgene (endogenes I $\kappa$ B $\alpha$ , Bfl-1, ICAM-1 und p53) feststellen, während c-myc, Bcl-2 und Bcl-Xl in ihrer Expression nicht beeinträchtigt waren. Dies unterstützt die These, dass neben einem I $\kappa$ B $\alpha$ -abhängigen auch ein I $\kappa$ B $\alpha$ -unabhängiger Signalweg existiert, der durch EBV aktiviert wird. Auf der anderen Seite stellt sich die Frage, inwieweit die Überexpression eines mutierten I $\kappa$ B $\alpha$  mit der *in vivo*-Situation eines induzierten endogenen I $\kappa$ B $\alpha$  zu vergleichen ist. Die Frage, ob die Gene mit dem TypII(-/+)-Expressionsprofil selektiv NF $\kappa$ B2-abhängig oder sogar abhängig vom alternativen Signalweg reguliert werden, lässt sich nur durch den Einsatz spezifischer chemischer I $\kappa$ B $\alpha$ -Stabilisatoren oder durch Überexpression von konstitutiv aktivem I $\kappa$ B $\alpha$  bzw. nicht degradierbarem p100 in LCLs mit anschließender mRNA-Analyse klären.



Neben NF $\kappa$ B2 ist als weiteres positiv regulierendes Molekül Tp12 ähnlich reguliert, das nach Eliopoulos et al. (2002) mit NIK in einem Komplex wirksam ist, während NIK selbst kaum reguliert wird. Auch hier stellt sich die Frage nach einer selektiven Aktivierung eines bestimmten Signalweges.

#### **4.3.3.3 EBV/EBNA2 induziert antiapoptotische Moleküle**

Innerhalb der TypII(+/+)- und TypII(-/+)-Gene waren keine Gene vertreten, die, wie z.B. die meisten TypI(+/-)-Gene, in grundlegende Prozesse der Lebenserhaltung und Zellteilung involviert waren. Demnach scheinen die grundlegenden Mechanismen der Proliferation in MYC- und EBV-abhängig proliferierenden Zellen identisch zu sein. Auf der anderen Seite waren jedoch in EBV-abhängig proliferierenden Zellen antiapoptotische Moleküle wie A1, Bcl-2, IEX-1L (Abb. 7D) stärker exprimiert, was die höhere Sensitivität von BLs gegenüber apoptotischen Signalen wie oxidativen Stress erklärt.

#### **4.3.3.4 Abhängigkeit der MYC- sowie EBV/EBNA2-abhängigen Proliferation von NF $\kappa$ B**

Da der NF $\kappa$ B-Signalweg in LCLs viel stärker aktiviert zu sein scheint als in BLs, lag zunächst die Vermutung nahe, dass BLs für ihre Proliferation weniger oder keine NF $\kappa$ B-Aktivität benötigen. Die Tatsache, dass ausschließlich MYC-abhängig proliferierende Zelllinien zum Teil wesentlich sensitiver auf den NF $\kappa$ B-Hemmer BAY11-7085 reagieren als LCLs, zeigt jedoch, dass BLs offenbar nicht NF $\kappa$ B-unabhängig proliferieren, wobei unspezifische toxische Nebeneffekte von BAY11-7085 wahrscheinlich sind (Lloyd Lam, NIH, Staudt Labor, persönliche Mitteilung). Die geringere Sensitivität von LCLs könnte bedeuten, dass LCLs stärker den alternativen I $\kappa$ B-unabhängigen Signalweg benutzen oder weniger stark auf die Nebeneffekte von BAY11-7085 reagieren. Auf der anderen Seite ist vorstellbar, dass durch die NF $\kappa$ B-aktivierende Wirkung von LMP1 eine NF $\kappa$ B-Hemmung in LCLs leichter kompensiert werden kann als in BLs.

#### 4.3.4 Interferonantwort und STAT-Proteine

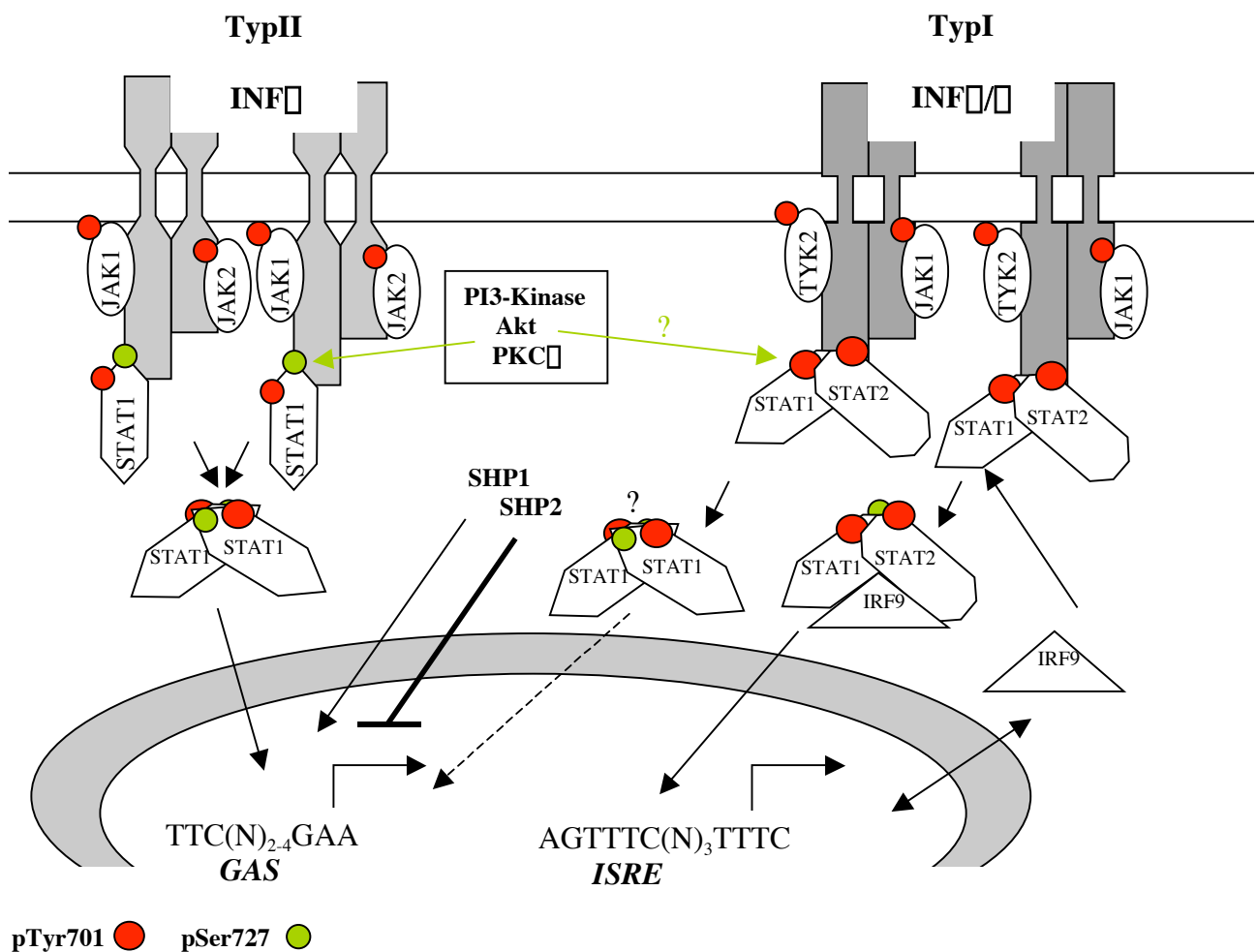
##### 4.3.4.1 STAT-Proteine

(Ramana et al., 2002, Kisseleva et al., 2002, Stark et al., 1998, Schindler und Strehlow, 2000)  
 Die wichtigsten intrazellulären Vermittler von Zytokinsignalen sind die „*Signal Transducers of Transkription*“ (=STAT) -Proteine. Die Dimerisierung von Zytokinrezeptoren durch ein entsprechendes Zytokin initiiert eine Tyrosinphosphorylierungssignalkaskade, in deren Verlauf mit dem Rezeptor assoziierte sogenannte Januskinasen (JAKs) aktiviert werden, die eine Tyrosinseitenkette der Dimerisierungsdomäne der ebenfalls assoziierten STAT-Proteine phosphorylieren (Abb. 39). Das Phosphotyrosin wird nun zusammen mit den umgebenden Aminosäuren durch die SH2-Bindedomäne eines anderen STAT-Moleküls spezifisch erkannt und gebunden, so dass es zur Dimerisierung sich gegenseitig erkennender STAT-Proteine kommt. Die Dimere migrieren in den Zellkern, binden dort (mit Ausnahme von STAT2) direkt an Promotoren und aktivieren über ihre C-terminale Transaktivierungsdomäne Gene, die in zelluläres Wachstum, Differenzierung, Entwicklung und Modulation der Immunantwort involviert sind. In der Literatur wird oftmals vorausgesetzt, dass beide STAT-Bindungspartner an ihrer Tyrosinseitenkette phosphoryliert sind. Hinweise auf Dimere aus phosphorylierten und unphosphorylierten STAT-Monomeren (STAT1/STAT2 oder STAT1/STAT3), die auch transkriptionell aktiv sind (Gupta et al., 1996, Zhang et al., 1995, 1990), legen jedoch nahe, dass die Phosphorylierung eines Bindungspartners genügt. Ebenfalls kann in Kernen unstimulierter Zellen ein gewisses Basisniveau an unphosphoryliertem STAT1 und STAT3 nachgewiesen werden (Schindler und Strehlow, 2000).

##### 4.3.4.2 STAT1 als Mediator der Interferon-Antwort

Obwohl eine Vielzahl von Zytokinen (IL-6, OnM, LIF, CNTF G-CSF, IL-9, GH, EGF, PDGF, CSF-1, AT-1) die Aktivierung von STAT1 induzieren, konnte in STAT1-defizienten K.O.-Mäusen lediglich eine Beeinträchtigung der Interferon(IFN)-Antwort nachgewiesen werden (zusammengefasst in Schindler und Strehlow, 2000), weshalb an dieser Stelle nur auf den Interferon-vermittelten Signalweg eingegangen wird. Interferone spielen eine wichtige Rolle bei der Abwehr von Virusinfektionen. Dabei unterscheidet man zwischen TypI (IFN $\alpha/\beta$ ) und TypII (IFN $\gamma$ ) -Interferonen. Bei der Stimulation mit TypII-Interferonen kommt es zur Bildung von STAT1-Homodimeren, die im Kern an sogenannte  $\gamma$ -aktivierte Sequenzen (GAS-Elemente) binden (Abb. 39). Wichtig für die Transaktivierung der Gene mit GAS-

Element ist hierbei nicht nur die Phosphorylierung von Tyr701, die die Dimerisierung von STAT1 ermöglicht, sondern auch die Phosphorylierung von Ser727. Nach neusten Erkenntnissen wird die STAT1-abhängige IFN- $\alpha$ -Antwort durch die dual-spezifische Phosphatase SHP2 (Wu et al., 2002) beendet, indem Ser727 und Tyr701 dephosphoryliert werden. Die Tyrosinphosphatase SHP-1 hat dagegen positive Effekte auf die STAT1-Aktivierung (You et al., 1997). Neben der im Homodimer aktiven Form von STAT1 (STAT1 $\alpha$ ) existiert ebenfalls eine aus alternativem Spleißen hervorgehende C-terminal trunkierte Form *STAT1 $\beta$* , die keine Transaktivierungsdomäne und somit kein Ser727 besitzt.



**Abb. 39:** Die Dimerisierung von Interferonrezeptoren durch Interferon initiiert eine Tyrosinphosphorylierungs-Signalkaskade in deren Verlauf JAK1/2 (TypII) bzw. JAK1/Tyk2 (TypI) aktiviert werden, die eine Tyrosinseitenkette der Dimerisierungsdomäne der assoziierten STAT-Proteine phosphorylieren. Das Phosphotyrosin-Motiv wird durch die SH2-Bindedomäne eines anderen STAT-Moleküls spezifisch erkannt und gebunden, so dass es zur Dimerisierung sich gegenseitig erkennender STAT-Proteine kommt. Bei der TypI-Signalkaskade entsteht das ISGF3-Trimer. Die Komplexe migrieren in den Zellkern, binden dort direkt an Promotoren und aktivieren über ihre C-terminale Transaktivierungsdomäne Gene, die in zelluläres Wachstum, Differenzierung, Entwicklung und Modulation der Immunantwort involviert sind. STAT1-Dimere binden Gas-Elemente während der ISGF3-Komplex über IRF9 an ISRE-Elemente bindet. Für die Transaktivierung von Genen mit GAS-Elementen durch STAT1 ist die Phosphorylierung von Ser727 am C-Terminus durch weitere Serinkinasen (z.B. Akt, PI3-Kinase und PKC $\beta$ ) nötig.

Diese trunkierte Form stellt im Homodimer eine kompetitiv inhibierende Form von STAT1 dar. Bei der TypI-Interferon-Antwort formiert sich aus STAT2 („ISGF3“), STAT1 („ISGF3“) und IRF9 („ISGF3“) der ISGF3-Komplex (zusammengefasst in Stark et al., 1998). Der ISGF3-Komplex aktiviert Gene, deren Promotor sogenannte Interferon-stimulierte regulatorische Elemente (ISREs) enthält. Nach bisheriger Meinung vermittelt in diesem Komplex IRF9 die DNA-bindende Aktivität und STAT2 die transaktivierende, so dass STAT1 in diesem Komplex genauso aktiv sein sollte wie STAT1. In einer aktuellen Untersuchung (Pilz et al., 2003) in STAT1-defizienten Mausfibroblasten konnte jedoch nachgewiesen werden, dass die Induktion von IFN-Zielgenen bei fehlender Ser727-Phosphorylierung oder bei ausschließlicher Expression von STAT1 um mehr als 70% gegenüber der Expression von STAT1 reduziert war.

Bezüglich STAT1 wurden Experimente durchgeführt (Kumar et al., 1997), die belegen, dass STAT1 ohne Tyr701- oder Ser727-Phosphorylierung eine wichtige Rolle bei der Induktion von Apoptose spielt. Man vermutet dabei eine Regulation der Expression von Caspasen. Ebenfalls führte eine Überexpression einer nicht phosphorylierbaren Tyr701Phe- STAT1-Mutante in STAT1-defizienten U3A-Zellen zur Induktion der IFN-induzierbaren Proteasomunterheiten LMP2 (Chatterjee-Kishore, 2000). Dabei erfolgte die direkte Bindung des überlappenden ICS-2/GAS-Elementes über ein IRF-1/STAT1-Heterodimer.

#### **4.3.4.3 Biologische Funktionen von TypI und TypII Interferonen**

Die biologische Funktion der zellulären Antwort auf Interferone besteht in erster Linie darin, Infektionen durch Viren oder andere Krankheitskeime entgegenzuwirken. Die drei zentralen Mechanismen der Abwehr von Viren sind die Aktivierung der Doppelstrang-abhängigen Proteinkinase (PKR), der 2',-5'-Oligoadenylatsynthetase (2-5A-Synthetase) und der Mx-GTPasen. Die PKR und die 2-5A-Enzyme können alternativ zum IFN-Signal durch doppelsträngige RNA (die z.B. von Viren stammt) aktiviert werden. Die aktivierte phosphorylierte PKR phosphoryliert den Translations-Elongations-Initiations-Faktor eIF2, was zur Inhibition der Proteinsynthese und somit zur Apoptose von vom Virus befallenen Zellen führt. Desweiteren ist die PKR in zahlreiche noch mechanistisch aufzuklärende Signalwege der Kontrolle der Apoptose involviert. Die 2-5A-Synthetase synthetisiert nach Aktivierung kurze 2',5'-Oligoadenylate, die wiederum Einzelstrang-RNA-verdauende RNaseIII aktivieren. Das zytosolische MxA-Protein interagiert mit dem viralen Nukleocapsid und interferiert mit dem intrazellulären Transport des Nukleocapsids in den Zellkern (Übersichtsartikel Haller und Kochs, 2002).

Der Unterschied zwischen TypI- und TypII-Interferonen liegt in der Gewichtung der Aktivierung verschiedener Signalwege. So kann beispielsweise die Inhibition der PKR die antivirale Wirkung von IFN $\alpha$  gegen EMCV neutralisieren, während IFN $\alpha$  immer noch wirksam ist. Laut genanntem Übersichtartikel (Stark et al., 1998) werden die PKR- und Mx-Gene durch TypI-Interferone induziert, während 2-5A-Synthetase und RNaseL auch durch IFN $\alpha$  induziert werden. In einer anderen Untersuchung an humanen Fibrosarkomen, die mit Interferonen behandelt wurden (Der et al., 1998) konnte jedoch keine Induktion von 2-5A-mRNA nach IFN $\alpha$ -Behandlung detektiert werden. Während TypI-Interferone demnach vorrangig der viralen Abwehr dienen, spielt IFN $\alpha$  eine zentrale Rolle in der Regulation der Immunantwort allgemein. So werden MHCII-Moleküle im Gegensatz zu MHCI-Molekülen lediglich von IFN $\alpha$  hochreguliert. Die Transaktivierung der **MHCI**-Gene erfolgt dabei über **IRF-1** während die **MHCII**-Regulation vom Transaktivatorprotein **CIITA** vermittelt wird. Desweiteren induzieren beide Interferon-Typen die Expression der Untereinheiten LMP2 und LMP7 des Immunoproteasoms (Der et al., 1998), was die Antigenpräsentation durch MHCI-Molekülen z.B. auf B-Zellen beeinflusst. So wurde gezeigt, dass - im Gegensatz zu EBNA2-abhängig (EBV-transformierten) wachsenden B-Zelllinien mit intaktem Immunoproteasom – MYC-abhängig wachsende B-Zellen, die keine LMP2/LMP7-Proteasomaktivität besitzen (Gavioli et al., 2001), nicht durch spezifische zytotoxische T-Zellen (CTL) erkannt werden, wenn das entsprechende Antigen in diesen B-Zellen überexprimiert wurde (Staege et al., 2002). Der Phänotyp konnte jedoch durch Zugabe von entsprechenden auf MHCI-Proteinen präsentierbaren Peptiden wieder hergestellt werden.

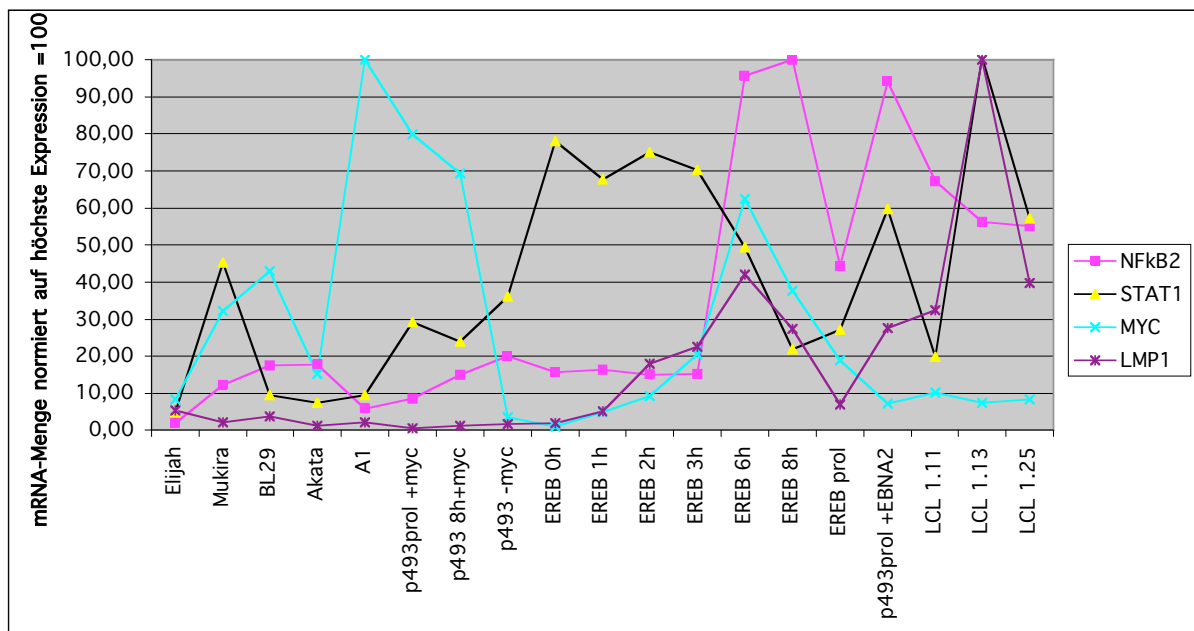
Im Gegensatz zu TypI-Interferonen wird IFN $\gamma$  nur von wenigen Zellen (T-Zellen und NK-Zellen) ausgeschüttet. Neben der Aktivierung von Macrophagen (durch TH1-Zellen), induziert IFN $\gamma$  die Differenzierung CD4-positiver T-Zellen zu TH1-Zellen und beeinflusst den Immunglobulin-Isotyp-Switch in B-Zellen.

#### **4.3.4.4 Vorangegangene Untersuchungen in EREB2-5 und P493-6 und neue Ergebnisse**

Wie schon oben angeklungen, wurde bereits in vorangegangenen Untersuchungen (Gavioli et al., 2001, Staege et al., 2002) festgestellt, dass das Immunoproteasom in MYC-abhängig wachsenden, BL-ähnlichen B-Zellen (A1, P493-6 + MYC/-EBNA2) und BLs weniger aktiv ist als in B-Zellen, die EBNA2-abhängig wachsen (LCLs, EREB2-5, P493-6 + EBNA2/-MYC). In BL-Zellen ist die Expression der IFN-induzierbaren katalytischen Untereinheiten Lmp2, Lmp7 und MECL-1 und der regulatorischen Untereinheiten PA28 $\alpha$ / $\beta$  im Vergleich zu LCLs reprimiert. Dies hatte eine geringere Immunogenität der BL-ähnlichen Zellen zur Folge,

die sich in geringerer CTL-Antwort (s.o.) und geringerer Stimulation der Proliferation von PBMCs (aus peripherem Blut gewonnene mononukleäre Zellen) äußerte. Da in den genannten Arbeiten ein konditionales Zellsystem verwendet wurde (P493-6), in dem man entweder MYC oder EBNA2 induzieren kann, konnten genetische oder epigenetische Effekte ausgeschlossen und die unterschiedliche Proteasomaktivität bzw. Immunogenität auf MYC bzw. EBNA2 zurückgeführt werden. Bisher war jedoch der Mechanismus, wie diese Regulation erfolgen konnte, unklar.

Die Auswertung der Microarrays (Lymphochip) ergab, dass *STAT1*-mRNA in EREB2-5-Zellen, die arretiert sind, am stärksten exprimiert ist, also vermutlich negativ mit Proliferation korreliert. Dies könnte, da arretierte EREB2-5-Zellen 3 Tage nach Östrogenentzug beginnen, apoptotisch zu werden, auch mit der Apoptose-regulierenden Funktion von STAT1 (s.o.) zu tun haben. Desweiteren fiel auf, dass von EBV abhängig proliferierende Zellen STAT1 stärker exprimieren als Zellen, die MYC-abhängig proliferieren (Abb. 19A, Abb. 20 mit Ausnahme der Zelllinie Mukira).



**Abb. 20:** Vergleich der Expressionsmuster von NFκB2, STAT1, MYC und LMP1. Um einen Vergleich zu vereinfachen, wurden die maximalen Expressionen auf "100" normiert.

Die höhere Expression von STAT1 in LCLs erfolgt nach neuesten Erkenntnissen vermutlich durch die Expression des viralen LMP1, das über NFκB und weitere bisher unbekannte den Zell-Zell-Kontakt mit einbeziehende Mechanismen die STAT1-Expression induziert (Richardson et al., 2003). Beim Vergleich der mRNA-Expressionsprofile von LMP1 und STAT1 fällt jedoch auf, dass die STAT1-Expression mit der Expression von LMP1 nur in der

Gruppe der proliferierenden LCLs korreliert (Abb. 40). In der EREB2-5-Kinetik (Abb. 30) nimmt STAT1 drei bis acht Stunden nach Östrogenzugabe ab, während LMP1 im gleichen Zeitraum ansteigt. Der Vergleich der P493-6-Zellen mit und ohne Tetrazyklin (d.h. +/- MYC) ergab eine geringe aber reproduzierbare STAT1-Repression nach MYC-Aktivierung, die auch in vier unabhängigen Affymetrix-Arrayhybridisierungen beobachtet wurde (Schuhmacher et al., 2001, Schlosser et al., pers. Mitteilung). Auch die A1- und BL-Linien zeichneten sich mit Ausnahme von Mukira-Zellen durch eine extrem niedrige STAT1-RNA-Menge aus. Dies deckt sich mit der Beobachtung, dass in der EREB2-5-Kinetik die MYC-Expression negativ mit der STAT1-Expression korreliert. Wenn, wie es die Literatur suggeriert, STAT1 ein NF $\kappa$ B-Zielgen sein sollte, könnte MYC über Repression von NF $\kappa$ B, wie es in Abschnitt 4.3.3.1 beschrieben wurde, ebenfalls die STAT1-Expression inhibieren, während LMP1 STAT1 gleichzeitig induziert. Aufschluss darüber, ob MYC direkt an der Repression des STAT1-Genes beteiligt ist, können MYC/MIZ-Chromatin-Immunoprecipitationen geben (Wanzel et al., 2003).

Westernblot-Daten, in denen noch weitere LCL- und auch EBV-negative BL-Linien miteinbezogen wurden, bestätigten die STAT1-mRNA-Ergebnisse (Abb. 29). Die Differenz der im Westernblot sichtbar gemachten STAT1-Gesamtproteinmenge zwischen den EBV-abhängig und MYC-abhängig wachsenden Zellen überschreitet sogar die Differenz in der mRNA-Expression, was möglicherweise auf unterschiedliche Degradationsraten in den beiden Zelltypen zurückzuführen ist. Komplette andere Mengenverhältnisse ergeben sich hinsichtlich der Tyr701-Phosphorylierung von STAT1. Zwar ist im Durchschnitt die Menge an Phospho-Tyr701-STAT1 in LCLs im allgemeinen höher als in BLs, dabei ist jedoch der Tyr701-Phosphorylierungsgrad von STAT1 in LCLs offensichtlich wesentlich geringer als in BLs. Dies erkennt man am deutlichsten beim Vergleich der Linien LCLBucher und BL70 (Abb. 29), die fast identische Phospho-Tyr701-STAT1-Signale aufweisen. In BL70-Zellen ist jedoch auch bei langer Exposition kein STAT1-Gesamtprotein in BL70 nachweisbar. Angesichts der in der Literatur beschriebenen Induktion der Phosphorylierung durch LMP1 (Gires et al., 1999, Dirmeier et al., Doktorarbeit 2002) überrascht dieser Befund. Möglicherweise läßt sich der Widerspruch dadurch erklären, dass in den genannten Arbeiten mit Hilfe konditionaler Systeme nur sehr kurzfristige Effekte (halbstündige Quervernetzung von LMP1-C-terminus-NGFR-Fusionproteinen) untersucht wurden. Die in dieser Arbeit gemachte Beobachtung wird durch Arbeiten bestätigt, in denen konstitutiv exprimiertes wt-LMP1 keinen Unterschied der Phosphorylierung von STAT1 bewirkte (Richardson et al., 2003, Higuchi et al., 2002). Denkbar wäre eine gleichzeitige LMP1-vermittelte Induktion

regulatorischer Moleküle wie die Phosphatase SHP-2, die sowohl Ser727 als auch Tyr701 dephosphoryliert (Wu et al., 2002). Der JAK-Inhibitor SOCS-1 ist auszuschließen, da dieser in BLs und LCLs ähnlich stark exprimiert wurde (Abb. 27D). Auffallend ist dabei ebenfalls, dass der Phosphorylierungsgrad von STAT1 in der EBV-konvertierten (=infizierten) BL2-Linie wesentlich höher ist als in LCLs, was bedeuten kann, dass EBV-unabhängige Mechanismen, die mit Herkunft und Entwicklungsstatus der Zelle zu tun haben, die Phosphorylierung von STAT1 beeinflussen.

Dagegen zeigt die EREB2-5-Kinetik im Westernblot eine klare Induktion von Phospho-Ser727-STAT1. Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass laut der bisherigen Literatur (s.o.) für die TypI-Interferonantwort keine Tyr701-Phosphorylierung aber Ser727-Phosphorylierung von STAT1 erforderlich ist. Dies korreliert damit, dass im mRNA-Expressions-Cluster von STAT1 fast ausschließlich TypI-Interferon-induzierte bzw. relevante Gene enthalten, die nach Der et al. (1998) nicht durch IFN $\alpha$  induziert werden (MxA, SP100, IFI-6-16, ISGF3 $\beta$ , Staf50). Dies würde bedeuten, dass EBV in erster Linie den IFN $\alpha$ / $\beta$  und nur in geringem Maße den IFN $\gamma$ -Signalweg aktiviert. Der IFN $\alpha$ / $\beta$ -Signalweg ist aber offenbar nicht vollständig aktiv, da der Anteil an phosphoryliertem eIF2 $\beta$  (eIF2 $\beta$  wird durch eine aktivierte PKR phosphoryliert) in LCLs nur geringfügig höher ist als in BL-Linien und der A1-Linie. Möglicherweise ist sowohl in LCLs als auch in BLs die Aktivierung der PKR durch die Expression der viralen EBERs gehemmt (Sharp et al., 1993; Yamamoto et al., 2000; Nanbo et al., 2002)

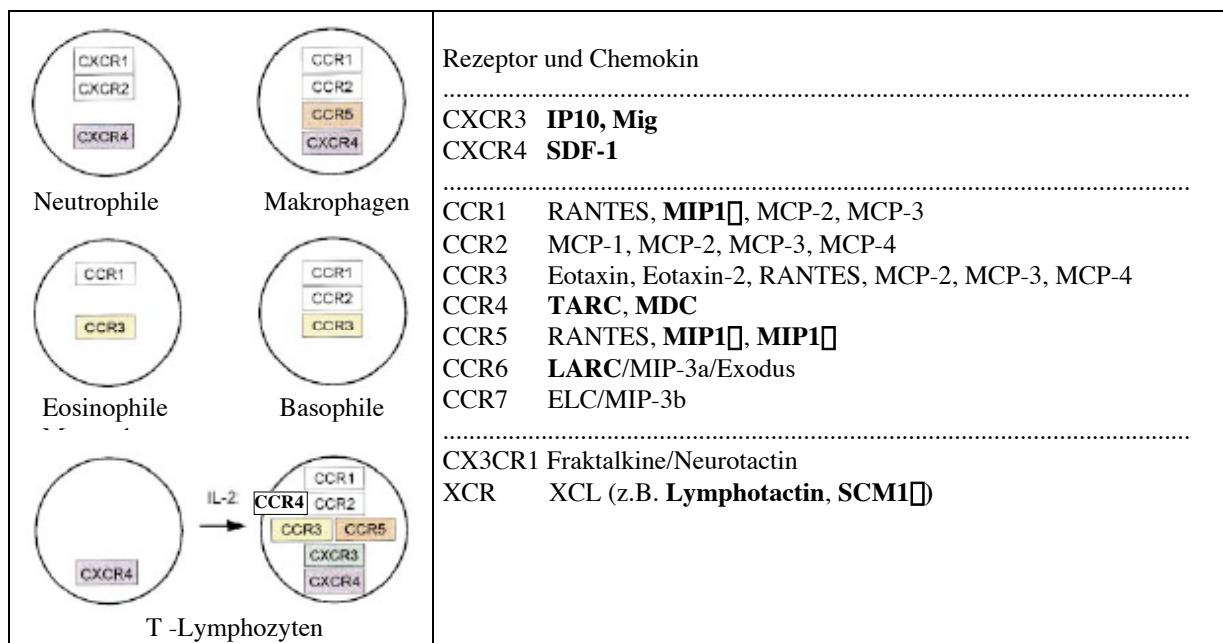
Zusammenfassend kann man aus mRNA und noch besser aus Westernblot-Daten deutlich erkennen, dass die STAT1-Expression im Laufe einer MYC-abhängigen Proliferation reprimiert und im Laufe einer EBV-vermittelten Proliferation induziert ist. Diese Erkenntnisse legen nahe, dass die MYC-induzierte Repression von STAT1 und somit die Repression des IFN-Signalweges das molekulare Bindeglied zwischen MYC-Expression einerseits und Repression der B-Zell-Immunogenität andererseits darstellen. Ob die Induktion der IFN-Antwort eine durch EBV provozierte virusspezifische Antwort der Wirtszelle ist, die das Virus durch Expression von EBERs und weitgehende Repression der Phosphorylierung von Tyr701 kompensieren muss oder ob STAT1 für das *in vivo*-Überleben des Virus (Persistenz in Gedächtnis-B-Zellen) von Vorteil ist, bleibt letztlich bis zur Entwicklung geeigneter Tiermodelle ungeklärt. Die Existenz von STAT1-defizienten LCLs zeigt, dass STAT1 für die *in vitro*-Immortalisierung von B-Zellen nicht benötigt wird (Depuis et al., 2003). Die Expression von STAT1 und entsprechender konstitutiv aktiver oder unterschiedlich phosphorylierbarer STAT1-Mutanten in A1 und P493-6 wird schließlich die



Frage klären, ob und welche Form von STAT1 die Immunogenität dieser Zellen wieder herstellt.

#### 4.3.5 T-Zellrekrutierung und B-Zellaktivierung durch EBNA2-Zielgene

Neben SDF1 $\square$ , MIP1 $\square$  und MDC aus den Run-On-Daten wurden bei der Microarray-Analyse von BLs und LCLs auf Lymphochips (Abb. 7A/B) weitere Chemokine gefunden, die in BLs reprimiert, aber in LCLs und durch EBNA2-Expression in EREB2-5 induziert wurden. Dazu gehören MIP1 $\square$ , IP10, Mig, Mig-2, LARC, Lymphotactin (SCM1 $\square$ ) und SCM1 $\square$ , die laut Literatur (Übersichtsartikel Chensue, 2001, Baggiolini, 1998) alle chemotaktisch auf aktivierte T-Helferzellen (TH-Zellen) wirken (Abb. 41).



**Abb. 41** (nach Baggiolini et al., 1998): Humane Chemokinrezeptoren, ihre Liganden und Präsenz auf weißen Blutzellen. Fett gedruckte Chemokine sind durch EBV/EBNA2 induziert. CCR4 und XCR wurden ebenso als auf TH-Zellen exprimierte Chemokinrezeptoren beschrieben.

Dabei gelten CXCR3 (Rezeptor für Mig und IP10) als TH1-zellspezifisch und CCR4 (Rezeptor für TARC und MDC) als TH2-zellspezifisch exprimierte Chemokinrezeptoren.

MDC und LARC sollen auch Chemoattraktoren für T-Gedächtnis-Zellen und aktivierte TH1- und CD8-T-Zellen sein (Ghia et al., 2001, Kimura et al., 2002). Die Rekrutierung von TH-Zellen passt zu Beobachtungen von Sutkowski et al. (2001), dass EBV das Superantigen HERV-K18 (ein endogenes Retrovirus) induziert, das effizient T-Zellen stimuliert. Die Wichtigkeit von HERV-K18 und somit die Stimulation von TH-Zellen für den EBV-Lebenszyklus wird dadurch untermauert, dass Neue-Welt-Primaten, die das HERV-K18-Gen

nicht besitzen, nach Infektion mit EBV keine Persistenz in Gedächtnis-B-Zellen entwickeln. Gleichzeitig werden laut Array-Daten Komponenten des BCR-Signalkomplexes (CD79B/Ig $\alpha$ , CD79A/Ig $\alpha$ , Syk, Immunglobulin Leichte und Schwere Ketten) herunterreguliert, wodurch vermutlich die Aufnahme und Prozessierung von Antigenen und eine entsprechende antigenspezifische T-Zell-Aktivierung verhindert wird. Es wäre auch denkbar, dass mit dem Ausschalten des BCR-Signalkomplexes dem Virus die Möglichkeit eingeräumt wird, allein über LMP2a einen positiven BCR-Stimulus zu imitieren, der für die Differenzierung zur Gedächtnis-B-Zelle nötig ist. Als Szenario ist denkbar, dass die von der Spezifität des BCR unabhängige polyklonale Rekrutierung und Aktivierung von TH-Zellen eine wichtige Rolle bei der Abschaltung des viralen Proliferationsprogrammes und damit bei der Etablierung der *in vivo* Latenz des Virus in B-Zellen spielt. Auch könnte hierdurch die Ausreifung der infizierten B-Zellen in Gedächtniszellen und/oder die Entwicklung von zytotoxischen T-Zellen begünstigt werden, die weiter proliferierende virusinfizierte B-Zellen eliminieren und so das Überleben des infizierten Wirtsorganismus gewährleisten.

Die Repression der genannten Chemokine (bis auf MIP1 $\alpha/\beta$ , die induziert werden) könnte im Umkehrschluss eine weitere Erklärung für die geringe Immunogenität von BLs in Bezug auf die T-Zell-Antwort sein.

#### 4.3.6 TypIII-Gene

TIMP-1 und Tcl-1a gehören zu den Genen, deren Expression in LCLs und BLs am meisten differiert (50-100facher Unterschied). Dabei zeigt TIMP-1 neben einer mehr als 10fach geringeren Expression in arretierten P493-6 gegenüber arretierten EREB2-5 in der MYC-Induktionskinetik (P493-6) eine mehr als 5fache Repression. MYC wirkt also aktiv an der Repression von TIMP-1 mit. TIMP-1 ist als Inhibitor von Matrixmetalloproteinasen (MMPs) maßgeblich an der negativen Regulation der Angiogenese beteiligt: Je mehr TIMP-1 exprimiert wird, desto mehr werden die für die Umstrukturierung des Gewebes nötigen MMPs gehemmt. Auf der anderen Seite induziert TIMP-1 die Expression von IL-10 und wirkt antiapoptotisch, wenn man es in EBV-negativen BLs exprimiert. So konnten Guedez et al. (2001) bei Transplantationsversuchen in Nacktmäusen durch Expression von TIMP-1 in EBV-negativen BLs den Phänotyp von EBV-positiven-BLs mit aktiviertem EBV-Latenzprogramm (=Latenz-Typ2/3-BLs) herbeiführen: TIMP-1 beschleunigt zunächst das Tumorstadium, verhindert aber die Angiogenese, so dass der Tumor wegen mangelnder Versorgung/Durchblutung nur zu einer bestimmten Größe wachsen kann. Somit wurde im Lymphochip-Screen ein Schlüsselprotein "wiederentdeckt", das entscheidend die

Eigenschaften und das pathogene Verhalten von BLs und LCLs prägt. Möglicherweise handelt es sich bei Tcl-1a, das in transgenen Mäusen Lymphome generiert (Hoyer et al., 2002) und GLUT5, dessen biologische Relevanz noch vollkommen unklar ist, um ähnlich wichtige Moleküle. Zunächst lag es aufgrund der MYC-unabhängigen Expression von Tcl-1a und Glut5 nahe, dass es sich um konstitutiv aktivierte Gene handelt, die mit MYC koexprimiert werden müssen, um eine nichtapoptotische proliferative Wirkung von MYC zu ermöglichen. Erstaunlicherweise lassen sich aber beide mRNAs durch EBNA2 in P493-6 reprimieren. Die biologische Relevanz des für D-*Fructose* spezifischen Transporters GLUT5 ist noch ungewiss. Die reziproke Expression des D-*Glucose*-spezifischen Transportes GLUT3 (Abb. 31b) könnte ein Hinweis auf alternative Stoffwechselwege von BLs und LCLs sein. Interessant wäre in diesem Zusammenhang der Einsatz der für GLUT5 spezifischen Inhibitoren, wie sie von Girniene et al. (2003) beschrieben wurden.

#### 4.4 Abschließender Vergleich der Methoden

Mit Hilfe der Microarraytechnologie (mRNA-Hybridisierungen auf Lymphochips) konnten in relativ kurzer Zeit und mit einem im Vergleich zur 2D-Analyse mit geringem Arbeitseinsatz sehr viel mehr Daten erhoben werden. Die systematische Analyse der Unterschiede der mRNA-Expressionsmuster von LCLs, BLs und *in vitro* generierter MYC-abhängig proliferierender Zelllinien ermöglichte durch Clusteranalyse die Zuordnung differentiell regulierter Signalwege (NF $\kappa$ B, STAT1/IFN, MYC) und gewebsspezifischer Expressionsmuster (im Rahmen dieser Doktorarbeit nicht diskutiert). Dennoch ist diese Methode hinsichtlich Sensitivität und Zuverlässigkeit der Run-On-Technologie und konventionellen mRNA-Analysemethoden (Northern Blot, quantitative RT-PCR) unterlegen. So wurden klare/stark induzierte im Northernblot oder in der Real-Time-PCR bewiesene EBNA2-Zielgene (SDF1, SIAT1, CD22 und CXCR4) der EREB2-5-EBNA2-Induktionskinetik in der Lymphochip-Analyse nur als sehr schwach induziert oder entgegengesetzt reguliert gefunden. Ein schwer lösbares Problem könnte dabei die Normalisierung der Arraydaten auf die Gesamtfluoreszenz der Probe darstellen, da in EREB2-5-Zellen durch Induktion von EBNA2 möglicherweise vielmehr B-Zell-relevante Gene induziert als reprimiert werden, so dass auf den auf B-Zell-Gene spezialisierten Lymphochips ebenfalls die Gesamtfluoreszenz gegenüber arretierten EREB2-5 erhöht ist. So stellt auch bei der Real-Time-RT-PCR die Wahl eines Genes, das nicht durch EBNA2 oder MYC reguliert wird, ein Problem dar, da die üblichen mRNAs, die zur Standardisierung

benutzt werden ("house-keeping-Gene") wie GAPDH durch MYC und/oder EBNA2 induziert werden.

Da viele Proteine in der Zelle auf posttranslationaler Ebene reguliert werden (eine Ausnahme sind hier sezernierte Proteine wie Chemokine und Zytokine), kann ein mRNA-Profil jedoch nur der Ausgangspunkt für weitere Untersuchungen auf Proteinebene und hinsichtlich biologischer Funktion sein, wie die Experimente mit STAT1 und SIAT1 eindrucksvoll belegen. Ebenso wurde weder auf Lymphochips noch auf Affimetrixchips die Regulation von eIF-5A, GMF□ oder AF103803 detektiert, weil diese mRNAs entweder nicht reguliert (eIF-5A) oder nicht als Probe vorhanden waren. In Zukunft werden vermutlich für das Erstellen von Expressionsprofilen Screeningmethoden genutzt, die schnellen Durchsatz und Identifikation von Proteinen (inklusive Modifikationen) mit Quantifizierung verbinden (beschrieben in Aebersold und Mann, 2003 ).

## 5 Zusammenfassung

Das Epstein Barr Virus (EBV) ist ein ubiquitär vorkommendes Herpesvirus, mit dem etwa weltweit 90% der erwachsenen Bevölkerung permanent infiziert sind. Die zumeist asymptomatisch verlaufende Infektion betrifft primäre B-Zellen des Rachenraumes, die nach Aufnahme des Virus entweder zur Virus-Produktion (*lytischer Zyklus*) oder zur Proliferation angeregt werden (*Latenzprogramm*, Entstehung von *B-Lymphoblasten*). Letzteres wird durch den viralen Transkriptionsfaktor EBNA2 kontrolliert, der durch seine viralen und zellulären Zielgene ruhende B-Zellen *in vitro* immortalisieren kann. Die EBV-infizierten B-Lymphoblasten werden *in vivo* effizient durch T-Zellen erkannt und abgetötet. EBV entkommt der Immunantwort durch Persistenz in Gedächtnis-B-Zellen, die vermutlich durch Differenzierung der infizierten B-Lymphoblasten entstehen. Es gibt Hinweise, dass diese Differenzierung EBV-vermittelt unter der Mitwirkung von T-Helfer-Zellen abläuft, was auf eine komplexe Kommunikation des Virus mit dem Immunsystem schließen lässt.

In der vorliegenden Arbeit wurden Mechanismen der EBV-vermittelten B-Zell-Immortalisierung und -Kommunikation untersucht. Ein Vergleich von EBNA2-Zielgenen mit Zielgenen des Protoonkogens *c-myc*, das bei Überexpression B-Zell-Proliferation induzieren kann, ermöglichte dabei die Unterscheidung von Zielgenen, die mit Proliferation und B-Zell-Kommunikation assoziiert sind. Die methodische Herangehensweise bestand in der Proteom-Analyse (2D-Gelelektrophorese mit massenspektrometrischer Proteinidentifikation), Promotoraktivitäts-Analyse (nukleärer Run-On) und einer umfassenden mRNA-Expressions-Analyse (DNA-Chip-Hybridisierung) konditional oder permanent MYC- oder EBV/EBNA2-abhängig proliferierender Zellen.

Die erhaltenen Daten bestätigen, dass die von EBNA2 und MYC gemeinsam induzierten Zielgene in grundlegende Prozesse der Lebenserhaltung wie den Nukleotid-, Protein-, und Polyamin-Stoffwechsel, sowie in die oxidative Stressantwort, DNA-Reparatur und Zellteilung involviert sind. Dagegen waren gegensätzlich regulierte Gene funktionell in den Bereich B-Zell-Signaltransduktion- und B-Zell-Kommunikation einzuordnen. Die EBV-abhängige Proliferation ist sowohl mit der Aktivierung des NF $\kappa$ B-Signalwegs assoziiert, als auch mit der verstärkten Expression zentraler Komponenten der Interferon (IFN)-Antwort (insbesondere STAT1) und mit der Repression von Komponenten des B-Zell-Rezeptors (BCR) und der BCR-Signaltransduktion. Die NF $\kappa$ B-Aktivierung führt zur Induktion von antiapoptotischen Genen und von Chemoattraktoren für T-Helferzellen.

Die aus Array- und Protein-Daten hervorgehende EBV/EBNA2-vermittelte Aktivierung des NF $\kappa$ B- und des IFN-Signalweges einerseits und die MYC-vermittelte Repression derselben andererseits könnten das molekulare Bindeglied zwischen EBV-vermittelter T-Zell-Stimulation und MYC-vermittelter Immuntoleranz darstellen. Die chemokinvermittelte T-Zell-Rekrutierung und die vermutlich durch STAT1-Expression begünstigte Antigenpräsentation weisen T-Zellen eine aktive Rolle bei der Reifung von EBV-infizierten Lymphoblasten zu B-Gedächtniszellen zu.

**6 Literatur**

- Aebersold, R. and Mann, M. (2003) Mass spectrometry-based proteomics. *Nature*, **422**, 198-207.
- Ali-Osman, F., Brunner, J.M., Kutluk, T.M. and Hess, K. (1997) Prognostic significance of glutathione S-transferase pi expression and subcellular localization in human gliomas. *Clin Cancer Res*, **3**, 2253-2261.
- Alizadeh, A., Eisen, M., Davis, R.E., Ma, C., Sabet, H., Tran, T., et al. (1999) The lymphochip: a specialized cDNA microarray for the genomic-scale analysis of gene expression in normal and malignant lymphocytes. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **64**, 71-78.
- Alizadeh, A.A., Eisen, M.B., Davis, R.E., Ma, C., Lossos, I.S., Rosenwald, A., et al. (2000) Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature*, **403**, 503-511.
- Anagnostopoulos, I., Hummel, M., Kreschel, C. and Stein, H. (1995) Morphology, immunophenotype, and distribution of latently and/or productively Epstein-Barr virus-infected cells in acute infectious mononucleosis: implications for the interindividual infection route of Epstein-Barr virus. *Blood*, **85**, 744-750.
- Arrigo, A.P. (1999) Gene expression and the thiol redox state. *Free Radic Biol Med*, **27**, 936-944.
- Asai, K. (2001) [Review of the research of glia maturation factor and cloning of human and rat glia maturation factor-gamma (GMFG) cDNA]. *Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi*, **21**, 15-20.
- Asai, K., Fujita, K., Yamamoto, M., Hotta, T., Morikawa, M., Kokubo, M., et al. (1998) Isolation of novel human cDNA (hGMF-gamma) homologous to Glia Maturation Factor-beta gene. *Biochim Biophys Acta*, **1396**, 242-244.
- Babcock, G.J., Decker, L.L., Volk, M. and Thorley-Lawson, D.A. (1998) EBV persistence in memory B cells in vivo. *Immunity*, **9**, 395-404.
- Babcock, G.J., Hochberg, D. and Thorley-Lawson, A.D. (2000) The expression pattern of Epstein-Barr virus latent genes in vivo is dependent upon the differentiation stage of the infected B cell. *Immunity*, **13**, 497-506.
- Bachrach, U., Wang, Y.C. and Tabib, A. (2001) Polyamines: new cues in cellular signal transduction. *News Physiol Sci*, **16**, 106-109.
- Baggiolini, M. (1998) Chemokines and leukocyte traffic. *Nature*, **392**, 565-568.
- Baumforth, K.R., Young, L.S., Flavell, K.J., Constandinou, C. and Murray, P.G. (1999) The Epstein-Barr virus and its association with human cancers. *Mol Pathol*, **52**, 307-322.
- Bevec, D., Jaksche, H., Oft, M., Wohl, T., Himmelsbach, M., Pacher, A., et al. (1996) Inhibition of HIV-1 replication in lymphocytes by mutants of the Rev cofactor eIF-5A. *Science*, **271**, 1858-1860.
- Bjellqvist, B., Pasquali, C., Ravier, F., Sanchez, J.C. and Hochstrasser, D. (1993) A nonlinear wide-range immobilized pH gradient for two-dimensional electrophoresis and its definition in a relevant pH scale. *Electrophoresis*, **14**, 1357-1365.
- Blum, H., Beier, H. and Gross, H.J. (1987) Improved Silver Staining of Plant Proteins, RNA and DNA in Polyacrylamide Gels. *Electrophoresis*, **8**, 93-99.
- Bornkamm, G.W. and Hammerschmidt, W. (2001) Molecular virology of Epstein-Barr virus. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **356**, 437-459.
- Briegel, K., Bartunek, P., Stengl, G., Lim, K.C., Beug, H., Engel, J.D., et al. (1996) Regulation and function of transcription factor GATA-1 during red blood cell differentiation. *Development*, **122**, 3839-3850.

- Burgstahler, R., Kempkes, B., Steube, K. and Lipp, M. (1995) Expression of the chemokine receptor BLR2/EBI1 is specifically transactivated by Epstein-Barr virus nuclear antigen 2. *Biochem Biophys Res Commun*, **215**, 737-743.
- Caamano, J. and Hunter, C.A. (2002) NF-kappaB family of transcription factors: central regulators of innate and adaptive immune functions. *Clin Microbiol Rev*, **15**, 414-429.
- Caldwell, R.G., Wilson, J.B., Anderson, S.J. and Longnecker, R. (1998) Epstein-Barr virus LMP2A drives B cell development and survival in the absence of normal B cell receptor signals. *Immunity*, **9**, 405-411.
- Caraglia, M., Marra, M., Giuberti, G., D'Alessandro, A.M., Budillon, A., del Prete, S., et al. (2001) The role of eukaryotic initiation factor 5A in the control of cell proliferation and apoptosis. *Amino Acids*, **20**, 91-104.
- Carel, J.C., Myones, B.L., Frazier, B. and Holers, V.M. (1990) Structural requirements for C3d,g/Epstein-Barr virus receptor (CR2/CD21) ligand binding, internalization, and viral infection. *J Biol Chem*, **265**, 12293-12299.
- Chatterjee-Kishore, M., Wright, K.L., Ting, J.P. and Stark, G.R. (2000) How Stat1 mediates constitutive gene expression: a complex of unphosphorylated Stat1 and IRF1 supports transcription of the LMP2 gene. *Embo J*, **19**, 4111-4122.
- Chen, G., Gharib, T.G., Huang, C.C., Thomas, D.G., Shedden, K.A., Taylor, J.M., et al. (2002) Proteomic analysis of lung adenocarcinoma: identification of a highly expressed set of proteins in tumors. *Clin Cancer Res*, **8**, 2298-2305.
- Chensue, S.W. (2001) Molecular machinations: chemokine signals in host-pathogen interactions. *Clin Microbiol Rev*, **14**, 821-835, table of contents.
- Cohen, J.I. (2000) Epstein-Barr virus infection. *N Engl J Med*, **343**, 481-492.
- Coller, H.A., Grandori, C., Tamayo, P., Colbert, T., Lander, E.S., Eisenman, R.N., et al. (2000) Expression analysis with oligonucleotide microarrays reveals that MYC regulates genes involved in growth, cell cycle, signaling, and adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 3260-3265.
- Coope, H.J., Atkinson, P.G., Huhse, B., Belich, M., Janzen, J., Holman, M.J., et al. (2002) CD40 regulates the processing of NF-kappaB2 p100 to p52. *Embo J*, **21**, 5375-5385.
- Cordier, M., Calender, A., Billaud, M., Zimmer, U., Rousselet, G., Pavlish, O., et al. (1990) Stable transfection of Epstein-Barr virus (EBV) nuclear antigen 2 in lymphoma cells containing the EBV P3HR1 genome induces expression of B- cell activation molecules CD21 and CD23. *J Virol*, **64**, 1002-1013.
- Der, S.D., Zhou, A., Williams, B.R. and Silverman, R.H. (1998) Identification of genes differentially regulated by interferon alpha, beta, or gamma using oligonucleotide arrays. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 15623-15628.
- Dupuis, S., Jouanguy, E., Al-Hajjar, S., Fieschi, C., Al-Mohsen, I.Z., Al-Jumaah, S., et al. (2003) Impaired response to interferon-alpha/beta and lethal viral disease in human STAT1 deficiency. *Nat Genet*, **33**, 388-391.
- Eisen, M.B., Spellman, P.T., Brown, P.O. and Botstein, D. (1998) Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 14863-14868.
- Eliopoulos, A.G., Davies, C., Blake, S.S., Murray, P., Najafipour, S., Tsihchlis, P.N., et al. (2002) The Onkogenic protein kinase Tpl-2/Cot contributes to Epstein-Barr virus-encoded latent infection membrane protein 1-induced NF-kappaB signaling downstream of TRAF2. *J Virol*, **76**, 4567-4579.
- Fairchild, T.A. and Patejunas, G. (1999) Cloning and expression profile of human inorganic pyrophosphatase. *Biochim Biophys Acta*, **1447**, 133-136.
- Fan, Z., Beresford, P.J., Oh, D.Y., Zhang, D. and Lieberman, J. (2003) Tumor suppressor NM23-H1 is a granzyme A-activated DNase during CTL-mediated apoptosis, and the nucleosome assembly protein SET is its inhibitor. *Cell*, **112**, 659-672.



- Feinberg, A.P. and Vogelstein, B. (1983) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem*, **132**, 6-13.
- Forster, R., Kremmer, E., Schubel, A., Breitfeld, D., Kleinschmidt, A., Nerl, C., et al. (1998) Intracellular and surface expression of the HIV-1 coreceptor CXCR4/fusin on various leukocyte subsets: rapid internalization and recycling upon activation. *J Immunol*, **160**, 1522-1531.
- Francis, M.K., Phinney, D.G. and Ryder, K. (1995) Analysis of the hormone-dependent regulation of a JunD-estrogen receptor chimera. *J Biol Chem*, **270**, 11502-11513.
- Fruehling, S. and Longnecker, R. (1997) The immunoreceptor tyrosine-based activation motif of Epstein-Barr virus LMP2A is essential for blocking BCR-mediated signal transduction. *Virology*, **235**, 241-251.
- Fuchs, R. and Blakesley, R. (1983) Guide to the use of type II restriction endonucleases. *Methods Enzymol*, **100**, 3-38.
- Gavioli, R., Frisan, T., Vertuani, S., Bornkamm, G.W. and Masucci, M.G. (2001) c-myc overexpression activates alternative pathways for intracellular proteolysis in lymphoma cells. *Nat Cell Biol*, **3**, 283-288.
- Gerner, C., Frohwein, U., Gotzmann, J., Bayer, E., Gelbmann, D., Bursch, W., et al. (2000) The Fas-induced apoptosis analyzed by high throughput proteome analysis. *J Biol Chem*, **275**, 39018-39026.
- Ghia, P., Transidico, P., Veiga, J.P., Schaniel, C., Sallusto, F., Matsushima, K., et al. (2001) Chemoattractants MDC and TARC are secreted by malignant B-cell precursors following CD40 ligation and support the migration of leukemia-specific T cells. *Blood*, **98**, 533-540.
- Gires, O., Kohlhuber, F., Kilger, E., Baumann, M., Kieser, A., Kaiser, C., et al. (1999) Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus interacts with JAK3 and activates STAT proteins. *Embo J*, **18**, 3064-3073.
- Gires, O., Zimmer-Strobl, U., Gonnella, R., Ueffing, M., Marschall, G., Zeidler, R., et al. (1997) Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus mimics a constitutively active receptor molecule. *Embo J*, **16**, 6131-6140.
- Girniene, J., Tatibouet, A., Sackus, A., Yang, J., Holman, G.D. and Rollin, P. (2003) Inhibition of the D-Fructose transporter protein GLUT5 by fused-ring glyco-1,3-oxazolidin-2-thiones and -oxazolidin-2-ones. *Carbohydr Res*, **338**, 711-719.
- Gorg, A., Postel, W., Domscheit, A. and Gunther, S. (1988) Two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients of leaf proteins from barley (*Hordeum vulgare*): method, reproducibility and genetic aspects. *Electrophoresis*, **9**, 681-692.
- Gossen, M. and Bujard, H. (1992) Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 5547-5551.
- Grignani, F., Kinsella, T., Mencarelli, A., Valtieri, M., Riganelli, D., Lanfrancone, L., et al. (1998) High-efficiency gene transfer and selection of human hematopoietic progenitor cells with a hybrid EBV/retroviral vector expressing the green fluorescence protein. *Cancer Res*, **58**, 14-19.
- Guedez, L., McMarlin, A.J., Kingma, D.W., Bennett, T.A., Stetler-Stevenson, M. and Stetler-Stevenson, W.G. (2001) Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 alters the tumorigenicity of Burkitt's lymphoma via divergent effects on tumor growth and angiogenesis. *Am J Pathol*, **158**, 1207-1215.
- Gupta, S., Yan, H., Wong, L.H., Ralph, S., Krolewski, J. and Schindler, C. (1996) The SH2 domains of Stat1 and Stat2 mediate multiple interactions in the transduction of IFN- $\alpha$  signals. *Embo J*, **15**, 1075-1084.
- Gygi, S.P., Rochon, Y., Franza, B.R. and Aebersold, R. (1999) Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Mol Cell Biol*, **19**, 1720-1730.

- Haller, O. and Kochs, G. (2002) Interferon-induced mx proteins: dynamin-like GTPases with antiviral activity. *Traffic*, **3**, 710-717.
- Haque, S.J. and Williams, B.R. (1994) Identification and characterization of an interferon (IFN)-stimulated response element-IFN-stimulated gene factor 3-independent signaling pathway for IFN-alpha. *J Biol Chem*, **269**, 19523-19529.
- Higuchi, M., Kieff, E. and Izumi, K.M. (2002) The Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 putative Janus kinase 3 (JAK3) binding domain does not mediate JAK3 association or activation in B-lymphoma or lymphoblastoid cell lines. *J Virol*, **76**, 455-459.
- Hoyer, K.K., French, S.W., Turner, D.E., Nguyen, M.T., Renard, M., Malone, C.S., et al. (2002) Dysregulated TCL1 promotes multiple classes of mature B cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 14392-14397.
- Hsieh, J.J., Zhou, S., Chen, L., Young, D.B. and Hayward, S.D. (1999) CIR, a corepressor linking the DNA binding factor CBF1 to the histone deacetylase complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 23-28.
- Hurley, E.A. and Thorley-Lawson, D.A. (1988) B cell activation and the establishment of Epstein-Barr virus latency. *J Exp Med*, **168**, 2059-2075.
- Hynes, N.E. and Lane, H.A. (2001) Myc and mammary cancer: Myc is a downstream effector of the ErbB2 receptor tyrosine kinase. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, **6**, 141-150.
- Janz, A., Oezel, M., Kurzeder, C., Mautner, J., Pich, D., Kost, M., et al. (2000) Infectious Epstein-Barr virus lacking major glycoprotein BLLF1 (gp350/220) demonstrates the existence of additional viral ligands. *J Virol*, **74**, 10142-10152.
- Jochner, N., Eick, D., Zimmer-Strobl, U., Pawlita, M., Bornkamm, G.W. and Kempkes, B. (1996) Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 is a transcriptional suppressor of the immunoglobulin mu gene: implications for the expression of the translocated c-myc gene in Burkitt's lymphoma cells. *Embo J*, **15**, 375-382.
- Johannsen, E., Koh, E., Mosialos, G., Tong, X., Kieff, E. and Grossman, S.R. (1995) Epstein-Barr virus nuclear protein 2 transactivation of the latent membrane protein 1 promoter is mediated by J kappa and PU.1. *J Virol*, **69**, 253-262.
- Kaiser, C., Laux, G., Eick, D., Jochner, N., Bornkamm, G.W. and Kempkes, B. (1999) The proto-Onkogene c-myc is a direct target gene of Epstein-Barr virus nuclear antigen 2. *J Virol*, **73**, 4481-4484.
- Kaiser, C., von Stein, O., Laux, G. and Hoffmann, M. (1999) Functional genomics in cancer research: identification of target genes of the Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 by subtractive cDNA cloning and high-throughput differential screening using high-density agarose gels. *Electrophoresis*, **20**, 261-268.
- Kang, H.A. and Hershey, J.W. (1994) Effect of initiation factor eIF-5A depletion on protein synthesis and proliferation of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, **269**, 3934-3940.
- Kang, H.S., Lee, M.J., Song, H., Han, S.H., Kim, Y.M., Im, J.Y., et al. (2001) Molecular identification of IgE-dependent histamine-releasing factor as a B cell growth factor. *J Immunol*, **166**, 6545-6554.
- Karimpour, S., Lou, J., Lin, L.L., Rene, L.M., Lagunas, L., Ma, X., et al. (2002) Thioredoxin reductase regulates AP-1 activity as well as thioredoxin nuclear localization via active cysteines in response to ionizing radiation. *Onkogene*, **21**, 6317-6327.
- Kempkes, B., Pawlita, M., Zimmer-Strobl, U., Eissner, G., Laux, G. and Bornkamm, G.W. (1995) Epstein-Barr virus nuclear antigen 2-estrogen receptor fusion proteins transactivate viral and cellular genes and interact with RBP-J kappa in a conditional fashion. *Virology*, **214**, 675-679.

- Kempkes, B., Spitkovsky, D., Jansen-Durr, P., Ellwart, J.W., Kremmer, E., Delecluse, H.J., et al. (1995) B-cell proliferation and induction of early G1-regulating proteins by Epstein-Barr virus mutants conditional for EBNA2. *Embo J*, **14**, 88-96.
- Kempkes, B., Zimmer-Strobl, U., Eissner, G., Pawlita, M., Falk, M., Hammerschmidt, W., et al. (1996) Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 (EBNA2)-oestrogen receptor fusion proteins complement the EBNA2-deficient Epstein-Barr virus strain P3HR1 in transformation of primary B cells but suppress growth of human B cell lymphoma lines. *J Gen Virol*, **77**, 227-237.
- Keppler, O.T., Hinderlich, S., Langner, J., Schwartz-Albiez, R., Reutter, W. and Pawlita, M. (1999) UDP-GlcNAc 2-epimerase: a regulator of cell surface sialylation. *Science*, **284**, 1372-1376.
- Keppler, O.T., Moldenhauer, G., Oppenlander, M., Schwartz-Albiez, R., Berger, E.G., Funderud, S., et al. (1992) Human Golgi beta-galactoside alpha-2,6-sialyltransferase generates a group of sialylated B lymphocyte differentiation antigens. *Eur J Immunol*, **22**, 2777-2781.
- Khan, S., van den Broek, M., Schwarz, K., de Giuli, R., Diener, P.A. and Groettrup, M. (2001) Immunoproteasomes largely replace constitutive proteasomes during an antiviral and antibacterial immune response in the liver. *J Immunol*, **167**, 6859-6868.
- Khanna, R., Burrows, S.R. and Moss, D.J. (1995) Immune regulation in Epstein-Barr virus-associated diseases. *Microbiol Rev*, **59**, 387-405.
- Kieff, E. (1996) In Fields, B.N., Knipe, D.M., Howle, P.M., Chanock, R.M., Monath, T.P., Melnick, J.L., Roizman, B. and Strauss, S.E. (eds.), *Virology*. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, pp. 2345-2396.
- Kilger, E., Kieser, A., Baumann, M. and Hammerschmidt, W. (1998) Epstein-Barr virus-mediated B-cell proliferation is dependent upon latent membrane protein 1, which simulates an activated CD40 receptor. *Embo J*, **17**, 1700-1709.
- Kimura, T., Takeshima, H., Nomiya, N., Nishi, T., Kino, T., Kochi, M., et al. (2002) Expression of lymphocyte-specific chemokines in human malignant glioma: Essential role of LARC in cellular immunity of malignant glioma. *Int J Oncol*, **21**, 707-715.
- Kisseleva, T., Bhattacharya, S., Braunstein, J. and Schindler, C.W. (2002) Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges. *Gene*, **285**, 1-24.
- Klier, H., Csonga, R., Joao, H.C., Eckerskorn, C., Auer, M., Lottspeich, F., et al. (1995) Isolation and structural characterization of different isoforms of the hypusine-containing protein eIF-5A from HeLa cells. *Biochemistry*, **34**, 14693-14702.
- Knutson, J.C. (1990) The level of c-fgr RNA is increased by EBNA-2, an Epstein-Barr virus gene required for B-cell immortalization. *J Virol*, **64**, 2530-2536.
- Kruse, M., Rosorius, O., Kratzer, F., Bevec, D., Kuhnt, C., Steinkasserer, A., et al. (2000) Inhibition of CD83 cell surface expression during dendritic cell maturation by interference with nuclear export of CD83 mRNA. *J Exp Med*, **191**, 1581-1590.
- Kulwichit, W., Edwards, R.H., Davenport, E.M., Baskar, J.F., Godfrey, V. and Raab-Traub, N. (1998) Expression of the Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 induces B cell lymphoma in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 11963-11968.
- Kumar, A., Commane, M., Flickinger, T.W., Horvath, C.M. and Stark, G.R. (1997) Defective TNF-alpha-induced apoptosis in STAT1-null cells due to low constitutive levels of caspases. *Science*, **278**, 1630-1632.
- Lam, N. and Sugden, B. (2003) CD40 and its viral mimic, LMP1: similar means to different ends. *Cell Signal*, **15**, 9-16.
- Lataillade, J.J., Clay, D., Dupuy, C., Rigal, S., Jasmin, C., Bourin, P., et al. (2000) Chemokine SDF-1 enhances circulating CD34(+) cell proliferation in synergy with cytokines: possible role in progenitor survival. *Blood*, **95**, 756-768.

- Laux, G., Adam, B., Strobl, L.J. and Moreau-Gachelin, F. (1994) The Spi-1/PU.1 and Spi-B ets family transcription factors and the recombination signal binding protein RBP-J kappa interact with an Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 responsive cis-element. *Embo J*, **13**, 5624-5632.
- Laux, G., Dugrillon, F., Eckert, C., Adam, B., Zimmer-Strobl, U. and Bornkamm, G.W. (1994) Identification and characterization of an Epstein-Barr virus nuclear antigen 2-responsive cis element in the bidirectional promoter region of latent membrane protein and terminal protein 2 genes. *J Virol*, **68**, 6947-6958.
- Leone, A., Flatow, U., King, C.R., Sandeen, M.A., Margulies, I.M., Liotta, L.A., et al. (1991) Reduced tumor incidence, metastatic potential, and cytokine responsiveness of nm23-transfected melanoma cells. *Cell*, **65**, 25-35.
- Levitskaya, J., Sharipo, A., Leonchiks, A., Ciechanover, A. and Masucci, M.G. (1997) Inhibition of ubiquitin/proteasome-dependent protein degradation by the Gly-Ala repeat domain of the Epstein-Barr virus nuclear antigen 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 12616-12621.
- Lewis, T.S., Hunt, J.B., Aveline, L.D., Jonscher, K.R., Louie, D.F., Yeh, J.M., et al. (2000) Identification of novel MAP kinase pathway signaling targets by functional proteomics and mass spectrometry. *Mol Cell*, **6**, 1343-1354.
- Li, Q. and Verma, I.M. (2002) NF-kappaB regulation in the immune system. *Nat Rev Immunol*, **2**, 725-734.
- Lim, R. and Zaheer, A. (1996) In vitro enhancement of p38 mitogen-activated protein kinase activity by phosphorylated glia maturation factor. *J Biol Chem*, **271**, 22953-22956.
- Lim, R., Zaheer, A., Yorek, M.A., Darby, C.J. and Oberley, L.W. (2000) Activation of nuclear factor-kappaB in C6 rat glioma cells after transfection with glia maturation factor. *J Neurochem*, **74**, 596-602.
- Lim, R., Zhong, W.X. and Zaheer, A. (1990) Antiproliferative function of glia maturation factor beta. *Cell Regul*, **1**, 741-746.
- Ling, P.D., Ryon, J.J. and Hayward, S.D. (1993) EBNA-2 of herpesvirus papio diverges significantly from the type A and type B EBNA-2 proteins of Epstein-Barr virus but retains an efficient transactivation domain with a conserved hydrophobic motif. *J Virol*, **67**, 2990-3003.
- Lipowsky, G., Bischoff, F.R., Schwarzmaier, P., Kraft, R., Kostka, S., Hartmann, E., et al. (2000) Exportin 4: a mediator of a novel nuclear export pathway in higher eukaryotes. *Embo J*, **19**, 4362-4371.
- Lovric, J., Dammeier, S., Kieser, A., Mischak, H. and Kolch, W. (1998) Activated raf induces the hyperphosphorylation of stathmin and the reorganization of the microtubule network. *J Biol Chem*, **273**, 22848-22855.
- Mao, M., Fu, G., Wu, J.S., Zhang, Q.H., Zhou, J., Kan, L.X., et al. (1998) Identification of genes expressed in human CD34(+) hematopoietic stem/progenitor cells by expressed sequence tags and efficient full-length cDNA cloning. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 8175-8180.
- Masucci, M.G. and Ernberg, I. (1994) Epstein-Barr virus: adaptation to a life within the immune system. *Trends Microbiol*, **2**, 125-130.
- Matin, A. and Hung, M.C. (1993) Negative regulation of the neu promoter by the SV40 large T antigen. *Cell Growth Differ*, **4**, 1051-1056.
- Mueller-Lantzsch, N., Lenoir, G.M., Sauter, M., Takaki, K., Bechet, J.M., Kuklik-Roos, C., et al. (1985) Identification of the coding region for a second Epstein-Barr virus nuclear antigen (EBNA 2) by transfection of cloned DNA fragments. *Embo J*, **4**, 1805-1811.
- Murata, S., Kawahara, H., Tohma, S., Yamamoto, K., Kasahara, M., Nabeshima, Y., et al. (1999) Growth retardation in mice lacking the proteasome activator PA28gamma. *J Biol Chem*, **274**, 38211-38215.

- Nalesnik, M.A. (1996) Posttransplantation lymphoproliferative disorders (PTLD): current perspectives. *Semin Thorac Cardiovasc Surg*, **8**, 139-148.
- Nanbo, A., Inoue, K., Adachi-Takasawa, K. and Takada, K. (2002) Epstein-Barr virus RNA confers resistance to interferon-alpha-induced apoptosis in Burkitt's lymphoma. *Embo J*, **21**, 954-965.
- Nemerow, G.R. and Cooper, N.R. (1984) Early events in the infection of human B lymphocytes by Epstein-Barr virus: the internalization process. *Virology*, **132**, 186-198.
- Niedobitek, G., Agathangelou, A., Herbst, H., Whitehead, L., Wright, D.H. and Young, L.S. (1997) Epstein-Barr virus (EBV) infection in infectious mononucleosis: virus latency, replication and phenotype of EBV-infected cells. *J Pathol*, **182**, 151-159.
- Nihiro, H. and Clark, E.A. (2002) Regulation of B-cell fate by antigen-receptor signals. *Nat Rev Immunol*, **2**, 945-956.
- Nikaido, T., Shimada, K., Nishida, Y., Lee, R.S., Pardee, A.B. and Nishizuka, Y. (1989) Loss in transformed cells of cell cycle regulation of expression of a nuclear protein recognized by SLE patient antisera. *Exp Cell Res*, **182**, 284-289.
- Nishimura, K., Ohki, Y., Fukuchi-Shimogori, T., Sakata, K., Saiga, K., Beppu, T., et al. (2002) Inhibition of cell growth through inactivation of eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A) by deoxyspergualin. *Biochem J*, **363**, 761-768.
- Oh, J.J., Grosshans, D.R., Wong, S.G. and Slamon, D.J. (1999) Identification of differentially expressed genes associated with HER-2/neu overexpression in human breast cancer cells. *Nucleic Acids Res*, **27**, 4008-4017.
- Oster, S.K., Ho, C.S., Soucie, E.L. and Penn, L.Z. (2002) The myc Onkogene: MarvelouslyY Complex. *Adv Cancer Res*, **84**, 81-154.
- OMIM-Datenbank des NIH: <http://www.nlm.nih.gov>
- Pahl, H.L. (1999) Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Onkogene*, **18**, 6853-6866.
- Pajic, A., Spitkovsky, D., Christoph, B., Kempkes, B., Schuhmacher, M., Staeger, M.S., et al. (2000) Cell cycle activation by c-myc in a burkitt lymphoma model cell line. *Int J Cancer*, **87**, 787-793.
- Pilz, A., Ramsauer, K., Heidari, H., Leitges, M., Kovarik, P. and Decker, T. (2003) Phosphorylation of the Stat1 transactivating domain is required for the response to type I interferons. *EMBO Rep*, **4**, 368-373.
- Polack, A., Hortnagel, K., Pajic, A., Christoph, B., Baier, B., Falk, M., et al. (1996) c-myc activation renders proliferation of Epstein-Barr virus (EBV)-transformed cells independent of EBV nuclear antigen 2 and latent membrane protein 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 10411-10416.
- Pomerantz, J.L. and Baltimore, D. (2002) Two pathways to NF-kappaB. *Mol Cell*, **10**, 693-695.
- Pongubala, J.M., Van Beveren, C., Nagulapalli, S., Klemsz, M.J., McKercher, S.R., Maki, R.A., et al. (1993) Effect of PU.1 phosphorylation on interaction with NF-EM5 and transcriptional activation. *Science*, **259**, 1622-1625.
- Postel, E.H., Berberich, S.J., Flint, S.J. and Ferrone, C.A. (1993) Human c-myc transcription factor PuF identified as nm23-H2 nucleoside diphosphate kinase, a candidate suppressor of tumor metastasis. *Science*, **261**, 478-480.
- Pui, J.C., Allman, D., Xu, L., DeRocco, S., Karnell, F.G., Bakkour, S., et al. (1999) Notch1 expression in early lymphopoiesis influences B versus T lineage determination. *Immunity*, **11**, 299-308.
- Ramana, C.V., Gil, M.P., Schreiber, R.D. and Stark, G.R. (2002) Stat1-dependent and -independent pathways in IFN-gamma-dependent signaling. *Trends Immunol*, **23**, 96-101.

- Rhoads, R.E. (1999) Signal transduction pathways that regulate eukaryotic protein synthesis. *J Biol Chem*, **274**, 30337-30340.
- Richardson, C., Fielding, C., Rowe, M. and Brennan, P. (2003) Epstein-Barr virus regulates STAT1 through latent membrane protein 1. *J Virol*, **77**, 4439-4443.
- Rilbe, H. (1976) Theoretical Aspects of Steady-State Focusing. In Catsimpoilas, N. (ed.), *Isoelectric Focusing*. Academic Press, New York, pp. 13-52.
- Robertson, K.D., Hayward, S.D., Ling, P.D., Samid, D. and Ambinder, R.F. (1995) Transcriptional activation of the Epstein-Barr virus latency C promoter after 5-azacytidine treatment: evidence that demethylation at a single CpG site is crucial. *Mol Cell Biol*, **15**, 6150-6159.
- Rosorius, O., Reichart, B., Kratzer, F., Heger, P., Dabauvalle, M.C. and Hauber, J. (1999) Nuclear pore localization and nucleocytoplasmic transport of eIF-5A: evidence for direct interaction with the export receptor CRM1. *J Cell Sci*, **112**, 2369-2380.
- Ruhl, M., Himmelsbach, M., Bahr, G.M., Hammerschmid, F., Jaksche, H., Wolff, B., et al. (1993) Eukaryotic initiation factor 5A is a cellular target of the human immunodeficiency virus type 1 Rev activation domain mediating trans-activation. *J Cell Biol*, **123**, 1309-1320.
- Schindler, C. and Strehlow, I. (2000) Cytokines and STAT signaling. *Adv Pharmacol*, **47**, 113-174.
- Schleger, C., Verbeke, C., Hildenbrand, R., Zentgraf, H. and Bleyl, U. (2002) c-MYC activation in primary and metastatic ductal adenocarcinoma of the pancreas: incidence, mechanisms, and clinical significance. *Mod Pathol*, **15**, 462-469.
- Schroeder, T. and Just, U. (2000) Notch signalling via RBP-J promotes myeloid differentiation. *Embo J*, **19**, 2558-2568.
- Schuhmacher, M., Kohlhuber, F., Holzel, M., Kaiser, C., Burtscher, H., Jarsch, M., et al. (2001) The transcriptional program of a human B cell line in response to Myc. *Nucleic Acids Res*, **29**, 397-406.
- Senftleben, U., Cao, Y., Xiao, G., Greten, F.R., Krahn, G., Bonizzi, G., et al. (2001) Activation by IKK $\alpha$  of a second, evolutionary conserved, NF- $\kappa$ B signaling pathway. *Science*, **293**, 1495-1499.
- Shaffer, A.L., Rosenwald, A., Hurt, E.M., Giltnane, J.M., Lam, L.T., Pickeral, O.K., et al. (2001) Signatures of the immune response. *Immunity*, **15**, 375-385.
- Sharp, T.V., Schwemmle, M., Jeffrey, I., Laing, K., Mellor, H., Proud, C.G., et al. (1993) Comparative analysis of the regulation of the interferon-inducible protein kinase PKR by Epstein-Barr virus RNAs EBER-1 and EBER-2 and adenovirus VAI RNA. *Nucleic Acids Res*, **21**, 4483-4490.
- Shi, X.P., Yin, K.C., Zimolo, Z.A., Stern, A.M. and Waxman, L. (1996) The subcellular distribution of eukaryotic translation initiation factor, eIF-5A, in cultured cells. *Exp Cell Res*, **225**, 348-356.
- Sixbey, J.W., Nedrud, J.G., Raab-Traub, N., Hanes, R.A. and Pagano, J.S. (1984) Epstein-Barr virus replication in oropharyngeal epithelial cells. *N Engl J Med*, **310**, 1225-1230.
- Sjoblom, A., Jansson, A., Yang, W., Lain, S., Nilsson, T. and Rymo, L. (1995) PU box-binding transcription factors and a POU domain protein cooperate in the Epstein-Barr virus (EBV) nuclear antigen 2-induced transactivation of the EBV latent membrane protein 1 promoter. *J Gen Virol*, **76**, 2679-2692.
- Sjoblom, A., Yang, W., Palmqvist, L., Jansson, A. and Rymo, L. (1998) An ATF/CRE element mediates both EBNA2-dependent and EBNA2-independent activation of the Epstein-Barr virus LMP1 gene promoter. *J Virol*, **72**, 1365-1376.

- Staege, M.S., Lee, S.P., Frisan, T., Mautner, J., Scholz, S., Pajic, A., et al. (2002) MYC overexpression imposes a nonimmunogenic phenotype on Epstein-Barr virus-infected B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 4550-4555.
- Stark, G.R., Kerr, I.M., Williams, B.R., Silverman, R.H. and Schreiber, R.D. (1998) How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem*, **67**, 227-264.
- Strobl, L.J., Hofelmayr, H., Marschall, G., Brielmeier, M., Bornkamm, G.W. and Zimmer-Strobl, U. (2000) Activated Notch1 modulates gene expression in B cells similarly to Epstein-Barr viral nuclear antigen 2. *J Virol*, **74**, 1727-1735.
- Subramanian, C., Cotter, M.A., 2nd and Robertson, E.S. (2001) Epstein-Barr virus nuclear protein EBNA-3C interacts with the human metastatic suppressor Nm23-H1: a molecular link to cancer metastasis. *Nat Med*, **7**, 350-355.
- Subramanian, C., Knight, J.S. and Robertson, E.S. (2002) The Epstein Barr nuclear antigen EBNA3C regulates transcription, cell transformation and cell migration. *Front Biosci*, **7**, d704-716.
- Subramanian, C. and Robertson, E.S. (2002) The metastatic suppressor Nm23-H1 interacts with EBNA3C at sequences located between the glutamine- and proline-rich domains and can cooperate in activation of transcription. *J Virol*, **76**, 8702-8709.
- Suen, T.C. and Hung, M.C. (1991) c-myc reverses neu-induced transformed morphology by transcriptional repression. *Mol Cell Biol*, **11**, 354-362.
- Sutkowski, N., Conrad, B., Thorley-Lawson, D.A. and Huber, B.T. (2001) Epstein-Barr virus transactivates the human endogenous retrovirus HERV-K18 that encodes a superantigen. *Immunity*, **15**, 579-589.
- Svensson, H. (1966) *J. Chromatogr*, **25**, 266-273.
- Sylla, B.S., Hung, S.C., Davidson, D.M., Hatzivassiliou, E., Malinin, N.L., Wallach, D., et al. (1998) Epstein-Barr virus-transforming protein latent infection membrane protein 1 activates transcription factor NF-kappaB through a pathway that includes the NF-kappaB-inducing kinase and the IkappaB kinases IKKalpha and IKKbeta. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 10106-10111.
- Tamura, K., Taniguchi, Y., Minoguchi, S., Sakai, T., Tun, T., Furukawa, T., et al. (1995) Physical interaction between a novel domain of the receptor Notch and the transcription factor RBP-J kappa/Su(H). *Curr Biol*, **5**, 1416-1423.
- Tanaka, H., Matsumura, I., Ezoe, S., Satoh, Y., Sakamaki, T., Albanese, C., et al. (2002) E2F1 and c-Myc potentiate apoptosis through inhibition of NF-kappaB activity that facilitates MnSOD-mediated ROS elimination. *Mol Cell*, **9**, 1017-1029.
- Thomas, T. and Thomas, T.J. (2001) Polyamines in cell growth and cell death: molecular mechanisms and therapeutic applications. *Cell Mol Life Sci*, **58**, 244-258.
- Tierney, R.J., Kirby, H.E., Nagra, J.K., Desmond, J., Bell, A.I. and Rickinson, A.B. (2000) Methylation of transcription factor binding sites in the Epstein-Barr virus latent cycle promoter Wp coincides with promoter down-regulation during virus-induced B-cell transformation. *J Virol*, **74**, 10468-10479.
- Tome, M.E., Fiser, S.M., Payne, C.M. and Gerner, E.W. (1997) Excess putrescine accumulation inhibits the formation of modified eukaryotic initiation factor 5A (eIF-5A) and induces apoptosis. *Biochem J*, **328** ( Pt 3), 847-854.
- Wang, D., Liebowitz, D. and Kieff, E. (1985) An EBV membrane protein expressed in immortalized lymphocytes transforms established rodent cells. *Cell*, **43**, 831-840.
- Wang, L., Grossman, S.R. and Kieff, E. (2000) Epstein-Barr virus nuclear protein 2 interacts with p300, CBP, and PCAF histone acetyltransferases in activation of the LMP1 promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 430-435.
- Wanzel, M., Herold, S. and Eilers, M. (2003) Transcriptional repression by Myc. *Trends Cell Biol*, **13**, 146-150.

- Westermeier, R., Barnes, N., Gronau-Czybulka, S., Habeck, C., Schach, H., Schickle, H., Seymour, C., Theeling, G., Wiesner, P. (1997) *Electrophoresis in Practice*. John Wiley & Sons.
- Wilk, S., Chen, W.E. and Magnusson, R.P. (2000) Properties of the nuclear proteasome activator PA28gamma (REGgamma). *Arch Biochem Biophys*, **383**, 265-271.
- Wonsey, D.R., Zeller, K.I. and Dang, C.V. (2002) The c-Myc target gene PRDX3 is required for mitochondrial homeostasis and neoplastic transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 6649-6654.
- Wu, T.R., Hong, Y.K., Wang, X.D., Ling, M.Y., Dragoi, A.M., Chung, A.S., et al. (2002) SHP-2 is a dual-specificity phosphatase involved in Stat1 dephosphorylation at both tyrosine and serine residues in nuclei. *J Biol Chem*, **277**, 47572-47580.
- Yamamoto, N., Takizawa, T., Iwanaga, Y. and Shimizu, N. (2000) Malignant transformation of B lymphoma cell line BJAB by Epstein-Barr virus-encoded small RNAs. *FEBS Lett*, **484**, 153-158.
- Yohannan, J., Wienands, J., Coggeshall, K.M. and Justement, L.B. (1999) Analysis of tyrosine phosphorylation-dependent interactions between stimulatory effector proteins and the B cell co-receptor CD22. *J Biol Chem*, **274**, 18769-18776.
- You, M. and Zhao, Z. (1997) Positive effects of SH2 domain-containing tyrosine phosphatase SHP-1 on epidermal growth factor- and interferon-gamma-stimulated activation of STAT transcription factors in HeLa cells. *J Biol Chem*, **272**, 23376-23381.
- You, Z., Madrid, L.V., Saims, D., Sedivy, J. and Wang, C.Y. (2002) c-Myc sensitizes cells to tumor necrosis factor-mediated apoptosis by inhibiting nuclear factor kappa B transactivation. *J Biol Chem*, **277**, 36671-36677.
- Zaheer, A., Mathur, S.N. and Lim, R. (2002) Overexpression of glia maturation factor in astrocytes leads to immune activation of microglia through secretion of granulocyte-macrophage- colony stimulating factor. *Biochem Biophys Res Commun*, **294**, 238-244.
- Zeidler, R., Meissner, P., Eissner, G., Lazis, S. and Hammerschmidt, W. (1996) Rapid proliferation of B cells from adenoids in response to Epstein- Barr virus infection. *Cancer Res*, **56**, 5610-5614.
- Zhang, X., Blenis, J., Li, H.C., Schindler, C. and Chen-Kiang, S. (1995) Requirement of serine phosphorylation for formation of STAT-promoter complexes. *Science*, **267**, 1990-1994.
- Zhou, S., Fujimuro, M., Hsieh, J.J., Chen, L. and Hayward, S.D. (2000) A role for SKIP in EBNA2 activation of CBF1-repressed promoters. *J Virol*, **74**, 1939-1947.
- Zimber-Strobl, U., Kremmer, E., Grasser, F., Marschall, G., Laux, G. and Bornkamm, G.W. (1993) The Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 interacts with an EBNA2 responsive cis-element of the terminal protein 1 gene promoter. *Embo J*, **12**, 167-175.
- Zimber-Strobl, U. and Strobl, L.J. (2001) EBNA2 and Notch signalling in Epstein-Barr virus mediated immortalization of B lymphocytes. *Semin Cancer Biol*, **11**, 423-434.
- Zimber-Strobl, U., Strobl, L.J., Meitinger, C., Hinrichs, R., Sakai, T., Furukawa, T., et al. (1994) Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 exerts its transactivating function through interaction with recombination signal binding protein RBP-J kappa, the homologue of Drosophila Suppressor of Hairless. *Embo J*, **13**, 4973-4982.



7 Abkürzungen

µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
°C	Temperatur in Grad-Celsius
A (in DNA-Sequenz)	Desoxyadenosin-5'-phosphat
Abb.	Abbildung
Acc	Accession-Nummer
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BCR	B-Zell-Rezeptor
BGH	Rinderwachstumshormon („bovine growth hormone“)
BL	Burkittlymphom
bp	Basenpaar
C (in DNA-Sequenz)	Desoxy <b>cytidin</b> -5'-phosphat
CD	cluster of differentiation/ cluster determinants
cDNA	komplementäre DNA
CMV	Cytomegalievirus
CR	Komplementrezeptor („complement receptor“)
Cx	Cycloheximid
DAH	Diaminoheptan
DEAE	Diethylaminoethyl
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxyribonucleotidtriphosphat
DTE	1,4-Dithioeritol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EBNA	EBV nukleäres Antigen
EBV	Epstein-Barr Virus
ECL	verstärkte chemische Lumineszenz („Enhanced Chemical Luminescence“)
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetra-acetat
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor (epidermal growth factor)
eIF	eukaryontischer Initiations-Translations-Faktor
EMSA	Electromobility Shift Assay
ER	Östrogenrezeptor
ERE2-5	B-Zelllinie mit ER-EBNA2-Fusionsprotein
FCS	Fötale Kälberserum
FcγRII	Fcγ-Rezeptor II
G (in DNA-Sequenz)	Desoxyguanosin-5'-phosphat
GFP	grün fluoreszierendes Protein („green fluorescent protein“)
h	Stunde
h (als Kürzel vor Name)	human
HAT	Histonacetyl-Transferase
HDAC	Histondeacetylase
IEF	Isoelektrische Fokussierung
Ig	Immunglobulin
IKK	IκB-Kinase
IL	Interleukin

## Abkürzungen

---

INF	Interferon
IRF	Interferon Response Factor
I $\square\square$	NF $\square\square$ -Inhibitor
kD	Kilodalton
LB	“Luria Bertani“
LCL	Lymphoblastoide Zelllinie
LMP	Latentes Membranprotein
LMP-Agarose	Agarose mit geringem Schmelzpunkt (“Low Melting Point“)
LPS	Lipopolysaccharid
M	mol/l
mA	Milliamper
MALDI-ToF-MS	Matrix-assistierte Laserdesorptions/Ionisations-Flugzeit-Massenspektrometrie
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MEF	Embryonaler Mausfibroblast
Mn-SOD	Mangan-abhängige Superoxiddismutase
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
MYD88	Myloid Differentiation Primary Response Gene 88
MYC	Onkogen aus dem Avian Myelocytomatosis Virus
NEMO	NF $\square\square$ essentieller Modulator
NES	Kernexport-Signal
NF $\square\square$	Nukleärer Faktor $\square\square$
NIK	NF $\square\square$ induzierende Kinase
NLS	Kernlokalisations-Sequenz
ODC	Ornithindecaboxylase
P493-6	von EREB2-5 stammende Zelllinie, die unter der Kontrolle von Tetrazyklin (Tet-Off-System) MYC exprimiert
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
pBKS	pBlueskript II KS (Stratagene)
PBMC	aus peripherem Blut gewonnene mononukleäre Zellen
PBS	“Phosphate buffered saline“
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute (“rounds per minute“)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	PCR mit cDNA aus <i>reverser Transkription</i> von Zell-mRNA
SAMDC	S-Adenosylmethionin-Decarboxylase
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulphat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
sec	Sekunde(n)
SH2	Src Homology Domäne Typ 2
SH3	Src Homology Domäne Typ 3
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
t (in DNA-Sequenz)	Desoxythymidin-5'-phosphat
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	„Tris-buffered saline“
TCR	T-Zell-Rezeptor
TD	Transaktivierungsdomäne

## Abkürzungen

---

TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tet	Tetrazyklin
TGF□	transformierender Wachstumsfaktor □ („transforming growth factor□")
TIMP-1	Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 1
TLR	Toll like Rezeptor
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TRAF	TNF-Rezeptor assoziierter Faktor
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-ammoniummethan
u	Einheit der Enzymaktivität (Definition durch Hersteller)
V	Volt
w/v	Verhältnis Masse/Volumen
x g	fache Erdbeschleunigung

### Bezeichnung der Aminosäuren im *ein*-Buchstaben-Code, *drei*-Buchstaben-Code

Code	Aminosäure	Code	Aminosäure	Code	Aminosäure	Code	Aminosäure
A, Ala	Alanin	G, Gly	Glycin	M, Met	Methionin	S, Ser	Serin
C, Cys	Cystein	H, His	Histidin	N, Asn	Asparagin	T, Thr	Threonin
D, Asp	Aspartat	I, Iso	Isoleucin	P, Pro	Prolin	V, Val	Valin
E, Glu	Glutamat	K, Lys	Lysin	Q, Gln	Glutamin	W, Trp	Tryptophan
F, Phe	Phenylalanin	L, Leu	Leucin	R, Arg	Arginin	Y, Tyr	Tyrosin

## Lebenslauf

---

Martin Schlee

Klinische Molekularbiologie  
GSF, Hämatologikum  
Marchioninstr. 25  
81377 München

Geroldseckstr. 4  
81375 München

Tel. 089-7099-517  
FAX 089-7099-500  
schlee@gsf.de

Tel. 089-71668409

### Lebenslauf

- 1973 Geboren in Hildesheim
- 1993 (Mai) Abitur, Jacobsongymnasium Seesen
- 1994 - 1999 Studium Biochemie, Universität Bielefeld
- 1998 (Mai-Juli) Forschungsaufenthalt im Labor von Prof. Dr. I. Pecht, Weizmann-Institut, Institut für Immunologie, Rehovot, Israel
- 1999 Diplomarbeit, Universität Bielefeld, Fakultät für Chemie, BiochemieIII,:  
"Untersuchung der Beteiligung von ADAM9 an der Prozessierung von membranständigem CD23"  
Betreuer: Prof. Dr. J. Frey
- Dezember1999 - Doktorarbeit für den Dr. rer. nat., GSF, Institut für Gesundheit und  
Mai 2003 Umwelt, Abteilung Klinische Molekularbiologie:  
"Identifizierung und Charakterisierung von Zielgenen des Epstein-Barr  
Virus nukleären Antigens 2 (EBNA2)"  
Betreuer: Prof. Dr. G. W. Bornkamm
- Januar 2003 Forschungsaufenthalt im Labor von Prof. Dr. L. Staudt, National  
Institutes of Health, National Cancer Institute, Bethesda, USA
- März 2003 Forschungsaufenthalt im Labor von Prof. Dr. R. Fagard, Service de  
Biochimie, Hopital Avicenne, Bobigny, Frankreich

München, den 27.05.2003

Martin Schlee

## Danksagung

Ich danke **Prof. Georg W. Bornkamm** für die Bereitstellung des Themas und des Arbeitsplatzes, die Betreuung, die konstruktive Durchsicht dieser Arbeit und für die Herstellung des Kontaktes mit meinen Kooperationspartnern. Weiter danke ich **Prof. Horst Domdey**, dass er, ohne zu zögern, meine Fachvertretung an der LMU übernommen hat.

Mein Dank gilt **Prof. Louis Staudt** (NIH, Bethesda), in dessen Labor ich die Lymphochip-Hybridisierung -und Auswertung durchführen durfte. Aus seinem Team bedanke ich mich besonders bei **Dr. Andreas Rosenwald** für die Herstellung der Lymphochips und für seine sorgfältige und geduldige Betreuung der Durchführung der Hybridisierung, die zur Generierung von Daten geführt hat, die einen Großteil der Hauptaussage dieser Arbeit ausmachen, **Michael Chiorazzi** und **Dr. Lloyd Lam** für die Hilfe bei der Auswertung und Interpretation der Daten. Insgesamt möchte ich mich beim Staudt-Lab-Team für die herzliche Arbeits-Atmosphäre und Susann Kolmar und Dr. Adrian Wiestner für die herzliche Aufnahme in ihr Haus, Integration ins Familienleben und die europäische Bewirtung bedanken.

Ich danke **Prof. Remi Fagard** (Hopital Avicenne, Bobigny) für seine ständige Kooperationsbereitschaft, besonders die Vermittlung seines sensitiven Westernblotprotokolls, ohne das die sauberen STAT1-pY701-Westernblots nicht zustandegekommen wären, für seine Gastfreundschaft, die Einführung in die STAT1-Problematik, und den ständigen Austausch bzw. die fruchtbaren Diskussionen von Daten.

Ich danke **Prof. Dirk Eick** für die Einführung in den nukleären Run-On, für meine Integration in sein Labor, das gute Arbeitsklima, sowie sein ständig wohlwollendes Interesse für den Fortgang meiner Arbeit.

Weiter danke ich **Dr. Josip Lovric** für die Einführung in die 2D-Gelelektrophorese und die MALDI-ToF- Massenspektrometrie, **Dr. Guido Sauer** für die Optimierung und Hilfe bei der MALDI-Analyse, **Dr. Reinhard Mailhammer** für die Einführung in die Lightcycler-PCR, **Dr. Michael Pawlita**, **Dr. Cornelia Detke** (beide Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg) und **Dr. Falk Nimmerjahn** für die Hilfe bei der FACS-Analyse der Oberflächenglykosylierung von LCLs und BLs.

Ich danke **Dr. Diana Dudziak** für ihre ständige Hilfsbereitschaft und zur Verfügungstellung von Arbeitsmaterialien, wie Plasmiden, Bakterien, Enzymen usw., besonders für die super RNA-Kinetik-Membran von EREB2-5, und **Maja Santak** für die Einführung in den Thymidin-Inkorporationsassay und für ihre Hilfe, literweise EREB2-5 zu züchten.

Ich danke **Dr. Gerhard Laux** für ständige Betreuung und Diskussionsbereitschaft im Forscher-Alltag und die aufmerksame konstruktive Durchsicht dieser Arbeit, **Dr. Arndt Kieser** für Diskussion und das Verschenken von Antikörpern, **Dr. Josef Mautner** für das Vergolden und Immortalisieren meines Blutes, **Michael Hölzel** für Diskussion, Ideen und Begeisterung in der Forschung, **Rob Chapman** für Diskussion und ständige Spielbereitschaft, **Andreas Lang** und **Isabel Schlosser** für ein offenes Ohr, **Dr. Marino Schuhmacher**, **Ana Banjac** und **Cemile Jakupoglu** (und ihrer Mutter) für Wein und unerwartete, willkommene Mahlzeiten am Wochenende (auch nach Ladenschluss von ALDI), **Thomas Grimm** für Gummibärchen und das ständige Ausleihen seines Internetzugangs, **Dr. Bernhard Neuhierl** für ständige Hilfsbereitschaft bei Computerproblemen.

Meinen **Eltern** danke ich für die Unterstützung meines Biochemie-Studiums und für Care-Pakete während der Doktorarbeit, um die mich alle beneidet haben, meinen **Geschwistern** und Anhang, **Gaby Pruschke** und **Michael Engelke** für aufmunternde Worte und den Versuch, mir immer wieder klarzumachen, dass es noch die Welt außerhalb des Labors und nach der Doktorarbeit gibt.

**Nikolaos Giannakis** Danke ich für aufmunternde Worte und meinen einzigen echten Urlaub während der Doktorarbeit.

Meinem Chemielehrer **W. Nöller** danke ich für die Vermittlung der Grundlagen der Chemie und der Methode, wie man am effektivsten Naturwissenschaft lernt. Meinem Biolehrer **E. Menke** danke ich für die Begeisterung für die Biologie, die er bei mir wieder geweckt hat.