

UNTERSUCHUNG MOLEKULARER MECHANISMEN DER EBNA-2 VERMITTELTEN TRANSAKTIVIERUNG

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

von

ANDREA HARTMANN

München, März 2007

GSF-Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt GmbH
Institut für Klinische Molekularbiologie und Tumorgenetik, München

Dissertation eingereicht am: 5. März 2007

1. Gutachter: PD Dr. Bettina Kempkes

2. Gutachter: Prof. Dr. Elisabeth Weiß

Tag der mündlichen Prüfung: 30. Juli 2007

Für meine Eltern

Publikationen:

Grabusic, K., Maier, S., Hartmann, A., Mantik, A., Hammerschmidt, W., and Kempkes, B. (2006). The CR4 region of EBNA2 confers viability of Epstein-Barr virus-transformed B cells by CBF1-independent signalling. *J Gen Virol* 87, 3169-3176.

Maier, S., Staffler, G., Hartmann, A., Hock, J., Henning, K., Grabusic, K., Mailhammer, R., Hoffmann, R., Wilmanns, M., Lang, R., *et al.* (2006). Cellular target genes of Epstein-Barr virus nuclear antigen 2. *J Virol* 80, 9761-9771.

INHALTSVERZEICHNIS

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

TABELLENVERZEICHNIS

ZUSAMMENFASSUNG.....	1
1 EINLEITUNG	2
1.1 Das Epstein-Barr Virus	2
1.1.1 Lebenszyklus des Epstein-Barr Virus	3
1.1.2 Die EBV-Latenzgene	4
1.1.3 Infektiöse und fatale Mononukleose.....	5
1.1.3.1 Infektiöse Mononukleose.....	5
1.1.3.2 Fatale Mononukleose.....	5
1.1.4 EBV assoziierte Lymphome.....	6
1.2 Das Epstein-Barr Virus nukleäre Antigen 2 (EBNA-2).....	7
1.2.1 Die Primärstruktur von EBNA-2	8
1.2.2 EBNA-2 assoziierte Proteine.....	9
1.2.2.1 EBNA-2 assoziierte Proteine, die eine DNA-Bindung vermitteln	9
1.2.2.2 EBNA-2 assoziierte Proteine der Transkriptionsmaschinerie	11
1.2.2.3 Weitere EBNA-2 assoziierte Proteine	11
1.2.2.4 CBF1 - das EBNA-2-Adapterprotein.....	12
1.2.3 EBNA-2-Zielgene	14
1.2.3.1 Virale Zielgene	14
1.2.3.2 Zelluläre Zielgene.....	14
1.2.3.3 Mechanismus der Transaktivierung durch EBNA-2.....	15
1.2.4 Notch - das zelluläre Äquivalent von EBNA-2.....	16
1.3 Histonmodifikationen	17
1.4 Identifikation von assoziierten Proteinen mittels massenspektrometrischer Analyse.....	19
1.4.1 Die Tandem Affinity Purification (TAP-Reinigung)	20
1.4.2 Massenspektrometrische Analyse	22
1.5 Fragestellung.....	23
2 MATERIAL.....	25
2.1 Kulturen.....	25
2.1.1 Zelllinien.....	25
2.1.2 Bakterienstämme	25
2.2 Material für die Kultur eukaryotischer Zellen und Bakterien.....	26
2.2.1 Kultur eukaryotischer Zellen.....	26
2.2.2 Kultur von Bakterien.....	26
2.3 Oligonukleotide	26
2.4 Plasmide.....	28
2.5 Antikörper	29

2.6	Enzyme	30
2.7	DNA-Standards	30
2.8	Nukleinsäuren	30
2.9	Reagenziensysteme (Kits)	30
2.10	Chemikalien und Reagenzien	31
2.11	Verbrauchsmaterial	31
2.12	Laborausstattung	31
2.13	Software	32
2.14	Datenbanken	32
3	METHODEN	33
3.1	Arbeiten mit Bakterien	33
3.1.1	Kultivierung und Lagerung von Bakterien	33
3.1.2	Herstellung chemisch kompetenter Bakterien.....	33
3.1.3	Transformation chemisch kompetenter Bakterien.....	34
3.2	Methoden der Zellkultur	34
3.2.1	Bestimmung der Zellzahl	34
3.2.2	Kultivierung und Aufbewahrung von Zellen.....	34
3.2.3	Aktivierung der EBNA-2-Aktivität durch Östrogenzugabe	35
3.2.4	Stabile Transfektion	35
3.2.5	Luziferase-Assay für die Promotor-Reportergen-Studie	35
3.3	Molekularbiologische Methoden	36
3.3.1	Isolierung von Plasmid-DNA	36
3.3.1.1	Schnelle Plasmidisolierung	36
3.3.1.2	Präparative Aufarbeitung von Plasmid-DNA	37
3.3.2	Präzipitation gelöster DNA.....	37
3.3.3	Agarose-Gelelektrophorese	37
3.3.4	DNA-Fragmentisolierung aus dem Agarosegel.....	38
3.3.5	Klonierung von DNA	38
3.3.5.1	Polymerase Kettenreaktion (PCR)	38
3.3.5.2	DNA-Spaltung mit Restriktionsenzymen	38
3.3.5.3	Ligation.....	39
3.3.5.4	Klonierung von Expressionsvektoren	39
3.3.6	Real Time PCR.....	41
3.3.6.1	Unterschied zur konventionellen PCR.....	41
3.3.6.2	Quantifizierung	41
3.3.6.3	Schmelzkurvenanalyse	43
3.3.6.4	Durchführung	43
3.4	Chromatinimmunpräzipitation	44
3.4.1	Zellernte und Vernetzung der Zellkernbestandteile durch Formaldehyd	44
3.4.2	Isolierung der Zellkerne	44
3.4.3	Chromatinfragmentierung mittels Mikrokokken-Nuklease und Ultraschall	44
3.4.4	Immunpräzipitation der vernetzten Protein/DNA-Komplexe	45
3.4.5	Waschen und Elution der präzipitierten Immunkomplexe	45
3.4.6	Proteinase K-Verdau und Phenolchloroform-Extraktion der immunpräzipitierten DNA.....	46

3.5	Proteinbiochemische Methoden.....	46
3.5.1	Herstellung von Zelllysaten.....	46
3.5.2	Proteinbestimmung nach Bradford.....	47
3.5.3	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	47
3.5.4	Western Blot.....	48
3.5.5	Trichloressigsäure (TCA) – Fällung.....	48
3.5.6	Färbungen zur Darstellung von Proteinen im SDS-Gel.....	48
3.5.6.1	Silberfärbung.....	48
3.5.6.2	Coomassie-Färbung.....	49
3.5.6.3	Coomassie-Färbung mit colloidalem Coomassie.....	49
3.5.7	Immunpräzipitation (IP).....	49
3.6	Protein-Reinigungen.....	50
3.6.1	Tandem Affinity Purification (TAP-Reinigung).....	50
3.6.2	Tandem Immunpräzipitation (TIP-Reinigung).....	51
3.6.3	GST pull down.....	51
3.6.3.1	Reinigung von GST-Fusionsproteinen nach bakterieller Expression.....	51
3.6.3.2	GST pull down.....	51
3.7	Massenspektrometrie.....	52
3.7.1	Trypsin-Verdau.....	52
3.7.1.1	Trypsin-Verdau für direktes Aufspotten auf ein MALDI-Target.....	52
3.7.1.2	Trypsin-Verdau für LC-Lauf.....	53
3.7.2	Nano Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (nanoHPLC).....	53
3.7.3	MALDI-TOF/TOF bzw. LC-MALDI-TOF/TOF.....	54
3.7.3.1	Präparation der Proben für direktes Bepöten der MALDI-Targets.....	55
3.7.3.2	Automatisches Bepöten der MALDI-Targets nach HPLC-Trennung.....	55
3.7.3.3	Verwendete Messparameter.....	55
3.7.4	Datenbanksuche.....	56
4	ERGEBNISSE.....	57
4.1	Identifizierung von EBNA-2-Binderegionen in EBNA-2-Zielgenen.....	58
4.1.1	EBNA-2 bindet direkt an Genfragmente in SLAMF1, DNASE1L3 und CCL3.....	58
4.1.2	Charakterisierung der Chromatinmodifikation des Transkriptionsstarts und seiner angrenzenden Bereiche im Promotor und 1. Exon-Intron-Bereich der Gene SLAMF1, DNASE1L3 und CCL3.....	62
4.1.2.1	SLAMF1.....	64
4.1.2.2	DNASE1L3.....	66
4.1.2.3	CCL3.....	67
4.1.3	Eine Promotor-Reportergen-Studie eines Bereiches des CCL3-Promotors.....	71
4.1.3.1	Untersuchung der EBNA-2-Regulation des CCL3-Promotors.....	71
4.1.3.2	Untersuchung der Notch-Regulation des CCL3-Promotors.....	72
4.2	Identifizierung von EBNA-2/CBF1 assoziierten Proteinen.....	75
4.2.1	Generierung von TAP-Fusionsproteinen und ihrer stabilen Zelllinien.....	75
4.2.1.1	Konstruktion der verschiedenen TAP-EBNA-2- und TAP-CBF1-Fusionsproteine.....	75
4.2.1.2	Überprüfung der TAP-Fusionsproteine auf ihre Funktionalität.....	76
4.2.1.2.1	TAP getaggttes CBF1 rekrutiert EBNA-2 und Notch.....	76
4.2.1.2.2	TAP getaggttes EBNA-2 wird von CBF1 rekrutiert.....	78
4.2.1.3	Expression der TAP-Fusionsproteine in stabilen Zelllinien.....	79
4.2.2	Etablierung der TAP-Reinigung.....	82
4.2.2.1	Beeinträchtigt endogenes IgM die Effizienz der TAP-Reinigung?.....	82
4.2.2.2	Optimierung des 1. Schrittes der TAP-Reinigung – Die ProtA/IgG-Bindung.....	83
4.2.2.3	Optimierung der TEV-Spaltung.....	85

4.2.2.4	Die TAP-Reinigung.....	86
4.2.2.4.1	Depletion von zellulären Proteinen im 1. Reinigungsschritt.....	86
4.2.2.4.2	TAP-Reinigung von TAP-EBNA-2 und dem assoziierten Protein CBF1.....	87
4.2.3	Weiterentwicklung der TAP-Reinigung zur Tandem Immunpräzipitation (TIP-Reinigung).....	90
4.2.3.1	Vergleich der IgG-Affinitätsreinigung mit einer Immunpräzipitation.....	90
4.2.3.2	Vergleich der Calmodulinaffinitätsreinigung mit einer Immunpräzipitation.....	91
4.2.3.3	Die TIP-Reinigung.....	92
4.2.4	Der GST pull down – eine weiteres Reinigungsprinzip.....	94
4.2.5	Massenspektrometrische Analyse und Identifikation potentieller EBNA-2- und CBF1-Interaktionspartner.....	95
4.2.5.1	Sensitivitätstest des vorhandenen MALDI-TOF/TOF-Gerätes.....	96
4.2.5.2	LC-MALDI-TOF/TOF.....	97
4.2.5.3	Potentielle Interaktionspartner von TAP-EBNA-2 und TAP-CBF1.....	98
4.2.5.3.1	TAP- und TIP-Reinigungen von TAP-EBNA-2 in der CBF1 positiven Zelllinie AH304-9.....	101
4.2.5.3.2	TAP- und TIP-Reinigungen von TAP-EBNA-2 in der CBF1 negativen Zelllinie AH305-9.....	105
4.2.5.3.3	GST pull down mit GST-EBNA-2-Fusionsproteinen.....	108
4.2.5.3.4	TAP- und TIP-Reinigungen von TAP-CBF1 in der CBF1 negativen Zelllinie AH276-1.....	111
4.2.6	Gruppierung der potentiellen Interaktionspartner nach verschiedenen Gesichtspunkten.....	114
4.2.6.1	Gemeinsame potentielle Interaktionspartner von EBNA-2 und CBF1.....	114
4.2.6.2	Potentielle CBF1 abhängige EBNA-2-Interaktionspartner.....	115
4.2.6.3	Potentielle CBF1 unabhängige EBNA-2-Interaktionspartner.....	116
4.2.6.4	Potentielle CBF1-Interaktionspartner.....	117
4.2.7	Bestätigung der Interaktion von TFE3 mit EBNA-2.....	118
4.2.7.1	TFE3 bindet nicht an den TAP-tag.....	119
4.2.7.2	Bestätigung der TFE3/EBNA-2-Interaktion in einer TAP negativen Zelllinie.....	120
5	DISKUSSION.....	122
5.1	Analyse des molekularen Mechanismus der Zielgenaktivierung durch EBNA-2.....	122
5.1.1	Die Aktivität der Gene SLAMF1, DNASE1L3 und CCL3 korreliert mit dem Modifikationsstatus des Chromatins.....	122
5.1.2	EBNA-2 bindet am Transkriptionsstart und rekrutiert die an Serin 5 phosphorylierte Polymerase II.....	124
5.1.2.1	Nachweis einer EBNA-2-Bindung am Transkriptionsstart.....	124
5.1.2.2	Das Modell der EBNA-2/CBF1-Interaktion.....	124
5.1.2.3	Die Rekrutierung der Polymerase II weist Unterschiede auf.....	125
5.1.2.4	Überprüfung der EBNA-2-Bindung am Transkriptionsstart - ein Ausblick.....	126
5.1.3	Regulation des CCL3-Promotors durch EBNA-2 und Notch.....	126
5.1.3.1	Die Bindung an die CBF1-Bindestelle allein, reicht nicht für eine Transaktivierung durch EBNA-2 bzw. Notch aus.....	126
5.1.3.2	Beeinflusst der Bereich des Transkriptionsstarts die EBNA-2 bzw. Notch vermittelte Transaktivierung?.....	127
5.1.3.3	Kartierung des für die EBNA-2 bzw. Notch vermittelte Transaktivierung wichtigen Bereichs.....	128
5.2	Identifikation von weiteren assoziierten Proteinen des EBNA-2/CBF1-Multiproteinkomplexes.....	128
5.2.1	Etablierung der TAP-Reinigung, sowie der modifizierten TAP-Reinigung (= TIP-Reinigung) in B-Zellen.....	129
5.2.2	Weiterentwicklung der TAP-Reinigung zur TIP-Reinigung.....	130

5.2.3 Identifizierung der Interaktionspartner mittels MALDI-TOF/TOF	131
5.2.3.1 Sensitivitätstest des verwendeten Massenspektrometers	131
5.2.3.2 Massenspektrometrische Identifizierung potentieller EBNA-2- und CBF1- Interaktionspartner	132
5.2.3.3 Potentielle neue EBNA-2-Interaktionspartner und ihre möglichen Funktionen in Kombination mit EBNA-2.....	134
5.2.4 TFE3 und seine mögliche Rolle als EBNA-2-Interaktionspartner	140
5.3 EBNA-2 vermittelte Transaktivierung von zellulären Zielgenen	142
6 ABKÜRZUNGEN	144
7 LITERATUR	146
DANKSAGUNG	155
EHRENWÖRTLICHE VERSICHERUNG	156
CURRICULUM VITAE	157

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1.1: Die Struktur des EBNA-2-Proteins..... 8

Abb. 1.2: Schematische Darstellung der EBNA-2-Interaktionspartner 10

Abb. 1.3: Schematische Darstellung der CBF1-Interaktionspartner 13

Abb. 1.4: Die wichtigsten Histonmodifikationen 17

Abb. 1.5: Prinzip der TAP-Reinigung 21

Abb. 1.6: Prinzip des MALDI-Prozesses 23

Abb. 3.1: Bezeichnung und Schema der Fragmentierung von Peptiden 54

Abb. 4.1: Prinzip der Chromatinimmunpräzipitation..... 59

Abb. 4.2: EBNA-2 bindet direkt an Genfragmente in SLAMF1, CCL3 und DNASE1L3 61

Abb. 4.3: Darstellung der Fragmentgrößen von BJAB-K3-Chromatinen und Nachweis der EBNA-2-Bindung an das CD23-Gen..... 63

Abb. 4.4: SLAMF1, ein vor EBNA-2-Induktion aktiviertes Gen 65

Abb. 4.5: Im DNASE1L3-Gen kann sowohl eine intronische EBNA-2-Bindung, als auch eine an eine potentielle CBF1-Bindestelle, die distal zum Transkriptionsstart lokalisiert ist, nachgewiesen werden 68

Abb. 4.6: Im CCL3-Gen kann eine schwache EBNA-2-Bindung an der sich im Promotor befindenden CBF1-Bindestelle bei -346 bp nachgewiesen werden..... 70

Abb. 4.7: Cis aktive Gensegmente im Bereich -100 bp tragen zur EBNA-2 bzw. Notch vermittelten Transaktivierung bei 73

Abb. 4.8: Die CBF1-Bindestelle bei -346 bp ist essentiell für die Transaktivierung des CCL3-Gens. 74

Abb. 4.10: TAP getaggttes CBF1 rekrutiert EBNA-2 und Notch 78

Abb. 4.11: TAP-EBNA-2 wird von CBF1 rekrutiert..... 79

Abb. 4.12: Überprüfung der Expression der TAP-Fusionsproteine nach stabiler Transfektion 80

Abb. 4.13: Expression der TAP-Fusionsproteine auf physiologischem Level..... 81

Abb. 4.14: Expression des TAP-tags in den stabilen Zelllinien AH276-1 und AH304-9 81

Abb. 4.15: Der Protein A-tag bindet nicht an endogenes IgM..... 83

Abb. 4.16: 1stündige Inkubation mit IgG-Beads ist nicht effektiv genug..... 84

Abb. 4.17: Die optimale Inkubationszeit zur Bindung von ProtA an IgG beträgt 16 Stunden 84

Abb. 4.18: Eine effiziente TEV-Proteasespaltung wird nach 3stündiger Inkubation erreicht..... 86

Abb. 4.19: Depletion von GAPDH als Beispiel für ein zelluläres Protein im 1. TAP-Reinigungsschritt 87

Abb. 4.20: Verlauf einer TAP-Reinigung von TAP-EBNA-2 in DG75..... 88

Abb. 4.21: Ausbeuten der TAP-Reinigung von TAP-EBNA-2 und dem EBNA-2 assoziierten Protein CBF1..... 89

Abb. 4.22: Die finalen Eluate von TAP-EBNA-2 und TAP-CBF1 weisen Co-gereinigte assoziierte Proteine auf..... 90

Abb. 4.23: Die Effizienz der ProtA/IgG-Bindung im Vergleich zur Immunpräzipitation ist nahezu identisch..... 91

Abb. 4.24: Die Immunpräzipitation ist im Vergleich zur Calmodulinaffinitätsreinigung effektiver 92

Abb. 4.25: Prinzip der TIP-Reinigung..... 93

Abb. 4.26: Ausbeute der TIP-Reinigung von TAP-EBNA-2 und CBF1 94

Abb. 4.27: BSA und CBF1 weisen unterschiedliche Nachweisgrenzen in einem Coomassie gefärbten Gel auf 96

Abb. 4.28: MS- und MS/MS-Spektrum von TFE3 100

Abb. 4.29: TFE3 bindet nicht an den TAP-tag, sondern spezifisch an EBNA-2 120

Abb. 4.30: Nachweis der TFE3/EBNA-2-Interaktion in der Zelllinie SM295 121

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 2.1 Zelllinien..... 25

Tabelle 2.2 Oligonukleotide für PCR 26

Tabelle 2.3 Oligonukleotide für RT-PCR 27

Tabelle 2.4 Plasmide 28

Tabelle 2.5 Antikörper für Immunpräzipitation..... 29

Tabelle 2.6 Antikörper für Western Blot 30

Tabelle 4.1 MALDI-TOF/TOF-Analyse verschiedener Proteinmengen von BSA und CBF1 97

Tabelle 4.2 LC-MALDI-TOF/TOF-Analyse verschiedener Proteinmengen von BSA und CBF1 98

Tabelle 4.3 Potentielle EBNA-2-Interaktionspartner in der CBF1 positiven Zelllinie AH304-9 102

Tabelle 4.4 Potentielle EBNA-2-Interaktionspartner in der CBF1 negativen Zelllinie AH305-9..... 106

Tabelle 4.5 Potentielle EBNA-2-Interaktionspartner, die and den Bereich von AS 246 bis AS 422 bzw. AS 487 binden..... 109

Tabelle 4.6 Potentielle CBF1-Interaktionspartner in der CBF1 negativen Zelllinie AH276-1..... 112

Tabelle 4.7 Potentielle gemeinsame Interaktionspartner von EBNA-2 und CBF1 115

Tabelle 4.8 Potentielle CBF1 abhängige EBNA-2-Interaktionspartner 116

Tabelle 4.9 Potentielle CBF1 unabhängige EBNA-2-Interaktionspartner 116

Tabelle 4.10 Potentielle CBF1-Interaktionspartner 118

Zusammenfassung

Das Epstein-Barr Virus nukleäre Antigen 2 (EBNA-2) ist ein Schlüsselprotein bei der Initiation und der Aufrechterhaltung der B-Zelltransformation nach einer EBV-Infektion. EBNA-2 reguliert die Genexpression von viralen und zellulären Genen und induziert so das physiologische Proliferationsprogramm der B-Zelle. Die DNA-Bindung erfolgt indirekt durch eine Interaktion mit zellulären Adapterproteinen, zu denen das CBF1 (C-promoter binding factor 1) Protein zählt. Mit dieser Arbeit sollte ein Beitrag zum Verständnis der bisher wenig untersuchten molekularen Mechanismen, über die EBNA-2 zelluläre Zielgene transaktiviert, geleistet werden.

Die drei zellulären EBNA-2-Zielgene SLAMF1, DNASE1L3 und CCL3 wurden in dieser Arbeit exemplarisch untersucht. Die EBNA-2-Transaktivierung der drei Gene ist CBF1 abhängig. In allen drei Genen konnte erstmals eine EBNA-2-Bindung am Transkriptionsstart nachgewiesen werden. Erstmals ist auch der Nachweis gelungen, dass EBNA-2 an intronständige CBF1-Bindestellen rekrutiert wird.

Eine EBNA-2-Aktivierung führte in allen untersuchten Genen zur Rekrutierung der an Serin 5 phosphorylierten Polymerase II an den Transkriptionsstart, sowie auch zu CBF1-Bindestellen in Regionen, die distal zum Transkriptionsstart lokalisiert sind. Die Aktivierung der Genexpression korreliert in allen Fällen mit einer erhöhten Acetylierung der Histone H3 und H4, die nicht auf den Bereich des Transkriptionsstarts beschränkt war.

Eine detaillierte Analyse des CCL3-Gens erwies, dass die DNA-Bindung von CBF1 durch EBNA-2 unterstützt wird. Des Weiteren zeigte sich, dass eine nahe dem Transkriptionsstart gelegene Region entscheidend zur EBNA-2 vermittelten Transaktivierung beiträgt und vermutlich nicht durch CBF1 vermittelt wird.

Möglicherweise reguliert EBNA-2 nicht nur über eine Bindung an CBF1 die Transaktivierung eines Genes, sondern noch über einen zweiten Mechanismus, bei dem EBNA-2 direkt oder indirekt an den Transkriptionsstart oder in dessen unmittelbarer Nähe bindet.

Zur Identifikation von Proteinen, die direkt an dem molekularen Mechanismus der EBNA-2-Transaktivierung beteiligt sind, wurde die „Tandem Affinity Purification“ (TAP-Reinigung) zur Aufreinigung nativer EBNA-2-Komplexe in B-Zellen etabliert. Durch eine anschließende massenspektrometrische Analyse konnten potentielle EBNA-2-Interaktionspartner identifiziert werden. Für das interessante Kandidatenprotein TFE3, ein Transkriptionsfaktor des Immunglobulinlokus, konnte bereits eine spezifische Anreicherung über EBNA-2 nachgewiesen werden.

1 Einleitung

1964 wurde von Epstein, Barr und Achong das erste menschliche DNA-Tumovirus, das heute als Epstein-Barr Virus bekannt ist, entdeckt.

Zu den humanen DNA-Tumoviren zählen die Papillomaviren, die vor allem die Bildung von Karzinomen in der Genitalschleimhaut, wie das Zervixkarzinom, oder aber auch maligne Tumoren der Haut auslösen. Das Kaposi-Sarkom-assoziierte Herpesvirus (KSHV), auch als humanes Herpesvirus 8 bezeichnet (HHV8), spielt bei der Entstehung des Kaposi-Sarkoms eine wichtige Rolle. Ein weiteres DNA-Tumovirus ist das Hepatitis-B-Virus (HBV), das primäre Leberkarzinome auslöst. Auch das Epstein-Barr Virus ist ein Vertreter der DNA-Tumoviren.

Das Epstein-Barr Virus (EBV) kann aufgrund seiner Fähigkeit B-Zellen zu transformieren, bei immungeschwächten Personen zur Bildung von B-Zell-Lymphomen führen. Zu immungeschwächten Personen zählen neben AIDS-Patienten auch Patienten, die nach einer Knochenmarks- oder Organtransplantation durch Medikamente immunsupprimiert sind.

Da aber EBV auch im Zusammenhang mit einer Vielzahl anderer Tumoren auftritt, ist die Erforschung dieses Virus sehr wichtig und von großem Interesse.

Eines der Schlüsselproteine bei der EBV-Transformation ist das EBV nukleäre Antigen 2 (EBNA-2). Diese Arbeit befasst sich mit diesem Protein und leistet einen Beitrag zum Verständnis einiger molekularer Mechanismen.

1.1 Das Epstein-Barr Virus

Das ubiquitär verbreitete Epstein-Barr Virus (EBV), auch humanes Herpesvirus 4 genannt, gehört zur Subfamilie der γ -Herpesviren. Es besitzt ein 172kb großes und als lineare doppelsträngige DNA vorliegendes Genom, das während der Infektion einer B-Zelle zirkularisiert und mit jeder Zellteilung durch die zelluläre Replikationsmaschinerie repliziert wird (Spear and Longnecker, 2003). EBV wird durch den Speichel übertragen und besitzt die Eigenschaft, ruhende humane B-Lymphozyten zu infizieren und durch die Expression von elf viralen Latenzgenen zu transformieren. Die EBV-Infektion von primären B-Lymphozyten bewirkt *in vitro* die Entstehung von unbegrenzt proliferierenden lymphoblastoiden Zelllinien, sogenannten LCLs. *In vivo* benützt das Virus das Latenz I Programm (siehe 1.1.1), um als Episom lebenslang in einem transkriptionellen ruhigen Status in ruhenden B-Gedächtniszellen, die im peripheren Blut zirkulieren, zu persistieren.

1.1.1 Lebenszyklus des Epstein-Barr Virus

Wie bereits erwähnt, wird EBV durch den Speichel von Mensch zu Mensch übertragen, infiziert dann humane B-Zellen und persistiert ein Leben lang in B-Gedächtniszellen mit einer Frequenz von $0,5-50 \times 10^6$ pro B-Zelle (Khan et al., 1996). Das Virus infiziert B-Zellen, indem es über das Glykoprotein gp350/220 an den sich auf reifen B-Zellen befindenden C3d-Komplementrezeptor CR2 (CD21) bindet und anschließend durch die rezeptorvermittelte Endozytose in die Zelle aufgenommen wird (Nemerow et al., 1985). Für die Virusinfektion ist außerdem noch die Interaktion von gp42, einem weiteren Glykoprotein, mit dem zellulären humanen Leukozyten Antigen (HLA-DR) als Korezeptor notwendig (Borza and Hutt-Fletcher, 2002). Die doppelsträngige DNA wandert in den Zellkern, wird zirkularisiert und amplifiziert. Zur Zeit gibt es zwei Theorien wie EBV in die B-Gedächtniszellen gelangt. Die Arbeitsgruppe von Thorley-Lawson ist der Meinung, dass EBV die Entwicklung, die die B-Zellen nach ihrer Aktivierung durchlaufen, verwendet, um in die B-Gedächtniszellen zu gelangen. So infiziert EBV *in vivo* naive B-Zellen, die dann das Keimzentrum durchlaufen und zu B-Gedächtniszellen werden (Babcock et al., 2000). Die zweite Theorie, aufgestellt von der Arbeitsgruppe Küppers, besagt, dass EBV nicht nur naive, sondern auch direkt B-Gedächtniszellen infizieren kann. Um in den neu infizierten B-Gedächtniszellen lebenslang persistieren zu können, schaltet EBV die meisten seiner viralen Gene einfach ab (Kurth et al., 2000).

Nachdem eine B-Zelle mit EBV infiziert wurde, kommt es zur Expression von neun viralen Latenzgenen und zwei kleinen nicht-polyadenylierten RNAs (EBER-1 und EBER-2). Zu den neun exprimierten Latenzgenen gehören die sechs Kernproteine (EBV nukleäres Antigen) EBNA-1, -2, -3A, -3B, -3C und -LP, sowie die drei integralen, latenten Membranproteine LMP1, LMP2A und LMP2B. Das Genexpressionsprogramm dieser Phase der EBV-Infektion wird als Latenz III, oder auch „growth program“ bezeichnet.

EBNA-2 und EBNA-LP sind die beiden ersten viralen Antigene, die bei der EBV-Infektion von primären B-Zellen exprimiert werden. Ihre Expression wird zuerst vom W-Promotor kontrolliert. Im Anschluss daran bewirkt EBNA-2 einen Promotorwechsel von Wp nach Cp, unter dessen Kontrolle die Expression von EBNA-1, -3A, -3B und -3C steht. Um bei der Immortalisierung das Zellwachstum und weitere Überleben der Zelle zu sichern, ist ein Zusammenspiel der viralen Kernproteine EBNA-2, -LP, -3A, -3C und -1 und des Membranproteins LMP-1 erforderlich. Die Schlüsselrolle bei der Immortalisierung spielt jedoch EBNA-2, das neben dem schon erwähnten Promotorwechsel von Wp nach Cp, auch für die Induktion der LMP-1- und LMP-2-Expression verantwortlich ist, sowie die Aktivität von weiteren für das Zellwachstum wichtigen Genen kontrolliert, wie zum Beispiel des zellulären Protoonkogens c-myc (Kaiser et al., 1999; Übersicht: Kieff and Rickinson, 2007).

In der sogenannten Latenz II („default program“), wandern EBV infizierte B-Zellen in Follikel und entwickeln sich zu B-Gedächtniszellen. In dieser Phase, bei der es sich vermutlich um eine Übergangsphase von der proliferierenden zur persistierenden Phase handelt, werden

nur noch die viralen Gene EBNA-1, LMP1 und LMP2A exprimiert (Übersicht: Thorley-Lawson, 2001).

Wenn EBV in ruhenden B-Gedächtniszellen persistiert, spricht man von Latenz I („latency program“). In dieser Phase kann das Virus der Immunantwort entgehen, da es nur noch das Protein EBNA-1 exprimiert. Aufgrund einer Blockade der proteasomalen Degradation, kann EBNA-1 nicht durch die MHC-Klasse-I-Moleküle auf der Zelloberfläche präsentiert werden (Levitskaya et al., 1997).

Der Mechanismus einer Reaktivierung ist zur Zeit noch unbekannt. Hierbei differenzieren sich die EBV infizierten ruhenden B-Gedächtniszellen zu Plasmazellen aus und es kommt zur Produktion und Ausschüttung neuer Viruspartikel. Diese Phase wird als lytische Phase bezeichnet (Übersicht: Koppers, 2003).

1.1.2 Die EBV-Latenzgene

Phasen, während derer es nicht zur Produktion und Ausschüttung von Viruspartikeln kommt, werden in der EBV-Biologie mit dem Begriff „Latenz“ bezeichnet. In diesen Phasen kommt es zur Expression sogenannter Latenzgene, die im Folgenden näher beschrieben werden:

EBNA-1 ist in den Zellen für die Replikation des Virusgenoms und die Aufteilung auf die Tochterzellen verantwortlich. Es ist das einzige virale Protein, das direkt an die DNA binden kann. Die Bindung erfolgt an den „Origin of Replication“ (oriP), der auch ein EBNA-1 abhängiger Enhancer ist und eine wichtige Rolle in der Transkriptionsregulation spielt (Übersicht: Bornkamm and Hammerschmidt, 2001).

EBNA-2 und EBNA-LP sind die ersten viralen Gene, die nach einer EBV-Infektion exprimiert werden. EBNA-2 interagiert über das zelluläre Adapterprotein CBF1 (C-promoter binding factor 1) mit der DNA und kann dadurch die Transkription viraler und zellulärer Gene regulieren. Da sich diese Arbeit näher mit EBNA-2 beschäftigt, wird dieses Protein in Kapitel 1.2 ausführlich besprochen.

EBNA-LP wird neben EBNA-2 als erstes virales Protein exprimiert und geht mit EBNA-2 eine Kooperation in Bezug auf die Transkriptionsregulation ein. Dies bewirkt auch eine Verstärkung des EBNA-2-Transaktivierungspotentials.

Die Proteine der EBNA-3-Familie binden das zelluläre Adapterproteine CBF1 und stellen möglicherweise Antagonisten von EBNA-2 dar. Zahlreiche zelluläre Prozesse, wie die Zellzyklusregulation, die Aktivierung und Repression der Transkription sind Aufgaben der EBNA-3-Proteine (Übersicht: Bornkamm and Hammerschmidt, 2001).

Die latenten, integralen Membranproteine LMP1, LMP2A und LMP2B besitzen eine anti-apoptotische Wirkung. Der CD40-Rezeptor, ein Schlüsselrezeptor in der Aktivierung und Differenzierung von B-Zellen, wird von LMP1 imitiert. LMP1 kann unabhängig von einer Interaktion mit einer T-Zelle wichtige Wachstums- und Überlebenssignale, beispielsweise durch NF- κ B-Aktivierung, an die Zelle weiterleiten. LMP2A ähnelt dem B-Zell-Rezeptor (BCR), der für das Überleben einer B-Zelle ohne Antigenkontakt notwendig ist. So imitiert

LMP2A die Funktion des BCR und sendet ein Überlebenssignal an die Zelle (Übersicht: Thorley-Lawson, 2001). Durch Aggregatbildung von LMP2B mit LMP2A wird die Funktion von LMP2A vermindert (Übersicht: Bornkamm and Hammerschmidt, 2001).

1.1.3 Infektiöse und fatale Mononukleose

1.1.3.1 Infektiöse Mononukleose

Mehr als 90% der Weltbevölkerung sind EBV positiv und tragen das Virus latent in sich. Eine Primärinfektion mit EBV verläuft im Kleinkindalter normalerweise symptomlos, bei Jugendlichen und Erwachsenen kommt es allerdings in 30–50% der Fälle zu einer Infektiösen Mononukleose (IM), auch Pfeiffersches Drüsenfieber genannt. Bei der IM handelt es sich um eine gutartig verlaufende Krankheit, bei der es unter anderem zu einer Expansion des Parakortex des lymphatischen Gewebes kommt. Die drastische Proliferation der infizierten B-Lymphozyten führt zu einer starken EBV-spezifischen zytotoxischen T-Zellantwort, die für die Symptome verantwortlich ist. Auf diese Weise steht die EBV-Infektion unter der Kontrolle des Immunsystems (immuno surveillance). Nach dem Abklingen der Krankheit verbleiben jedoch einige EBV-infizierte B-Gedächtniszellen im Wirt und können reaktiviert werden und Neuinfektionen auslösen (Übersicht: Crawford, 2001).

1.1.3.2 Fatale Mononukleose

Der fatalen Mononukleose, auch als X-gekoppeltes lymphoproliferatives Syndrom (XLS) bezeichnet, liegt ein erblich bedingter Defekt des SAP-Proteins (signalling lymphocyte activation (SLAM)-associated protein) zugrunde (Skare et al., 1987; Morra et al., 2001). Das T-Zell-Protein SAP interagiert mit dem auf B- und T-Zellen exprimierten SLAM-Protein und wirkt als negativer Regulator, indem es den durch SLAM induzierten Signaltransduktionsweg inhibiert. Personen mit diesem Gendefekt zeigen normalerweise keine Symptome. Werden diese Personen aber von EBV infiziert, kommt es aufgrund des nicht-funktionellen SAP-Proteins zu einer überreaktiven Immunantwort, die eine Zerstörung der Leber und des Knochenmarks zur Folge hat. Diejenigen Patienten, die solch eine Infektion überleben, weisen eine höhere Prädisposition zur Lymphomentstehung auf (Übersicht: Middeldorp et al., 2003).

1.1.4 EBV assoziierte Lymphome

Die für EBV charakteristische Eigenschaft Zellen zu transformieren, kann neben der Entwicklung von B-Zell-Lymphomen auch zu T-Zell-Lymphomen oder nasopharyngealen Karzinomen, die gehäuft im asiatischen Raum auftreten, führen (Übersicht: Middeldorp et al., 2003). Im Folgenden wird genauer auf die EBV assoziierten B-Zell-Lymphome eingegangen, die in zwei Gruppen eingeteilt werden können: Die erste Gruppe beschreibt Lymphome, wie das Burkitt-Lymphom (BL) oder das Hodgkin-Lymphom (HD), die bei immunkompetenten Personen auftreten und die zweite Gruppe Lymphome, die bei immunsupprimierten Personen auftreten, wie beispielsweise das Posttransplant-Lymphom (posttransplant lymphoproliferative disorder = PTLD).

Ungefähr 50% der Hodgkin-Lymphome und 96% der endemischen, sowie 20% der nicht-endemischen Burkitt-Lymphome treten in Assoziation mit EBV auf (Übersicht: Crawford, 2001).

Eine der häufigsten malignen Lymphomerkrankungen ist das Hodgkin-Lymphom (HD), das sich in den sekundären lymphatischen Organen, wie Milz oder Lymphknoten entwickelt und einkernige Hodgkin-Zellen (HD-Zellen) oder mehrkernige Hodgkin-Reed/Sternberg-Zellen (HRS-Zellen) aufweist. Eine Analyse von HD- und HRS-Zellen ergab, dass einige keinen funktionalen B-Zell-Rezeptor (BCR) besitzen (Kuppers et al., 1994). Während Zellen ohne BCR normalerweise in Apoptose getrieben werden, können HD- und HRS-Zellen überleben. Da in EBV positiven HD-Lymphomen die Latenz II Proteine EBNA-1, LMP1 und LMP2A („default program“) exprimiert werden, könnten für die Zellen wichtige Überlebenssignale von LMP1 und LMP2A kommen (Kuppers et al., 2003; Kuppers, 2002).

Charakteristisch für Burkitt-Lymphome, die in Zentralafrika die häufigste Neoplasie im Kindesalter darstellt, ist die Chromosomentranslokation des Protoonkogens c-myc in den Immunglobulin-Lokus, die in einer konstitutiven Aktivierung von c-myc resultiert (Manolov and Manolova, 1972). Die häufigste Translokation findet zwischen dem c-myc-Lokus auf Chromosom 8 und dem schwere-Ketten Immunglobulin-Lokus auf Chromosom 14 statt und wird als t(8;14) bezeichnet. In EBV positiven BLs wird EBNA-1, entsprechend der Latenz I („latency program“), als einziges virales Protein exprimiert (Rowe et al., 1986). Die Rolle von EBV, insbesondere von EBNA-1 bei der Tumorentstehung ist noch unklar.

Allgemein ist die Rolle von EBV in der Pathogenese bei immunkompetenten Patienten noch unklar. Möglicherweise spielen einige Proteine eine Rolle bei wachstumsfördernden Signalwegen, bei der Apoptoseinhibition, Angiogenese oder der Inhibition der lokalen Immunantwort (Übersicht: Middeldorp et al., 2003 und Rickinson and Kieff, 2007).

Wie bereits erwähnt, kann es bei immungeschwächten Personen zur Ausbildung von B-Zell-Lymphomen kommen, da das Immunsystem nach einer EBV-Infektion bzw. Reaktivierung die Proliferation EBV-transformierter B-Zellen nicht mehr kontrollieren kann. Zu immungeschwächten Personen zählen neben AIDS-Patienten auch Patienten, die in Folge einer Knochenmarks- oder Organtransplantation durch Medikamente immunsupprimiert sind.

Bei den Posttransplant-Lymphomen (PTLD) handelt es sich um eine schwerwiegende Komplikation in Folge einer Transplantation. Bei Organtransplantationen hat die EBV-Präsenz meistens beim Empfänger ihren Ursprung, bei Knochenmarkstransplantationen hingegen beim Spender (Haque and Crawford, 1998).

In diesen durch EBV-Infektion entstandenen hochmalignen B-Zelllymphomen kann das Genexpressionsprogramm der Latenz III, das alle EBV nukleären Antigene enthält, nachgewiesen werden und entspricht dem der *in vitro* etablierten LCLs. Im Gegensatz zu BL- und HD-Tumoren exprimieren PTLDs EBNA-2. Für diese Erkrankung gibt es derzeit nur zwei Behandlungsmöglichkeiten. So wird eine PTLD durch eine Verminderung der Immunsuppression in Kombination mit der Gabe des B-Zell-spezifischen Rituximab behandelt (Wagner et al., 2004). Rituximab ist ein monoklonaler Antikörper, der gegen den Pan-B-Zellmarker CD20 gerichtet ist und zur Reduktion der EBV positiven B-Zellen beiträgt. Eine weitere Behandlungsstrategie ist die adaptive Immuntherapie, bei der EBV-spezifische zytotoxische T-Zellen (CTL) *ex vivo* stimuliert und anschließend in den Patienten reinfundiert werden. Da zuerst eine T-Zelllinie *ex vivo* etabliert werden muss, kann mit der Therapie in vielen Fällen erst sehr spät begonnen werden. Ein weiterer Nachteil dieser Behandlungsstrategie sind die hohen Kosten und der große Arbeitsaufwand (Übersicht: Middeldorp et al., 2003).

Aufgrund der Schwere der Erkrankungen und dem Fehlen effizienter Behandlungsmöglichkeiten ist es von besonderem Interesse, eine effektive, schnelle und kostengünstige therapeutische Strategie zu entwickeln, die auf ein breites Spektrum der Krankheiten angewandt werden kann. Außerdem sollte die Therapie möglichst als Prävention entwickelt werden, da somit die Entstehung der einzelnen Erkrankungen durch eine EBV-Infektion verhindert werden kann.

Ein möglicher Angriffspunkt wäre hierfür das in dieser Arbeit näher untersuchte EBNA-2, da dieses Protein bei der Immortalisierung eine Schlüsselrolle spielt und in den Lymphomen der immunsupprimierten Patienten exprimiert wird. So würden die Signalwege von EBNA-2 bei immundefizienten Patienten unterbrochen und eine langfristige immunologische Behandlung ermöglicht werden.

1.2 Das Epstein-Barr Virus nukleäre Antigen 2 (EBNA-2)

Das Epstein-Barr Virus nukleäre Antigen 2 (EBNA-2) ist ein Schlüsselprotein bei der Immortalisierung und der Aufrechterhaltung der B-Zelltransformation nach einer EBV-Infektion. EBNA-2 und EBNA-LP sind die ersten nach einer EBV-Infektion exprimierten Proteine (Cohen et al., 1989; Hammerschmidt and Sugden, 1989; Kempkes et al., 1995b).

EBNA-2 reguliert die Genexpression von viralen und zellulären Genen und induziert so das physiologische Proliferationsprogramm der B-Zelle (Bornkamm and Hammerschmidt, 2001).

1.2.1 Die Primärstruktur von EBNA-2

EBNA-2 ist ein ca. 84kDa großes, aus 487 Aminosäuren bestehendes Protein, das verschiedene Regionen besitzt. Durch Komplementationsexperimente mit verschiedenen deletierten und mutierten EBNA-2-Proteinen mit dem 1967 beschriebenen EBNA-2 defizienten Virus-Stamm P3HR1, konnten die für die Transformation essentiellen EBNA-2-Domänen identifiziert werden. Hierbei handelt es sich um folgende drei Regionen:

- eine saure Transaktivierungsdomäne (TAD) nahe dem Carboxyterminus (AS 420-464),
- eine Region, die für die Interaktion mit zellulären DNA-Adapterproteinen (Adapter), beispielsweise CBF1, wichtig ist (AS 280-337) und
- eine negativ geladene Region (DIM) am Aminoterminus (AS 1-57), die eine Rolle bei der Dimerisierung spielt.

Des Weiteren besitzt EBNA-2 neben einem Prolin-reichen Bereich (Pro), einem Arginin- und Glycin-reichen Bereich (Arg-Gly), einem C-terminal gelegenen Kernlokalisationsignal (NLS) auch die sogenannte Diversity-Region (DIV), in der die Sequenz von EBNA-2-Proteinen zwischen den beiden Virusstämmen (EBV Typ A und B) wenig konserviert ist (Abb. 1.1A).

Durch Homologievergleich der Primärstruktur der EBNA-2-Proteine der beiden Virusstämmen (EBV Typ A und B) mit EBNA-2 verwandten Proteinen der Lymphokryptoviren aus Rhesusaffen und Pavian, konnten neun konservierte Regionen (CR) definiert werden (Abb. 1.1B) (Kieff and Rickinson, 2007).

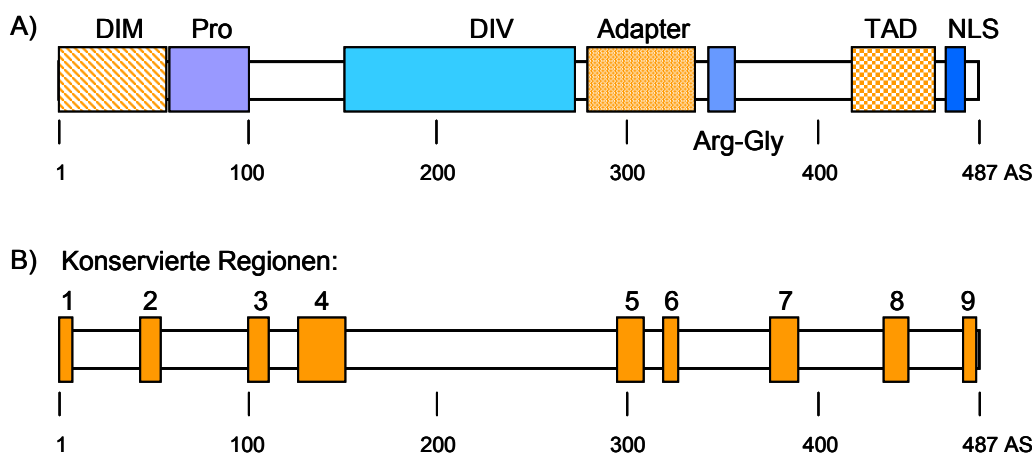


Abb. 1.1: Die Struktur des EBNA-2-Proteins

(A) Das EBNA-2-Protein besitzt eine negativ geladene Region (DIM) am Aminoterminus (AS 1-57), die eine Rolle bei der Dimerisierung spielt, eine Region, die für die Interaktion mit zellulären DNA-Adapterproteinen (Adapter), beispielsweise CBF1, wichtig ist (AS 280-337) und eine saure Transaktivierungsdomäne (TAD) nahe dem Carboxyterminus (AS 420-464). Des Weiteren besitzt EBNA-2 neben einem Prolin-reichen Bereich (Pro), einem Arginin-Glycin-reichen Bereich (Arg-Gly), einem C-terminal gelegenen Kernlokalisationsignal (NLS), auch die sogenannte Diversity-Region (DIV), in der die Sequenz von EBNA-2-Proteinen zwischen den beiden Virusstämmen (EBV Typ A und B) wenig konserviert ist. (B) In schematischer Form sind die neun konservierten Regionen (CR) von EBNA-2 dargestellt.

1.2.2 EBNA-2 assoziierte Proteine

EBNA-2 ist ein multifunktionelles Onkogen, das mit einer Vielzahl von Proteinen interagieren kann. Zu diesen direkten und indirekten Interaktionspartnern zählen Proteine mit den unterschiedlichsten Funktionen, wie beispielsweise der Vermittlung einer DNA-Bindung. Des Weiteren sind sie in den RNA-Metabolismus involviert, in der Apoptose oder der Transkriptionsmaschinerie. Die Interaktionspartner wurden hauptsächlich über GST pull downs, Yeast Two-Hybrid Experimente und Immunpräzipitationen identifiziert.

1.2.2.1 EBNA-2 assoziierte Proteine, die eine DNA-Bindung vermitteln

Da EBNA-2 keine DNA-Bindedomäne besitzt, kann es nicht direkt an die DNA binden (Zimmer-Strobl et al., 1991; Ling et al., 1993; Grossman et al., 1994), sondern benötigt ein zelluläres DNA-Bindeprotein, das als Adapter wirkt. Dadurch wird es EBNA-2 ermöglicht, als Transkriptionsfaktor zu agieren. Die Gruppe der DNA-Bindeproteine beinhaltet neben CBF1, PU.1 und c-Jun/ATF auch Nur77.

Das bisher am besten untersuchte zelluläre Adapterprotein, ist das zelluläre Bindeprotein CBF1 (C-promoter binding factor 1), auch als RBP-J bezeichnet. Das Adapterprotein CBF1 wird in Kapitel 1.2.2.4 ausführlicher besprochen. Die Interaktion zwischen EBNA-2 und CBF1 wird über die CR6-Region vermittelt (Ling and Hayward, 1995). Für die Aktivierung des viralen LMP2A-Gens und der Immortalisierung der B-Zellen ist diese Interaktion essentiell. Untersuchungen mit einem mutierten EBNA-2, das nicht mehr an CBF1 binden konnte, zeigten, dass eine B-Zellimmortalisierung nicht mehr stattfand (Übersicht: Kieff and Rickinson, 2007). Die CBF1/EBNA-2-Interaktion wird durch das Protein SKIP (Ski binding protein) über die CR5-Region weiter unterstützt (Zhou et al., 2000).

Das multifunktionelle Protein SKIP, das auch ein Bestandteil des Spleißosoms ist, kann entweder als Koaktivator, oder als Korepressor bei einer Transkription agieren (Übersicht: Folk et al., 2004). SKIP bindet CBF1 und wirkt als Koaktivator, indem es, wie bereits erwähnt, mit EBNA-2 interagiert. Es ist aber auch Bestandteil des von CBF1 rekrutierten Korepressorkomplex, der die Proteine SMRT, CIR, Sin3A und HDAC2 umfasst (Zhou et al., 2000).

Um ein weiteres Ankerprotein könnte es sich bei dem Transkriptionsfaktor PU.1, einem Mitglied der ets-Familie, handeln, der in B-Zellen und Makrophagen exprimiert wird (Laux et al., 1994a). Eine Wechselwirkung von PU.1 und EBNA-2 konnte in der Arbeitsgruppe Pagano beschrieben werden (Yue et al., 2004). Die Interaktion wird möglicherweise direkt oder indirekt über die CR5/6-Region vermittelt (Johannsen et al., 1995). Ob EBNA-2 und PU.1 tatsächlich miteinander interagieren ist umstritten. Bei der EBNA-2 vermittelten Transaktivierung des LMP1-Promotors konnte gezeigt werden, dass neben der CBF1-Bindestelle, auch die PU.1-Bindestelle wichtig ist (Johannsen et al., 1995; Laux et al., 1994b; Sjoblom et al., 1995a).

Die Bindung von EBNA-2 an das c-Jun/ATF-Heterodimer, das an die ATF/CRE-Bindestelle bindet, scheint den Effekt von EBNA-2 zu unterstützen, wurde aber nicht weiter untersucht (Johannsen et al., 1995; Laux et al., 1994a; Laux et al., 1994b; Sjoblom et al., 1998).

Eine EBNA-2 vermittelte Transaktivierung in Reporter-Promotor-Studien konnte bis zum jetzigen Zeitpunkt nur durch Interaktion mit dem Adapterprotein CBF1 nachgewiesen werden. Für die anderen Proteine wie PU.1 und c-Jun/ATF ist meines Wissens nach kein ähnliches Experiment veröffentlicht worden.

Darüber hinaus interagiert EBNA-2 in der CR4-Region indirekt mit Nur77 (Lee et al., 2002). Ursprünglich wurde Nur77 als Transkriptionsfaktor beschrieben (Philips et al., 1997). Spätere Arbeiten zeigten jedoch, dass Nur77 sowohl pro-apoptotische, als auch anti-apoptotische Funktionen ausüben kann (Li et al., 2000; Suzuki et al., 2003). Die Arbeitsgruppe von D. Hayward publizierte im Jahr 2002, dass die Interaktion von Nur77 und EBNA-2 die pro-apoptotische Aktivität von Nur77 aufhebt (Lee et al., 2002). Allerdings wurde diese Interaktion nur in Zellextrakten und nicht mit gereinigten Komponenten dargestellt. Möglicherweise wird die Interaktion von weiteren noch nicht charakterisierten Proteinen der Zelle vermittelt.

Die Arbeitsgruppe Kempkes zeigte, dass rekombinante Epstein-Barr Viren, die eine EBNA-2-CR4-Deletion tragen, primäre B-Zellen mit einer signifikant niedrigeren Frequenz als Wildtyp EBV immortalisieren. Die auswachsenden Klone weisen im Vergleich zu Wildtyp EBV eine deutlich geringere Proliferationsrate auf (Grabusic et al., 2006). Aufgrund dieser Ergebnisse zeigt sich, dass die CR4-Region eine wichtige Funktion im Immortalisierungsprozess besitzt. Ein Ziel dieser Arbeit ist die Identifizierung neuer EBNA-2-Interaktionspartner, die möglicherweise einen Beitrag zum Verständnis der EBV-Biologie leisten können.

Die einzelnen Interaktionspartner und ihre Bindung an die verschiedenen EBNA-2 konservierten Regionen (CR) sind in Abbildung 1.2 schematisch dargestellt.

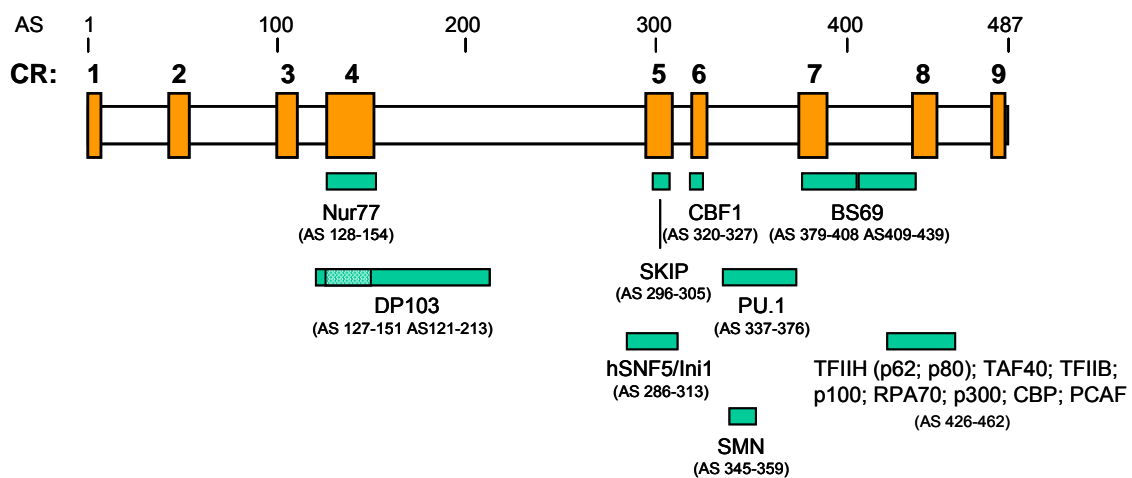


Abb. 1.2: Schematische Darstellung der EBNA-2-Interaktionspartner

Dargestellt ist die Primärstruktur von EBNA-2 mit den neun konservierten Regionen (CR) als gelbe Boxen und den assoziierten Proteinen in grünen Boxen mit der Angabe der für die Bindung essentiellen Aminosäuren (genauere Erklärung siehe Text).

1.2.2.2 EBNA-2 assoziierte Proteine der Transkriptionsmaschinerie

Bei der CR8-Region von EBNA-2 handelt es sich um eine Transaktivierungsdomäne, über die verschiedene Faktoren der basalen Transkriptionsmaschinerie und transkriptionelle Koaktivatoren rekrutiert werden. So interagiert EBNA-2 mit den beiden Untereinheiten p62 und p80 des basalen Transkriptionsfaktors TFIID, mit TAF40 und TFIIB. Die Transkription wird durch die Interaktion der sauren Domäne von EBNA-2 mit TFIIB und TAF40, das neben seiner Rolle als Transkriptionsfaktor auch eine Histon-Acetyltransferase- (HAT-) Aktivität besitzt, stimuliert (Tong et al., 1995a; Tong et al., 1995c). Des Weiteren erfolgt eine positive Beeinflussung der Transkription durch die Rekrutierung von p100, das mit den beiden Untereinheiten p56 und p34 von TFIIE interagiert (Tong et al., 1995b). Eine Interaktion zwischen EBNA-2 und dem Einzelstrang bindenden DNA-Protein RPA70 konnte ebenfalls beschrieben werden (Tong et al., 1995c). Die Arbeitsgruppe Kieff konnte die EBNA-2-Rekrutierung der Histonacetyltransferasen p300, CBP und PCAF beschreiben (Wang et al., 2000).

Neben der Rekrutierung von HATs und Transkriptionsfaktoren interagiert EBNA-2 auch mit hSNF5/Ini1, einer Komponente des SWI/SNF-Chromatin-Remodelling-Komplexes (Wu et al., 1996). Die Interaktion zwischen EBNA-2 und hSNF5/Ini1 erfolgt im Bereich der Diversity Region, wobei bis zum jetzigen Zeitpunkt die exakte Bindestelle noch nicht bestimmt werden konnte. Es scheint aber, dass die beiden konservierten Bereiche in der Diversity Region um die Aminosäuren 286 (286IPP) und 313 (DQQ313) für die Bindung wichtig sind. Des Weiteren ist die Phosphorylierung von Aminosäure 469 für die Bindung essentiell (Kwiatkowski et al., 2004). Die Interaktion von hSNF5/Ini1 mit GADD34 und PP-1 bewirkt einen Wachstumsarrest, der durch die EBNA-2/hSNF5/Ini1-Interaktion teilweise aufgehoben werden kann (Wu et al., 2002) (vgl. Abb. 1.2).

1.2.2.3 Weitere EBNA-2 assoziierte Proteine

Da EBNA-2 mit den Proteinen DP103 und SMN interagiert, könnte es auch eine Rolle im RNA-Metabolismus spielen. Das Protein DP103, eine RNA-Helikase, gehört zur Familie der DEAD-Box-Proteine und bindet EBNA-2 sowohl in der CR4-Region, als auch in dem angrenzenden Bereich (AS121-213) (Grundhoff et al., 1999). SMN (survial motor neuron), das auch an DP103 bindet, spielt eine Rolle bei der RNA-Prozessierung und wird über die methylierten Arginine des Arginin-Glycin-reichen Bereichs von EBNA-2 an dieses rekrutiert (Barth et al., 2003). Es wird vermutet, dass EBNA-2 durch die Interaktion mit DP103 mit Spleißosom-Komplexen Kontakt aufnehmen kann. Während der Bindung von EBNA-2 an DP103 kann SMN den Komplex verlassen und entfaltet eine Koaktivator Funktion im RNA-Pol II-Komplex auf dem LMP1-Promotor (Voss et al., 2001).

BS69, ein Korepressor, bindet über das PXLXP-Motif nicht nur an E1A, sondern auch an den C-Terminus (CR7 und CR8) von EBNA-2. BS69 spielt eine Rolle bei der Zellzykluskontrolle

und besitzt eine Inhibitorfunktion. Es wird vermutet, dass diese Inhibitorfunktion durch die Interaktion von BS69 mit EBNA-2 neutralisiert wird (Ansieau and Leutz, 2002) (vgl. Abb.1.2).

1.2.2.4 CBF1 - das EBNA-2-Adapterprotein

CBF1 (C-promoter binding factor 1), das auch als RBP-J bezeichnet wird, ist ein ubiquitär exprimiertes Gen und gehört zur Familie der CSL-Proteine. Diese Familie setzt sich aus CBF1, Su(H) in *Drosophila melanogaster*, Lag1 in *Caenorhabditis elegans* und „Recombination Signal Binding Protein-J“ (RBP-J) in der Maus zusammen. CBF1 spielt eine zentrale Rolle bei der Vermittlung von zellulären und viralen Signalen und bindet an die DNA-Sequenz 5'-GTGGGAA-3' (Tun et al., 1994). Im Jahre 2004 konnten Kovall und Hendrickson die Kristallstruktur von CBF1 lösen und zeigten, dass CBF1 aus den drei Strukturdomänen NTD, CTD und BTD aufgebaut ist. Die CTD Domäne beinhaltet den C- und N-Terminus von CBF1, die in der tertiären Struktur nebeneinander liegen. Erstaunlicherweise konnte keine abgegrenzte DNA-Bindedomäne charakterisiert werden. Die DNA-Bindung erfolgt über einzelne Aminosäuren, die über die Domänen NTD und BTD verteilt sind. Bei der CBF1/DNA-Interaktion steht nicht jedes Nukleotid in direktem Kontakt mit einer Aminosäure, sondern es kommt auch zu Kontakten zwischen Aminosäuren und dem Ribose-Phosphat-Rückgrat der DNA, die vermutlich der korrekten Positionierung der Aminosäuren mit den Nukleotiden dienen (Kovall and Hendrickson, 2004).

CBF1 kann als Repressor agieren, indem es die Korepressorkomplexe SMRT/NcoR/HDAC1 und CIR/HDAC2/SAP30 an die Promotoren rekrutiert. Die Repression wird hierbei durch die Rekrutierung der Histondeacetylasen (HDAC) bewirkt (Kao et al., 1998; Hsieh et al., 1999; Mumm and Kopan, 2000). Die Bindung des Korepressorkomplexes an CBF1 wird über die AS 120-200 vermittelt (Übersicht: Hayward, 2004).

Als negativer Regulator von CBF1 wurde KyoT2 identifiziert, der mit der CBF1/DNA-Bindung interferiert (Taniguchi et al., 1998). Der CBF1-Interaktionspartner SHARP spielt eine Rolle bei der Zusammenführung von CBF1 und dem HDAC-Korepressorkomplex (Oswald et al., 2002). Ein weiterer Interaktionspartner von CBF1 ist MINT, ein negativer Regulator der Notch-Signalweiterleitung, da es mit Notch um die CBF1-Bindung kompetitiert (Kuroda et al., 2003).

Durch die EBNA-2-Interaktion mit CBF1 wird der Korepressorkomplex verdrängt und CBF1 wirkt als Adapterprotein und ermöglicht EBNA-2 den indirekten DNA-Kontakt (Hsieh and Hayward, 1995).

Auch Notch, ein Transmembranrezeptor, dessen intrazelluläre Domäne bei Ligandbindung abgespalten wird, kann nicht direkt an die DNA binden und benützt CBF1 als Adapterprotein. Die Notch/CBF1-Interaktion bewirkt ebenfalls eine Verdrängung des Korepressorkomplexes und ermöglicht Notch, seine Funktion als Transkriptionsfaktor auszuführen (Übersicht: (Mumm and Kopan, 2000). In diesem Zusammenhang ist auch der indirekte CBF1-

Interaktionspartner MAML (Mastermind-like) zu nennen, der als Koaktivator fungiert und den DNA-Bindekomplex von Notch und CBF1 stabilisiert (Wu et al., 2000).

Aufgrund dieser Ergebnisse basiert das Modell, dass CBF1 an die DNA bindet und den Korepressorkomplex rekrutiert. In Anwesenheit von EBNA-2 bzw. Notch wird der Korepressorkomplex verdrängt und EBNA-2 bzw. Notch binden an CBF1 und rekrutieren den Koaktivatorkomplex. Die Arbeitsgruppe Tolnay beobachtete jedoch in Chromatinimmunpräzipitationen, dass die DNA-Bindung von CBF1 erst mit Anwesenheit von EBNA-2 erfolgte (Mohan et al., 2006). Ein Ziel dieser Arbeit ist es zu klären, ob das von der Arbeitsgruppe Tolnay beschriebene Phänomen auch in anderen EBNA-2-Zielgenen beobachtet werden kann und somit das oben beschriebene Modell in Frage stellt.

Die Bindung von Notch und EBNA-2 an CBF1 erfolgt über die AS 179-361 bzw. AS196-372 (Fuchs et al., 2001; Hsieh and Hayward, 1995; Sakai et al., 1998) und überlappt somit mit der Binderegion des Korepressorkomplexes (AS 120-200), was die Verdrängung des Korepressorkomplexes erklärt (Abb. 1.3).

Der Interaktionspartner SKIP scheint verschiedene Komplexe in Zusammenhang mit einer CBF1-Bindung zu stabilisieren. So interagiert SKIP sowohl mit CBF1 und dem Korepressorkomplex, als auch mit CBF1 und den Aktivatoren EBNA-2 bzw. Notch (Zhou et al., 2000).

Des Weiteren konnte eine Interaktion zwischen CBF1 und den Proteinen der EBNA-3-Familie gezeigt werden. Über die AS 159-331 wird die Bindung von EBNA-3B und über die AS 144-181 die Bindung von EBNA-3C an CBF1 vermittelt (Krauer et al., 1996; Young et al., 1997; Zhao et al., 1996). Die Bindung von EBNA-3A findet im Bereich von AS159-487 an CBF1 statt (Krauer et al., 1996). Da sich die Binderegionen von EBNA-2 und den Proteinen der EBNA-3-Familie überlappen, muss man annehmen, dass es teilweise zu einer Konkurrenz im Bezug auf die CBF1-Bindung kommt (Abb. 1.3).

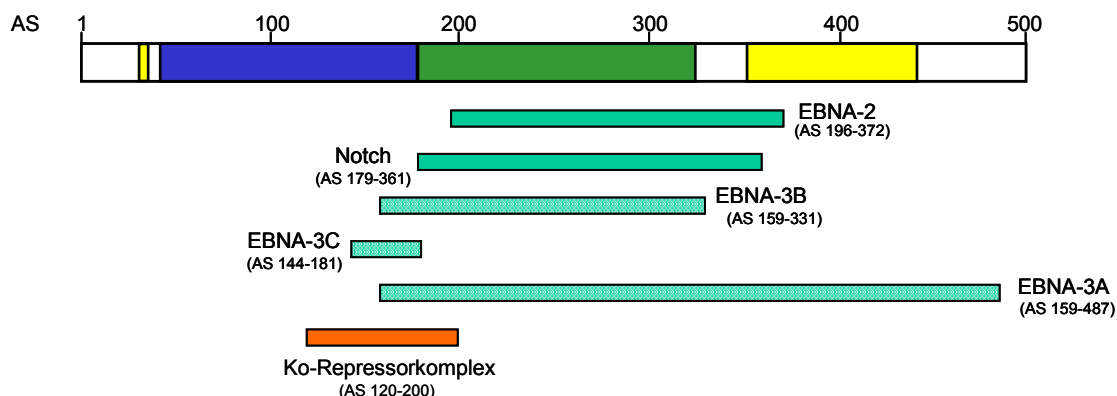


Abb. 1.3: Schematische Darstellung der CBF1-Interaktionspartner

In schematischer Form ist die Primärstruktur von CBF1 mit den assoziierten Proteinen unter Angabe ihrer jeweiligen Binderegion dargestellt. Als rote Box ist der Bindebereich des Korepressorkomplexes, bestehend aus SKIP, CIR, SMRT, Sin3A, HDAC1/2, SAP30 und NcoR dargestellt und als grüne Boxen die anderen Interaktionspartner. Die drei Strukturdomänen NTD (in blau), BTD (in grün) und CTD (in gelb) von CBF1 sind schematisch eingezeichnet.

1.2.3 EBNA-2-Zielgene

1.2.3.1 Virale Zielgene

Neben der Transkription der EBNA-Gene, die durch EBNA-2 über den C-Promotor reguliert werden, transaktiviert EBNA-2 auch die Promotoren der drei für die latenten Membranproteine LMP1, LMP2A und LMP2B kodierenden Gene (Abbot et al., 1990; Fahraeus et al., 1990; Ghosh and Kieff, 1990; Jin and Speck, 1992; Sung et al., 1991; Wang et al., 1990). In allen viralen Promotoren konnten EBNA-2 responsive Elemente gefunden werden, die funktionelle CBF1-Bindestellen enthalten. An einer Transaktivierung durch EBNA-2 sind neben CBF1 noch weitere Transkriptionsfaktoren beteiligt. In erst kürzlich durchgeführten Experimenten konnte gezeigt werden, dass für eine Transaktivierung durch EBNA-2 nicht nur die CBF1-Bindestelle nötig ist, sondern auch bestimmte Basen in der Umgebung der CBF1-Bindestelle, wie beispielsweise ein PolyG-Bereich im LMP1-Promotor oder ein einzelnes G im LMP2A-Promotor (nicht veröffentlichte Daten der Arbeitsgruppe Kempkes).

1.2.3.2 Zelluläre Zielgene

EBV induziert aber nicht nur virale Gene, sondern auch zelluläre Gene. Hierbei unterscheidet man zwischen primären oder sekundären Zielgenen. Bei primären Zielgenen handelt es sich um Gene, deren Transkription direkt durch EBNA-2 beeinflusst wird und nicht durch die Produkte anderer EBNA-2-Zielgene angeschaltet werden; ist dies der Fall, spricht man von sekundären Zielgenen.

Zu den primären Zielgenen gehören neben CD23 und CD21, der Chemokinrezeptor CCR7, das Proto-Onkogen c-myc, AML-2, BATF und HES-1, das für ein Helix-loop-Helix-Protein kodiert (Wang et al., 1987; Burgstahler et al., 1995; Calender et al., 1990; Cordier et al., 1990; Johansen et al., 2003; Kaiser et al., 1999; Sakai et al., 1998; Spender et al., 2002).

Sowohl CD23, ein Fc-epsilon-Rezeptor II mit einer schwachen Affinität, als auch CD21, der Komplementrezeptor 2, ein Teil des B-Zell-Rezeptorkomplexes und Ligand für CD23 gehören zu den B-Zell-Aktivierungsmarkern. Bei CCR7 handelt es sich um einen G-gekoppelten Rezeptor, der eine Rolle bei dem sogenannten „homing“ von B- und T-Zellen zu den sekundären lymphatischen Organen spielt.

BATF, ein Mitglied der AP-1/ATF-Transkriptionsfaktor-Superfamilie, steuert möglicherweise die virale Latenzphase, da es die Expression von BZLF1, das den Eintritt in die lytische Phase erlaubt, reprimiert.

Auch das Zielgen AML-2 gehört zu einer Transkriptionsfaktor-Familie („Runt family“) und ist möglicherweise in die Steuerung des Genexpressionsprogramms von LCLs involviert (Übersicht: Kempkes, 2005).

Ein weiteres Zielgen von EBNA-2 ist die schwere Immunglobulinkette IgM. Allerdings bewirkt EBNA-2 hier keine Transaktivierung des Gens, sondern reprimiert dieses. Aufgrund der

Translokation von c-myc in den Immunglobulin-Lokus in einem Burkitt-Lymphom reprimiert EBNA-2 nicht nur die IgM-Expression, sondern auch die c-myc-Expression. Der Mechanismus dieser Repression durch EBNA-2 ist bis zum jetzigen Zeitpunkt nicht geklärt, scheint aber teilweise nicht CBF1 abhängig zu sein (Jochner et al., 1996; Kempkes et al., 1996; Maier et al., 2005).

Auch das Gen der Aktivierungs-induzierten Cytidin-Deaminase (AID) wird durch EBNA-2 reprimiert. AID stellt einen Schlüsselfaktor bei der Somatischen Hypermutation dar (Tobollik et al., 2006). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass es durch EBNA-2 auch zur Repression des BCL6-Gens kommt. Das Gen BCL6 kodiert für ein Keimzentrum assoziiertes Protein (Boccellato et al., 2006).

Welcher molekulare Mechanismus der Repression von Zielgenen durch EBNA-2 zugrunde liegt, ist, wie bereits erwähnt, noch unklar.

Die Arbeitsgruppe Tolnay konnte das Fc-Rezeptor Homolog 5 (FcRH5) als neues, direktes Zielgen von EBNA-2 identifizieren (Mohan et al., 2006).

Erst kürzlich konnten weitere zelluläre EBNA-2-Zielgene beschrieben werden (Maier et al., 2006). Hierbei handelt es sich um CDK5R1, ein Aktivator einer Cyclin-abhängigen Kinase, um FGR, eine zytoplasmatische Tyrosin-Kinase und RHOH, ein Protein mit inhibierender Wirkung auf NFκB und p38. Des Weiteren konnten drei Gene identifiziert werden, deren Proteine eine Rolle in der B-Zell-Aktivierung spielen. Hierbei handelt es sich um SAMS1, ein Adapterprotein mit möglichen Aufgaben in Signalwegen der B-Zell-Aktivierung und den Chemokinen CCL3 und CCL4, die nach Antigenkontakt von B-Zellen sekretiert werden. DNASE1L3 ist in die DNA-Fragmentierung in apoptotischen Zellen involviert und ABHD6 spielt eine Rolle im aromatischen Stoffwechsel. Während MFN1 eine Rolle bei der Fusion von Mitochondrien spielt, kodiert SLAMF1 für einen Rezeptor, der homophile Interaktionen eingeht und RAPGEF2 für den Guaninnukleotid-Austauschfaktor für zwei Ras-verwandte GTPasen (Maier et al., 2006).

1.2.3.3 Mechanismus der Transaktivierung durch EBNA-2

Im Gegensatz zu den viralen Zielgenen ist der Mechanismus der Transaktivierung durch EBNA-2 bei zellulären Zielgenen zum jetzigen Zeitpunkt wenig untersucht und verstanden.

Einzig im Promotor des CD23-Gens konnte ein EBNA-2 responsives Element identifiziert und die Bindung von CBF1 an dieses Element bestätigt werden (Ling et al., 1994; Wang et al., 1991). Bei den übrigen Zielgenen konnten bisher keine CBF1-Bindestellen in den Promotoren beschrieben werden. Es wurde vermutet, dass eine Transaktivierung durch EBNA-2 auch über intronische CBF1-Bindestellen möglich ist. Im ersten Intron von CD21 und c-myc konnte jeweils eine CBF1-Bindestelle identifiziert werden (Übersicht: Kieff and Rickinson, 2007; Makar et al., 1998). Die Bindung von CBF1 an diese Stellen konnte jeweils bestätigt werden (Makar et al., 2001; Diplomarbeit: Popp, 2002). Ob EBNA-2 über intronische CBF1-Bindestellen indirekt mit der DNA in Kontakt treten kann und wie daraufhin

eine Transaktivierung des Zielgens stattfindet, ist ungeklärt. Eine Möglichkeit wäre, dass das intronisch gebundene EBNA-2 eine Art Enhancer darstellt, mit dem Promotor in Kontakt tritt und dadurch die Transaktivierung des Zielgens bewirkt.

Obwohl die Interaktion von EBNA-2 mit seinem Adapterprotein CBF1 gut untersucht ist, war nicht bekannt, ob die Transaktivierung der Zielgene durch EBNA-2 CBF1 abhängig ist. Mit Hilfe einer somatischen CBF1 knock out Zelllinie (Maier et al., 2005) konnte erst kürzlich gezeigt werden, dass neun der zehn neu identifizierten EBNA-2-Zielgene (CCL3, DNASE1L3, ABHD6, SAMSN1, SLAMF1, CDK5R1, CCL4, RHOH und MFN1) CBF1 abhängig sind. Lediglich RAPGEF2 wies eine teilweise CBF1 unabhängige Induktion auf (Maier et al., 2006).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass möglicherweise alle zellulären Zielgene CBF1 abhängig sind. Das virale Zielgen LMP1 dagegen kann auch ohne CBF1 durch EBNA-2 transaktiviert werden. EBNA-2-Proteine, deren CBF1-Binderegion deletiert wurde bzw. die beiden für die CBF1-Bindung wichtigen Tryptophane mutiert wurden, bewirkten weiterhin die Transaktivierung von LMP1 (Sjoblom et al., 1995b; Yalamanchili et al., 1994).

1.2.4 Notch - das zelluläre Äquivalent von EBNA-2

Notch ist ein Transmembranrezeptor, der nach Aktivierung durch einen Liganden, zu denen Mitglieder der Delta- oder Jagged-Familie gehören, proteolytisch gespalten wird. Das dabei entstandene zytoplasmatische Fragment (Notch-IC) ist ein Transkriptionsfaktor, dem die DNA-Bindedomäne fehlt und daher nicht direkt mit der DNA in Kontakt treten kann. Die indirekte DNA-Bindung wird durch eine Interaktion mit dem Adapterprotein CBF1 vermittelt (Übersicht: Mumm and Kopan, 2000 und Kempkes, 2005).

Notch und EBNA-2 besitzen ähnliche funktionelle und biochemische Eigenschaften. In ihren Sequenzen lassen sich mit Ausnahme der zwei konservierten Aminosäuren ($\Phi W \Phi P$) in den CBF1 interagierenden Domänen Ram (Notch-IC) und CR6 (EBNA-2) keine Homologien feststellen. Bei beiden Proteinen handelt es sich um Transkriptionsfaktoren, denen eine DNA-Bindedomäne fehlt und die somit nicht direkt an die DNA binden können. Sowohl EBNA-2, als auch Notch interagieren mit dem Adapterprotein CBF1, um mit der DNA in Kontakt zu treten und die Transaktivierung ihrer Zielgene zu bewirken.

Die Tatsache, dass sich Notch und EBNA-2 teilweise gegenseitig ersetzen können, bestätigt, dass es sich bei Notch um das zelluläre Äquivalent von EBNA-2 handelt. Unabhängig voneinander postulierten zwei Gruppen, dass sowohl EBNA-2, als auch Notch die Transaktivierung des Zielgens CD21 bewirkten (Strobl et al., 2000; Gordadze et al., 2001). Des Weiteren konnten die Transaktivierung von LMP2A und die Repression der schweren Immunglobulinkette beschrieben werden (Strobl et al., 2000). Es war jedoch nicht möglich, EBNA-2 bei der B-Zell-Transformation durch Notch zu ersetzen. Möglicherweise liegt der Grund dafür in der Tatsache, dass Notch nicht wie EBNA-2 die Expression des bei einer B-

Zell-Transformation wichtigen Proteines LMP1 induzieren kann (Gordadze et al., 2001; Hofelmayr et al., 2001).

Neben den bereits erwähnten Zielgenen, ist EBNA-2 und Notch noch die Transaktivierung der Zielgene Hes1, BATF, CD23 und c-myc gemeinsam (Übersicht: Kempkes, 2005).

1.3 Histonmodifikationen

Histone bilden zusammen mit 146 bp langen DNA-Stücken sogenannte Nukleosomen, die wiederum der Grundbaustein des Chromatins sind. Es gibt fünf Histone, die in zwei Gruppen eingeteilt werden. Hierbei handelt es sich um die Kern-Histone H2A, H2B, H3 und H4 und das sogenannten Linker-Histon H1, auf das im Folgenden nicht näher eingegangen wird. Die Kern-Histone, die reich an basischen, positiv geladenen Aminosäuren, wie Arginin und Lysin sind, weisen eine ähnliche Struktur auf und bestehen aus einer globulären Domäne und einer N-terminalen Elongation, auch tail genannt.

Durch verschiedene Mechanismen während der Replikation oder Transkription wird die DNA im Chromatin für Proteine zugänglich gemacht. Über die Arginin-Reste, die eine Wechselwirkung mit dem Phosphatrückgrat der DNA eingehen, interagieren die Histone mit der DNA. Diese Wechselwirkung kann durch Histonmodifikationen, wie Acetylierung, Methylierung, Phosphorylierung und Ubiquitinierung verändert werden und bewirkt eine Änderung der Chromatinstruktur, die wiederum die Regulation der Transkription beeinflusst (Berger, 2002). Die wichtigsten Histonmodifikationen sind in Abbildung 1.4 zusammengefasst. Es zeigt sich auch, dass Lysine sowohl methyliert, als auch acetyliert werden können.

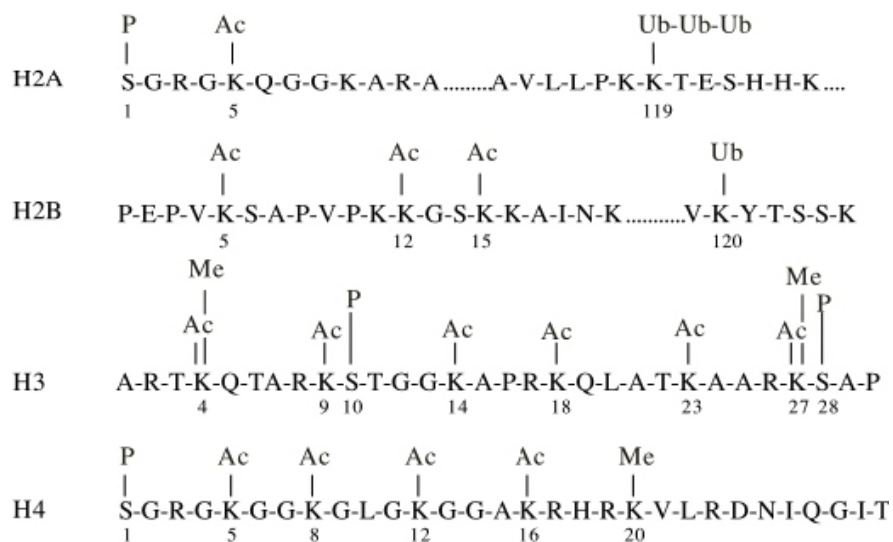


Abb. 1.4: Die wichtigsten Histonmodifikationen

In dieser Abbildung sind die Positionen der wichtigsten Histonmodifikationen, sowie die Art der Modifikation angegeben. Ac = Acetylierung, Me = Methylierung, P = Phosphorylierung, Ub = Ubiquitinierung (nach Spencer and Davie, 1999).

Im Gegensatz zu anderen Modifikationen ist die kurzlebige, reversible Acetylierung von Kern-Histonen und ihre Auswirkungen auf die Transkription sehr gut untersucht. Der Acetylierungszustand eines Histonrests wird durch die beiden Enzym-Familien Histon-Acetyltransferase (HAT) und Histon-Deacetylase (HDAC) bestimmt, wobei hyperacetylierte Histone mit transkriptionell aktivem Chromatin und hypoacetylierte Histone mit inaktivem Chromatin verbunden sind. Die Einführung einer Acetylgruppe an einem Histonrest bewirkt die Neutralisierung einer positiven Ladung und schwächt dadurch die Interaktion zwischen Histonen und DNA (Grant and Berger, 1999). Eine Vielzahl von Transkriptions-Kofaktoren weist eine HAT-Aktivität auf, interagiert mit Transkriptionsfaktoren oder Proteinen des basalen Transkriptionskomplexes und bewirkt hauptsächlich eine Acetylierung von Histon H3 und Histon H4 (Marmorstein, 2001).

Eine weitere Histonmodifikation ist die Methylierung, die durch Histonmethyltransferasen (HMT) katalysiert wird. Bei einer Lysin-Methylierung handelt es sich um eine äußerst stabile Modifikation. Durch die Methylierung wird zum einen keine Ladung verändert und zum anderen wird die Bindung durch benachbarten Iminogruppen nicht destabilisiert, wie es bei einer Arginin-Methylierung der Fall ist (Jenuwein, 2001).

Enzyme, die eine Methylierung rückgängig machen, konnten bis zum jetzigen Zeitpunkt nicht eindeutig identifiziert werden. Es wird vermutet, dass eine Methylierung nicht durch eine einfache Reaktion, wie beispielsweise einer Hydrolase, rückgängig gemacht werden kann (Bannister et al., 2002). Die Methylierung des Lysin 9 an Histon H3 (H3-K9) ist eine sehr gut charakterisierte Modifikation, die mit einer Repression, also transkriptionell inaktivem Chromatin verbunden ist (Richards and Elgin, 2002). Kommt es jedoch zur Methylierung des benachbarten Lysin 4 (H3-K4), ist dies ein Zeichen für transkriptionell aktives Chromatin. Die H3-K4 Methylierung verhindert eine Methylierung von H3-K9 (Nishioka et al., 2002). Interessanterweise konnte bei aktiver Transkription vor allem eine Trimethylierung von H3-K4 beobachtet werden (Santos-Rosa et al., 2002). Die Dimethylierung hingegen scheint eher ein allgemeines Signal für Euchromatin zu sein (Sims et al., 2003).

Es scheint allerdings, dass eine einzelne Histonmodifikation meistens von einer anderen, sich auf demselben Tail befindenden, Histonmodifikation beeinflusst wird. Aufgrund dieser komplexen Vorgänge bei einer Histonmodifikation, wurde vorgeschlagen einen „Histon-Code“ zu erstellen, der Auskunft darüber gibt, welche Modifikation bzw. Kombination von Modifikationen welche Auswirkung hat (Strahl and Allis, 2000; Turner, 2000).

1.4 Identifikation von assoziierten Proteinen mittels massenspektrometrischer Analyse

Die Sequenzierung gesamter Genome verschiedener Organismen konnte in den letzten Jahren erfolgreich zum Abschluss gebracht werden. Der Höhepunkt der Genomanalyse war sicherlich die Entschlüsselung des mit 2,85 Milliarden Basenpaaren größten existierenden Genoms, des menschlichen Genoms (Lander et al., 2001; Venter et al., 2001; Abdellah et al., 2004). Trotz großer Erfolge und Fortschritte auf dem Gebiet der genomischen Arbeitsmethoden blieben jedoch viele Fragen offen. Es hat sich die Erkenntnis durchgesetzt, dass die relativ statische Information des Genoms allein nicht zur Klärung der dynamischen Abläufe eines Organismus und somit für Fragestellungen der Biologie und Medizin ausreichend ist.

Das Dogma „ein Gen, ein Protein, eine Funktion“ gilt heute nicht mehr (Lottspeich, 1999). Ein Hauptgrund hierfür ist die Tatsache, dass fast alle Proteine nach ihrer Expression noch weiter modifiziert werden und dies die Ausübung ihrer eigentlichen Funktion ermöglicht. So wird durch Bindung kleiner Moleküle an bestimmte Aminosäuren die Lokalisation und Aktivität vieler Proteine gesteuert (Proud et al., 2005). Sogenannte posttranslationale Modifikationen spielen eine zentrale Rolle bei der Übertragung von Signalen (Mann et al., 2002; Tischer and Bastiens, 2003) und bei Interaktionen zwischen verschiedenen Proteinen (Restle et al., 2005). Die Analyse der Proteine einer Zelle oder Organismen (Proteom) mit Hilfe moderner und hochsensitiver Analysetechniken, wie der Massenspektrometrie, ist in den letzten Jahren immer mehr in den Mittelpunkt der Wissenschaft getreten. Unter einem Proteom versteht man heutzutage „das zu einem bestimmten Zeitpunkt und unter exakt definierten Randbedingungen quantitativ ermittelte Proteinmuster eines Organismus, einer Zelle, einer Organelle oder auch einer Körperflüssigkeit“ (Lottspeich, 1999). Daher ist es wichtig für die Probengewinnung definierte Ausgangssituationen zu erstellen. Weitere Herausforderungen sind die Bewältigung der großen Heterogenität der Proteine (Hydrophobizität, Größe, Menge, etc.), sowie der hohen Komplexität der Proteome bzw. der Proben. Die biologische Varianz der einzelnen Proben ist nicht zu vernachlässigen und muss daher durch Wiederholung des Experiments abgeschätzt werden.

Da in einer humanen Zelle trotz der „nur“ 20.000-25.000 Gene bis zu 50.000-300.000 unterschiedliche Proteine vorkommen (Pandey and Mann, 2000), ist die Auftrennung komplexer Proteingemische eines der Hauptprobleme bei einer Proteomanalyse. Die Reduktion der Komplexität einer Probe ist für eine erfolgreiche massenspektrometrische Analyse essentiell.

1.4.1 Die Tandem Affinity Purification (TAP-Reinigung)

Um die Komplexität der Probe zu reduzieren, wurden in dieser Arbeit drei verschiedene Methoden verwendet. Hierbei handelte es sich um die TAP-Reinigung, die TIP-Reinigung (eine modifizierte Form der TAP-Reinigung) und um eine GST pull down-Reinigung.

Die Reinigung wurde aber vorzugsweise mit der „Tandem affinity purification“ (TAP-Reinigung) durchgeführt und der daraus resultierenden Tandem Immunpräzipitation (TIP-Reinigung), die im Ergebnisteil ausführlich besprochen wird.

Im Folgenden wird die TAP-Reinigung näher beschrieben. Mit TAP werden alle Proteinreinigungstechniken beschrieben, die auf zwei unabhängigen Reinigungsschritten basieren. Die zur Aufreinigung nativer Komplexe aus Hefezellen im Labor von Seraphin entwickelte TAP-Reinigung (Rigaut et al., 1999), liegt der hier verwendeten TAP-Reinigung zugrunde. Da es sich bei dem TAP-tag um einen Doppeltag handelt, erzielt er durch die Verwendung zweier unabhängiger Reinigungsschritte eine spezifische Anreicherung von Multiproteinkomplexen.

Der TAP-tag besteht aus zwei IgG-Bindungsdomänen des *Staphylococcus aureus* Protein A (ProtA) und dem Calmodulin bindenden Protein (CBP). Zwischen diesen beiden tags befindet sich die Erkennungssequenz (TEV) für die hoch spezifische Tobacco etch Virus N1a Proteinase. Dieser tag kann sowohl C-, als auch N-terminal an Proteine fusioniert werden, die anschließend in Zellen exprimiert und mit der TAP-Reinigung aufgereinigt werden.

In Abbildung 1.5 sind die einzelnen Schritte der TAP-Reinigung schematisch wiedergegeben. Die TAP-Reinigung kann grob in zwei Hauptschritte, der ProtA/IgG-Bindung und der Calmodulinbindung, unterteilt werden. Im ersten Reinigungsschritt erfolgt die Bindung des ProtA-tags an die mit IgG gekoppelten Sepharose-Beads und ein anschließender Waschschrift zur Entfernung von Kontaminationen. Bei der ProtA/IgG-Bindung handelt es sich um eine sehr starke Interaktion, die nur unter denaturierenden Bedingungen mit niedrigem pH gelöst werden kann. Durch den Einsatz der TEV-Proteolyse ist eine Elution des gebundenen Proteinkomplexes unter nativen Bedingungen möglich. Das Eluat der TEV-Spaltung wird daraufhin im zweiten Reinigungsschritt mit den Calmodulinbeads inkubiert. Die Bindung des CBP-tags erfolgt unter Anwesenheit von Calciumionen an die Calmodulinbeads. Kontaminationen von unspezifisch gebundenen Proteinen, sei es an den Komplex oder an die Beads, werden durch einen Waschschrift entfernt. Mit diesem Waschschrift wird ebenfalls die TEV-Protease entfernt, die sich noch im Eluat befand. Durch Zugabe von EGTA, welches mit den Calciumionen eine Chelatbindung eingeht, erfolgt die native Elution des Proteinkomplexes.

Mit Hilfe des Doppeltags ist es möglich, Proteinkomplexe aus einem Zelllysat zum einen unter nativen Bedingungen aufzureinigen und zum anderen ermöglicht die Reinigung über zwei Reinigungsschritte eine sehr saubere und spezifische Aufreinigung des Komplexes. Da es sich allerdings um einen sehr langen Reinigungsprozess handelt, könnten schwache Interaktionen mit dem Komplex verloren gehen.

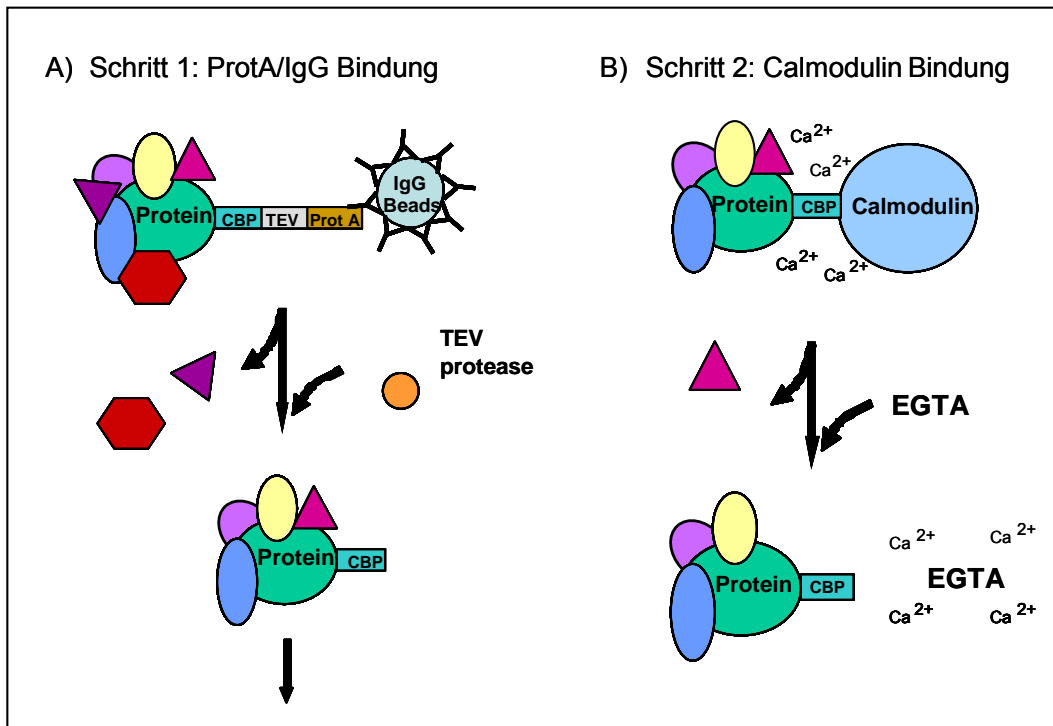


Abb. 1.5: Prinzip der TAP-Reinigung

In schematischer Form ist der Ablauf der TAP-Reinigung dargestellt. Die Reinigung eines TAP-Fusionsproteins aus einem Zellysate lässt sich in zwei Hauptschritte unterteilen, der ProtA/IgG-Bindung (A) und der Calmodulinbindung (B). Im ersten Schritt (A) bindet der ProtA-Tag an die mit IgG gekoppelten Sepharose-Beads. Durch die Zugabe der TEV-Protease wird der Proteinkomplex eluiert. Im zweiten Schritt (B) erfolgt die Bindung des CBP-Tags an Calmodulinbeads bei Anwesenheit von Calciumionen. Durch die Zugabe von EGTA, welches mit den Calciumionen eine Chelatbindung eingeht, kann der Proteinkomplex unter nativen Bedingungen eluiert werden.

Mit diesem TAP-Tag, der zum ersten Mal in Hefe eingesetzt worden war (Rigaut et al., 1999), konnten bereits eine Vielzahl von Multiproteinkomplexen gereinigt werden. Mittlerweile konnten auch Anreicherungen in höheren Eukaryoten (Forler et al., 2003) und Säugetierzellen (Knuesel et al., 2003) durchgeführt werden. Einen großen Erfolg mit dieser Reinigung konnten Bouwmeester und Kollegen erzielen, denen es gelang, in HEK293-Zellen eine physiologische und funktionelle Karte des TNF α /NF κ B-Signalweges zu beschreiben (Bouwmeester et al., 2004). Das Reinigungsprotokoll fand allerdings noch keine Anwendung in der B-Zelllinie DG75, wie es in dieser Arbeit geplant ist.

Wie bereits unter 1.4 erwähnt, ist es für eine erfolgreiche massenspektrometrische Analyse notwendig, die Komplexität eines Proteingemisches zu reduzieren. Dies erfolgt in dieser Arbeit zuerst durch die TAP-Reinigung. Anschließend wird das, nach tryptischem Verdau der Proteine im Eluat erhaltene Peptidgemisch mittels einer nano-Flüssigkeitschromatographie (nanoHPLC) weiter aufgetrennt. Hierbei wird eine Umkehr- oder Reverse Phase Chromatographie (RP-LC) mit einem C18-Material durchgeführt, das Peptide ihrer Hydrophobizität entsprechend auftrennt. Der Vorteil der nanoHPLC ist deren Eigenschaft, sehr kleine Probenvolumina und geringe Probenkonzentrationen aufzutrennen.

1.4.2 Massenspektrometrische Analyse

Ende der 80er Jahre des letzten Jahrhunderts wurden mit Hilfe der schon seit langem bekannten Massenspektrometrie Techniken entwickelt, die es ermöglichten auch schwerflüchtige Biomoleküle mit sehr sanften Ionisierungstechniken in die Gasphase zu bringen und massenspektrometrisch zu analysieren. Bei diesen Methoden handelt es sich um die Elektrospray-Ionisierung (ESI) (Fenn et al., 1989) und die Matrix-unterstützte Laserdesorption/Ionisation (MALDI; Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation) (Hillenkamp et al., 1991). Dass es sich um eine bedeutende Entwicklung handelt, zeigt die Auszeichnung von Fenn und Tanaka mit dem Chemie Nobelpreis im Jahre 2002. Da die Massenspektrometrie (MS) neben einer sehr hohen Empfindlichkeit auch eine hohe Scan- und Analyse-Geschwindigkeit aufweist, ist sie mittlerweile weit verbreitet, wenn es um Proteinidentifizierung oder Proteinquantifizierung in der Proteomik geht.

Ein Massenspektrometer, das die Molekülmasse freier Ionen im Hochvakuum bestimmt, besteht grundsätzlich aus folgenden drei Komponenten:

- Ionenquelle
- Massenanalysator
- Detektionseinheit

In der Ionenquelle werden Ionen erzeugt, die dann im Massenanalysator beschleunigt und ihrem Masse/Ladungsverhältnis (m/z) entsprechend aufgetrennt werden. Anschließend erfolgt die Detektion der Ionen in der Detektionseinheit.

Eine schematische Darstellung des Prinzips der Ionisierung mit der MALDI-Technik ist in Abbildung 1.6 dargestellt (aus Lottspeich und Zorbas, 2006). Um eine MALDI-Messung durchführen zu können, wird zuerst auf einem Stahltarget die Probe mit der sogenannten Matrix in einem Verhältnis von $1:10^3$ bis $1:10^4$ gemischt. Die verwendeten Matrices sind kleine organische Verbindungen, meistens organische Säuren, wie zum Beispiel 2,5-Dihydrobenzoesäure (DHB) oder α -Cyano-4-hydroxymizsäure (CHCA), die bei der eingestrahlten Laserwellenlänge im UV-Bereich eine hohe Absorption zeigen. Während der Verdunstung des Lösungsmittels kommt es zu einer, für die Ionisierung essentiellen, Kokristallisation von Analyt und Matrix, wobei das Analytmolekül in den Kristallverband der Matrix eingebaut wird. Die sich im Vakuum befindende Probe wird bei der anschließenden MALDI-MS-Messung mit mehreren Impulsen einer kurzwelligigen Laserstrahlung von kurzer Dauer (je 3-4ns) beschossen. Die Wellenlänge des Lasers ist so gewählt, dass der Großteil der Laserenergie von der Matrix absorbiert wird und es zur Übertragung der Energie durch Relaxation in das Gitter des Analyt/Matrixkristalls kommt. Analyt- und Matrixmoleküle werden durch Desorption eines Teilbereiches der Festkörperoberfläche in die Gasphase überführt. Der schonende Ionisierungsvorgang ist darauf zurückzuführen, dass der Großteil der Energie von der Matrix absorbiert wird und somit labile Biomoleküle, wie zum Beispiel Proteine, intakt bleiben. Durch die Übertragung von Protonen auf Analytmoleküle durch

radikalische Matrixmoleküle, spielen Matrixmoleküle bei der Ionisierung eine wichtige Rolle. Anschließend erfolgt die Beschleunigung der so entstandenen einfach-geladenen Ionen in einem durch Hochspannung erzeugten elektrostatischen Feld Richtung Massenanalysator und Detektor.

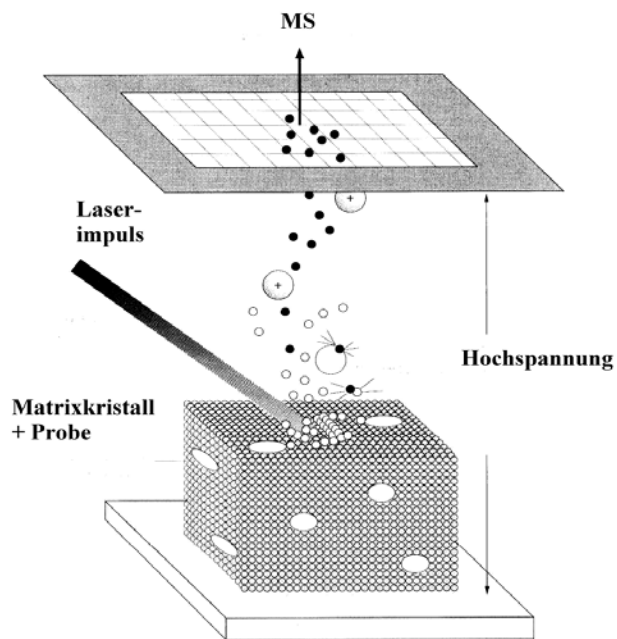


Abb. 1.6: Prinzip des MALDI-Prozesses

Nach dem Mischen der Probe mit einem Überschuss an ultraviolettem Licht absorbierender Matrix, wird die Probe mit mehreren Impulsen einer kurzwelligen Laserstrahlung beschossen. Durch Desorption eines Teilbereichs der Festkörperoberfläche werden Analyt- und Matrixmoleküle in die Gasphase überführt. Die Beschleunigung der einfach geladenen Ionen Richtung MS erfolgt in einem durch Hochspannung erzeugten elektrostatischen Feld.

Die hier beschriebene und in dieser Arbeit verwendete, von Karas und Hillenkamp (Hillenkamp et al., 1991) entwickelte MALDI-MS, ist in den letzten Jahren eine der wichtigsten Techniken zur Molekülmassenbestimmung von Biomolekülen geworden (Aebersold and Mann, 2003).

1.5 Fragestellung

Die Analyse der EBNA-2 regulierten viralen C-, LMP1- und LMP2-Promotoren, leistete wesentliche Beiträge zum Verständnis des molekularen Mechanismus der Transaktivierung durch EBNA-2. In allen drei viralen Promotoren konnte mindestens eine CBF1-Bindestelle nachgewiesen werden, die für die EBNA-2 abhängige Transaktivierung wichtig ist.

Da bei zellulären Zielgenen der Mechanismus der Transaktivierung durch EBNA-2 im Gegensatz zu den viralen Zielgenen, nur wenig untersucht ist, ist das Ziel dieser Arbeit einen Beitrag zum Verständnis dieser molekularen Mechanismen zu leisten. Vor Beginn dieser Arbeit waren nur für den CD23a-Promotor ein EBNA-2 responsives Element identifiziert und die Bindung von CBF1 an eines dieser Elemente bestätigt worden (Ling et al., 1994; Wang et al., 1991). Da die CBF1-Bindestelle im CD23a-Promotor nahe dem Transkriptionsstart liegt, ähnelt dieser Promotor in struktureller Hinsicht den viralen Promotoren LMP1p und LMP2p.

In dieser Arbeit sollten folgende Fragestellungen näher untersucht werden:

Nachweis und Kartierung der EBNA-2-Bindestellen

Bindet EBNA-2 über intronische CBF1-Bindestelle an CBF1 und findet über diese Bindung eine Transaktivierung des Zielgens statt? Hierzu sollten einige, der in unserer Arbeitsgruppe neu identifizierten und durch Real Time PCR bestätigten, EBNA-2-Zielgene untersucht werden (Maier et al., 2006). Es sollte zuerst überprüft werden, ob EBNA-2 an potentielle CBF1-Bindestellen, die sich entweder im Promotor oder 1. Intron befinden, bindet.

Charakterisierung der Chromatinmodifikation und Polymerase II-Rekrutierung nach EBNA-2-Aktivierung

Kann eine EBNA-2-Bindung an eine CBF1-Bindestelle nachgewiesen werden, sollten diese Gene im Hinblick auf Histonmodifikation und Rekrutierung der Polymerase II im Bereich des Transkriptionsstarts und des flankierenden Promotorbereichs, sowie des 1. Exon-Intron Bereichs analysiert werden.

Identifizierung von Regionen, die relevant für die EBNA-2 vermittelte Transaktivierung sind

Das CCL3-Gen weist eine potentielle CBF1-Bindestelle nahe dem Transkriptionsstart bei -346 bp auf. Da aber an der Regulation von Genen meistens eine Vielzahl von Faktoren beteiligt sind, sollte der Promotorbereich von -400 bp bis zum Transkriptionsstart des CCL3-Gens mittels einer Promotor-Reporter-Gen-Studie näher untersucht werden, um mögliche weitere Regionen zu kartieren, die für die EBNA-2-Transaktivierung relevant sind.

Identifizierung von neuen EBNA-2-Interaktionspartnern

Die Suche nach weiteren EBNA-2-Interaktionspartnern ist von großem Interesse, da diese einen wesentlichen Beitrag zum Verständnis der EBV-Biologie leisten können. EBNA-2 bewirkt nicht nur eine Transaktivierung von Zielgenen, sondern kann diese auch reprimieren, wie dies beispielsweise bei IgM der Fall ist. Der Mechanismus der Repression durch EBNA-2 ist bis zum jetzigen Zeitpunkt nicht geklärt. Die Identifikation neuer Interaktionspartner von EBNA-2 könnte daher Hinweise zum molekularen Mechanismus der Transaktivierung, sowie der Repression von Zielgenen durch EBNA-2 leisten. Der zweite Teil dieser Arbeit befasst sich daher mit der Identifikation neuer potentieller Interaktionspartner des EBNA-2/CBF1-Multiproteinkomplexes. Hierzu soll die „Tandem Affinity Purification“ (TAP-Reinigung) zur Aufreinigung nativer EBNA-2-Komplexe in B-Zellen etabliert werden. Die Multiproteinkomplexe werden anschließend massenspektrometrisch analysiert.

2 Material

2.1 Kulturen

2.1.1 Zelllinien

Tabelle 2.1 Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung
BJAB-K3	humane EBV-negative B-Zelllinie BJAB, stabil transfiziert mit dem ER/EBNA-2-Konstrukt (Kempkes et al., 1995a)
BL41-K3	humane EBV-negative Burkitt-Lymphomlinie BL41, stabil transfiziert mit dem ER/EBNA-2-Konstrukt (Kempkes et al., 1995a)
DG75	humane EBV-negative Burkitt-Lymphomlinie (Ben-Bassat et al., 1977)
SM224.9	humane EBV-negative Burkitt-Lymphomlinie DG75 (Ben-Bassat et al., 1977), mit vollständiger Deletion von CBF1 (Maier et al., 2005)
SM295	humane EBV-negative Burkitt-Lymphomlinie DG75 (Ben-Bassat et al., 1977), stabil transfiziert mit dem ER/EBNA-2-Konstrukt (Maier et al., 2005)
SM296	humane EBV-negative Burkitt-Lymphomlinie DG75 (Ben-Bassat et al., 1977), mit vollständiger Deletion von CBF1, anschließend stabil transfiziert mit dem ER/EBNA-2-Konstrukt (Maier et al., 2005)
721	humane EBV-positive lymphoblastoide Zelllinie (LCL), entstanden durch Infektion primärer B-Zellen mit dem EBV-Stamm B95.8 (Kavathas et al., 1980)
AH304-9	humane EBV-negative Burkitt-Lymphomlinie DG75 (Ben-Bassat et al., 1977), stabil transfiziert mit TAP-EBNA-2
AH305-9	humane EBV-negative Burkitt-Lymphomlinie SM224.9 (Maier et al., 2005), stabil transfiziert mit TAP-EBNA-2
AH276-1	humane EBV-negative Burkitt-Lymphomlinie SM224.9 (Maier et al., 2005), stabil transfiziert mit TAP-CBF1

2.1.2 Bakterienstämme

E. coli DH5 α F⁻, *lacI*⁻, *recA*⁻, *endA1*, *hsdR17*, $\Delta(lacZYA-argF)$, U169, F80d*lacZ* Δ M15, *supE44*, *thi-1*, *gyrA96*, *relA1*; Invitrogen, UK

2.2 Material für die Kultur eukaryotischer Zellen und Bakterien

2.2.1 Kultur eukaryotischer Zellen

„Gene Pulser“-Küvetten	Biorad, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Deutschland
Fötiales Kälberserum	Biochrom AG, Deutschland
Geneticin (G418 Sulfate)	GIBCO, UK
Hygromycin B	Invitrogen, UK
L-Glutamin	GIBCO, UK
Penicillin/Streptomycin	GIBCO, UK
RPMI 1640-Medium	GIBCO, UK
β -Estradiol (Östrogen)	Sigma-Aldrich, USA

2.2.2 Kultur von Bakterien

Ampicillin	Sigma-Aldrich, USA
Bacto-Agar	Invitrogen, UK
Bacto-Trypton	Invitrogen, UK
Bacto-Yeast-Extract	Invitrogen, UK

2.3 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden bei der Firma Metabion in Auftrag gegeben. Die Sequenzen der Oligonukleotide sind in 5'-3'-Orientierung angegeben. Die Oligonukleotide für die Real Time PCR (Tab. 3) wurden mit dem Programm Primer3 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) entworfen.

Tabelle 2.2 Oligonukleotide für PCR

Bezeichnung	Sequenz [5'-3']
AH187-A	CCG GAA TTC ATG GCA GGC CTT GCG CAA
AH187-B	GCT GGC GAA TTC AAG TGC CCC GG
AH192-A	CGG GAT CCC ATG GCA GGC CTT GCG
AH192-B	CCC AAC CTT TTT CAA GTG CCC CGG AGG
AH197-A	GGC CGG ATC CAT GGA AAA G
AH197-B	CCC AAG CTT CTA ATT AGC GTC TAC TTT C
AH199-A	CGG GAT CCG AGC ATG GCG CCT GT
AH199-B	CAT GCC ATG GAT ACC ACT GTG GCT GTA GAT G

Tabelle 2.3 Oligonukleotide für RT-PCR

Zielgen (site)	Bezeichnung	Sequenz [5'-3']	Amplifikatlänge [bp]
CD23 (-172 bp)	KG572	GCC GTC CTT CTA ACC CAA GAG	157
	KG573	AAG CAG CAA GTT CCC ACA GG	
CD21 (+4529 bp)	AH569.1	TTC ACA GGC CTT CCT TAA CC	224
	AH569.2	GCA CAG GCG ATG TAT CTG TGA AC	
DNASE1L3 (-2622 bp)	AH575.3	ATA AGA GGA AGC TAG GAA GTG AC	179
	AH575.4	ACT ATC AAG TTG GCC TTT CC	
DNASE1L3 (-1300 bp)	AH816.7	CCG AGT CTC AAT TTC TTC ATC TG	238
	AH816.8	TCA GCC CTG GAC AAA TAA CC	
DNASE1L3 (Trans. Start)	AH575.5	GGC TTC TCT GAG GGT GTG AC	183
	AH575.6	CTG CTC ACA TTT CCC AGG TC	
DNASE1L3 (+422 bp)	AH575.1	GTC TTC TGC CAG GAG TGG AG	171
	AH575.2	TGG GAC AAG AGT CAG TGG AG	
DNASE1L3 (+900 bp)	AH816.5	TGT TGC TCA AGA TAG TCC AAG G	243
	AH816.6	CTT CGG GAT GAA GTT TCC TG	
CCL3 (-2066 bp)	AH568.3	AAG CTC CGG TGA AAC CTA CC	183
	AH568.4	AGA GGA CAG AAG CCA AGT GC	
CCL3 (-1600 bp)	AH815.1	TCG TGG GAT TCT GAG CTT TC	246
	AH815.2	ACC TTC TCA GCC AGA TTA TAT GC	
CCL3 (-900 bp)	AH815.3	CTT AGG GTT GGC AAG GAA TA	249
	AH815.4	TCT CCA TCA GGG AAT GAT AA	
CCL3 (-346 bp)	AH568.1	CAT CAA CCC TAT CCC TGT GG	174
	AH568.2	GGG AAA TGG TTT CTC CTG TG	
CCL3 (Trans. Start)	AH568.5	CCA GGG CTG CCT ATA AAG AG	197
	AH568.6	TGA TGC AGA GAA CTG GTT GC	
CCL3 (+700 bp)	AH815.5	AAG GCT TCT CTT GGG TTG G	204
	AH815.6	AGT GAC TGG AAG GCA TTT GG	
SLAMF1 (-1000 bp)	AH817.1	CAA TAG CCA AGG TTG GAA GC	204
	AH817.2	GCA AGT GAG AAC GTG CAA AG	
SLAMF1 (Trans. Start)	AH571.3	GAA TCT GCA ACA TCC GGT TC	241
	AH571.4	ACC CGC TTC CTG TAT CAC TG	
SLAMF1 (+686 bp)	AH571.1	GGG ATT TCT GAA GGC TAG GG	242
	AH571.2	ACA GGC AGT CCA AAG TCC AC	
SLAMF1 (+1200 bp)	AH817.3	TGG GAG GTA GCC TGG AGT AG	217
	AH817.4	AAG AAA GTG GGC TGA GCA AG	

CDK5R1 (-1011 bp)	AH570.1	AGC CTT TGT GAA GGA TCT GG	215
	AH570.2	CCC GTC ACA AAT ATG ACC TC	
ABHD6 (Trans. Start)	AH573.7	TGA GAC AAC CGA TGT CAA GC	212
	AH573.8	CCA CAC ACA GTT CCA CAT CC	
ABHD6 (+8979 bp)	AH573.1	CAC GGC TTT CTG GTT CTC TC	157
	AH573.2	TGA CAA CTG GTT CCT CAT GG	
ABHD6 (+10465 bp)	AH573.3	TTT CCC TTC CCA GTG CTA AC	195
	AH573.4	ATG GGT AAT GAC CTC CAA GG	
SAMSN1 (Trans. Start)	AH574.3	GAA GGA GGA AGT GGC AGG TC	153
	AH574.4	TGG ATG GCT TTC TCT TGA GC	
SAMSN1 (+12647 bp)	AH574.1	TCC AGC AAT GAT CTG GTG TC	256
	AH574.2	TCT CTA TGT CCA GGG TCA CG	

2.4 Plasmide

Tabelle 2.4 Plasmide

Plasmid	Beschreibung
Ga50-7	von pBLuc5 abstammender Vektor mit Luziferase-Reportergen, SV40-Poly(A)-site zur Stabilisierung des Luc-Transkripts und β -Globin-Rumpfpromotor, welcher essentielle Promotorelemente, unter anderem eine TATA-Box, zur Verfügung stellt
K1 (GS156.1a)	Sequenz aus dem CCL3-Promotor (-400 bis -1 bp) in Ga50-7
K2 (GS176.1)	Sequenz aus dem CCL3-Promotor (-400 bis -101 bp) in Ga50-7
K3 (GS156.3a)	Sequenz aus dem CCL3-Promotor (-400 bis -201 bp) in Ga50-7
K4 (GS156.4a)	Sequenz aus dem CCL3-Promotor (-400 bis -301 bp) in Ga50-7
Cpwt (AH 153)	stark EBNA-2 responsive Sequenz aus dem EBV C-Promotor in vier Kopien vor dem Luziferasegen in p220.3
Cpmut (AH 154)	wie Cpwt, jedoch sind die CBF1-Bindestellen durch Mutation verändert, sodass CBF1 nicht binden kann und die Sequenz nicht mehr EBNA-2 responsiv ist; in vier Kopien vor dem Luziferasegen in p220.3
CMV-LTR-Luc	Vektor mit Luziferase-Gen unter Kontrolle eines konstitutiv aktiven CMV-Promotors und eines konstitutiv aktiven LTR-Enhancers
CMV- β Gal	Vektor mit β -Galaktosidase-Gen unter Kontrolle eines konstitutiv aktiven CMV-Promotors und eines konstitutiv aktiven LTR-Enhancers
pZOME-1N	N-terminaler TAP-tag (Cellzome, Heidelberg)
pZOME-1C	C-terminaler TAP-tag (Cellzome, Heidelberg)
Bshbmut	enthält ein EBNA-2 mit zusätzlicher N-terminalen <i>EcoRI</i> -Schnittstelle
gb235	episomaler Expressionsvektor

pHACS1	von pcDNA3 abstammender Vektor mit HA-tag, zur Expression von N-terminalen Fusionsproteinen unter der Kontrolle des CMV-Promotors
AJ247	Expressionsplasmid; humanes CBF1 in dem Vektor pHACS1
pNOTCH (pED1)	Expressionsplasmid; Notch in dem Vektor pHACS1
pSG5	eukaryotisches Expressionsplasmid mit SV40-Promotor
pSG5-EBNA2	Expressionsplasmid; EBNA-2 unter der Kontrolle des SV40-Promotors
Ga981-6 (12x Luc)	stark EBNA-2 responsive Sequenz aus dem EBV LMP-2A-Promotor, die zwei benachbarte CBF1-Bindestellen enthält, in sechs Kopien in Ga50-7
pGEX4T2	GST-Expressionsplasmid
pKF038	Expressionsplasmid; enthält C-terminales EBNA-2 (AS246-AS487)
pAH186-2	Vektor pSG5 mit EBNA-2 mit zusätzlicher N-terminaler <i>EcoRI</i> -Schnittstelle
pAH190	Expressionsplasmid; EBNA-2 mit N-terminalen TAP-tag
pAH193	Expressionsplasmid; TAP-tag
pAH195	Expressionsplasmid; CBF1 mit N-terminalen TAP-tag
pAH200	Expressionsplasmid; CBF1 mit C-terminalen TAP-tag

2.5 Antikörper

Tabelle 2.5 Antikörper für Immunpräzipitation

Bezeichnung	Isotyp	Spezies	Bezugsquelle
α - EBNA2 1E6	IgG 2a (monoklonal)	Ratte	E. Kremmer GSF, Deutschland
α - GST 6G9	IgG 2a (monoklonal)	Ratte	E. Kremmer GSF, Deutschland
α - CTD4 3E8-1 (phosphoryliertes Serin 5 des CTD von Pol II)	IgG 2a (monoklonal)	Ratte	E. Kremmer GSF, Deutschland
α - RB-J 6E7	IgG 2b (monoklonal)	Ratte	E. Kremmer GSF, Deutschland
α - FGC 4F11.1	IgG 2b (monoklonal)	Ratte	E. Kremmer GSF, Deutschland
α - RBP-J (C-20) sc-8212	polyklonal	Ziege	Santa Cruz Biotechnology, USA
α - RBP-J (D-20) sc-8213	polyklonal	Ziege	Santa Cruz Biotechnology, USA
Präimmunserum		Ziege	Rockland, Gilbertsville, PA, USA
α - acetyl Histon H3 (06-599)	polyklonal	Kaninchen	Upstate, USA
α - acetyl Histon H4 (06-866)	polyklonal	Kaninchen	Upstate, USA
α - dimethyl Histon H3 (Lys4) (07-030)	polyklonal	Kaninchen	Upstate, USA
α - Pol II (N-20) sc-899	polyklonal	Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology, USA
Präimmunserum		Kaninchen	Rockland, Gilbertsville, PA, USA

Tabelle 2.6 Antikörper für Western Blot

Bezeichnung	Spezies	Bezugsquelle
α - EBNA2 R3-1-3	Ratte	E. Kremmer GSF, Deutschland
α - RBP-J 7A11-161	Ratte	E. Kremmer GSF, Deutschland
α - TFE3	Kaninchen	Abcam, UK
α - GAPDH	Maus	Chemichon, UK
α - PAP-HRP	Kaninchen	Sigma-Aldrich, Deutschland
α - Maus-Ig-HRP	Schaf	GE Health Care, Deutschland
α - Ratte-IgG-HRP	Ziege	Santa Cruz Biotechnology, USA
α - Kaninchen-IgG-HRP	Ziege	Promega, Deutschland
α - Ratte 680	Ziege	Molecular Probes, USA
α - Maus 800	Esel	Rockland, Gilbertsville, PA, USA
α - Kaninchen 800	Ziege	Rockland, Gilbertsville, PA, USA

2.6 Enzyme

Mikrokokkus Nuklease	Roche Diagnostics GmbH, Deutschland
Proteinase K	Roche Diagnostics GmbH, Deutschland
Restriktionsenzyme	New England Biolabs, USA; MBI Fermentas, Deutschland
T4 DNA Ligase	New England Biolabs, USA
Trypsin Gold	Promega, Deutschland
TEV Protease	Invitrogen, UK

Die zugehörigen Puffer wurden von den jeweiligen Herstellern bezogen.

2.7 DNA-Standards

1 kb DNA Ladder	Invitrogen, UK
100 bp DNA Ladder Plus	Fermentas, Deutschland
λ DNA/ <i>Hind</i> III Fragments	GIBCO, UK

2.8 Nukleinsäuren

MS2 RNA	Roche Diagnostics GmbH, Deutschland
---------	-------------------------------------

2.9 Reagenziensysteme (Kits)

Jet Star 2.0	Genomed, Deutschland
LightCycler Fast Start DNA Master ^{PLUS}	Roche Diagnostics GmbH, Deutschland
SYBR Green I	
NucleoSpin Extract II	Macherey-Nagel, Deutschland

2.10 Chemikalien und Reagenzien

Acetonitril	Merck, Deutschland
Acetyl-Coenzym A	Roche Diagnostics GmbH, Deutschland
Agarose	Invitrogen, UK
Calmodulinbeads	Stratagene, Holland
Complete Protease inhibitor	Roche Diagnostics GmbH, Deutschland
dNTPs	Roche Diagnostics GmbH, Deutschland
Emerald-Enhancer	Applied Biosystems, Deutschland
Ethidiumbromid	Merck, Deutschland
Formaldehyd	ICN Biomedicals, Deutschland
Galacton-Plus	Applied Biosystems, Deutschland
Glykogen	Sigma-Aldrich, Deutschland
Glutathionsepharose 4B	GE Health Care, Deutschland
Sepharose 6 Fast flow	GE Health Care, Deutschland
Iodoacetamid	ICN Biomedicals, Deutschland
Protein A-Sepharose	GE Health Care, Deutschland
Protein G-Sepharose	GE Health Care, Deutschland
TCA	ICN Biomedicals, Deutschland
TFA	Applied Biosystems, Deutschland
Luciferin	Roche Diagnostics GmbH, Deutschland
RNAasin	Promega, Deutschland
Standardpeptid-Mix II	Bruker, Deutschland
Trypanblau	Sigma-Aldrich, Deutschland

2.11 Verbrauchsmaterial

Bio-Spin Säulen	Biorad, Deutschland
LightCycler Capillaries (20 µl)	Roche Diagnostics GmbH, Deutschland
NuPAGE Gele	Invitrogen, UK
Zip-Tip	Millipore, Deutschland

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

2.12 Laborausstattung

3.2RS Varifuge	Heraeus Instruments, Deutschland
5415 Zentrifuge	Eppendorf, Deutschland
6K10 und 2K15 Zentrifuge	SIGMA Centrifuges GmbH, Deutschland
Bakterien-Inkubator	Heraeus Instruments, Deutschland
Bakterienschüttler	New Brunswick Scientific, USA

Elektroporationsgerät	Biorad, Deutschland
Geldokumentationssystem	Ltf Labortechnik, Deutschland
Gelelektrophorese-Kammern (DNA)	PeqLab, Deutschland, und Biorad, USA
LightCycler 2.0	Roche Diagnostics GmbH
MALDI-TOF/TOF (Proteomanalyzer 4700)	Applied Biosystems, Deutschland
Mikroskop Axiovert 25	Carl Zeiss AG, Deutschland
Mikrotiterplatten	Berthold, Deutschland
nanoHPLC	Dionex, Deutschland
Neubauer Zählkammer	Menzel-Gläser, Deutschland
Orion Microplate Luminometer	Berthold Detection Systems, USA
PCR Gerät	Perkin Elmer, USA
Quarzküvette 50 µl	Biometra GmbH, Deutschland
Spannungsquellen	Biorad, USA
Spektralphotometer GeneRay	Biometra GmbH, Deutschland
Sterilbank	Heraeus Instruments, Deutschland
Thermomixer 5436	Eppendorf, Deutschland
UV-Transilluminator ($\lambda = 350 \text{ nm}$)	Herolab, Deutschland
UV-Transilluminator ($\lambda = 312 \text{ nm}$)	PeqLab, Deutschland
Zell-Inkubator	Heraeus Instruments, Deutschland

2.13 Software

Clone Manager 7, Version 7.03	Scientific & Educational Software, USA
ClustalW (Alignments)	http://www.ebi.ac.uk/clustalw/index.html
LightCycler Software 4.0 und 4.05	Roche Diagnostics GmbH, Deutschland
Primer3	http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi
Simplicity 4.02 (Luminometer)	Berthold Detection Systems, USA
GPS Explorer 3.5	Applied Biosystems, Deutschland

2.14 Datenbanken

Ensembl Genome Browser	http://www.ensembl.org
NCBI Homepage	http://www.ncbi.nlm.nih.gov
ExpASY	http://www.expasy.org
MASCOT	http://www.matrixscience.com/

3 Methoden

3.1 Arbeiten mit Bakterien

3.1.1 Kultivierung und Lagerung von Bakterien

Bakterien wurden über Nacht bei 37°C auf LB-Agar-Platten, die gegebenenfalls Antibiotika zur Selektion enthielten, unter Schütteln kultiviert. Für Flüssigkulturen wurden 3 ml LB-Medium mit einer Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Mit dieser Übernachtskultur wurde dann das gewünschte Volumen der Hauptkultur angeimpft und wiederum bei 37°C geschüttelt bis die gewünschte optische Dichte (OD) der Kultur erreicht wurde.

Bakterien in Flüssigkulturen oder auf Agarplatten können für mehrere Tage bei 4°C gelagert werden. Für die Langzeitlagerung wurden sie mit 10% DMSO bei -80°C aufbewahrt.

LB-Medium:	1% Bacto-Trypton; 0,5% Bacto-Yeast-Extract; 1% NaCl; pH 7,4
LB-Agar:	LB-Medium; 1,5% Bacto-Agar
Ampicillin:	50 µg/ml (Platten) bzw. 100 µg/ml (Flüssigkulturen)

3.1.2 Herstellung chemisch kompetenter Bakterien

Von einem Vereinzelausstrich des gewünschten Bakteriums wurde eine Kolonie gepickt und eine 5 ml Übernachtskultur angeimpft. Am folgenden Tag wurden 500 ml LB-Medium mit 1-2 ml der Übernachtskultur angeimpft und bei 37°C bis zu einer $OD_{595} = 0,375$, welche der exponentiellen Wachstumsphase von Bakterien entspricht, unter Schütteln inkubiert. Die Bakterienkultur wurde auf eisgekühlte Gefäße verteilt, 10 Minuten auf Eis abgekühlt und anschließend bei 4°C und 16000 g (ohne Bremse) für 7 Minuten zentrifugiert. Jedes Zellsediment wurde in 10 ml eiskalter $CaCl_2$ -Lösung resuspendiert und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien bei 4°C und 1100 g für 5 Minuten zentrifugiert und jedes Zellsediment wiederum in 10 ml eiskalter $CaCl_2$ -Lösung resuspendiert, auf Eis gehalten und erneut abzentrifugiert. Nachdem jedes Zellsediment in 2 ml eiskalter $CaCl_2$ -Lösung resuspendiert worden war, wurde es aliquotiert, in einem Eis-Ethanol-Gemisch schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

$CaCl_2$-Lösung:	60 mM $CaCl_2$; 10 mM PIPES (pH 7,0); 15% Glycerol; Lösung steril filtrieren
------------------------------------	--

3.1.3 Transformation chemisch kompetenter Bakterien

100 µl chemisch kompetenter Bakterien (DH5α oder BL21 DE3) wurden auf Eis aufgetaut und mit 500 ng der zu transformierenden DNA gemischt. Nach einer Inkubationszeit von 20 Minuten auf Eis, wurden die Bakterien für 60 Sekunden einem Hitzeschock bei 42°C unterzogen. Im Anschluss daran wurde der Transformationsansatz mit 900 µl LB-Medium versetzt und zur Expression des Resistenzgens für 60 Minuten bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Danach wurden geeignete Mengen auf Agarplatten mit entsprechendem Selektionsmedium ausplattiert und über Nacht bei 37°C bebrütet.

3.2 Methoden der Zellkultur

3.2.1 Bestimmung der Zellzahl

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte in einer Neubauer-Zählkammer. Um lebende von toten Zellen unterscheiden zu können, wurden die Zellen mit einer 0,4%igen Trypanblau-Lösung 1:2 gemischt. Da tote Zellen den Farbstoff aufnehmen, sind sie im Mikroskop aufgrund ihrer Blaufärbung erkennbar.

Die Berechnung der Zellkonzentration erfolgte anhand folgender Formel:

$$c_z = \mu_z \cdot v_z \cdot 10^4$$

c_z Anzahl der Zellen/ml

μ_z Mittelwert der Zellzahl pro Großquadrat

v_z Verdünnungsfaktor

3.2.2 Kultivierung und Aufbewahrung von Zellen

Alle verwendeten Zelllinien wurden in RPMI-Vollmedium bei 37°C und 6% CO₂ kultiviert. Dem Medium der Zelllinien BJAB-K3 und BL41-K3 wurde zusätzlich 0,8 µg/µl G418, dem der Zelllinien AH304-9, AH305-9 und AH276-1 0,4 µg/µl Hygromycin B und dem der Zelllinien SM295 und SM295 1,2 µg/µl G418 beigefügt. Die Zellen wurden jeden dritten bis vierten Tag auf ca. 4x10⁵ Zellen/ml gesplittet. Alle verwendeten Zelllinien wachsen in Suspensionskultur. Zur Konservierung von Zellen im lebendem Zustand, wurden 1x10⁷ Zellen bei 300 g für 10 Minuten abzentrifugiert, in 1 ml Einfriermedium resuspendiert und in einem vorgekühlten Adapter mindestens 2 Tage bei -80°C aufbewahrt und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert. Um tiefgefrorene Zellen in Kultur zu nehmen, wurden diese so schnell wie möglich auf 37°C erwärmt. Nachdem die Zellen einmal in RPMI-Vollmedium gewaschen worden waren, wurden sie in einem geeigneten Kulturgefäß in Medium aufgenommen.

RPMI-Vollmedium: RPMI 1640; 10% FKS; 100 U/ml Penicillin/Streptomycin; 2 mM L-Glutamin

G418 (Geneticin) Stocklösung: 100 mg/ml

β-Estradiol Stocklösung: 20 mM in Ethanol

Einfriermedium: 40% RPMI 1640-Medium; 50% FKS; 10% DMSO

3.2.3 Aktivierung der EBNA-2-Aktivität durch Östrogenzugabe

Einige der verwendeten Zelllinien exprimieren ein Fusionsprotein aus EBNA-2 und der Hormonbindungsdomäne des Östrogenrezeptors (ER/EBNA-2). In Abwesenheit von Östrogen liegt das Fusionsprotein in einer inaktiven Konformation vor, da die Hormonbindungsdomäne des Östrogenrezeptors an das Hitzeschock-Protein HSP90 bindet. Bei Östrogenzugabe zum Zellkulturmedium dissoziiert HSP90 und ER/EBNA-2 kann seine aktive Konformation annehmen und alle beschriebenen Funktionen von EBNA-2 ausüben (Kempkes et al., 1995a; Kempkes et al., 1995b; Kempkes et al., 1996). Die EBNA-2-Aktivität wurde durch Zugabe von 1 μM β -Estradiol induziert.

3.2.4 Stabile Transfektion

Pro Transfektionsansatz wurden 1×10^7 Zellen bei 300 g für 10 Minuten abzentrifugiert, anschließend einmal in RPMI-Medium gewaschen und in 250 μl RPMI-Medium aufgenommen. Die Zellen wurden mit 10 μg des jeweiligen Plasmid-Konstrukts gemischt und in eine „Gene Pulser“-Küvette (Biorad) mit einem Elektrodenabstand von 4 mm überführt. Nach der Elektroporation, welche bei 950 μF und 250 V erfolgte, wurden die Zellen sofort in warmes RPMI-Vollmedium überführt und bei 37°C und 6% CO_2 kultiviert. Nach 2 Tagen wurden die Zellen in verschiedenen Konzentrationen (1×10^5 , 5×10^4 , $2,5 \times 10^4$ und $1,25 \times 10^4$ Zellen/ml) in 96 well Platten ausgesät und durch Zugabe von 0,4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Hygromycin B unter Selektion kultiviert. Nach 2 bis 3 Wochen konnten auswachsende Einzelzellklone expandiert und daraufhin auf ihre Richtigkeit mit Hilfe von Western Blots geprüft werden.

3.2.5 Luziferase-Assay für die Promotor-Reportergen-Studie

3.2.5.1 Transiente Transfektion

Pro Transfektionsansatz wurden 1×10^7 Zellen bei 300 g für 10 Minuten abzentrifugiert, anschließend einmal in RPMI-Vollmedium gewaschen und in 250 μl RPMI-Vollmedium aufgenommen. Die Zellen wurden mit 10 μg des jeweiligen Plasmid-Konstrukts und 2 μg CMV- βGal gemischt und in eine „Gene Pulser“-Küvette (Biorad) mit einem Elektrodenabstand von 4 mm überführt. Nach der Elektroporation, welche bei 950 μF und 250 V erfolgte, wurden die Zellen sofort in warmes RPMI-Vollmedium überführt. Die Zellen wurden bei 37°C und 6% CO_2 kultiviert. Alle Transfektionen wurden im Triplikat durchgeführt.

3.2.5.2 Luziferase-Aktivitätsbestimmung

Die Zellen wurden 48 h nach der Transfektion für 10 Minuten bei 300 g abzentrifugiert, in PBS gewaschen und in 100 μl Luc-Extraktionspuffer resuspendiert. Unlösliche Zellbestandteile wurden bei ca. 21000 g für 10 Minuten bei 4°C abzentrifugiert und der Überstand wurde bei -80°C eingefroren oder direkt zur Messung verwendet. Zur Luziferase-

Aktivitätsbestimmung wurden von jeder Probe 2x 10 µl in einer Mikrotiterplatte vorgelegt. Im Messgerät (Orion Microplate Luminometer, Berthold Detection Systems) wurde nach Zugabe von 50 µl Luc-Messpuffer die Biolumineszenz in „relativen Lichteinheiten“ (RLE) gemessen.

5x Luc-Extraktionspuffer: 50% (w/v) Glycerin; 5% (w/v) Triton X-100; 10 mM EDTA; 125 mM Tris/HCl (pH 7,8); frisch angesetzte 1x Verdünnung mit H₂O mit 2 mM DTT versetzen
Luc-Messpuffer: 20 mM Tricin; 1,07 mM (MgCO₃)·Mg(OH)₂·5(H₂O); 2,67 mM MgSO₄; 0,1 mM EDTA; 33,3 mM DTT; 270 µM Acetyl-Coenzym A; 470 µM Luciferin; 530 µM ATP; Lagerung im Dunkeln bei -20°C

3.2.5.3 Normierung der Luziferase-Aktivität durch Bestimmung der β-Galaktosidase-Aktivität

Zum Ausgleich möglicher Schwankungen in der Zahl der eingesetzten Zellen und in der Transfektionseffizienz innerhalb einer Versuchsreihe, wurde als Kontrolle das Plasmid CMV-β-Gal kotransfiziert und die β-Galaktosidase-Aktivität in jedem Ansatz gemessen. In diesem Plasmid steht das lacZ-Gen für die β-Galaktosidase unter der Kontrolle des konstitutiv aktiven CMV-Promotors und LTR-Enhancers. Zur Normierung der Luziferase-Aktivität wurde der Quotient luc/gal aus der relativen Luziferase-Aktivität und der relativen β-Galaktosidase-Aktivität gebildet.

Für die Messung der β-Galaktosidase-Aktivität wurden von jeder Probe 2x 10 µl in einer Mikrotiterplatte vorgelegt und mit je 100 µl Gal-Reaktionspuffer für 15 Minuten inkubiert. Anschließend erfolgte die Messung der Biolumineszenz nach Zugabe von 50 µl Gal-Messpuffer im Messgerät.

Gal-Reaktionspuffer: 100 mM NaP (pH 8,0); 1 mM MgCl₂; 1% Galacton-Plus; frisch ansetzen
Gal-Messpuffer: 0,2 M NaOH; 10% Emerald-Enhancer; frisch ansetzen

3.3 Molekularbiologische Methoden

3.3.1 Isolierung von Plasmid-DNA

3.3.1.1 Schnelle Plasmidisolierung

Um möglichst schnell eine Aussage über die von Bakterien aufgenommene Plasmid-DNA zu machen, wurde eine Plasmidschnellaufarbeitung durchgeführt. Hierzu wurde eine 3 ml Übernachtskultur mit einer Einzelkolonie beimpft. Am folgenden Tag wurde 1 ml der Kultur abzentrifugiert und das Zellsediment in 300 µl TENS-Puffer lysiert. Nach einer 5minütigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurden 150 µl 3 M Natrium-Acetat (pH 5,2) zugegeben, weitere 5 Minuten auf Eis inkubiert und bei 4°C und 16000 g für 10 Minuten abzentrifugiert. Für die Fällung der Plasmid-DNA wurden 400 µl des Überstandes mit 900 µl 100% Ethanol versetzt, nochmals 5 Minuten auf Eis inkubiert und erneut bei 4°C und 16000 g für 10

Minuten zentrifugiert. Das erhaltene DNA-Zellsediment wurde einmal mit 70% Ethanol gewaschen, kurz getrocknet und in 30 µl TER gelöst.

Zur Überprüfung des Plasmids wurden 2 µl der gelösten DNA mit Restriktionsenzymen gespalten und elektrophoretisch, wie in Kapitel 3.3.3 beschrieben, aufgetrennt.

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

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

3.3.1.2 Präparative Aufarbeitung von Plasmid-DNA

Von den auf ihre Richtigkeit überprüften Bakterienklonen wurde anschließend eine Plasmid-Maxiaufarbeitung aus 400 ml-Kulturen durchgeführt. Diese Aufarbeitung erfolgte mit Hilfe des Plasmid-Maxipräparationskits Jetstar 2.0 nach dem Herstellerprotokoll.

3.3.2 Präzipitation gelöster DNA

50 µg gelöste DNA wurden mit 6 µl 3 M NaCl (Endkonzentration 300 mM) versetzt, mit Wasser auf 100 µl aufgefüllt und mit 2,5 Volumen 100% Ethanol für 30 Minuten bei -80°C oder über Nacht bei -20°C gefällt. Nach Zentrifugation bei 4°C und 17600 g für 30 Minuten wurde das Präzipitat zur Entfernung der Salze zweimal mit 70% Ethanol gewaschen, kurz luftgetrocknet und schließlich in H₂O oder TE gelöst.

TE (pH 8,0): 10 M Tris/HCl (pH 8,0); 1 M EDTA (pH 8,0)

3.3.3 Agarose-Gelelektrophorese

Die Laufstrecke der DNA im Agarosegel ist proportional zum Logarithmus ihrer Größe. So wurden für die analytische Auftrennung von DNA-Fragmenten von 0,1-10 kb Agarosegele mit einer Konzentration von 0,8-1,5% verwendet. Die Agarose wurde in 1x TAE-Puffer, welcher auch als Laufpuffer diente, aufgekocht und auf ca. 60°C abgekühlt. Unmittelbar vor dem Gießen wurde dem Gel 1 µl konz. Ethidiumbromid (10 mg/ml) pro 100 ml Gel zugegeben. Die DNA-Proben wurden mit DNA-Auftragspuffer versetzt und bei 5-7 V/cm aufgetrennt.

Durch Interkalation des zugegebenen Ethidiumbromids emittiert die DNA nach Anregung mit UV-Strahlen ($\lambda = 350$ nm) sichtbares Licht (das auf einem UV-Transilluminator sichtbar ist). Die gleichzeitige Auftrennung von Größenmarkern bekannter Länge, wie zum Beispiel der 1-kb DNA-Leiter, ermöglichte die Bestimmung der Fragmentgrößen.

TAE-Puffer: 40 mM Tris/HCl (pH 7,8); 5 mM Na-Acetat, 1 mM EDTA (pH 8,0)

6x DNA-Auftragspuffer: 15% Ficoll, 0,25% Orange G oder 0,25% Bromphenolblau/Xylencyanol FF; in TE (pH 8,0)

3.3.4 DNA-Fragmentisolierung aus dem Agarosegel

Um nach einem Restriktionsverdau das gewünschte DNA-Fragment aufzureinigen, wurde der gesamte Restriktionsansatz auf einem Agarosegel aufgetragen. Da mit dem DNA-Fragment noch weitergearbeitet werden sollte, wurden die Banden nur mit langwelligem UV-Licht (350 nm) angeregt. Die Banden wurden aus dem Gel ausgeschnitten und mit Hilfe des Gel Extraktionskit von Qiagen nach dem Herstellerprotokoll aufgereinigt.

3.3.5 Klonierung von DNA

3.3.5.1 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dient der spezifischen, enzymatischen Amplifikation eines DNA-Fragments zwischen zwei Oligonukleotid-Primern, die gegenläufig an den jeweils komplementären DNA-Strang gebunden sind. Die DNA-Polymerase fügt dann an die 3'-OH-Enden der Primer komplementär zum Matrizenstrang Nukleotide an. Dieses DNA-Syntheseprodukt wird dann denaturiert und es erfolgt ein neuer Zyklus mit Hybridisierung der Oligonukleotide und anschließender DNA-Strang-Synthese.

Um die PCR-Produkte für Klonierungen weiterverwenden zu können, wurde nach Angaben des Herstellers die Pwo-Polymerase verwendet, da diese eine 3'-5'-Exonukleaseaktivität besitzt.

Soweit nicht anders beschrieben, wurde das folgende Standardprogramm für alle PCR-Reaktionen verwendet:

1x	Anfangsdenaturierung	94°C	2 min
25-30x	Denaturierung	94°C	15 sek
	Annealing	Spez. Temperatur	30 sek
	Extension	72°C	45 sek
1x	Schlussexension	72°C	7 min

3.3.5.2 DNA-Spaltung mit Restriktionsenzymen

Für analytische Spaltungen wurden üblicherweise 0,1-0,5 µg doppelsträngiger DNA mit 1-5 U Enzym geschnitten. Als Restriktionspuffer wurden standardmäßig die nach einer Tabelle der Firma Boehringer klassifizierten Puffer (A, B, L, M, H) eingesetzt. In einigen Fällen wurde aber auch auf das Puffersystem von BioLabs oder Fermentas zurückgegriffen. Wurden bei einem Doppelverdau zwei Enzyme eingesetzt, die unterschiedliche Salzkonzentrationen benötigen, musste zwischen den Restriktionen eine Umsalzung durchgeführt werden, welche mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kit erfolgte. In der Regel wurden Restriktionen bei 37°C und einer Inkubationszeit von 2 Stunden durchgeführt.

Für präparative Spaltungen wurden 10 µg Plasmid-DNA eingesetzt und über Nacht verdaut.

3.3.5.3 Ligation

Um die Konzentration der einzelnen DNA-Fragmente zu bestimmen, wurden die Fragmente auf ein Agarosegel aufgetragen und dann mit Hilfe eines optischen Vergleichs mit gespaltener *HindIII* λ -Phagen-DNA ermittelt. Die Vektor-DNA und die im 3fach molaren Überschuss eingesetzte Insert-DNA wurden dann nach Zugabe von 1-2 μ l T4-DNA-Ligase in dem vom Hersteller mitgelieferten Ligase-Puffer bei Raumtemperatur für 2 Stunden ligiert. Zur anschließenden Transformation in 50 μ l CaCl_2 -kompetenter DH5 α wurde die Hälfte des Ligationsansatzes (5 μ l) verwendet.

3.3.5.4 Klonierung von Expressionsvektoren

pAH186-2

Da der Vektor pSG5-EBNA-2 (B. Kempkes, München), der EBNA-2 unter der Kontrolle des SV40-Promotors exprimiert, keine geeignete Schnittstelle am N-Terminus von EBNA-2 aufwies, wurde diese aus dem Vektor bshbmut (B. Kempkes, München) eingeführt. Hierzu wurden beide Plasmide mit *MluI* und *BstEII* verdaut. Das aus bshbmut resultierende Insert wurde in den aus pSG5-EBNA-2 resultierenden Vektor kloniert.

pAH190 TAP-EBNA-2

Zur Herstellung des Vektors pAH190 TAP-EBNA-2 wurde der N-terminale TAP-tag aus dem Vektor pZome-1N mittels PCR amplifiziert. Als Primer wurden AH187-A und AH187-B, der eine *EcoRI*-Schnittstelle einführt, verwendet. Die PCR wurde über 20 Zyklen mit einer spezifischen Temperatur von 69°C durchgeführt. Das PCR-Produkt wurde mittels *EcoRI*-Restriktion in den Vektor pAH186-2 kloniert (Zwischenvektor pAH188). Hierbei wurde der N-TAP-tag in frame an den kodierenden Bereich von EBNA-2 gebracht. Nachdem die richtige Orientierung des eingeführten TAP-tags mittels einer Restriktion mit *StuI* und *BsmBI* überprüft worden war, wurde der Vektor sequenziert. Da der Zwischenvektor pAH188 weder EBNA-1, noch einen Selektionsmarker enthält, eignete er sich nicht für die stabile Expression in Säugetierzellen. Daher musste die TAP-EBNA-2-Kassette in einen geeigneten Vektor umkloniert werden. Hierzu wurde der Vektor gb235 (G. Bommer, München) mit *HindIII* und *XhoI* verdaut und die entstandenen Schnittstellen anschließend mittels Klenow aufgefüllt. Die TAP-EBNA-2-Kassette wurde dann als *SalI*-Fragment aus pAH188 ausgeschnitten, die entstandenen Schnittstellen mit Klenow aufgefüllt und über eine blunt end Ligation in den geschnittenen gb235-Vektor kloniert. Die richtige Orientierung der Kassette des entstandenen pAH190-Plasmides wurde mittels *EcoRI*- und *BglII*-Restriktion überprüft und anschließend sequenziert.

pAH193 TAP-tag

Um den Expressionsvektor für den TAP-tag alleine herzustellen, wurde der TAP-tag aus dem Vektor pZome-1N mittels PCR amplifiziert. Als Primer wurden AH192-A, der eine *BamHI*-

Schnittstelle einführt und AH192-B verwendet. Die PCR wurde über 20 Zyklen mit einer spezifischen Temperatur von 69°C durchgeführt. Sowohl das PCR-Produkt, als auch der Vektor gb235 wurden mit *HindIII* und *BamHI* verdaut und anschließend ligiert, sowie sequenziert.

pAH195 TAP-CBF1

Zur Generierung des Vektors pAH195 TAP-CBF1 wurde das humane CBF1 aus dem Vektor AJ247 mittels *XbaI*- und *XhoI*-Restriktion gewonnen. Die Schnittstellen des erhaltenen CBF1-Fragments wurden anschließend mit Klenow aufgefüllt. Der Vektor pAH193 wurde mit *HindIII* verdaut und die entstandenen Restriktionsstellen ebenfalls mit Klenow aufgefüllt. Über eine blunt end Ligation wurde der kodierende Bereich von CBF1 in frame an den N-TAP-tag gebracht. Nach Überprüfung der richtigen Orientierung des eingebrachten humanen CBF1 mittels *AccI*-, sowie *PvuI*- und *HindIII*-Restriktion, wurde das Plasmid sequenziert.

pAH200 CBF1-TAP

Für das Konstrukt pAH200 CBF1-TAP wurde das humane CBF1 mittels PCR amplifiziert. Als Primer wurden AH199-A, der eine *BamHI*-Schnittstelle einführt, verwendet und AH199-B, der das Stopcodon am C-Terminus von CBF1 durch eine *NcoI*-Schnittstelle ersetzt. Die PCR wurde zuerst über 3 Zyklen mit einer spezifischen Temperatur von 56°C durchgeführt, für die folgenden 20 Zyklen wurde die spezifische Temperatur auf 66°C erhöht. Das erhaltene PCR-Fragment AH198 wurde mit *NcoI* und *BamHI* verdaut. In einer weiteren PCR wurde der C-terminale TAP-tag aus dem Vektor pZome-1C amplifiziert. Als Primer wurden hierfür AH197-A und AH197-B, der eine *HindIII*-Schnittstelle einführt, verwendet. Die PCR wurde über 20 Zyklen mit einer spezifischen Temperatur von 60°C durchgeführt. Mit einer *NcoI*- und *HindIII*-Restriktion wurde das PCR Produkt AH196 weiterbearbeitet. Die beiden PCR-Produkte AH198 und AH196 wurden in den mit *BamHI* und *HindIII* verdauten Vektor gb235 ligiert und anschließend sequenziert.

pAH362 GST-EBNA-2 (AS246-487)

Um das Plasmid pAH362 GST-EBNA-2, das den C-terminalen Teil (AS246-487) von EBNA-2 enthält, wurde diese EBNA-2-Region aus dem Plasmid pKF038 mittels *SalI*- und *NotI*-Restriktion gewonnen (Zwischenprodukt AH360). Das Zwischenprodukt AH360 wurde in den ebenfalls mit *SalI* und *NotI* verdauten Vektor pGEX4T2, der den GST-tag enthält, ligiert, wobei das C-terminale EBNA-2 in frame an den GST-tag gebracht wurde. Die Richtigkeit des entstandenen Klons wurde durch Restriktionsverdau und Sequenzierung überprüft.

3.3.6 Real Time PCR

3.3.6.1 Unterschied zur konventionellen PCR

Die Real Time PCR ist ein hochsensitives und sehr selektives Verfahren zur Quantifizierung von DNA, im Gegensatz zur konventionellen PCR, die nur semiquantitative Ergebnisse liefert.

Eine PCR-Reaktion gliedert sich in exponentielle, lineare und Plateau Phase.

Bei der exponentiellen Phase, die zu Beginn der Reaktion stattfindet, sind ausreichend Reagenzien vorhanden, sodass die Amplifikation mit einer Verdopplung pro Zyklus (100% Reaktionseffizienz vorausgesetzt) erfolgt. Die Reaktionskinetik ist in jeder Probe gleich.

Da daraufhin weniger Reagenzien zur Verfügung stehen, verlangsamt sich die Reaktion in der linearen Phase auf weniger als eine Verdopplung pro Zyklus. Außerdem beginnen die Reaktionsprodukte zu degradieren. Die Reaktionskinetik kann dabei in den einzelnen Proben leicht unterschiedlich sein.

In der abschließenden Plateau-Phase sind die Reagenzien vollständig verbraucht. Es findet somit keine Amplifikation mehr statt.

Bei der konventionellen PCR kann nur das Endprodukt der Reaktion betrachtet werden. Dessen Menge liefert jedoch nur eine ungenaue Aussage über die Menge an Template zu Beginn der Reaktion. Die Real Time PCR dagegen ermöglicht die Aufzeichnung der Amplifikation „in Echtzeit“ während der gesamten Reaktion, also auch bereits während der exponentiellen Phase, in der die Menge des Amplifikats noch repräsentativ für die in der Reaktion eingesetzte Templatemenge ist.

Die Beobachtung der Amplifikationsreaktion wird durch Zugabe des Fluoreszenzfarbstoffs SYBR Green ermöglicht, der sequenzspezifisch in die kleine Furche doppelsträngiger DNA bindet und mit blauem Licht ($\lambda = 530 \text{ nm}$) zur Fluoreszenz angeregt werden kann. Freies SYBR Green fluoresziert dagegen kaum. Zu Beginn der Reaktion liegen Primer und Template-DNA denaturiert und der Farbstoff in Lösung vor, wodurch ein schwaches Hintergrund-Fluoreszenzsignal entsteht. Durch die Amplifikation entstehen mehr und mehr doppelsträngige DNA-Fragmente, an die SYBR Green binden kann. Die Fluoreszenz-Emission wird nach jedem Zyklus am Ende der Elongationsphase gemessen und steigt mit wachsender Zahl der Amplifikate an.

3.3.6.2 Quantifizierung

3.3.6.2.1 Kreuzungspunkt

Für die Quantifizierung der PCR-Produkte wird ermittelt, nach wie vielen Zyklen das Fluoreszenzsignal aus dem Hintergrund tritt. Die Zyklenzahl ist indirekt proportional zur Templatemenge der Probe. Die Fluoreszenz wird graphisch dargestellt, wobei die Zyklenzahl auf der Abszisse und die Fluoreszenzintensität auf der Ordinate aufgetragen wird. Es wird eine zur x-Achse parallel liegende so genannte „Kreuzungslinie“ von der log-linearen Region

jeder Kurve definiert, die signifikant über der Hintergrund-Fluoreszenz liegt. Die Kreuzungslinie ist für alle Proben, die in einem Lauf analysiert werden, gleich. Der Punkt, an dem die Kreuzungslinie die jeweilige Fluoreszenzkurve schneidet, ist der so genannte „Kreuzungspunkt“, anhand dessen die Konzentration des PCR-Produktes berechnet wird. Er wird von der Software nach der „Second Derivative Maximum“ - Methode ermittelt, die das Maximum der zweiten Ableitung einer Kurve bestimmt, an dem sich die Probenfluoreszenz am deutlichsten von der Hintergrundfluoreszenz absetzt.

3.3.6.2.2 Kalibrator – Fixpunkt für die relative Quantifizierung

Bei der relativen Quantifizierung wird die Menge an Template nicht absolut ermittelt, sondern im Verhältnis zu einer Standardprobe, die als Kalibrator bezeichnet wird. Der Kalibrator wird bei jedem Lauf im Duplikat parallel zu den untersuchten Proben amplifiziert. Die Software gibt die Menge an Template in jeder Probe im Verhältnis zur Menge des Kalibrators an. „Konzentrationsverhältnis 1,4“ bedeutet also, dass die Probe 1,4-mal so viel Template enthält wie der Kalibrator. Als Kalibrator dient eine der Proben aus der Verdünnungsreihe zur Herstellung der Standardkurve (siehe Kap. 5.3.6.2.3).

3.3.6.2.3 Effizienzkorrektur mittels Standardkurve

Die Templatemenge in einer Probe wird nach folgender Formel berechnet:

$$N_n = N_0 \cdot E^{C_p}$$

N_n Anzahl der Moleküle im PCR-Zyklus n

N_0 Anzahl der Moleküle zu Beginn der Reaktion

E Amplifikationseffizienz

C_p Zyklus, bei dem das Signal aus dem Hintergrund tritt (Kreuzungspunkt)

Im Idealfall findet eine Verdopplung pro Zyklus statt ($E = 2$). Die Amplifikationseffizienz ist jedoch abhängig von Faktoren wie Sequenz, Fragmentlänge und Reinheit der Nukleinsäure und damit für jedes Gen und sein PCR-Produkt unterschiedlich. Um die Effizienz der jeweiligen PCR-Reaktion zu berücksichtigen, wurde für jedes Gen eine Standardkurve erstellt.

Hierzu wurde zunächst das PCR-Produkt des jeweiligen Gens generiert und eine Verdünnungsreihe mit den Verdünnungsstufen 10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6} , 10^{-8} und 10^{-10} hergestellt, wobei die ersten drei Verdünnungsstufen in 10 ng/µl MS2 RNA (Roche Diagnostics GmbH) und die letzten beiden in Wasser verdünnt wurden. Die Phagen-RNA hat die Funktion eines Carriers und erlaubt ein vielfaches Einfrieren und Auftauen der Verdünnungen. Mit 1 µl jeder Verdünnung wurden im LightCycler Gerät die Standards amplifiziert. Durch Auftragen der Kreuzungspunkte gegen den dekadischen Logarithmus der relativen Konzentration wurden die Standardkurve, aus deren Steigung die Amplifikationseffizienz ermittelt wurde, erstellt.

3.3.6.3 Schmelzkurvenanalyse

Um die Qualität der PCR-Produkte zu überprüfen, wurde nach der PCR eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Doppelsträngige DNA weist in Abhängigkeit von Sequenz, GC-Gehalt und Länge einen charakteristischen Schmelzpunkt auf. Das erwünschte PCR-Produkt hat somit einen anderen Schmelzpunkt als eventuelle Nebenprodukte oder Primer-Dimere. Durch kontinuierliches Erhitzen der PCR-Produkte in der Kapillare wird die dsDNA langsam denaturiert und die Fluoreszenz sinkt mit zunehmender Temperatur. Die Schmelztemperatur T_m eines Produkts ist definiert als die Temperatur, bei der nur noch die Hälfte der ursprünglichen Fluoreszenz vorhanden ist. Als zusätzliche Kontrolle wurden die PCR-Produkte anschließend auf einem 1,5%igen Agarosegel analysiert.

3.3.6.4 Durchführung

Für die Real Time PCR wurde der LightCycler Fast Start DNA Master^{PLUS} SYBR Green I (Roche Diagnostics GmbH) Kit gemäß des Herstellerprotokolls verwendet. 1 µl der nach der Chromatinpräzipitation (siehe Kap. 3.4) gewonnenen DNA wurde als Template für die Amplifikation eingesetzt. Die Amplifikation erfolgte in speziellen Glaskapillaren (LightCycler Capillaries (20 µl), Roche Diagnostics GmbH) mit je 0,5 µM der Primer in einem Volumen von 10 µl. Als Kontaminationskontrolle wurde in einem Ansatz pro Lauf und Zielgen statt DNA Wasser verwendet. Für die relative Quantifizierung wurde außerdem in zwei Ansätzen pro Lauf und Zielgen der jeweilige Kalibrator amplifiziert (siehe Kap. 5.3.6.2.2).

Das Standard real time PCR-Programm setzt sich aus folgenden Schritten zusammen:

# Zyklen	Programm	Analysis mode	Temperatur	Haltezeit	Acquisition mode
1	Denaturierung	None	95°C	10 min	None
38	Amplifikation	Quantification	95°C	0 sek	None
			60°C bzw. 62°C	10 sek	None
			72°C	20 sek	Single
1	Schmelzkurve	Melting curve	95°C	0 sek	None
			65°C	10 sek	None
			99°C	0 sek	Cont. (slope 0,2°C/sek)
1	Kühlen	None	40°C	30 sek	None

3.4 Chromatinimmunpräzipitation

3.4.1 Zellernte und Vernetzung der Zellkernbestandteile durch Formaldehyd

Für die Chromatinimmunpräzipitation wurden jeweils 2×10^8 Zellen verwendet, die durch Zentrifugation bei 300 g für 10 Minuten geerntet und nach zweimaligem Waschen in eiskaltem PBS in 20 ml kaltem RPMI 1640 resuspendiert wurden.

Im anschließenden Vernetzungsschritt wurde 37%iges Formaldehyd mit einer Endkonzentration von 1% zu den Zellen gegeben und bei RT rollend inkubiert. Die Inkubationszeit war von der jeweiligen Zelllinie abhängig, so betrug sie für 721 5 Minuten, für BL41-K3 7 Minuten und für BJAB-K3 10 Minuten. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden 2 ml 1,25 M Glycin zugegeben und für 5 Minuten bei RT inkubiert und danach auf Eis gestellt.

3.4.2 Isolierung der Zellkerne

Durch Zentrifugation bei 640 g und 4°C für 4 Minuten wurden die Zellen sedimentiert und anschließend zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen. Durch dreimaliges Waschen in je 20 ml kaltem Lysepuffer wurden die Kerne isoliert und das Sediment in 3 ml MNase Puffer resuspendiert.

Lysepuffer: 10 mM Tris/HCl (pH 7,5); 10 mM NaCl; 3 mM MgCl₂; 0,5% NP-40
MNase Puffer: 10 mM Tris/HCl (pH 7,5); 10 mM NaCl; 3 mM MgCl₂; 4% NP-40; 1 mM CaCl₂
unmittelbar vor Verwendung Zugabe von Complete Proteinase Inhibitor

3.4.3 Chromatinfragmentierung mittels Mikrokokken-Nuklease und Ultraschall

Das Chromatin wurde zunächst durch Zugabe von 50 U Mikrokokken-Nuklease fragmentiert. Nach einer 10minütigen Inkubation der Proben bei 37°C, wurde die Reaktion durch Zugabe von EGTA mit einer Endkonzentration von 3 mM gestoppt. Bei der Mikrokokken-Nuklease handelt es sich um ein Enzym, das bei Inkubation mit Zellkernen die doppelsträngige DNA zwischen den Nukleosomen schneidet und so bei einem partiellen Verdau Fragmente unterschiedlicher Größe generiert.

Um die Fragmentierung zu verbessern, wurde ein zweiter Fragmentierungsschritt mittels Ultraschall durchgeführt. Hierzu wurden die Proben auf eine Endkonzentration von 1% SDS und 35 mM NaCl eingestellt und auf Eis für 5 Minuten mit einer Amplitude von 35% sonifiziert. Die jeweilige Impulsdauer betrug 5 Sekunden, wobei zwischen den Impulsen eine Pause von 25 Sekunden eingehalten wurde. Die sonifizierten Proben wurden in Reaktionsgefäße aliquotiert und bei max. Geschwindigkeit bei 4°C für 10 Minuten

zentrifugiert. Die Überstände wurden in neue Reaktionsgefäße überführt und bei -80°C aufbewahrt.

Zur Überprüfung der DNA-Fragmentgrößen wurde die Vernetzung in einem $10\ \mu\text{l}$ Aliquot, wie in Kapitel 3.4.6 beschrieben, revertiert und die DNA in einem 1,5%igen Agarosegel aufgetrennt.

3.4.4 Immunpräzipitation der vernetzten Protein/DNA-Komplexe

Um die Anreicherung spezifischer DNA/Protein-Komplexe zu verfolgen, wurden neben dem Ansatz mit dem spezifischen Antikörper noch ein Ansatz mit einer Isotypkontrolle mitgeführt. Unter der Isotypkontrolle versteht man die Zugabe eines Antikörpers gleichen Isotyps, jedoch mit einer unterschiedlichen Antigenspezifität.

Für die Präzipitation der Immunkomplexe wurden pro Ansatz $150\ \mu\text{l}$ des Gesamtchromatins mit IP-Verdünnungspuffer auf ein Volumen von $1\ \text{ml}$ aufgefüllt. War das Chromatin bei -80°C gelagert, wurde es vor Verwendung bei max. Geschwindigkeit bei 4°C für $10\ \text{Minuten}$ abzentrifugiert. Dem so verdünnten Chromatin wurden $100\ \mu\text{l}$ des Antikörpers zugesetzt, wenn es sich um Hybridomzellüberstände handelte. Wurde ein aufkonzentrierter mono- oder polyklonaler Antikörper verwendet, wurden dem Chromatin $3\ \mu\text{l}$ zugegeben. Die Proben wurden dann über Nacht bei 4°C rollend inkubiert. Zur Präzipitation der Immunkomplexe wurden $100\ \mu\text{l}$ einer 50%igen Protein G-Sepharose-Suspension, die durch zweimaliges Waschen mit IP-Verdünnungspuffer prä-equilibriert worden war, zu den Proben gegeben und bei RT für $3\ \text{Stunden}$ rollend inkubiert.

IP-Verdünnungspuffer: 20 mM Tris/HCl (pH 8,0); 150 mM NaCl; 1% Triton X-100; 2 mM EDTA (pH 8,0)

3.4.5 Waschen und Elution der präzipitierten Immunkomplexe

Die Immunkomplexe wurden einmal mit $1\ \text{ml}$ Waschpuffer I, ein weiteres Mal mit $1,5\ \text{ml}$ Waschpuffer I, sowie je einmal mit $1\ \text{ml}$ Waschpuffer II und Waschpuffer III gewaschen, wobei die Proben mit dem jeweiligen Waschpuffer für $5\ \text{Minuten}$ bei RT unter Schütteln inkubiert wurden. Zwischen den einzelnen Waschschritten wurden die Immunkomplexe durch Zentrifugation bei $2000\ \text{g}$ für $2\ \text{Minuten}$ sedimentiert und der Überstand verworfen. Anschließend folgten $2\ \text{Waschschr}$ itte mit jeweils $1\ \text{ml}$ TE-Puffer und einer Inkubationszeit von $1\ \text{Minute}$ bei RT unter Schütteln. Die Proben wurden wiederum bei $2000\ \text{g}$ für $2\ \text{Minuten}$ zentrifugiert und die Überstände verworfen.

Zur Elution der Immunkomplexe wurden $200\ \mu\text{l}$ Elutionspuffer zu den Proben gegeben und für $15\ \text{Minuten}$ bei 65°C unter Schütteln inkubiert. Die Proben wurden anschließend bei $5000\ \text{g}$ für $2\ \text{Minuten}$ zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Der Elutionsschritt wurde mit weiteren $100\ \mu\text{l}$ Elutionspuffer wiederholt und die Überstände vereinigt.

Waschpuffer I:	20 mM Tris/HCl (pH 8,0); 150 mM NaCl; 2 mM EDTA (pH 8,0); 0,1% SDS; 1% Triton X-100; unmittelbar vor Verwendung Zugabe von Complete Proteinase Inhibitor
Waschpuffer II:	20 mM Tris/HCl (pH 8,0); 500 mM NaCl; 2 mM EDTA (pH 8,0); 0,1% SDS; 1% Triton X-100; unmittelbar vor Verwendung Zugabe von Complete Proteinase Inhibitor
Waschpuffer III:	20 mM Tris/HCl (pH 8,0); 2 mM EDTA (pH 8,0); 250 mM LiCl; 1% NP-40; 1% Na-Deoxycholat; unmittelbar vor Verwendung Zugabe von Complete Proteinase Inhibitor
Elutionspuffer:	25 mM Tris/HCl (pH 7,5); 10 mM EDTA (pH 8,0); 0,5% SDS

3.4.6 Proteinase K-Verdau und Phenolchloroform-Extraktion der immunpräzipitierten DNA

Das Eluat der Chromatinimmunpräzipitation (300 µl) wurde mit 20,5 µl Proteinase K (20 µg/µl) versetzt und für 1 Stunde bei 42°C und dann für mindestens 5 Stunden bei 65°C inkubiert.

Die Isolierung der DNA erfolgte durch die Phenolchloroform-Extraktion. Hierzu wurden die Proben mit dem gleichen Volumen eines Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisches (25:24:1) gründlich gemischt und anschließend 5 Minuten bei max. Geschwindigkeit zentrifugiert. Nach Zentrifugation bleiben die durch das Phenol denaturierten Proteine in der unteren organischen Phase oder bilden eine Interphase. Die obere Phase, die die DNA enthält, wurde zur Entfernung von Phenolresten einer Chloroformextraktion (Chloroform-Isoamylalkohol 24:1) unterzogen. Die DNA wurde dann durch Zugabe von 1 µl Glycogen (20 µg/µl) und 32 µl 8M LiCl, sowie 1 ml 100% Ethanol bei -80°C für 1 Stunde präzipitiert. Nach einer Zentrifugation für 10 Minuten bei max. Geschwindigkeit wurde das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 25 µl TE gelöst.

Wurde das Chromatin zur Überprüfung der Fragmentgrößen bzw. zur Berechnung des Inputs einer Proteinase K-Spaltung, sowie anschließender DNA-Präzipitation unterzogen, wurden 10 µl des Chromatins mit Elutionspuffer (siehe 3.4.5) auf 300 µl aufgefüllt. Die präzipitierte DNA wurde am Ende in 50 µl TE gelöst.

3.5 Proteinbiochemische Methoden

3.5.1 Herstellung von Zelllysaten

Für ein Western Blot Zelllysate wurden 1×10^7 Zellen für 10 Minuten bei 1200 rpm abzentrifugiert, mit PBS gewaschen und in 200 µl NP40-1% resuspendiert. Nach einer 30minütigen Inkubation auf Eis, wurde das Lysat im Branson Digital Sonifier W-250 D für 10-20 sec mit einer Amplitude von 10% beschallt. Um die Lysate von Membranbestandteilen und sonstigen Aggregaten zu reinigen, wurden sie für 15 Minuten bei max. Geschwindigkeit und 4°C abzentrifugiert und der Überstand bei -80°C gelagert.

NP40-1%: 150mM NaCl, 1% NP-40, 50mM Tris/HCl pH 8,0
unmittelbar vor Verwendung Zugabe von Complete Proteinase Inhibitor

3.5.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Bestimmung des Proteingehalts der Lysate wurde nach der Bradford-Methode durchgeführt. Der Nachweis beruht auf der Beobachtung von Bradford (1976), dass in einer sauren Lösung, die Coomassie Brilliant Blue enthält, das Absorptionsmaximum nach Ausbildung von Proteinkomplexen von 495 nm nach 595 nm verschoben wird.

Für den Nachweis wurden in einer Küvette 3-10 µl der Probe mit 1 ml der 1:5 mit Wasser verdünnter Bradford-Lösung gemischt und die Extinktion gegen einen entsprechenden Leerwert bei 595 nm gemessen.

Zur Berechnung der Proteinkonzentration war es notwendig eine Eichkurve mit verschiedenen Mengen (1 µg, 3 µg, 5 µg und 7 µg) von Rinder-Serumalbumin zu erstellen.

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

3.5.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung von Proteinen wurde die vertikale, diskontinuierliche Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) verwendet, die SDS als Detergenz enthält (Laemmli, 1970). SDS wirkt als denaturierendes anionisches Detergenz, das an Proteine proportional zu deren Molekulargewicht bindet. Durch seine negative Partialladung wird der gerichtete Lauf der Proteine im elektrischen Feld ermöglicht. Des Weiteren wird das Laufverhalten der Proteine auch durch ihre Aminosäurezusammensetzung beeinflusst, was zur Folge hat, dass mit dieser Methode nur das apparente Molekulargewicht bestimmt wird.

Standardmäßig wurden 8 oder 10%ige Trenngele und 5%ige Sammelgele aus einer 30% (w/v) Acrylamidlösung nach Sambrook et al.(1989) gegossen. In der Regel wurden 5 µl der Probe in 5 µl 2x Laemmli-Puffer aufgenommen und nach 10minütigem Kochen bei 95°C auf das Gel geladen. Von den Beads wurden in der Regel 10 µl mit 20 µl 2x Laemmli-Puffer versetzt und ebenfalls nach 10minütigem Kochen bei 95°C auf das Gel geladen.

Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte pro Gel bei 25 mA für ca. 60 Minuten. Das Gel wurde anschließend entweder auf eine PVDF-Membran geblottet, mit Coomassie gefärbt oder einer Silberfärbung unterzogen.

2x Laemmli Puffer: 2% SDS; 10% Glycerin; 10% β-Mercaptoethanol; 50 mM Tris/HCl (pH 6,8);
1 Spatelspitze Bromphenolblau

Elektrophorese-Laufpuffer: 25 mM Tris/Base; 0,2 M Glycin; 0,1% SDS

3.5.4 Western Blot

Die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden mittels elektrophoretischem Transfer auf eine PVDF- oder Nitrocellulose-Membran geblottet. Der Proteintransfer erfolgte in einer mit Transferpuffer gefüllten Kammer bei 400 mA für 1 Stunde. Im Anschluss an eine 30minütige Blockierung der Membran mit Blockpuffer folgte die Inkubation mit dem in Blockpuffer verdünnten Primärantikörper für eine Stunde oder über Nacht bei 4°C. Nach mehrfachem Waschen der Membran mit PBS/Tween wurde die Membran mit dem wiederum in Blockpuffer verdünnten, gegen den Isotyp des Primärantikörpers gerichteten, Sekundärantikörper inkubiert. Erfolgte die Detektion mit dem ECL™ System war der Sekundärantikörper mit dem Enzym Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppelt. Wurde die Detektion jedoch mit Hilfe des Odyssey Gerätes durchgeführt, handelte es sich um Fluoreszenz gekoppelte Sekundärantikörper.

Der Nachweis der gebundenen Antikörper erfolgte entweder durch die Messung der Fluoreszenz mit Hilfe des Odyssey Gerätes, oder mit dem "Enhanced Chemiluminescence" System (ECL™) von GE Healthcare. Hierbei bewirkt die Oxidation von Luminol durch die Peroxidase eine Lichtemission, die durch eine Exposition auf Röntgenfilmen sichtbar gemacht werden.

Transferpuffer:	20% Methanol; 0,1% SDS; 25mM Tris/Base; 192 mM Glycin
Blockpuffer:	5% Milchpulver; 50 mM Tris/HCl (pH 7,5); 150 mM NaCl
PBS/Tween:	0,05% Tween 20 in PBS

3.5.5 Trichloressigsäure (TCA) – Fällung

Um Proteine aus einer wässrigen Lösung zu fällen, wurden diese mit dem gleichen Volumen einer 20%igen Trichloressigsäure gemischt und für mindestens 20 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einer 10minütigen Zentrifugation bei max. Geschwindigkeit und 4°C wurde das Pellet zweimal mit 70% Ethanol gewaschen und luftgetrocknet. Das Pellet wurde dann in 2x Laemmli Puffer (siehe 3.5.3) resuspendiert und für 20 Minuten bei 70°C erhitzt.

3.5.6 Färbungen zur Darstellung von Proteinen im SDS-Gel

3.5.6.1 Silberfärbung

Alle für die Silberfärbung verwendeten Lösungen wurden immer frisch und erst kurz vor Gebrauch angesetzt.

Die Gele wurden nach dem Lauf für mindestens 2 Stunden in der Fix-Lösung fixiert, wobei die Lösung nach einer Stunde gewechselt wurde. Danach wurden die Gele zuerst für 20 Minuten in Rinse-Lösung und dann für 10 Minuten in bidest. Wasser geschwenkt. Um die Empfindlichkeit der Färbung zu steigern, wurden die Gele für 1 Minute in Imprägnierlösung gebadet und dreimal kurz (20 Sekunden) mit bidest. Wasser gewaschen. Für die

anschließende Färbung wurden die Gele für 45 Minuten in Färbelösung gegeben. Nach einem kurzen Waschen mit bidest. Wasser, um überschüssiges Silbernitrat zu entfernen, wurden die Gele in der Entwicklerlösung bis zum Sichtbarwerden der Banden unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch mindestens 5minütiges Schütteln in Stop-Lösung gestoppt.

Fix-Lösung:	10% Eisessig; 30% Ethanol
Rinse-Lösung:	20% Ethanol
Imprägnierlösung:	0,2% Natriumthiosulfat-Lösung
Färbelösung:	0,2% Silbernitrat
Entwicklerlösung:	0,5 mg/l Natriumthiosulfat; 0,025% Formaldehyd; 0,3% Natriumcarbonat
Stop-Lösung:	50% Methanol; 10% Eisessig

3.5.6.2 Coomassie-Färbung

Im Anschluss an eine SDS-Gelelektrophorese wurde das Gel für 15-30 Minuten in der Coomassie-Lösung geschüttelt. Nachdem sich das Gel stark blau gefärbt hatte, wurde die Coomassie-Lösung entfernt und das Gel entfärbt. Dies erfolgte entweder mit Coomassie-Fix durch mehrmaliges Wechseln der Lösung bis das Gel entfärbt war und nur noch die Proteinbanden blau gefärbt waren. Eine schonendere Entfärbung konnte durch alleiniges Schwenken in bidest. Wasser über Nacht erfolgen.

Coomassie-Lösung:	50% Methanol; 10% Essigsäure; 0,275% Coomassie Brilliant Blue R250
Coomassie-Fix:	50% Methanol; 10% Essigsäure

3.5.6.3 Coomassie-Färbung mit colloidalem Coomassie

Die Färbung erfolgte nach Herstellerangaben mit dem colloidalem Coomassie (Imperial Protein Stain) von Perbio Science.

3.5.7 Immunpräzipitation (IP)

Soweit nicht anders angegeben, wurden standardmäßig 1×10^7 Zellen pro Immunpräzipitationsansatz (IP-Ansatz) verwendet. Die Zellen wurden in PBS gewaschen und in 500 μ l Lysepuffer gründlich resuspendiert. Nach einer 30minütigen Inkubation auf Eis, wurde das Lysat im Branson Digital Sonifier W-250 D für 10-20 sek mit einer Amplitude von 10% beschallt und anschließend für 15 Minuten bei max. Geschwindigkeit und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 50 μ l Antikörperüberstand bzw. 4 μ g gereinigtem Antikörper versetzt und 1 Stunde auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 40 μ l einer 50%igen Protein G Sepharose Suspension, die zuvor dreimal in Lysepuffer äquilibriert wurde, folgte eine Inkubation von 1 Stunde bei 4°C unter Rollen.

Die Beads wurden bei 1000 g abzentrifugiert und dreimal mit je 500 μ l Lysepuffer (ohne Proteinaseinhibitoren) gewaschen. Die Beads wurden zur Elution der gebundenen Proteine

mit 30 µl 2x Laemmli Puffer (siehe 3.5.3) versetzt, gemischt und 10 Minuten bei 80°C erhitzt. Die IP-Eluate wurden dann bei -80°C gelagert.

Lysepuffer: 150 mM NaCl, 1% NP-40, 50 mM Tris/HCl pH 8,0
unmittelbar vor Verwendung Zugabe von Complete Proteinase Inhibitor

3.6 Protein-Reinigungen

3.6.1 Tandem Affinity Purification (TAP-Reinigung)

Die Beschreibung der TAP-Reinigung bezieht sich hier auf den unter 1.4.1 beschriebenen TAP-tag, bestehend aus Protein A, TEV und CBP.

Alle Schritte wurden auf Eis und mit gekühlten Puffern, sowie Zentrifugationsschritten bei 4°C durchgeführt. 1×10^9 der mit dem TAP-Fusionsprotein-Plasmid stabil transfizierten Zellen wurden abzentrifugiert, zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und anschließend in 20 ml Lysepuffer lysiert. Nach einer 30minütigen Inkubation auf Eis, wurden die Zellen zweimal bei einer Amplitude von 10% für je 30 sek sonifiziert. Zur Entfernung von Membranbestandteilen und sonstigen Aggregaten wurde das Lysat 15 Minuten bei max. Geschwindigkeit zentrifugiert.

Nach Zugabe von 800 µl IgG-Beads, erfolgte die Inkubation unter ständiger Bewegung auf einem Drehrad über Nacht bei 4°C. Die Beads wurden zweimal mit je 10 ml Lysepuffer gewaschen und einmal mit 10 ml TEV-Puffer. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Beads geteilt und jeweils in eine 2 ml Biospin-Säule überführt und in 1 ml TEV-Puffer aufgenommen. Die TEV-Spaltung erfolgte nach Zugabe von 150 U TEV Protease für 3 Stunden bei 16°C unter Rollen. Die Elution folgte gemäß dem Gesetz der Schwerkraft und wurde mit 500 µl Lysepuffer wiederholt. Für die Calmodulinbindung wurden die Eluate der beiden parallel durchgeführten TEV-Spaltungen vereinigt und in eine 10 ml Polyprep-Säule überführt, die 400 µl prä-äquilibrierte Calmodulinbeads enthielt. Nach Zugabe von 9 ml CBP-Puffer und 9 µl einer 1 M CaCl₂-Lösung erfolgte die Calmodulinbindung für 3 Stunden bei 4°C unter Bewegung. Anschließend wurden die Calmodulinbeads mit 30 ml CBP-Puffer gewaschen. Für die Elution der Proteinkomplexe wurden die Beads mit 1 ml CE-Puffer für 20 Minuten inkubiert. Der Elutionsschritt wurde einmal mit 1 ml CE-Puffer wiederholt. Die Eluate wurden vereinigt und bis zur weiteren Bearbeitung bei -80°C eingefroren.

Lysepuffer: 150 mM NaCl; 1% Igepal; 50 mM Tris/HCl (pH 8,0)
TEV-Puffer: 10 mM Tris/HCl (pH 8,0); 150 mM NaCl; 0,1% Igepal; 0,5 mM EDTA;
1 mM DTT (frisch zugeben)
CBP-Puffer: 10 mM Tris/HCl (pH 8,0); 10 mM β-Mercaptoethanol; 150 mM NaCl;
1 mM Mg-Acetat; 1 mM Imidazol; 2 mM CaCl₂; 0,1% Igepal
CE-Puffer: 10 mM Tris/HCl (pH 8,0); 10 mM β-Mercaptoethanol; 150 mM NaCl;
1 mM Mg-Acetat; 1 mM Imidazol; 2 mM EGTA; 0,1% Igepal

3.6.2 Tandem Immunpräzipitation (TIP-Reinigung)

Der erste Schritt der TIP-Reinigung entspricht dem der TAP-Reinigung, wie unter 3.6.1 beschrieben. Nach TEV-Spaltung erfolgte dann eine Immunpräzipitation, wie unter 3.5.7 beschrieben. Es wurden 2 ml des Antikörperüberstandes und 80 µl Protein G-Sepharose-Beads für die IP eingesetzt. Die Inkubation mit Antikörper und Beads erfolgte für 3 Stunden bei 4°C unter Bewegung. Die Beads wurden für die Elution der gebundenen Proteine mit 90 µl des 1xNuPAGE LDS-Ladepuffer versetzt und für 10 Minuten bei 80°C erhitzt.

3.6.3 GST pull down

3.6.3.1 Reinigung von GST-Fusionsproteinen nach bakterieller Expression

Für die Expression der GST-Fusionsproteine wurden die Expressionsplasmide zuerst frisch transformiert, auf Ampicillin enthaltenden LB-Platten ausgestrichen und über Nacht inkubiert. Mit Kolonien dieser Platten wurden jeweils 50 ml LB-Medium angeimpft und über Nacht geschüttelt. Am nächsten Tag wurde 1 Liter LB-Medium mit der Übernachtskultur angeimpft und bei 37°C bis zu einer OD₅₉₅ von 0,5-0,8 geschüttelt. Anschließend wurde die Expression der Fusionsproteine durch IPTG-Zugabe (Endkonzentration 1 mM) induziert und die Kulturen für 4 Stunden bei 30°C geschüttelt. Die Bakterienkultur wurde bei 4500 rpm für 10 Minuten abzentrifugiert und nach einmaligem Waschen in PBS in 20 ml Proteinase Inhibitor enthaltenden HEMGN-Puffer aufgenommen. Das Bakterienlysat wurde im Branson Digital Sonifier W-250 D dreimal 20 Sekunden mit einer Amplitude von 10% beschallt und anschließend bei 12000 rpm für 20 Minuten abzentrifugiert. Nach Zugabe von 100 µl GST-Sepharose-Beads, erfolgte eine 1stündige Inkubation bei 4°C. Die Beads wurden dreimal mit je 20 ml HEMGN-Puffer gewaschen und in 3 ml HEMGN-Puffer aufgenommen. Eine Aufbewahrung über Nacht bei 4°C war nach Proteinase-Inhibitor Zugabe möglich.

3.6.3.2 GST pull down

Pro Ansatz wurden 6×10^8 Zellen der Zelllinie DG75 abzentrifugiert, einmal mit PBS gewaschen und in 30 ml Lysepuffer aufgenommen. Nach einer 30minütigen Inkubation auf Eis, wurden die Zellen zweimal bei einer Amplitude von 10% für je 30 Sekunden sonifiziert. Zur Entfernung von Membranbestandteilen und sonstigen Aggregaten wurde das Lysat 15 Minuten bei max. Geschwindigkeit und 4°C zentrifugiert. Der Zellextrakt wurde dann für 2 Stunden bei 4°C unter Rollen mit den, an die Beads gekoppelten, GST-Fusionsproteinen inkubiert. Nach 4maligem Waschen der Beads mit je 20 ml HEMGN-Puffer, erfolgte die Elution der GST-Fusionsproteine und deren gebundener Proteine. Hierzu wurden die Beads mit 1 ml Elutionspuffer für 15 Minuten inkubiert. Dieser Schritt wurde ein weiteres Mal wiederholt. Die Überstände wurden vereinigt und konnten bei -80°C gelagert werden.

HEMGN-Puffer:	25 mM HEPES (pH 7,6); 0,1 mM EDTA (pH 8,0); 12,5 mM MgCl ₂ ; 10% Glycerol; 0,1% Igepal; 0,1 M KCl; 1 mM DTT
Lysepuffer:	150 mM NaCl; 50 mM Tris/HCl (pH 8,0); 1% Igepal
Elutionspuffer:	HEMGN-Puffer + 20 mM reduziertes Glutathion

3.7 Massenspektrometrie

3.7.1 Trypsin-Verdau

3.7.1.1 Trypsin-Verdau für direktes Aufspotten auf ein MALDI-Target

Für eine Charakterisierung der einzelnen durch Gelelektrophorese getrennten Proteine werden diese in der Gelmatrix enzymatisch in Peptide gespalten, um anschließend massenspektrometrisch analysiert zu werden. Hierzu wurden aus einem mit Coomassie gefärbten NuPAGE Gel (Fertiggele der Firma Invitrogen) Banden mit einem Skalpell unter der Umluft-Sterilbank ausgeschnitten und in ca. 1 mm große Gelwürfel zerteilt. Diese Gelwürfel wurden dann in ABC-Puffer aufgenommen und zweimal für jeweils 5 Minuten bei 37°C in diesem Puffer inkubiert bzw. gewaschen. Nach dem 15minütigen Reduktionsschritt mit 50 µl DTT-Lösung bei 55°C und der anschließenden Abkühlung der Gelstücke auf RT, wurden diese mit 50 µl Iodacetamid-Lösung alkyliert und 20 Minuten bei RT im Dunklen inkubiert. Es folgten drei Waschschriffe mit ABC-Puffer. Nach vollständiger Entfärbung aller Gelstücke wurden diese zweimal mit 100 µl 100% Acetonitril (ACN) für jeweils 15 Minuten inkubiert. Als Ergebnis der Acetonitrilbehandlung lagen die Gelstücke dann weiß und zusammengeschrumpft vor. Um restliches ACN zu beseitigen, wurden die Gelstücke offen bei RT für 15 Minuten inkubiert.

Für die enzymatische Spaltung wurden 5-10 µl der Trypsinlösung direkt auf die Gelstücke gegeben, 5 Minuten inkubiert und anschließend soviel Spaltpuffer zugegeben bis alle Gelstücke vollständig mit Puffer bedeckt waren. Die Spaltung erfolgte über Nacht bei 37°C.

Nach der enzymatischen Spaltung lagen die in der Gelmatrix eingebetteten Proteine nun als wesentlich kleinere Peptide vor, die dadurch aus der Gelmatrix isoliert werden konnten. Zunächst wurde der Überstand, der bereits Peptide enthält, abzentrifugiert und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Danach wurden die Gelstücke mit 10-20 µl Elutionspuffer bedeckt und für 5 Minuten in ein Ultraschallbad gestellt. Dieser Vorgang wurde solange wiederholt bis die Gelstücke weiß gefärbt und zusammengeschrumpft waren. Die vereinigten Eluate wurden in der Speed Vac zur Trockene eingeeengt und bei -20°C aufbewahrt. Um den Peptidverlust in den Reaktionsgefäßen möglichst gering zu halten, wurden für alle Schritte silikonisierte bzw. sogenannte „low bind“ Reaktionsgefäße verwendet.

Für die anschließende MALDI-MS/MS-Analyse wurden die Proben in 8 µl einer wässrigen Lösung (70% ACN; 0,1% TFA) aufgenommen.

ABC-Puffer:	50 mM Ammoniumcarbonat ; 30% Acetonitril (ACN)
Spaltpuffer:	10 mM Ammoniumcarbonat
DTT-Lösung:	45,38 mM DTT
Iodacetamid-Lösung:	18,6 mg in 1 ml bidest. Wasser (lichtempfindlich!)
Trypsinlösung:	0,03 µg/µl Trypsin (gelöst in Spaltpuffer)
Elutionspuffer :	80% Acetonitril; 1% Trifluoressigsäure

3.7.1.2 Trypsin-Verdau für LC-Lauf

Die Proben wurden nach der Proteinreinigung auf einem NuPAGE Gel (Invitrogen) aufgetragen und ca. 1 cm weit elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurden die Proteine mittels colloidalem Coomassie sichtbar gemacht. Unter einer Umluft-Sterilbank wurden zwei ca. 0,5 cm große Gelstücke ausgeschnitten und der unter 3.7.1.1 beschriebenen enzymatischen Spaltung unterzogen. Die Volumina der einzelnen Schritte wurde den größeren Gelstücken angepasst.

Für die weitere LC-MS/MS-Analyse wurden die Proben in 20 µl einer wässrigen 0,1% TFA Lösung gelöst.

3.7.2 Nano Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (nanoHPLC)

Zur Trennung des nach dem tryptischen Verdau erhaltenen Peptidgemisches wurde die Ultimate HPLC der Firma LC-Packings verwendet. Die Trennung erfolgte über eine Umkehrphase- oder Reverse-Phase Chromatographie (RP-HPLC). Die verwendeten Säulen enthalten poröse mit 18-Alkylketten beschichtete Silicapartikel, dem sogenannten C18-Material. An dieses C18-Material können Peptide entsprechend ihrer Hydrophobizität unterschiedlich stark binden und mit einem steigenden Acetonitril-(ACN) Gradienten eluiert werden.

Als Trennsäule wurde hier die firmeneigene PepMap C18-Säule (15 cm Länge) mit einem Innendurchmesser (ID) von 75 µm verwendet. Die Flußgeschwindigkeit des HPLC-Puffers (A: 0,1% Trifluoressigsäure (TFA) in Wasser; B: 80% ACN, 0,08% TFA in Wasser) betrug konstant 200 nl/min. Bei Trennung der Peptidgemische, erhalten aus TAP- und TIP-Reinigungen, wurden die Peptide zuerst über 50 Minuten mit einem linearen Gradienten von 5 bis 50% B aufgetrennt, dem dann noch ein linearer Gradient von 50 bis 100% B über 15 Minuten folgte. Abschließend wurde ein 10minütiger Waschschrift mit 100% B durchgeführt. Zur Entsalzung der Probe wurde der analytischen Säule eine kurze Vorsäule (5 x 0,3mm), die mit demselben C18-Material gefüllt war, vorgeschaltet. Die Vorsäule wurde mit einer zweiten HPLC-Pumpe (Fluss 20 µl/min; 0,1% TFA) betrieben. Nach der Trennung wurde die Absorption der Peptide in einem sogenannten „Nano-Flow-Cell“ UV-Detektor bei einer Wellenlänge von 214 nm und 280 nm gemessen. Bei 214 nm werden die Amidbindungen der Peptide gemessen und bei 280 nm die aromatischen Aminosäuren.

Zur Auftrennung des Peptidgemisches nach GST pull down wurden folgende zwei Gradienten verwendet: 90 Minuten 5 bis 50% B und 3 Minuten 50 bis 100% B. Der Waschschrift mit 100% B wurde über 6 Minuten durchgeführt.

3.7.3 MALDI-TOF/TOF bzw. LC-MALDI-TOF/TOF

Mit dem hier verwendeten MALDI-TOF/TOF-Instrument (Proteomanalyzer 4700) wurden ausschließlich Peptide mit einer Masse von 900 bis 4000 Da massenspektrometrisch analysiert.

Nach der Ionisation der Moleküle mittels der MALDI-Technik werden die Ionen in Richtung TOF-Analysator beschleunigt, wobei die Fluggeschwindigkeit der Ionen direkt proportional zu $1/\sqrt{m}$ (m = Ionenmasse) ist. Demzufolge benötigen schwerere Ionen für den Flug in einer feldfreien Driftstrecke länger als leichtere. Über diese benötigte Flugzeit für eine definierte Strecke im Hochvakuum kann die Masse der einzelnen geladenen Moleküle sehr genau bestimmt werden (Time-of-flight). Mit dem hier verwendeten Gerät ist es zusätzlich möglich, die MS/MS-Technik, auch MS-Sequenzierungstechnik genannt, die sich zur Peptid-/Protein-Identifizierung eignet, anzuwenden (siehe auch 4.2.5). So werden einzelne Peptide, sogenannte Precursor, selektiert (TOF_1), in der Kollisionszelle mit Inertgas zur Kollision gebracht und dadurch fragmentiert. Diese Bruchstücke werden dann wiederum analysiert (TOF_2). Die Peptide zerfallen bei der Kollision in charakteristische Fragmente. Die einzelnen Bruchstücke werden nach der Nomenklatur von Roepstorff und Fohlmann mit verschiedenen Buchstaben bezeichnet (Abb. 3.1). Die Bruchstücke, die durch die Spaltung der labilen Amidbindung zwischen den einzelnen Aminosäuren erzeugt werden, treten am häufigsten auf und sind am informativsten. Mit b-Ionen werden die Ionen bezeichnet, wenn sie den N-Terminus des ursprünglichen Peptids enthalten und mit y-Ionen, wenn sie den C-Terminus beinhalten. Je nach Art der Fragmentierung treten noch a-, c-, x- und z-Ionen auf (Abb. 3.1). Aufgrund der hohen Kollisionsenergie kommt es bei MALDI-TOF/TOF-Instrumenten zusätzlich noch zur Fragmentierung der Aminosäuren-Seitenketten, wodurch die beiden massenidentischen Aminosäuren Leucin und Isoleucin unterschieden werden können (Medzihradszky et al., 2000).

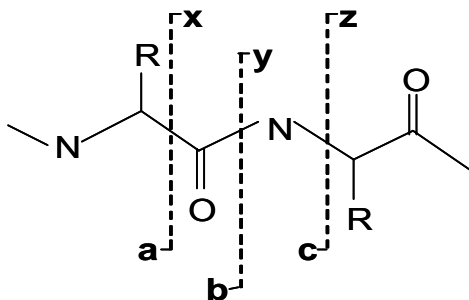


Abb. 3.1: Bezeichnung und Schema der Fragmentierung von Peptiden

Gezeigt sind die Bruchstellen der einzelnen Fragmente mit ihrer Bezeichnung nach Roepstorff und Fohlmann (Roepstorff and Fohlman, 1984).

Für alle Messungen wurde α -Cyano-4-hydroxymethylsäure (CHCA) als MALDI-Matrix (2,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ in 70% ACN; 0,1% TFA) aufgrund der gleichmäßigen Kristallisation, sowie der hohen MS-Sensitivität im niederen Molekulargewichtsbereich verwendet.

3.7.3.1 Präparation der Proben für direktes Besspotten der MALDI-Targets

Die Peptide für eine erfolgreiche MALDI-Messung sollten ohne Kontaminationen und möglichst salzfrei sein. Daher wurden die meisten Proben mit Hilfe von C18-Material enthaltenden Zip-Tips nach der Vorschrift des Herstellers entsalzt und gereinigt.

Bei den Zip-Tips handelt es sich um C18-Säulen, an die Peptide ihrer Hydrophobizität entsprechend binden können, Salze hingegen werden unter den hydrophilen Waschbedingungen entfernt.

Auf ein 192 well MALDI-Stahltarget wurden 0,5 μl der zu analysierenden Peptidlösung pipettiert, bei RT getrocknet und anschließend 0,5 μl der Matrixlösung auf den getrockneten Spot pipettiert. Nachdem das Lösungsmittel verdampft war, wurden die Proben sofort massenspektrometrisch analysiert.

3.7.3.2 Automatisches Besspotten der MALDI-Targets nach HPLC-Trennung

Von der UV-Zelle aus wurden die getrennten Peptide über eine Fused-Silica Kapillare zu einem Pipettier-Roboter (Probot, LC Packings) geleitet. Dort wurde die Peptidlösung mit der Matrixlösung in einem Verhältnis von 1:4 gemischt. Bei weniger komplexen Proben (TAP und TIP gereinigt) wurden pro LC-Lauf 275 Fraktionen á 17 Sekunden und bei komplexeren Proben (GST-Eluat) aufgrund des längeren Gradienten 275 Fraktionen á 26 Sekunden automatisch auf das „Blank“ MALDI-Stahltarget gespottet.

3.7.3.3 Verwendete Messparameter

Die Kalibrierung des MALDI-Instruments erfolgte bei jedem Lauf neu mit Hilfe eines Standardpeptid-Mix im Massenbereich von 700 Da - 3200 Da. Der eingebaute N_2/YAG -Laser wurde auf eine Frequenz von 200 Hz und einer Wellenlänge von 355 nm eingestellt. Für ein MS-Spektrum wurden 2900 Laserschüsse ausgeführt und aufaddiert. Bei den folgenden MS/MS-Spektren wurde die Anzahl der Laserschüsse auf 4000 und die Laserenergie gegenüber der MS-Messung um 1000 Einheiten erhöht. Für die Fragmentierung der Peptide diente Luft als Kollisionsgas.

3.7.4 Datenbanksuche

Die enorme Menge an gewonnenen Daten einer Proteomanalyse können ohne Hilfe der Bioinformatik nicht mehr ausgewertet werden.

Hier wurden die gewonnenen MS/MS-Spektren in die GPS-Explorer 3.5 Software (Applied Biosystems) eingeladen und dort mit Hilfe des integrierten MASCOT-Programms (Perkins et al., 1999) ausgewertet. Die Auswertung der MS/MS-Daten und somit die Identifizierung der Proteine, wurde ausschließlich mit einer Suche gegen die öffentlich zugängliche SwissProt Proteindatenbank durchgeführt. Für die Suche wurden folgende Suchparameter verwendet: Als Taxon wurde Homo sapiens (zur Suche assoziierter Proteine) bzw. „other viruses“ (zur Suche von EBNA-2) gewählt, das verwendete Enzym zur Spaltung war Trypsin. Als fixe Modifikation wurde die Carbamidmethylierung gewählt und die Methioninoxidation als variable Modifikation. Es wurde mit einer Missspaltung („miss cleavage“) von 2 und einer Massentoleranz von 100 ppm gesucht. Bei der Suche wurden von dem Programm auch nur Treffer berücksichtigt, die mindestens einen „Peptiderank“ von 3 aufwiesen. Dieser „Peptiderank“ gibt die Peptidübereinstimmung in Zahlen von 1 bis 10 an, wobei 1 die beste Übereinstimmung widerspiegelt.

Als Ergebnis erhält man den „Total Ion Score“ und den „Best Ion Score“ als Konfidenzintervall in %. Der „Best Ion Score“ in % gibt die Wahrscheinlichkeit an, mit der das beste Peptide eines Proteins identifiziert worden ist. Der „Total Ion Score“ in % berechnet sich aus allen Einzelscores („Best Ion Score“) der gefundenen Peptide.

Bei der Proteinidentifizierung ist zu beachten, dass jeweils nur berechnet werden kann, mit welcher Wahrscheinlichkeit ein Peptid bzw. Protein korrekt identifiziert worden ist. Die Wahrscheinlichkeit für richtig identifizierte Proteine wurde hier auf $\geq 95\%$ gesetzt. Das heißt von 100 identifizierten Proteinen können 5 falsch identifiziert worden sein. Somit wurden alle Proteine, die einen Total Ion Score $\geq 95\%$ hatten, berücksichtigt. Von Proteinen, die einen geringeren Total Ion Score als 95% aufwiesen, jedoch einen Best Ion Score $\geq 80\%$ besaßen, wurden die MS/MS-Spektren manuell näher betrachtet. Zeigten diese Proteine nahezu durchgehende y- und/oder b-Ionen Serien, d.h. waren $\geq 75\%$ der theoretisch möglichen Fragmente vorhanden, wurden die Proteine als signifikant gewertet.

4 Ergebnisse

Ziel meiner Untersuchungen war die Beschreibung potentieller alternativer oder komplementärer Mechanismen, über die EBNA-2 die Transaktivierung zellulärer Zielgene reguliert. Die Arbeit gliedert sich in zwei große Hauptteile.

Im ersten Teil wird die Identifikation von EBNA-2-Binderegionen in EBNA-2-Zielgenen beschrieben. Hier wird auf die drei zellulären Zielgene SLAMF1, DNASE1L3 und CCL3 näher eingegangen. Zuerst wird beschrieben, ob EBNA-2 direkt an diese drei Zielgene bindet. Dann wird die Binderegion von EBNA-2 in diesen Zielgenen bestimmt und anschließend die Chromatinmodifikation in den entsprechenden Regionen charakterisiert. All diese Untersuchungen wurden mit Hilfe der Methode der Chromatinimmunpräzipitation (ChIP) durchgeführt. Als letztes wird der Promotorbereich des CCL3-Zielgens anhand einer Promotor-Reporterstudie näher betrachtet.

Der zweite Teil der Arbeit beschreibt eine Proteomics-Analyse zur Identifikation neuer assoziierter Proteine von EBNA-2 und/oder CBF1. Zur Aufreinigung nativer Multiproteinkomplexe von EBNA-2 und CBF1 wurde die Methode der „Tandem affinity purification“ (TAP-Reinigung) verwendet, die von der Arbeitsgruppe Seraphin in Hefe entwickelt wurde (Rigaut et al., 1999). Diese Reinigungstechnik wurde in dieser Arbeit für die Anwendung in B-Zellen optimiert. Eine Aufreinigung von Komplexen wurde auch mit der GST pull down Methode, sowie der TIP-Reinigung, einer modifizierten TAP-Reinigung, durchgeführt. Die gereinigten Komplexe wurden jeweils anschließend mittels LC-MALDI-TOF/TOF analysiert. Die potentiellen Interaktionspartner wurden dann näher betrachtet. So wurde untersucht, ob sie nur mit EBNA-2 oder CBF1 interagieren, oder aber auch mit beiden Proteinen. Des Weiteren wurde überprüft, ob eine Interaktion mit EBNA-2 abhängig von CBF1 war.

Abschließend konnte die Interaktion von EBNA-2 mit dem potentiellen Interaktionspartner TFE3 mit einer unabhängigen Methode bestätigt werden.

4.1 Identifizierung von EBNA-2-Binderegionen in EBNA-2-Zielgenen

Die Ausgangssituation zu Beginn meiner Arbeit waren die neu beschriebenen zellulären EBNA-2-Zielgene, die in einem genomweiten Affymetrix-Screen, der im Labor von B. Kempkes durchgeführt wurde, identifiziert wurden (Maier et al., 2006). Der Affymetrix-Screen wurde in den beiden Zelllinien BJAB-K3 und BL41-K3 durchgeführt. Diese beiden EBV negativen Zelllinien sind jeweils stabil mit dem ER/EBNA-2-Konstrukt transfiziert (Kempkes et al., 1995a). Zwölf Zielgene, die in beiden Zelllinien mehr als 3,5fach induziert waren, wurden mit einer unabhängigen Methode, der Real Time PCR, bestätigt.

Bei zellulären Zielgenen ist der Mechanismus der Transaktivierung durch EBNA-2 im Gegensatz zu viralen Zielgenen nur wenig untersucht. Lediglich im Promotor zweier zellulärer Zielgene konnten bisher EBNA-2 responsive Elemente gefunden werden. Im Promotor des CD23-Gens konnte ein EBNA-2 responsives Element gefunden werden. In einer Promotor-Reporter-Gen-Studie und in „Electrophoretic mobility shift assay“ (EMSA) konnte die Bindung von CBF1 an das responsive EBNA-2-Element bestätigt werden (Ling et al., 1994; Wang et al., 1991). Im Promotor des FcRH5-Gens konnte die Arbeitsgruppe Tolnay erst kürzlich vier CBF1-Bindestellen beschreiben und auch die EBNA-2-Bindung an drei dieser CBF1-Bindestellen nachweisen, sowie die Bindung von CBF1 an allen Bindestellen (Mohan et al., 2006).

Bei allen anderen Zielgenen sind bisher keine CBF1-Bindestellen im Promotor in der Literatur beschrieben worden. Jedoch konnte bei CD21 und c-myc eine CBF1-Bindestelle im ersten Intron nachgewiesen werden (Übersichtsartikel: Kieff and Rickinson, 2007; Makar et al., 1998), an die auch CBF1 bindet (Makar et al., 2001; Diplomarbeit: Popp 2002). Ob EBNA-2 an diese CBF1-Bindestellen auch binden kann, ist bisher in der Literatur nicht beschrieben worden.

4.1.1 EBNA-2 bindet direkt an Genfragmente in SLAMF1, DNASE1L3 und CCL3

Zu den in unserer Arbeitsgruppe neu identifizierten und durch Real Time PCR bestätigten EBNA-2-Zielgenen gehören auch SLAMF1, SAMS1, CCL3, CDK5R1, ABHD6 und DNASE1L3 (Maier et al., 2006). Im Folgenden sollte untersucht werden, ob EBNA-2 direkt an potentielle CBF1-Bindestellen und/oder den Transkriptionsstart (TS) in diesen Genen bindet. Mit dem Programm Genomatix MatInspector wurden jeweils die Promotorsequenz von -3000 bp bis zum Transkriptionsstart und das erste Intron nach potentiellen CBF1-Bindestellen abgesucht. Die Betrachtung von potentiellen CBF1-Bindestellen wurde auf diejenigen beschränkt, die die Sequenz 5'-gtggaa-3' aufwiesen.

Für einige potentielle CBF1-Bindestellen und für einige Transkriptionsstarts wurden Primer etabliert mit denen nach einer Chromatinimmunpräzipitation (ChIP) die EBNA-2-Bindung untersucht werden konnte.

Die ChIP-Technik ist eine immer häufiger verwendete biochemische Methode zur Untersuchung von Interaktionen zwischen Protein und DNA *in vivo* (Gohring and Fackelmayer, 1997; Orlando, 2000; Orlando et al., 1997). Um eine kovalente Vernetzung von Proteinen und DNA zu erreichen, werden proliferierende Zellen für kurze Zeit mit einer 1%igen Formaldehyd-Lösung inkubiert. Die Dauer dieses Vernetzungsschritts ist für die erfolgreiche Durchführung der Methode essentiell. Um eine Immunpräzipitation durchführen zu können, muss das Chromatin fragmentiert werden. Für eine hohe Auflösung sind kleine Fragmente nötig. Die Fragmentierung des Chromatins wird auf zwei Weisen erreicht. Zuerst erfolgt eine Behandlung mit dem Enzym Mikrokoccus Nuklease (MNase) und anschließend eine Sonifikation des Chromatins. Mit dem so fragmentierten Chromatin kann die Immunpräzipitation mit spezifischen Antikörpern durchgeführt werden. Parallel dazu werden auch immer Immunpräzipitationen mit den jeweiligen Isotypkontrollen durchgeführt. Anschließend wird die Vernetzung durch einen Proteinase K-Verdau revertiert und die DNA-Fragmente ausgefällt. Mit spezifischen Primern können in einer Real Time PCR die erhaltenen DNA-Fragmente analysiert werden. Die vier Hauptschritte der ChIP - Vernetzung, Fragmentierung, Immunpräzipitation und Revertierung mit DNA-Fällung - sind in Abbildung 4.1 schematisch dargestellt.

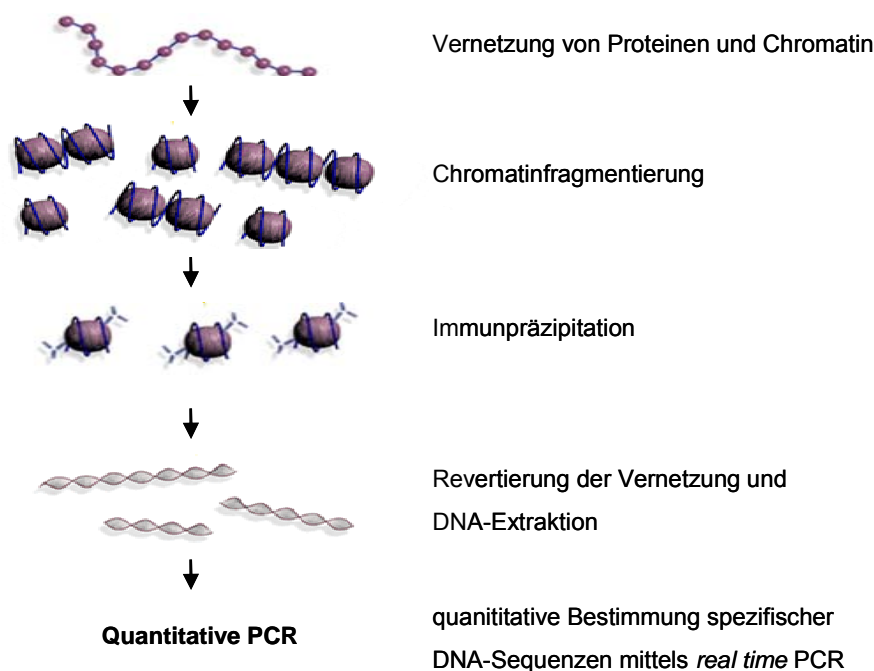


Abb. 4.1: Prinzip der Chromatinimmunpräzipitation

In schematischer Form ist das Prinzip der Chromatinimmunpräzipitation abgebildet. Als erstes erfolgt die Vernetzung von Protein und Chromatin mittels Formaldehydinkubation. Durch Sonifikation und Mikrokoccus-Nuklease-Behandlung des Chromatins wird dieses in kleine Fragmente gespalten. Danach erfolgt die Immunpräzipitation mit spezifischen Antikörpern. Die präzipitierten Immunkomplexe werden gewaschen und anschließend die Protein/DNA-Vernetzung revertiert. Die gefällten DNA-Fragmente können über quantitative PCR weiter untersucht werden.

Zum Nachweis der direkten EBNA-2-Interaktion mit potentiellen CBF1-Bindestellen der Gene CD21, SLAMF1, SAMS1, CCL3, CDK5R1, ABHD6 und DNASE1L3 wurde von 2×10^8 Zellen der EBV positiven Zelllinie 721 das Chromatin isoliert. In Abbildung 4.2A sind Aliquots der einzelnen Schritte zur Chromatinfragmentierung in einem Agarosegel aufgetrennt. Es zeigt sich deutlich, dass die Fragmente nach dem MNase Verdau (Spur 2) noch nicht der gewünschten Größe ≤ 1000 bp entsprechen. Erst nach dem Sonifikationsschritt weist das Chromatin Fragmente in einem Bereich von 400 bp bis 1000 bp auf (Spur 3). Die Größe der Fragmente wurde für alle verwendeten Chromatinpräparationen überprüft.

Die Immunpräzipitation wurde mit dem EBNA-2 spezifischem Antikörper 1E6 und einer Isotypkontrolle, dem GST spezifischen Antikörper, durchgeführt.

Zunächst wurde für alle zu untersuchenden Genfragmente ein spezifisches Primerpaar etabliert. Die Anreicherung dieser Genfragmente wurde dann in einer Real Time PCR nach der EBNA-2 spezifischen Immunpräzipitation im Vergleich zur Kontrollimmunpräzipitation untersucht und als ΔC_p -Wert in Abbildung 4.2B graphisch dargestellt. Da die DNA-Menge nach der Formel 2^{C_p} berechnet wird, entspricht ein ΔC_p -Wert von 1 einer 2-fachen Anreicherung. Im Folgenden wird immer dann von einer Anreicherung der Genfragmente ausgegangen, wenn das p -Value $< 0,05$ war und der ΔC_p -Wert ≥ 1 .

Jede Chromatinimmunpräzipitation wurde zuerst einer Qualitätskontrolle unterzogen. Dazu wurde die Anreicherung eines CD23-Genfragments, das die CBF1-Bindestelle bei -172 bp im Promotor beinhaltet, nach der Immunpräzipitation untersucht. Die C_p -Werte lagen für alle Chromatinpräparationen zwischen 2,2 und 3,8 und das p -Value bei $p=0,007$.

Ob EBNA-2 an potentielle CBF1-Bindestellen oder den Transkriptionsstart bindet, wurde für die Gene CD21, SLAMF1, SAMS1, CCL3, CDK5R1, ABHD6 und DNASE1L3 in der EBV positiven Zelllinie 721 untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.2B graphisch dargestellt.

Eine EBNA-2-Bindung konnte an der potentiellen intronischen CBF1-Bindestelle bei +422 bp im DNASE1L3-Gen mit einem p -Value von $p=0,0076$ nachgewiesen werden. Außerdem bindet EBNA-2 an den Transkriptionsstart der Gene SLAMF1 und CCL3, obwohl sich dort keine potentielle CBF1-Bindestelle befindet.

Die EBNA-2-Bindung an den Transkriptionsstart des Gens DNASE1L3 liegt zwar knapp unterhalb des definierten ΔC_p -Werts von 1, kann jedoch aufgrund des p -Values von $p=0,0129$ als signifikant gewertet werden. Für den Bereich des Transkriptionsstarts von CD21 und CDK5R1 konnte jeweils kein geeignetes Primerpaar etabliert werden, da es sich hier um sehr GC-reiche Bereiche handelte. Somit konnte nicht untersucht werden, ob auch hier eine EBNA-2-Bindung im Bereich des Transkriptionsstarts stattfindet.

Der Nachweis einer EBNA-2-Bindung an den Transkriptionsstart in den Genen SAMS1 und ABHD6 gelang nicht. Des Weiteren konnte in den Genen CD21, SLAMF1, SAMS1, CCL3, CDK5R1 und ABHD6 keine EBNA-2-Bindung an eine potentielle CBF1-Bindestelle nachgewiesen werden.

Bei den nachgewiesenen EBNA-2-Bindungen an den Bereich des Transkriptionsstarts in den Genen SLAMF1, CCL3 und DNASE1L3 handelt es sich nicht um Signale, die aufgrund einer geringen Auflösungsgrenze, von benachbarten Gensegmenten mit weiteren potentiellen CBF1-Bindestellen stammen. Ein Hinweis ist die Tatsache, dass an der TS-Stelle des SLAMF1-Gens ein sehr deutliches Signal von 3 Δ Cp-Werten vorliegt, bei der nahegelegenen potentiellen CBF1-Bindestelle +686 bp jedoch nur ein Δ Cp-Wert von 0,5. Bei dem CCL3-Gen weist die TS-Stelle einen Δ Cp-Wert von 1,2 auf, die nahegelegene CBF1-Bindestelle -346 bp nur einen Δ Cp-Wert von 0,5.

Im Weiteren sollten die drei Gene SLAMF1, CCL3 und DNASE1L3, bei denen eine EBNA-2-Bindung nachgewiesen werden konnte, näher untersucht werden. Bei allen drei Genen ist die Transaktivierung durch EBNA-2 von CBF1 abhängig (Maier et al., 2006). Die Lokalisation der potentiellen CBF1-Bindestellen ist in diesen drei Genen jedoch unterschiedlich und könnte eventuell in verschiedenen Mechanismen der Transaktivierung durch EBNA-2 resultieren.

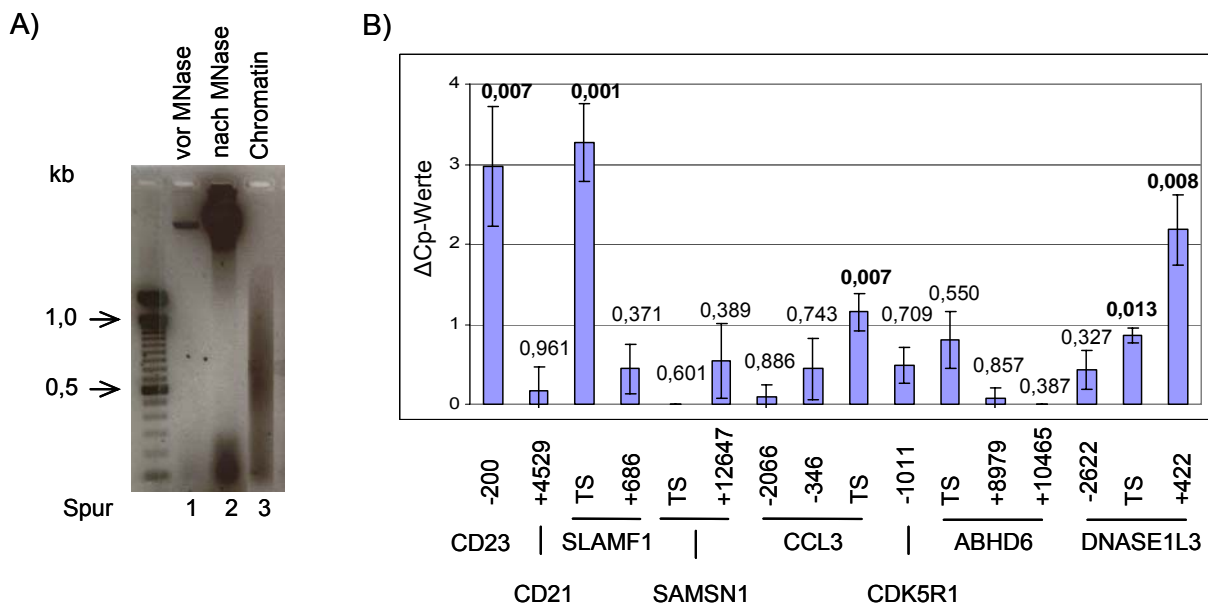


Abb. 4.2: EBNA-2 bindet direkt an Genfragmente in SLAMF1, CCL3 und DNASE1L3

2×10^8 Zellen der Zelllinie 721 wurden mit Formaldehyd inkubiert, mit Mikrokoccus Nuklease verdaut und sonifiziert. (A) Die Chromatinfragmente von 721 weisen Größen zwischen 400 bp und 1000 bp auf. Es wurde ein Aliquot vor (Spur 1) und nach (Spur 2) Mikrokoccus Nuklease (MNase) Verdau aufgetragen, sowie des sonifizierten Chromatins (Spur 3). Bei allen Aliquots wurde eine Revertierung der Vernetzung durchgeführt, die DNA-Fragmente gefällt und auf einem 1,5%igen Agarosegel aufgetrennt. (B) Das fragmentierte Chromatin wurde mit dem EBNA-2 spezifischen Antikörper 1E6 und einer entsprechenden Isotypkontrolle immunpräzipitiert. Die ausgefällten DNA-Fragmente wurden in einer quantitativen PCR als Template eingesetzt und analysiert. Gezeigt ist der Δ Cp-Wert, der den Unterschied zwischen der Zunahme des DNA-Gehalts der EBNA-2-Präzipitate relativ zur Isotypkontrolle wiedergibt. Die DNA-Menge entspricht 2^{Cp} . Alle dargestellten Ergebnisse sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten und derer Standardabweichung. Über den einzelnen Balken ist das jeweilige p-Value angegeben. TS= Transkriptionsstart

4.1.2 Charakterisierung der Chromatinmodifikation des Transkriptionsstarts und seiner angrenzenden Bereiche im Promotor und 1. Exon-Intron-Bereich der Gene SLAMF1, DNASE1L3 und CCL3

In den drei Genen SLAMF1, DNASE1L3 und CCL3, die eine EBNA-2-Bindung aufwiesen, sollten nun die molekularen Mechanismen der Transkription im Bereich des Transkriptionsstarts und der angrenzenden Bereiche des Promotors und des 1. Exon-Intron-Bereichs näher analysiert werden. Hierzu wurde eine ChIP-Analyse mit verschiedenen Antikörpern zur Untersuchung der Histonmodifikation, der Rekrutierung und Phosphorylierung der Polymerase II (Pol II) und wiederum der EBNA-2-Bindung durchgeführt.

Als experimentelles System wurde die EBV negative Zelllinie BJAB-K3, die stabil mit dem ER/EBNA-2-Konstrukt transfiziert ist, gewählt (Kempkes et al., 1995a). Bei Östrogenzugabe kann ER/EBNA-2 seine aktive Konformation einnehmen und seine Funktionen ausführen, ohne zuerst synthetisiert werden zu müssen. Da EBNA-2 nach Induktion nicht synthetisiert werden muss, können Effekte, die auf EBNA-2 zurückzuführen sind, schon sechs Stunden nach EBNA-2-Induktion beobachtet werden.

Für die folgenden ChIP-Experimente wurden BJAB-K3-Zellen für sechs Stunden mit oder ohne Östrogen kultiviert und anschließend von jeweils 2×10^8 Zellen das Chromatin isoliert. Zur Kontrolle der erhaltenen Fragmentgrößen wurden Aliquots der einzelnen Fragmentierungsschritte entnommen, die Vernetzung revertiert und auf einem 1,5%igen Agarosegel aufgetrennt. In Abbildung 4.3A ist deutlich zu erkennen, dass die Behandlung mit MNase (Spur 2 und 7) alleine, weder bei der mit Östrogen inkubierten, noch der unbehandelten BJAB-K3-Zelllinie ausreichte, um Fragmentgrößen im Bereich von 500 bp bis 1000 bp zu erhalten. Erst nach der Sonifikation konnte eine Fragmentgröße von 500 bp bis 1000 bp erreicht werden (Spur 1-3 und 8-10). Des Weiteren ist deutlich zu erkennen, dass die erhaltenen Chromatinmengen zwischen den einzelnen Präparationen (Spur 3-5 und Spur 8-10) variieren, obwohl die Ausgangsmenge in beiden Fällen 2×10^8 Zellen betrug. Bei der Auswertung der nachfolgenden ChIP-Experimente wird dieser Unterschied in der Ausbeute ausgeglichen, indem das Ergebnis in Prozent der Ausgangsmenge wiedergegeben wird.

Die Qualität des Chromatins wurde auch am Erfolg der EBNA-2-Bindung nach Östrogeninduktion bestimmt. Hierfür wurde die EBNA-2-Bindung an der bereits beschriebenen CBF1-Bindestelle bei -172 bp im Promotor des CD23-Gens überprüft.

Es wurde jeweils eine Immunpräzipitation mit einem EBNA-2 spezifischen Antikörper und einer entsprechenden Isotypkontrolle durchgeführt. Das Ergebnis eines repräsentativen Experiments ist in Abbildung 4.3B graphisch wiedergegeben. Gezeigt ist der ΔC_p -Wert, der die Zunahme des DNA-Gehalts der EBNA-2-Präzipitate relativ zur Isotypkontrolle wiedergibt. Bei der ChIP-Analyse ohne Östrogeninduktion konnte erwartungsgemäß keine EBNA-2-Bindung im CD23-Promotor nachgewiesen werden. Mit Östrogen betrug der ΔC_p -Wert 3.

Dies entspricht einer 8-fachen relativen Zunahme der EBNA-2-Bindung nach Östrogeninduktion. Auch bei den ChIP-Experimenten in der Zelllinie 721 wurden für die EBNA-2-Bindung im CD23-Gen ähnliche ΔC_p -Werte (2,2 bis 3,8) erhalten (vgl. 4.1.1).

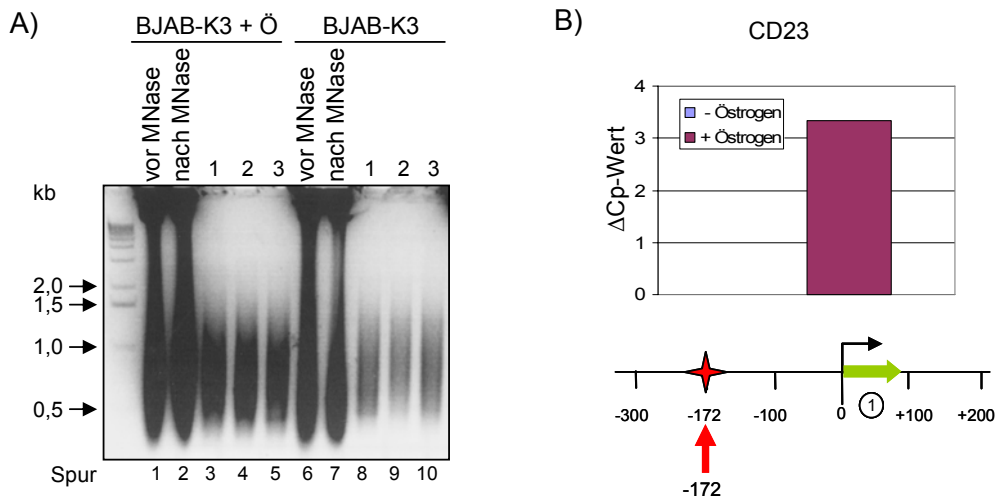


Abb. 4.3: Darstellung der Fragmentgrößen von BJAB-K3-Chromatinen und Nachweis der EBNA-2-Bindung an das CD23-Gen

BJAB-K3-Zellen wurden entweder für sechs Stunden mit Östrogen zur Induktion von EBNA-2 behandelt, oder blieben zur Kontrolle unbehandelt. Das Chromatin von je 2×10^8 Zellen wurde mit Formaldehyd vernetzt, mit Mikrokoccus Nuklease verdaut und sonifiziert. (A) Die Chromatinfragmente von BJAB-K3 weisen Größen zwischen 500 bp und 1000 bp auf. Es wurde ein Aliquot vor (Spur 1 bzw. 6) und nach (Spur 2 bzw. 7) Mikrokoccus Nuklease Verdau aufgetragen, sowie des sonifizierten Chromatins (Spur 3-5 bzw. 8-10). Bei allen Aliquots wurde eine Revertierung der Vernetzung durchgeführt, die DNA-Fragmente gefällt und auf einem 1,5%igen Agarosegel aufgetrennt. (B) EBNA-2-Bindung im Promotor des CD23-Gens. Schematische Darstellung eines Ausschnitts des CD23-Gens. Der hellgrüne Pfeil kennzeichnet das 1. nichttranslatierte Exon. Die CBF1-Bindestelle ist als roter Stern abgebildet. Der Transkriptionsstart wird durch den schwarzen Pfeil gekennzeichnet. Der rot hervorgehobene Pfeil markiert ein Primerpaar, das den Bereich mit der CBF1-Bindestelle amplifiziert. Das fragmentierte Chromatin wurde mit dem EBNA-2 spezifischen Antikörper 1E6 und einer entsprechenden Isotypkontrolle immunpräzipitiert. Die ausgefällten DNA-Fragmente wurden in einer quantitativen PCR als Templat eingesetzt und analysiert. Gezeigt ist der ΔC_p -Wert eines repräsentativen Experiments. Der ΔC_p -Wert gibt die Zunahme des DNA-Gehalts der EBNA-2-Präzipitate relativ zur Isotypkontrolle wieder, wobei die DNA-Menge 2^{C_p} entspricht. In blau ist die Situation ohne Östrogen (-) und in violett mit Östrogen (+) dargestellt.

Mit verschiedenen Chromatinpräparationen, die wie oben beschrieben präpariert und überprüft worden sind, wurden Immunpräzipitationen mit spezifischen Antikörpern und entsprechender Isotypkontrollen durchgeführt. Eine genaue Beschreibung der verwendeten Antikörper und Isotypkontrollen befindet sich im Materialteil unter 2.5.

Mit den verschiedenen Immunpräzipitationen sollten folgende Fragen geklärt werden:

- (i) Kann eine EBNA-2-Bindung an potentiellen CBF1-Bindestellen, sowie dem Transkriptionsstart nachgewiesen werden.
- (ii) Des Weiteren soll mit einer Immunpräzipitation von CBF1 untersucht werden, ob CBF1, wie in der Einleitung beschrieben, an die DNA bindet und einen Korepressorkomplex rekrutiert, der dann von EBNA-2 verdrängt wird und die EBNA-2/CBF1-Interaktion ermöglicht, oder, ob EBNA-2 mit CBF1 einen Komplex bildet und dann erst gemeinsam als Komplex an die DNA bindet.

(iii) Können bei der Rekrutierung der Polymerase II und der am Serin 5 des CTD-Bereichs phosphorylierten Subpopulation in den EBNA-2-Zielgenen Gemeinsamkeiten beobachtet werden.

(iiii) Mit den drei Histon-Antikörpern, die spezifisch für acetyliertes Histon H3 bzw. acetyliertes Histon H4 bzw. dimethyliertes Lysin 4 an Histon H3 sind, kann untersucht werden, ob diese nach EBNA-2-Induktion mit Transkriptionsaktivität korrelieren. Sowohl die Dimethylierung von Lysin 4 an Histon H3 (H3-K4), als auch hyperacetylierte Histone sind Zeichen für transkriptionell aktives Chromatin.

Die Ergebnisse der einzelnen ChIP-Experimente für die Gene SLAMF1, DNASE1L3 und CCL3 werden in den folgenden Kapiteln beschrieben.

4.1.2.1 SLAMF1

Die Analyse des SLAMF1-Gens wurde mit der unter 4.1.2 beschriebenen ChIP-Technik im Bereich von -1000 bp bis +1200 bp durchgeführt. Amplifikationen von Genfragmenten wurden mit Primern im Bereich von -1000 bp, +686 bp/ +846 bp, +1200 bp und am Transkriptionsstart (TS) durchgeführt. Die verwendeten Primer sind im Material-Teil dieser Arbeit in Tabelle 2.3 aufgeführt. Da die beiden intronischen potentiellen CBF1-Bindestellen bei +686 bp und +846 bp eng benachbart liegen, war es nicht möglich für diese zwei Bindestellen spezifische Primerpaare zu wählen (Abb. 4.4A). Die Auflösungsgrenze der mit der ChIP-Technik erzeugten Fragmentgrößen ist für den Bereich der beiden intronischen potentiellen CBF1-Bindestellen zu gering. Im weiteren Text wird dieser Bereich als +686 bp bezeichnet. Die Regionen um -1000 bp und +1200 bp dienen als Kontrollbereiche, da für sie keine potentiellen CBF1-Bindestellen vorhergesagt sind und somit auch keine EBNA-2-Bindung erwartet wird.

Das Ergebnis eines repräsentativen Experiments ist in Abbildung 4.4B-G graphisch dargestellt. Gezeigt ist der % Input, der das Verhältnis von Präzipitat-DNA zu Input-DNA nach Substraktion der Isotypkontrolle wiedergibt. Wie auch schon bei den ChIP-Experimenten in 721 Zellen (siehe 4.1.1), konnte eine sehr starke EBNA-2-Bindung am Transkriptionsstart, jedoch nicht an dem Bereich der potentiellen CBF1-Bindestellen +686 bp nachgewiesen werden. Erwartungsgemäß zeigte das ChIP-Experiment in der Zelllinie ohne Östrogen nahezu keine Signale an den untersuchten Bereichen (Abb. 4.4B). Die Ergebnisse der Immunpräzipitation von Pol II (Abb. 4.4C) und des phosphorylierten Serin 5 des CTD-Bereichs der Pol II korrelierten erwartungsgemäß. So konnte bei EBNA-2-Aktivierung eine starke Pol II-Rekrutierung am Transkriptionsstart und der CBF1-Bindestelle +686 bp beobachtet werden. In der benachbarten Region um +1200 bp war lediglich eine leichte Rekrutierung der Pol II erkennbar. Auch die Phosphorylierung von Serin 5 im CTD-Bereich der Pol II folgte diesem Muster. Da es sich bei SLAMF1 um ein voraktiviertes Gen handelt (Maier et al., 2006), konnte die Pol II-Rekrutierung auch in Abwesenheit von aktivem EBNA-2

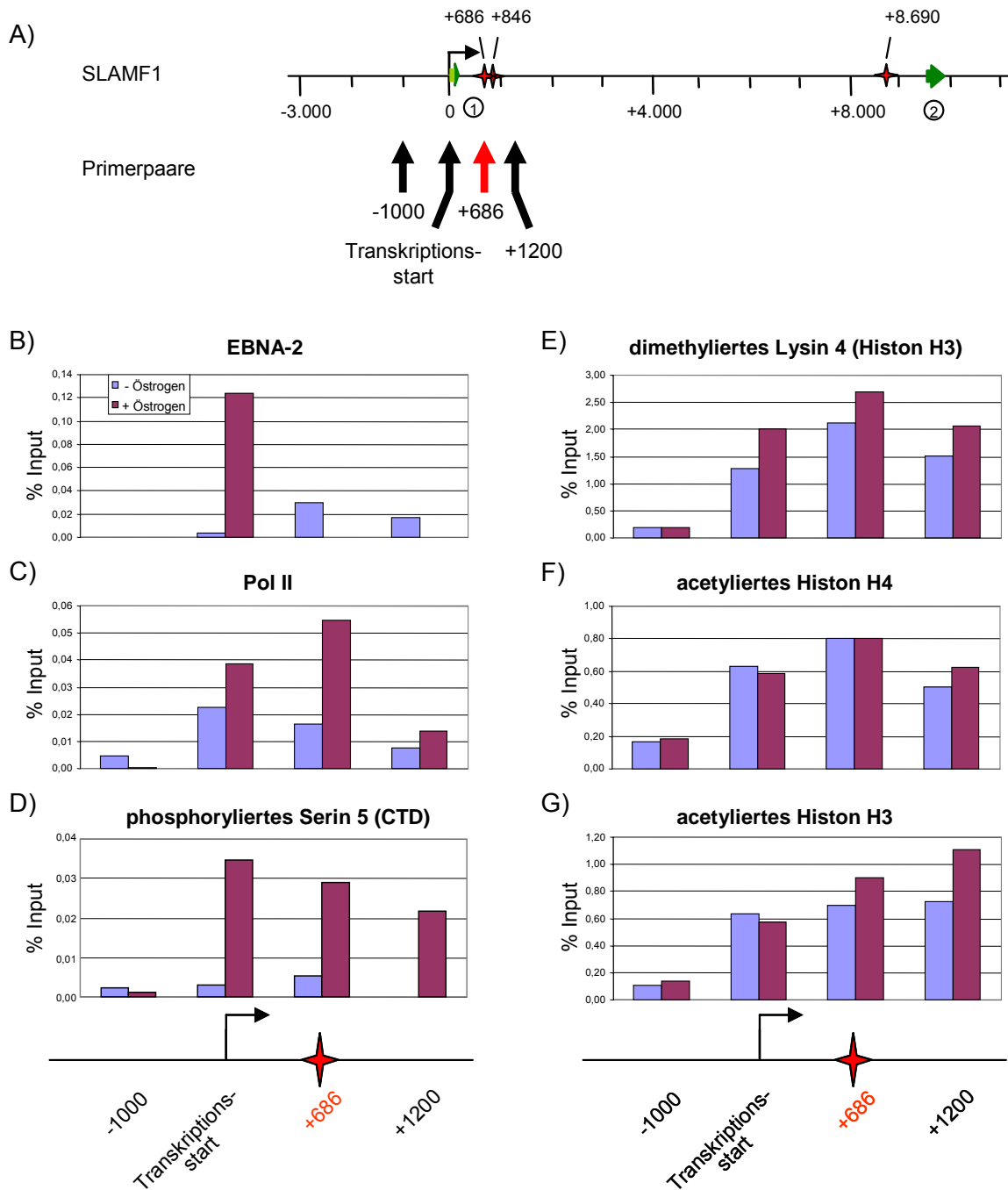


Abb. 4.4: SLAMF1, ein vor EBNA-2-Induktion aktiviertes Gen

(A) Schematische Darstellung eines Ausschnitts des SLAMF1-Gens. Die dunkelgrünen Pfeile kennzeichnen Exons und die hellgrünen nicht-translatierte Exonbereiche. Die Exons sind mit sich in Kreisen befindenden Zahlen durchnummeriert. Potentielle CBF1-Bindestellen sind als rote Sterne abgebildet. Der Transkriptionsstart wird durch den schwarzen Pfeil gekennzeichnet. Die für die PCR eingesetzten Primer markieren den enthaltenen Bereich des Gens als schwarz hervorgehobene Pfeile. Der rot hervorgehobene Pfeil markiert Primer, die einen Bereich mit einer CBF1-Bindestelle amplifizieren.

BJAB-K3-Zellen wurden sechs Stunden mit oder ohne Zugabe von Östrogen inkubiert. Das Chromatin von je 2×10^8 Zellen wurde mittels Formaldehyd vernetzt, fragmentiert und mit spezifischen Antikörpern gegen EBNA-2 (1E6) (B), Pol II (C), phosphoryliertes Serin 5 (D), dimethyliertes K4 H3 (E), acetyliertes H4 (F) und acetyliertes H3 (G) immunpräzipitiert. Alle Immunpräzipitationen wurden ebenfalls mit einer Isotypkontrolle durchgeführt, für (B) und (D) mit dem GST-Antikörper und für (C), (E), (F) und (G) mit normalem Kaninchenserum. Gezeigt ist der % Input, der das Verhältnis von Präzipitat-DNA zu Input-DNA nach Subtraktion der Isotypkontrolle wiedergibt. Pol II = Polymerase II; CTD = C-terminale Domäne der Pol II; TS = Transkriptionsstart

beobachtet werden, wobei eine geringere Rekrutierung statt fand. Die Zunahme der Dimethylierung von Lysin 4 im Histon H3, die ein Signal für aktives Chromatin ist, nahm ab dem Transkriptionsstart drastisch zu und blieb auf einem hohen Niveau (Abb. 4.4E). Auch hier war zu erkennen, dass SLAMF1 ein voraktiviertes Gen ist und somit auch ohne aktivem EBNA-2 die Zunahme in der Dimethylierung von Lysin 4 im Histon H3 deutlich vorhanden war. Durch die Aktivierung von EBNA-2 kam es zu einer ca. 1,4fachen Zunahme der Dimethylierung des Lysin 4, die über den betrachteten Bereich konstant war. Die Untersuchung des Acetylierungszustands von Histon H4 (Abb. 4.4F) und Histon H3 (Abb. 4.4G), wies in der betrachteten Region ab dem Transkriptionsstart eine hohe Grundaktivität auf. Während die Aktivierung von EBNA-2 an einigen untersuchten Bereichen des Histons H3 eine deutliche Erhöhung der Acetylierung bewirkte, ändert sich der Acetylierungszustand im Histon H4 nur geringfügig.

4.1.2.2 DNASE1L3

Das DNASE1L3-Gen wurde im Bereich von -2650 bp bis +900 bp näher untersucht. Amplifikationen von Genfragmenten wurden mit Primern im Bereich von -2622 bp, -1300 bp, +422 bp, +900 bp und am Transkriptionsstart (TS) durchgeführt. Die verwendeten Primer sind im Material-Teil dieser Arbeit in Tabelle 2.3 aufgeführt. Neben einer potentiellen CBF1-Bindestelle bei +422 bp im ersten Intron, weist das DNASE1L3-Gen eine weitere potentielle CBF1-Bindestelle bei -2622 bp im Promotorbereich auf. Die Regionen um -1300 bp und +900 bp dienen als Kontrollbereiche, da für sie keine potentiellen CBF1-Bindestellen vorhergesagt sind und somit auch keine EBNA-2-Bindung erwartet wird (Abb. 4.5A).

Das Ergebnis eines repräsentativen Experiments ist in Abbildung 4.5B-G graphisch dargestellt. Gezeigt ist der % Input, der das Verhältnis von Präzipitat-DNA zu Input-DNA nach Substraktion der Isotypkontrolle wiedergibt. Die in der CHIP-Analyse in 721 Zellen nachgewiesene EBNA-2-Bindung an die intronische CBF1-Bindestelle bei +422 bp und dem Transkriptionsstart (siehe 4.1.1), konnte hier bestätigt werden. Zusätzlich konnte ein schwaches Signal an der potentiellen CBF1-Bindestelle bei -2622 bp beobachtet werden. Die Analysen der Kontrollsituation ohne Östrogen weisen erwartungsgemäß keine Signale auf (Abb. 4.5B). In Abbildung 4.5C lässt sich eine Pol II-Rekrutierung am Transkriptionsstart bei EBNA-2-Aktivierung nachweisen. In den benachbarten Regionen um +422 bp und +900 bp war lediglich eine leichte Rekrutierung der Pol II erkennbar. Auch das Ergebnis der Serin 5 Phosphorylierung am CTD-Bereich korrelierte mit der Pol II-Rekrutierung (Abb. 4.5 D). Überraschenderweise konnte sowohl bei der Pol II-Rekrutierung, als auch bei der Serin 5 Phosphorylierung des CTD-Bereichs ein starkes Signal bei der zweiten, sich im Promotor befindenden potentiellen CBF1-Bindestelle bei -2622 bp beobachtet werden. Da sich in der benachbarten Region um -1300 bp, die zu Kontrollzwecken untersucht wurde, nahezu kein Signal erkennen lässt, handelt es sich bei dem Signal bei -2622 bp um ein spezifisches Signal. War EBNA-2 nicht aktiv (- Östrogen), konnten an der potentiellen CBF1-Bindestelle

bei -2622 bp und dem Transkriptionsstart eine schwache Pol II-Rekrutierung beobachtet werden. Diese Pol II-Rekrutierungen waren jedoch im Vergleich zur Pol II-Rekrutierung nach EBNA-2-Aktivierung gering.

Die Dimethylierung von Lysin 4 im Histon H3 wies ein überraschendes Muster auf (Abb. 4.5E). So war eine sehr starke Dimethylierung, unabhängig von dem Aktivierungszustand von EBNA-2, an der CBF1-Bindestelle bei -2622 bp zu beobachten. Nach der Aktivierung von EBNA-2 nahm die Dimethylierung jedoch deutlich bereits ab der Stelle -1300 bp zu und nicht erst ab dem Transkriptionsstart. War EBNA-2 nicht aktiv (- Östrogen), ließ sich trotzdem eine Dimethylierung, verstärkt ab dem Transkriptionsstart, erkennen, obwohl DNASE1L3 kein voraktiviertes Gen ist. Ein ähnliches Muster zeigten aber auch die beiden Untersuchungen zum Acetylierungszustand des Histons H4 (Abb. 4.5F) und des Histons H3 (Abb. 4.5G). Auch hier war ein starkes Signal unabhängig vom Aktivierungszustand von EBNA-2, an der CBF1-Bindestelle bei -2622 bp zu erkennen. War EBNA-2 nicht aktiv (- Östrogen), weisen die näher betrachteten Stellen ab -1300 bp im Bezug auf die Acetylierung von Histon H4 und Histon H3 bereits eine leichte Acetylierung auf. Nach Aktivierung von EBNA-2 war ab der Stelle -1300 bp eine drastische Zunahme der Acetylierung von Histon H4 und Histon H3 zu beobachten. Insgesamt zeigte Histon H4 eine stärkere Acetylierung im Vergleich zu Histon H3. Betrachtete man die Ergebnisse zur Untersuchung der Dimethylierung von Lysin 4 im Histon H3 und die Acetylierung der Histone H4 und H3, ließ sich ein ähnliches Muster im Bezug auf Zunahme nach der EBNA-2-Aktivierung und der bereits vorhandenen Signale ohne aktivem EBNA-2 erkennen.

4.1.2.3 CCL3

Das CCL3-Gen wurde im Bereich von -2066 bp bis +700 bp näher untersucht. Amplifikationen von Genfragmenten wurden mit Primern im Bereich von -2066 bp, -1600 bp, -900 bp, -346 bp, +700 bp und am Transkriptionsstart (TS) durchgeführt. Die verwendeten Primer sind im Material-Teil dieser Arbeit in Tabelle 2.3 aufgeführt. Im Promotorbereich des CCL3-Gens konnten zwei potentielle CBF1-Bindestellen bei -2066 bp und bei -346 bp gefunden werden. Die Regionen um -1600 bp, -900 bp und +700 bp dienen als Kontrollbereiche, da für sie keine potentiellen CBF1-Bindestellen vorhergesagt sind und somit auch keine EBNA-2-Bindung erwartet wird (Abb. 4.6A).

Das Ergebnis eines repräsentativen Experiments ist in Abbildung 4.6B-H graphisch dargestellt. Gezeigt ist der % Input, der das Verhältnis von Präzipitat-DNA zu Input-DNA nach Substraktion der Isotypkontrolle wiedergibt. Auch im CCL3-Gen konnte die bereits in der ChIP-Analyse in den 721 Zellen (4.1.1) nachgewiesene EBNA-2-Bindung an den Transkriptionsstart bestätigt werden. So zeigte sich ein starkes Signal am Transkriptionsstart und ein schwächeres, aber immer noch deutliches Signal an der potentiellen CBF1-Bindestelle bei -346 bp (Abb. 4.6B). Die Analysen der Kontrollsituation ohne Östrogen wiesen erwartungsgemäß nahezu keine Signale auf.

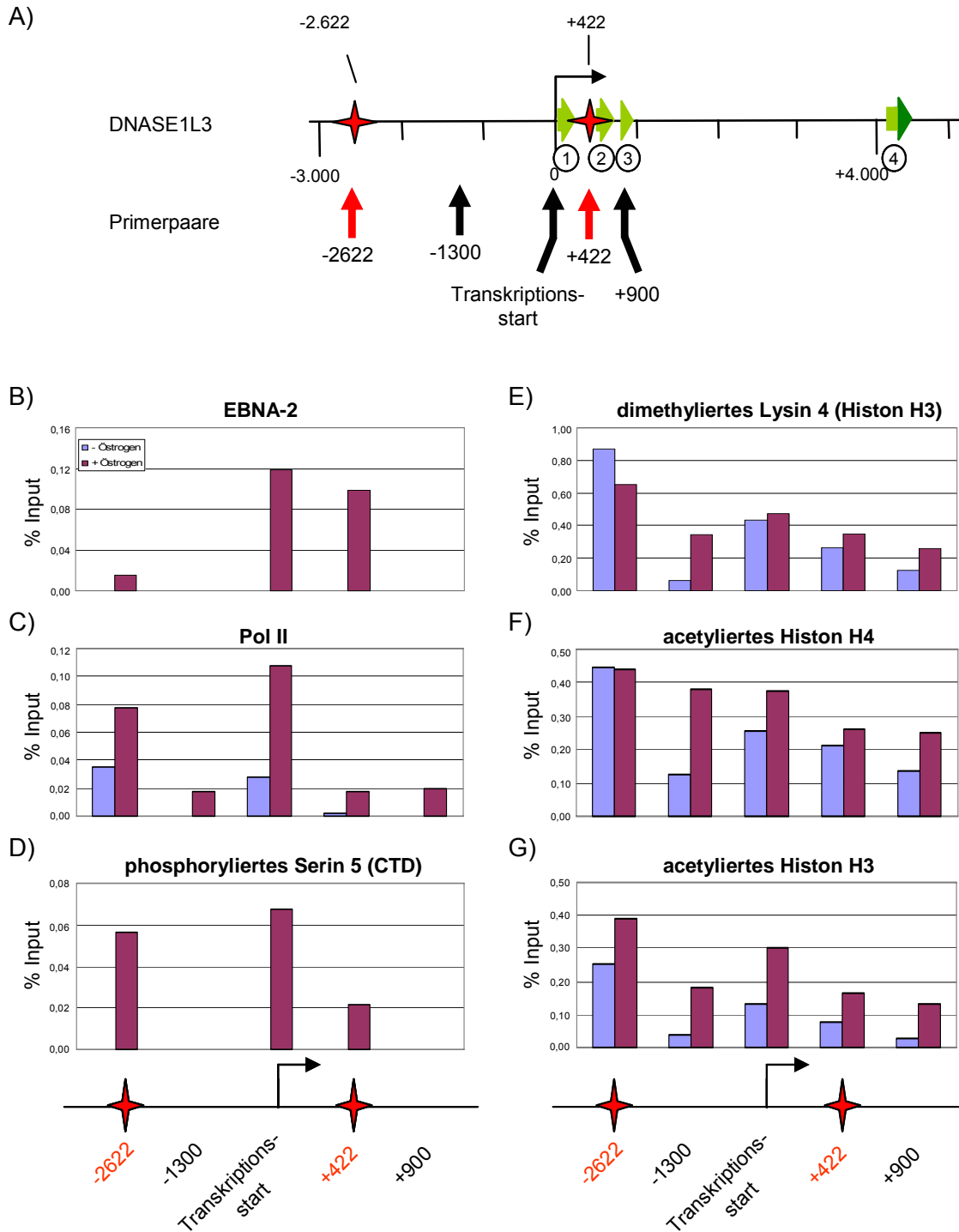


Abb. 4.5: Im DNASE1L3-Gen kann sowohl eine intronische EBNA-2-Bindung, als auch eine an eine potentielle CBF1-Bindestelle, die distal zum Transkriptionsstart lokalisiert ist, nachgewiesen werden

(A) Schematische Darstellung eines Ausschnitts des DNASE1L3-Gens. Die dunkelgrünen Pfeile kennzeichnen Exons und die hellgrünen nicht-translatierte Exonbereiche. Potentielle CBF1-Bindestellen sind als rote Sterne abgebildet. Der Transkriptionsstart wird durch den schwarzen Pfeil gekennzeichnet. Die für die PCR eingesetzten Primer markieren den enthaltenen Bereich des Gens als schwarz hervorgehobene Pfeile. Die rot hervorgehobenen Pfeile markieren Primer, die einen Bereich mit einer CBF1-Bindestelle amplifizieren.

BJAB-K3-Zellen wurden sechs Stunden mit oder ohne Zugabe von Östrogen inkubiert. Das Chromatin von je 2×10^8 Zellen wurde mittels Formaldehyd vernetzt, fragmentiert und mit spezifischen Antikörpern gegen EBNA-2 (B), Pol II (C), phosphoryliertes Serin 5 (D), dimethyliertes K4 H3 (E), acetyliertes H4 (F) und acetyliertes H3 (G) immunpräzipitiert. Alle Immunpräzipitationen wurden ebenfalls mit einer Isotypkontrolle durchgeführt, für (B) und (D) mit dem GST-Antikörper und für (C), (E), (F) und (G) mit normalem Kaninchenserum. Gezeigt ist der % Input, der das Verhältnis von Präzipitat-DNA zu Input-DNA nach Substraktion der Isotypkontrolle wiedergibt. Pol II = Polymerase II; CTD = C-terminale Domäne der Pol II; TS = Transkriptionsstart

Nach Aktivierung von EBNA-2 war ein deutliches CBF1-Signal an der potentiellen CBF1-Bindestelle bei -346 bp, jedoch nicht an der zweiten potentiellen CBF1-Bindestelle bei -2066 bp erkennbar (Abb. 4.6C). War EBNA-2 nicht aktiv (- Östrogen), konnte an keiner potentiellen CBF1-Bindestelle eine CBF1-Bindung nachgewiesen werden.

Dieses Ergebnis war unerwartet. Wie in der Einleitung beschrieben, geht das allgemeingültige Modell zur Aktivierung von CBF1 abhängigen Genen davon aus, dass CBF1 an die DNA bindet und einen Korepressorkomplex rekrutiert. Dieser wird dann von EBNA-2 verdrängt und EBNA-2 kann an CBF1 binden. In den hier durchgeführten Experimenten, konnte die CBF1 Bindung an die DNA erst nach EBNA-2-Aktivierung nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass EBNA-2 mit CBF1 einen Komplex eingeht und dann gemeinsam an die DNA bindet.

Die EBNA-2 abhängige Pol II-Rekrutierung konnte ab der potentiellen CBF1-Bindestelle bei -346 bp beobachtet werden und erfolgte vorwiegend im Bereich des Transkriptionsstarts (Abb. 4.6D). Mit diesen Pol II-Daten korrelierten auch die Ergebnisse der Serin 5 Phosphorylierung am CTD-Bereich der Pol II (Abb. 4.6E). War EBNA-2 nicht aktiv (- Östrogen), konnten bei den Immunpräzipitationen von Pol II und dem phosphorylierten Serin 5 des CTD-Bereichs keine bzw. äußerst schwache Hintergrundsignale beobachtet werden. Diese Ergebnisse waren erwartungsgemäß, da CCL3 ein durch CBF1 reprimiertes Gen ist (Maier et al., 2006).

Die Dimethylierung von Lysin 4 im Histon H3 ließ sich, unabhängig vom Aktivierungszustand von EBNA-2, deutlich ab der Stelle -900 bp nachweisen, die über den betrachteten Bereich bis +700 bp kontinuierlich abnahm (Abb. 4.6F). Nach der Aktivierung von EBNA-2 kam es allerdings zu einer verstärkten Dimethylierung von Lysin 4, die ab der CBF1-Bindestelle -346 bp deutlich erkennbar war.

Die beiden Untersuchungen zum Acetylierungszustand des Histons H4 (Abb. 4.6G) und des Histons H3 (Abb. 4.6H) wiesen ein ähnliches Muster auf. War EBNA-2 nicht aktiv (- Östrogen), wiesen beide Histone eine fast identische Acetylierung auf. Diese nahm bei -900 bp etwas zu, dann wieder etwas ab und blieb auf einem relativ ähnlichen Niveau. Bei Histon H4 hingegen stieg die Acetylierung gegen Ende des betrachteten Bereichs bei +700 bp wieder an. Nach Aktivierung von EBNA-2 (+ Östrogen) nahm die Acetylierung bei beiden Histonen über den betrachteten Bereich von -2066 bp bis +700 bp zu, wobei es ab der Stelle -900 bp zu einer drastischen Zunahme kam.

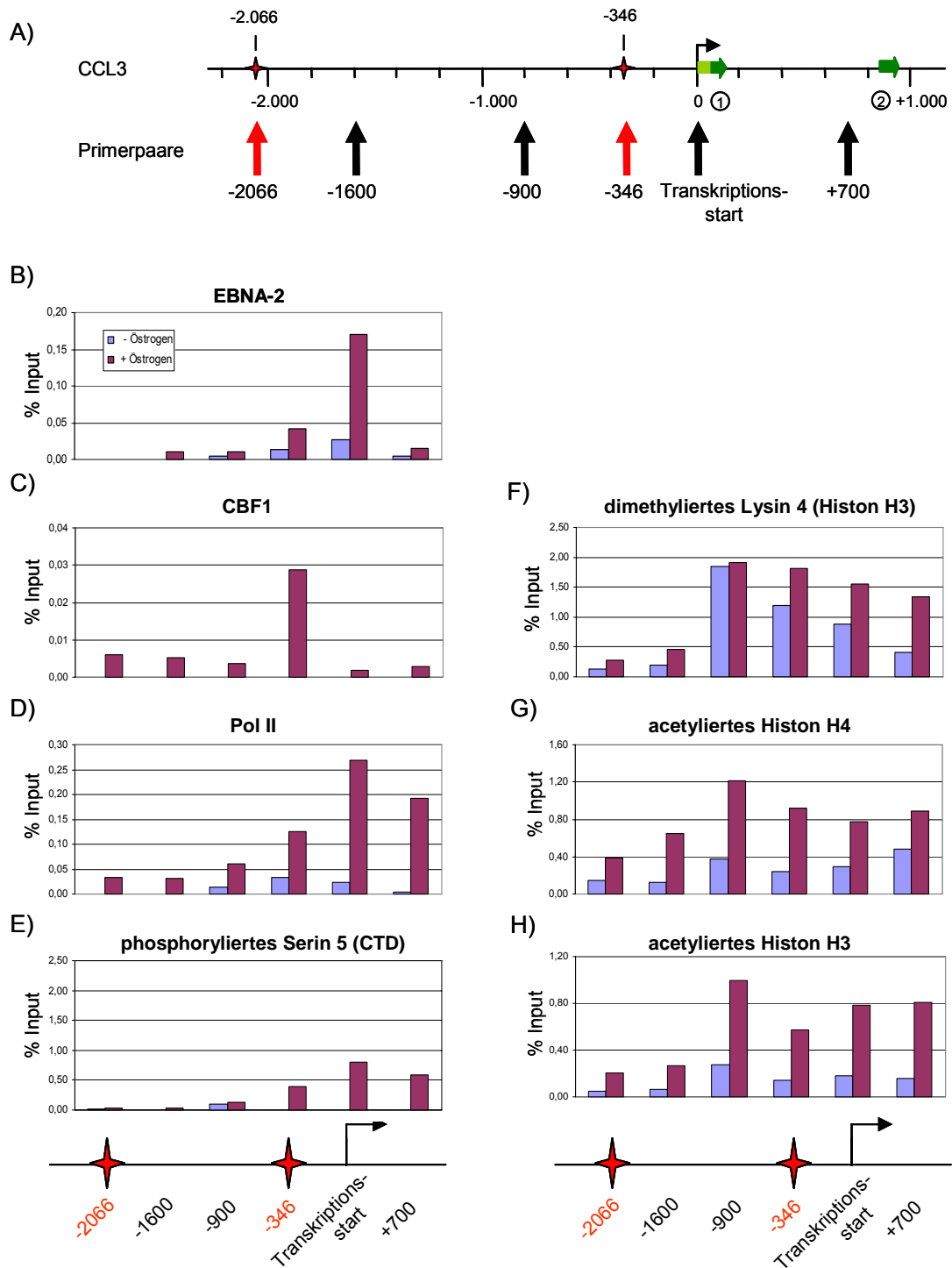


Abb. 4.6: Im CCL3-Gen kann eine schwache EBNA-2-Bindung an der sich im Promotor befindenden CBF1-Bindestelle bei -346 bp nachgewiesen werden

(A) Schematische Darstellung eines Ausschnitts des CCL3-Gens. Die dunkelgrünen Pfeile kennzeichnen Exons und die hellgrünen nicht-translatierte Exonbereiche. Potentielle CBF1-Bindestellen sind als rote Sterne abgebildet. Der Transkriptionsstart wird durch den schwarzen Pfeil gekennzeichnet. Die für die PCR eingesetzten Primer markieren den enthaltenen Bereich des Gens als schwarz hervorgehobene Pfeile. Die rot hervorgehobenen Pfeile markieren die einen Bereich mit einer CBF1-Bindestelle amplifizieren.

BJAB-K3-Zellen wurden sechs Stunden mit oder ohne Zugabe von Östrogen inkubiert. Das Chromatin von je 2×10^8 Zellen wurde mittels Formaldehyd vernetzt, fragmentiert und mit spezifischen Antikörpern gegen EBNA-2 (B), CBF1 (D-20; Santa Cruz) (C), Pol II (D), phosphoryliertes Serin 5 (E), dimethyliertes K4 H3 (F), acetyliertes H4 (G) und acetyliertes H3 (H) immunpräzipitiert. Alle Immunpräzipitationen wurden ebenfalls mit einer Isotypkontrolle durchgeführt, für (B) und (E) mit dem GST-Antikörper, für (C) mit normalem Ziegenserum und für (D), (F), (G) und (H) mit normalem Kaninchenserum. Gezeigt ist der % Input, der das Verhältnis von Präzipitat-DNA zu Input-DNA nach Substraktion der Isotypkontrolle wiedergibt.

Pol II = Polymerase II; CTD = C-terminale Domäne der Pol II; TS = Transkriptionsstart

4.1.3 Eine Promotor-Reporter-gen Studie eines Bereiches des CCL3-Promotors

Im CCL3-Gen konnten keine intronischen potentiellen CBF1-Bindestellen gefunden werden. Der Promotor hingegen enthält zwei potentielle CBF1-Bindestellen, wobei eine davon sehr nah am Transkriptionsstart bei -346 bp liegt. Die zweite befindet sich weit entfernt vom Transkriptionsstart bei -2066 bp (vgl. Abb. 4.6A). In Kapitel 4.1.2.3 konnte gezeigt werden, dass EBNA-2 über CBF1 an die dem Transkriptionsstart nahe gelegenen CBF1-Bindestelle bei -346 bp bindet, jedoch nicht an die weit entfernte CBF1-Bindestelle bei -2066 bp. Außerdem wurde eine EBNA-2-Bindung am Transkriptionsstart beobachtet.

Als Adapter für die EBNA-2-Bindung spielt das DNA-Bindeprotein CBF1 eine wichtige Rolle (siehe Kapitel 1.2.2ff). Da aber an der Regulation von Genen meistens eine Vielzahl von Faktoren beteiligt sind, sollte der Promotorbereich von -400 bp bis zum Transkriptionsstart näher untersucht werden, um neue Erkenntnisse über die Regulationsmechanismen durch EBNA-2 zu erhalten.

Die Untersuchung sollte mittels Luziferase-Assays in der EBV-negativen Burkitt-Lymphomlinie DG75 vollzogen werden. Hierzu wurden Promotor-Reporter-gen-Konstrukte verwendet, die von Frau Gabriele Staffler im Rahmen ihrer Diplomarbeit im Labor kloniert wurden und bereits einmal in der Zelllinie BJAB-K3 getestet wurden. Die verschiedenen Bereiche des CCL3-Promotors wurden in einen Vektor, der einen nicht aktiven β -Globin-Rumpfpromotor mit einer TATA-Box enthält, vor das Reporter-gen Luziferase kloniert. Alle vier Konstrukte, die im Folgenden mit K1-K4 bezeichnet werden, enthalten die CBF1-Bindestelle bei -346 bp. Das Konstrukt K1 enthält den gesamten Bereich des CCL3-Promotors von -400 bp bis zum Transkriptionsstart und besitzt somit zusätzlich die vorhergesagte TATA-Box des CCL3-Gens. Für die Konstrukte K2, K3 und K4 wurde das Fragment aus dem CCL3-Promotor am 3'-Ende um jeweils 100 bp verkürzt. In Abbildung 4.7A sind die Promotorfragmente der einzelnen Konstrukte schematisch wiedergegeben.

4.1.3.1 Untersuchung der EBNA-2-Regulation des CCL3-Promotors

Um überprüfen zu können, welche Bereiche neben der CBF1-Bindestelle für die Transaktivierung des Luziferasegens durch EBNA-2 notwendig sind, wurden die Konstrukte K1-K4 jeweils mit einem EBNA-2 enthaltenden Plasmid in die beschriebene DG75-Zelllinie transient transfiziert und nach 48 h geerntet. Die Luziferaseaktivität wurde gemessen und gegen die β -Galaktosidaseaktivität normalisiert. Als Hintergrundkontrolle wurde die transiente Transfektion anstelle von EBNA-2, mit dem entsprechenden Leervektor durchgeführt. In Abbildung 4.7B sind die Ergebnisse dieser Transfektionen zusammengestellt. Die Hintergrundaktivität der Kontrollansätze nach Transfektion des Leervektors, dargestellt in blauen Balken, lag in allen Ansätzen auf ungefähr demselben Niveau. Lediglich die Transfektion mit K1 wies ein etwas höheres Signal auf. Obwohl das Konstrukt K4 die CBF1-Bindestelle enthält, kam es nicht zur Transaktivierung des

Luziferasegens durch EBNA-2. Mit Zunahme der Fragmentlänge des CCL3-Promotors, konnte eine Transaktivierung des Luziferasegens erreicht werden. Mit dem Konstrukt K3, das den Promotorbereich von -400 bp bis -201 bp enthält, konnte lediglich eine 2,5fache Induktion des Luziferasegens erreicht werden. Das Konstrukt K2 (-400 bp bis -101 bp) bewirkte eine 7fache Induktion des Luziferasegens. Eine drastische Zunahme der Transaktivierung des Luziferasegens durch EBNA-2 konnte erst mit dem Konstrukt K1, das den komplett untersuchten Promotorbereich von -400 bp bis zum Transkriptionsstart enthält, erreicht werden. Berechnet man die Induktion der Transaktivierung kommt man nur auf eine 9fache Induktion, die auf den ersten Blick im Vergleich zu der 7fachen Induktion des Konstrukt K2 nicht sehr hoch erscheint. Beachtet man allerdings, dass die Hintergrundkontrolle bei K1 ca. doppelt so hoch war wie bei den anderen Konstrukten, kommt die Zunahme der Transaktivierung des Luziferasegens durch EBNA-2 deutlicher zum Ausdruck.

4.1.3.2 Untersuchung der Notch-Regulation des CCL3-Promotors

Um zu überprüfen, ob sich zelluläre Proteine ähnlich dem viralen Protein EBNA-2 verhalten, wurden die transienten Transfektionen mit Notch, dem zellulären Äquivalent von EBNA-2 durchgeführt. Hier wurden die Konstrukte K1-K4 jeweils zusammen mit Notch in die DG75-Zelllinien transient transfiziert und nach 48 h geerntet. Die Luziferaseaktivität wurde gemessen und gegen die β -Galactosidaseaktivität normalisiert. Als Hintergrundkontrolle wurde die transiente Transfektion anstelle von Notch mit dem entsprechenden Leervektor durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Transfektionen sind in Abbildung 4.7C graphisch dargestellt. Die Hintergrundkontrolle befand sich hier in allen Ansätzen auf demselben Niveau. Die Transfektion von Notch mit dem nur die CBF1-Bindestellen enthaltenden Konstrukt K4 konnte keine Transaktivierung des Luziferasegens bewirken. Mit den Konstrukten K3 (-400 bp bis -201 bp) und K2 (-400 bp bis -101 bp) konnte eine leichte Induktion der Transaktivierung durch Notch von 3 bzw. 4,5 erreicht werden. Wie schon bei EBNA-2 beobachtet (Abb. 4.7B), bewirkte erst die Transfektion von Notch mit dem Konstrukt K1 (-400 bp bis Transkriptionsstart) eine sehr deutliche 12fache Induktion der Transaktivierung des Luziferasegens. Dies zeigt, dass die Transaktivierung am CCL3-Promotor mit zellulären und viralen Proteinen sehr ähnlich abläuft.

Überraschender Weise konnte sowohl bei EBNA-2, als auch bei Notch beobachtet werden, dass die Bindung an CBF1 für die Transaktivierung nicht ausreichend ist. Da sich jeweils erst mit dem Konstrukt K1 eine deutliche Transaktivierung einstellte, hat der Promotorbereich des CCL3-Gens zwischen -100 bp und dem Transkriptionsstart einen verstärkenden Effekt. Es handelt sich allerdings nicht um einen essentiellen Bereich, da auch mit den Konstrukten K2 und K3 Transaktivierungen, wenn auch nur schwache, erreicht werden konnten. Dies lässt vermuten, dass die Sequenz von -100 bp bis zum Transkriptionsstart bestimmte Bindestellen für andere Transkriptionsfaktoren enthält, die mit EBNA-2 bzw. Notch kooperieren.

Da es zu keiner Transaktivierung mit dem Konstrukt K4 kam, könnte vermutet werden, dass die Bindung von EBNA-2 über CBF1 unwichtig ist. Dies kann allerdings aus zwei Gründen widerlegt werden. So handelt es sich zum einen bei CCL3 um ein CBF1 abhängiges Gen (Maier et al., 2006) und zum anderen wurden transiente Transfektionen mit K1 und Notch in der CBF1 negativen Zelllinie SM224.9 durchgeführt. Zur Kontrolle wurden auch wieder transiente Transfektionen mit dem entsprechenden Leervektor von Notch durchgeführt.

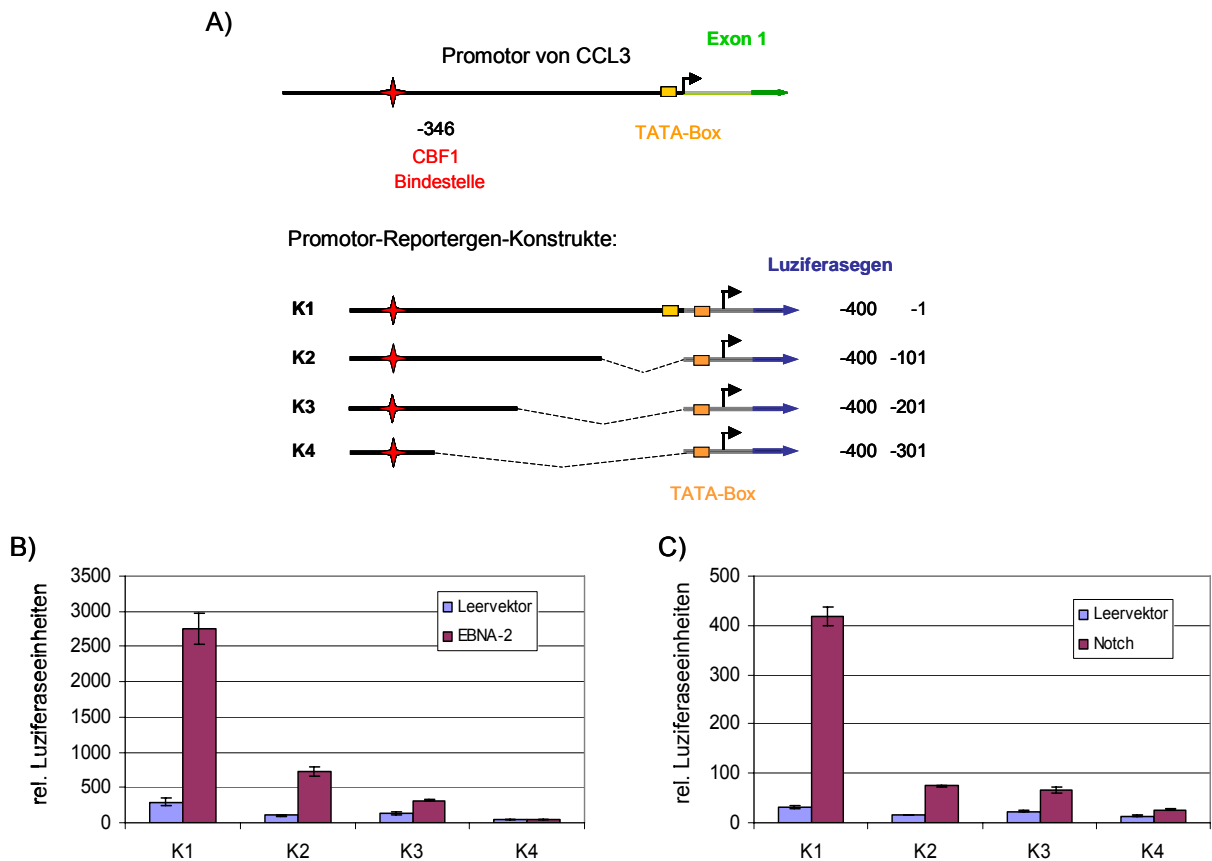


Abb. 4.7: Cis aktive Gensegmente im Bereich -100 bp tragen zur EBNA-2 bzw. Notch vermittelten Transaktivierung bei

(A) Schematische Darstellung eines Ausschnitts des CCL3-Gens. Die im Promotorbereich enthaltene potentielle CBF1-Bindestelle ist als roter Stern markiert. Des Weiteren sind schematisch die vier Promotor-Reporter-Gen-Konstrukte (K1-K4) abgebildet. Die Aktivierung der Promotor-Reporter-Gen-Konstrukte K1-K4 (B und C) wurde 48 h nach transienter Transfektion in die Zelllinie DG75 gemessen (jeweils in violett). Als Hintergrundkontrolle wurden die transienten Transfektionen jeweils mit den entsprechenden Leervektoren von EBNA-2 bzw. Notch durchgeführt (jeweils in blau). In (B) wurde jeweils EBNA-2 mit einem der Konstrukte K1-K4 transfiziert und in (C) jeweils Notch mit einem der Konstrukte K1-K4. Die Luciferaseaktivität wurde auf die β -Galaktosidaseaktivität normalisiert und ist in relativen Luciferaseeinheiten angegeben. Alle dargestellten Ergebnisse sind Mittelwerte von Triplikaten und deren Standardabweichungen.

Abbildung 4.8 zeigt, dass es nicht möglich war das Luciferasegen durch Notch zu transaktivieren. Die Transfektion mit Notch befanden sich auf demselben Niveau wie die Kontrolltransfektion mit dem entsprechenden Leervektor. Da ein negatives Ergebnis vermutet wurde, musste der Erfolg des Experimentes mit einer Kontrolltransfektion sichergestellt werden. Hierzu wurden Notch bzw. dessen Leervektor zusammen mit CBF1 in

die Zelllinie SM224.9 transient transfiziert. Das Ergebnis zeigte erwartungsgemäß die Transaktivierung des Luziferasegens (Abb. 4.7D). Diese ist mit der Transaktivierung von Notch in der DG75-Zelllinie vergleichbar (Abb. 4.7C). Ein Einfluss der im Bereich von -100 bp bis zum Transkriptionsstart des CCL3-Gens enthaltenen Faktoren auf die Interaktion von EBNA-2 bzw. Notch mit CBF1 kann mit diesem Experiment nicht ausgeschlossen werden.

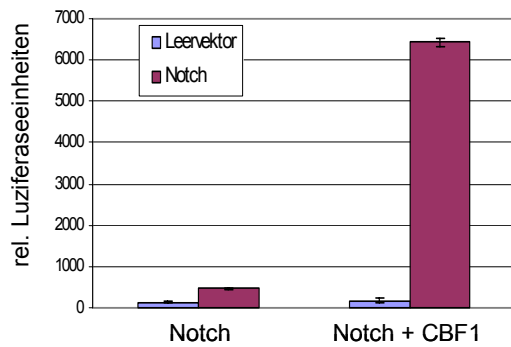


Abb. 4.8: Die CBF1-Bindestelle bei -346 bp ist essentiell für die Transaktivierung des CCL3-Gens

Die Aktivierung des Promotor-Reporter-gen Konstrukts K1 wurde 48 h nach transienter Transfektion von Notch bzw. Notch und CBF1 in die CBF1 negative Zelllinie SM224.9 gemessen (jeweils in violett). Als Hintergrundkontrolle wurden die transienten Transfektionen jeweils mit den entsprechenden Leervektoren von Notch durchgeführt (jeweils in blau). Die Luziferaseaktivität wurde auf die β -Galaktosidaseaktivität normalisiert und ist in relativen Luziferaseeinheiten angegeben. Alle dargestellten Ergebnisse sind Mittelwerte von Triplikaten und deren Standardabweichungen.

4.2 Identifizierung von EBNA-2/CBF1 assoziierten Proteinen

In der unter 4.1.3 beschriebenen Promotorstudie des CCL3-Gens zeigte sich, dass die Sequenz zwischen dem Transkriptionsstart und -100 bp den entscheidenden Teil zur EBNA-2- bzw. Notch-Aktivierung des CCL3-Gens beitrug. Mit Hilfe der Genomatix MatInspector Software wurde dieser Bereich nach potentiellen Bindestellen für Vertebraten-Transkriptionsfaktoren untersucht. Aus diesen Analysen ergaben sich keine Kandidaten, die eine EBNA-2-Bindung ermöglichen. Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte nun direkt nach EBNA-2 assoziierten Proteinen gesucht werden, die die EBNA-2-Transaktivierung unterstützen.

4.2.1 Generierung von TAP-Fusionsproteinen und ihrer stabilen Zelllinien

4.2.1.1 Konstruktion der verschiedenen TAP-EBNA-2- und TAP-CBF1-Fusionsproteine

Um EBNA-2 und CBF1 assoziierte Proteine identifizieren zu können, wurde die Methode der Tandem Affinitätsreinigung gewählt. Hierzu war es notwendig, die beiden Proteine mit dem „Tandem affinity purification“ (TAP) -tag zu fusionieren. Das Prinzip der TAP-Reinigung ist in der Einleitung in Kapitel 1.4.1 ausführlich beschrieben.

Bei dem TAP-tag handelt es sich um einen Doppeltag, der aus einer Kombination von kurzen Peptidsequenzen aus dem Calmodulin-bindenden Protein (CBP) und Protein A (ProtA) besteht. Zwischen diesen beiden Tags befindet sich die Erkennungssequenz (TEV) für die Tobacco etch Virus NIa Proteinase. Bei der von der TEV-Protease erkannten Sequenz handelt es sich um eine sehr spezifische Sequenz, die nur sehr selten vorkommt. Eine Spaltung der EBNA-2- und CBF1-Fusionsproteine durch die TEV-Protease an einer anderen Stelle im Protein, konnte durch Untersuchungen der Sequenz ausgeschlossen werden.

Der offene Leserahmen von EBNA-2 wurde in frame N-terminal mit dem TAP-tag fusioniert, im weiteren Text als TAP-EBNA-2 beschrieben. Der offene Leserahmen von CBF1 wurde sowohl N-, als auch C-terminal in frame mit dem TAP-tag fusioniert, im weiteren Text als TAP-CBF1 bzw. CBF1-TAP bezeichnet. Die einzelnen Klonierungsschritte der TAP-Fusionsproteine sind im Methodenteil dieser Arbeit in Kapitel 3.3.5.4 ausführlich beschrieben. In Abbildung 4.9 sind die verschiedenen TAP-Fusionsproteine schematisch dargestellt.

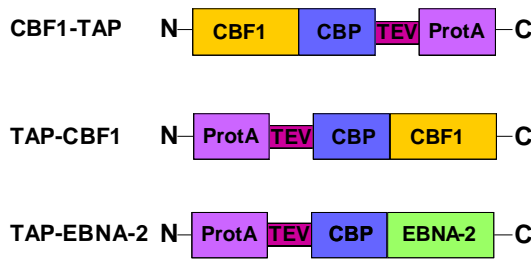


Abb. 4.9: Schematische Darstellung der TAP-Fusionsproteine von EBNA-2 und CBF1

Der TAP-tag ist ein Doppeltag bestehend aus zwei IgG Bindedomänen des Protein A aus *S. aureus* (ProtA) und dem Calmodulin-bindenden Peptid (CBP). Dazwischen befindet sich die Tobacco Etch Virus Spaltungssequenz (TEV). An CBF1 wurde der TAP-tag N- und C-terminal fusioniert und an EBNA-2 N-terminal. Hieraus resultieren die Bezeichnungen TAP-CBF1, CBF1-TAP und TAP-EBNA-2. Die Fusionsproteine sind schematisch dargestellt.

4.2.1.2 Überprüfung der TAP-Fusionsproteine auf ihre Funktionalität

Getaggte Proteine müssen immer auf ihre Funktionalität getestet werden, da eine Fusion eines Proteins mit einem Tag verschiedene Probleme mit sich führen kann. So könnte der Tag zum einen eine inkorrekte Faltung der Fusionsproteine zur Folge haben, so dass die Bindung zu anderen Interaktionspartnern gestört werden kann. Es könnte aber auch die Funktion der Proteine beeinträchtigt werden, da es durch die inkorrekte Faltung zu Verschiebungen von Domänen kommen kann bzw. aktive Zentren inaktiviert werden können. Auch wenn die Faltung des Fusionsproteins korrekt verläuft, könnte das alleinige Anhängen des Tags eine sterische Behinderung herbeiführen. Da es sich bei dem TAP-tag mit ca. 24 kDa um einen recht großen Tag handelt, musste ausgeschlossen werden, dass es zu sterischen Behinderungen kommt. Daher war es absolut notwendig zu überprüfen, ob die Fusionsproteine bekannte und für sie typische Merkmale noch aufwiesen. Hierfür eignete sich am Besten die Überprüfung der Transaktivierung eines Reporter-Promotor-Konstruktes, das vor dem Luziferasegen CBF1-Erkennungssequenzen enthielt, durch EBNA-2. Des Weiteren konnte auch die Interaktion von EBNA-2 mit CBF1 bzw. von CBF1 mit der DNA in diesem Luziferase-Assay getestet werden. Parallel dazu konnte auch überprüft werden, ob sich der TAP-tag als Negativkontrolle eignet oder selber Effekte zeigt.

4.2.1.2.1 TAP getaggtetes CBF1 rekrutiert EBNA-2 und Notch

Um die beiden CBF1 TAP-Fusionsproteine auf ihre Funktionalität hin zu überprüfen, wurde eine Luziferase-Aktivitätsbestimmung nach transienter Transfektion in die Zelllinie SM296 durchgeführt. Die Zelllinie SM296 ist eine humane EBV negative Burkitt-Lymphom-Zelllinie mit vollständiger Deletion von CBF1. Außerdem exprimiert diese Zelllinie stabil das ER/EBNA-2-Fusionsprotein. Durch Östrogenzugabe wird EBNA-2 aktiv und kann seine Funktionen, wie z.B. die Transaktivierung eines Gens über CBF1-Bindung, ausüben. Durch die Bindung von CBF1 an die DNA alleine kann dagegen keine Transaktivierung eines Gens erfolgen. Da die Zelllinie SM296 CBF1 negativ ist, konnten Effekte, die vom endogen exprimierten CBF1 ausgehen, ausgeschlossen werden. In diesem Experiment wurde ein Promotor-Reporter-Konstrukt verwendet, das einen artifiziellen Promotor darstellt, der vier CBF1-Erkennungsstellen vor dem Luziferasegen enthält (Cpwt). Die Konstrukte, die für

CBF1-TAP, TAP-CBF1, sowie den TAP-tag kodieren, wurden zusammen mit dem Cpwt-Konstrukt transient in die beschriebene SM296 Zelllinie transfiziert und unter Östrogenzugabe 48 h kultiviert (Abb. 9A blaue Balken). Als Hintergrundkontrolle dienten Ansätze ohne Östrogenzugabe (Abb. 9A violette Balken). Die Luziferaseaktivität wurde gemessen und gegen die β -Galaktosidaseaktivität normalisiert.

Abbildung 4.10A zeigt, dass beide TAP-CBF1 Konstrukte EBNA-2 rekrutieren konnten und es somit zur EBNA-2 vermittelten Transaktivierung des Luziferasegens kam. Im Vergleich zum Kontrollansatz mit dem TAP-tag zeigte CBF1-TAP eine 9fach höhere und TAP-CBF1 eine 7fach höhere Transaktivierungsaktivität. Somit besitzt TAP-CBF1 nur ca. 80% seiner Funktionalität im Vergleich zu CBF1-TAP. Dagegen zeigten die Ansätze mit TAP-tag keine Transaktivierungsaktivität und lagen auf dem Hintergrundlevel der Ansätze ohne Östrogenzugabe.

Da Notch das zelluläre Äquivalent zu dem viralen EBNA-2 ist, wurde außerdem untersucht, ob es den TAP-CBF1-Fusionsproteinen möglich ist auch Notch zu rekrutieren. Hierzu wurden CBF1-TAP bzw. TAP-CBF1, TAP-tag, Notch und das 12xLuc-Promotor-Reporter-Gen-Konstrukt in die humane, CBF1 negative Burkitt-Lymphom-Zelllinie SM224.9 transient transfiziert. Als Hintergrundkontrolle wurden alle transienten Transfektionen ohne Notch durchgeführt. Das 12xLuc-Promotor-Reporter-Gen-Konstrukt ähnelt dem oben beschriebenen Cpwt-Konstrukt, wobei es zwölf CBF1-Erkennungsstellen enthält. Da die Zelllinie SM224.9 kein endogenes CBF1 besitzt, liegen wiederum alle Effekte der transienten Transfektion dem exogen zugeführten TAP-CBF1 bzw. CBF1-TAP zugrunde. Nach 48 h wurde die Luziferaseaktivität gemessen und gegen die β -Galaktosidaseaktivität normalisiert. In Abbildung 4.10B sind die Ergebnisse dieser Transfektion zusammengestellt. Hier zeigte sich, dass die Kontrolltransfektion mit TAP-tag eine leichte Transaktivierung aufwies, diese jedoch auf demselben Niveau wie die Vektorkontroll-Transfektion lag, die kein CBF1-Konstrukt enthielt. Das Hintergrundlevel der Kontrollansätze ohne Notch, dargestellt in violetten Balken, lag in allen Ansätzen auf ungefähr demselben Niveau. Die Transaktivierungsaktivität von CBF1-TAP und TAP-CBF1 zeigt dasselbe Ergebnis wie schon mit EBNA-2 in Abbildung 4.10A. So besitzt TAP-CBF1 wieder ca. 80% seiner Funktionalität im Vergleich zu CBF1-TAP. CBF1-TAP hingegen zeigte eine ähnliche Funktionalität wie wtCBF1, da die Transaktivierungsaktivität in beiden Ansätzen ungefähr gleich war.

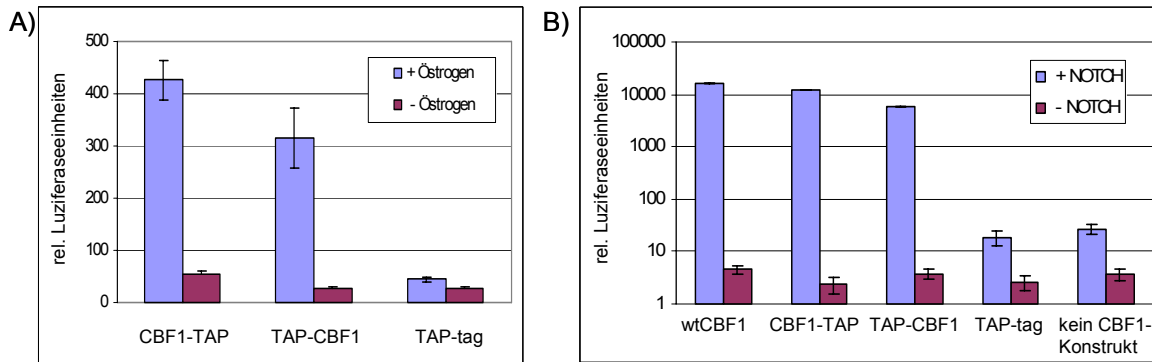


Abb. 4.10: TAP getagtes CBF1 rekrutiert EBNA-2 und Notch

(A) Die Aktivierung des Cpwt Promotor-Reportergen-Konstrukts (enthält vier CBF1-Erkennungsstellen) wurde 48 h nach transienter Transfektion von CBF1-TAP, TAP-CBF1 und TAP-tag in SM296 Zellen in Anwesenheit von Östrogen gemessen (in blau). Die Ansätze in violett ohne Östrogenzugabe dienten als Hintergrundkontrolle. (B) Die Aktivierung des 12xLuc-Promotor-Reportergen-Konstrukts (enthält zwölf CBF1-Erkennungsstellen) wurde 48 h nach transienter Transfektion von wtCBF1, CBF1-TAP, TAP-CBF1, TAP-tag und Vektor in SM224.9 Zellen gemessen (in blau). In allen Ansätzen wurde zusätzlich das Notch-Plasmid transfiziert. Als Hintergrundkontrolle dienten die Ansätze ohne Notch-Plasmid (violette Balken). Die Luciferaseaktivität ist auf die β -Galactosidaseaktivität normalisiert und in relativen Luciferaseeinheiten angegeben. Alle dargestellten Ergebnisse zeigen die Mittelwerte von Triplikaten und deren Standardabweichung.

4.2.1.2.2 TAP getagtes EBNA-2 wird von CBF1 rekrutiert

Um TAP-EBNA-2 auf seine Funktionalität hin zu überprüfen, wurde eine Luciferaseaktivitätsbestimmung nach transienter Transfektion in die humane Burkitt-Lymphom-Zelllinie DG75 durchgeführt. Da es sich bei DG75 um eine EBV negative Zelllinie handelt, enthält diese kein endogenes EBNA-2 und alle Effekte lassen sich somit auf das transfizierte TAP-EBNA-2 zurückführen. In allen TAP-EBNA-2 Transfektionen wurde das unter 4.2.1.2.2 beschriebene Cpwt-Promotor-Reportergen-Konstrukt verwendet. Ein funktionelles TAP-EBNA-2 kann von dem endogenen CBF1 rekrutiert werden und das Luciferasegen transaktivieren. Als Hintergrundkontrolle dienten Transfektionen mit dem Cpmut-Promotor-Reportergen-Konstrukt, das wie das Cpwt-Konstrukt aufgebaut ist, jedoch vier mutierte CBF1-Erkennungsstellen enthält, sodass eine CBF1-Bindung nicht mehr möglich ist. Die verschiedenen TAP-EBNA-2-Konstrukte, sowie wtEBNA-2 und der TAP-tag wurden entweder mit Cpwt oder mit Cpmut transient in DG75 transfiziert und nach 48 h geerntet. Die Luciferaseaktivität wurde gemessen und gegen die β -Galaktosidaseaktivität normalisiert (Abb. 4.11).

Da das wtEBNA-2 nur in dem Vektor pSG5 zur Verfügung stand, wurde die Transaktivierung von wtEBNA-2 mit der des Zwischenklons TAP-EBNA-2 in pSG5 verglichen (Abb. 4.11A). Die Transfektion mit TAP-tag wies eine geringe Transaktivierungsaktivität auf, die jedoch auf dem Niveau der Hintergrundkontrollen mit dem Cpmut-Konstrukt lag (violette Balken). Im Vergleich zum Kontrollansatz mit TAP-tag zeigte wtEBNA-2 eine ca. 6fach höhere und TAP-EBNA-2 in pSG5 eine ca. 4,3fach höhere Transaktivierungsaktivität. Somit besitzt TAP-EBNA-2 in pSG5 ungefähr 70% der wtEBNA-2 Funktionalität.

Das Ergebnis des Funktionalitätstests von TAP-EBNA-2 ist in Abbildung 4.11B gezeigt. Auch hier wies der TAP-tag eine Transaktivierungsaktivität auf Hintergrundlevel auf. TAP-EBNA-2 hingegen ist auch in seinem Endvektor funktionell und konnte von CBF1 rekrutiert werden. TAP-EBNA-2 wies eine ca. 5fach höhere Transaktivierungsaktivität im Vergleich zur TAP-tag Kontrolle auf.

In Abbildung 4.11C ist der Vergleich von TAP-EBNA-2 in pSG5 und TAP-EBNA-2 dargestellt. Da beide Ansätze ungefähr dieselbe Transaktivierungsaktivität aufwiesen, kann daraus geschlossen werden, dass TAP-EBNA-2 auch ungefähr 70% der wtEBNA-2 Funktionalität besitzt.

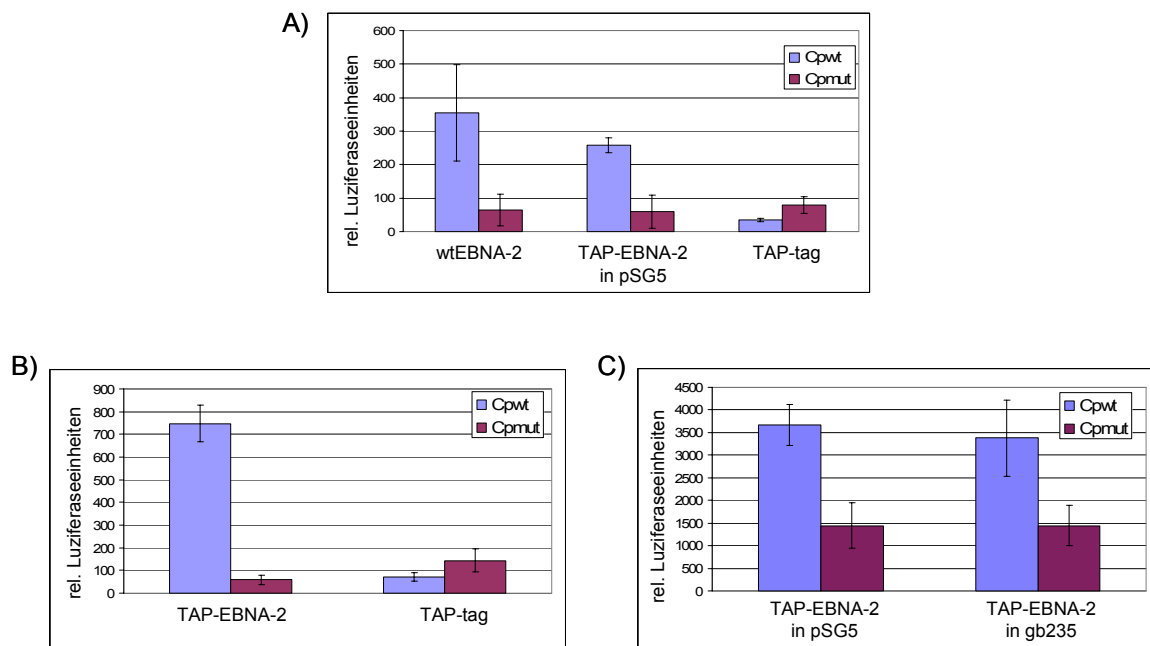


Abb. 4.11: TAP-EBNA-2 wird von CBF1 rekrutiert

In allen drei Teilabbildungen wurde die Aktivierung des CpwT-Promotor-Reportergen-Konstrukts (enthält vier CBF1-Erkennungsstellen) 48 h nach transients Transfektion in DG75-Zellen gemessen (in blau). Als Hintergrundkontrolle diente die Aktivierung des Cpmut-Promotor-Reportergen-Konstrukts (enthält vier mutierte CBF1-Erkennungsstellen) (in violett). In (A) wurden wtEBNA-2, TAP-EBNA-2 und TAP-tag im Vektor pSG5 transfiziert, in (B) TAP-EBNA-2 im Endvektor gb235 und TAP-tag im Endvektor gb235. In (C) wurden TAP-EBNA-2 im Vektor pSG5 und TAP-EBNA-2 im Endvektor gb235 transfiziert. Die Luciferaseaktivität wurde auf die β -Galaktosidaseaktivität normalisiert und ist in relativen Luciferaseeinheiten angegeben. Alle dargestellten Ergebnisse zeigen die Mittelwerte von Triplikaten und deren Standardabweichungen.

4.2.1.3 Expression der TAP-Fusionsproteine in stabilen Zelllinien

Da EBV B-Zellen infiziert, wurde für die Identifikation von EBNA-2 bzw. CBF1 assoziierten Proteinen eine humane B-Zelllinie gewählt. Hierfür eignete sich am Besten die Zelllinie DG75, da diese eine EBV negative Zelllinie ist und somit sichergestellt ist, dass nur zelluläre Interaktionspartner identifiziert werden können. Des Weiteren kann es zu keiner Kompetition zwischen endogenem und TAP getaggten EBNA-2 um Interaktionspartner kommen.

Für CBF1 war diese Zelllinie auch von Vorteil, da eine „knock out“ Zelllinie von DG75 existiert, die kein endogenes CBF1 mehr exprimiert. Diese Zelllinie wird mit SM224.9 bezeichnet.

Für die stabile Expression wurde das Expressionsvektor-Rückgrat eines episomal replizierenden Vektors (gb235) gewählt. Die Transkription der TAP-Fusionsproteine steht hier unter der Kontrolle des SV40-Promotors. Des Weiteren enthält der Vektor eine Hygromycin B-Resistenzkassette, die es ermöglicht auf Einzelzellklone, die das Plasmid aufgenommen haben, zu selektieren.

Zwei Tage nach der Transfektion der TAP-Fusionsproteine in die Zelllinien DG75 bzw. SM224.9 wurden die Zellen in verschiedenen Konzentrationen in 96 well Platten ausgesät und unter Zugabe von Hygromycin B unter Selektion kultiviert. Die so erhaltenen Einzelklone wurden in Western Blot Analysen auf die Expression des TAP-Fusionsproteins überprüft. In fast allen getesteten Klonen von TAP-CBF1 in SM224.9 konnte die Expression von TAP-CBF1 nachgewiesen werden (Abb. 4.12A). Als Negativkontrolle diente hier die verwendete Zelllinie SM224.9 (Spur 1) und als Positivkontrolle die Zelllinie DG75 (Spur 9).

Auch die meisten der TAP-EBNA-2 Klone in DG75 wiesen ein positives Signal im Bezug auf die TAP-EBNA-2-Expression auf (Abb. 4.12B). Als Negativkontrolle wurde hier DG75 (Spur 1) und als Positivkontrolle die EBV positive lymphoblastische Zelllinie 721 (Spur 9) verwendet. Diese beiden Kontrollen wurden auch für die Überprüfung der Expression von TAP-EBNA-2 in der CBF1 negativen Zelllinie SM224.9 verwendet (Abb. 4.12C). In diesem Ansatz konnten auch einige positive Klone identifiziert werden.

Für die weiteren Experimente wurde der TAP-CBF1 exprimierende Klon AH276-1 (Abb. 4.12A Spur 2) verwendet, der TAP-EBNA-2-Klon AH304-9 (Abb. 4.12B Spur 7) und der TAP-EBNA-2-Klon AH305-9, der das Protein in dem CBF1 negativen Hintergrund von SM224.9 exprimiert (Abb. 4.12C Spur 6).

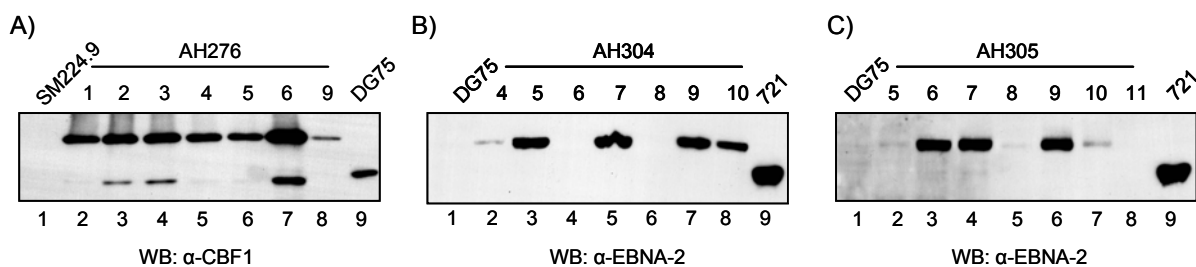


Abb. 4.12: Überprüfung der Expression der TAP-Fusionsproteine nach stabiler Transfektion

10 µg TAP-CBF1 wurden in 1×10^7 Zellen SM224.9 (A) und 10 µg TAP-EBNA-2 in 1×10^7 Zellen DG75 (B), sowie 10 µg TAP-EBNA-2 in 1×10^7 Zellen SM224.9 (C) transfiziert. Nach zweitägiger Inkubation bei 37°C wurden die Zellen unter Hygromycin B selektiert und isolierte Einzelklone in Western Blot Analysen auf die Expression der Fusionsproteine untersucht. Die Auftrennung von jeweils 10 µg Proteinlysate erfolgte in einem 10%igen Polyacrylamidgel. Als Positivkontrolle diente in (A) die Zelllinie DG75 und in (B) und (C) die EBV positive Zelllinie 721 (jeweils Spur 9). In (B) und (C) diente die EBV negative Zelllinie DG75 (jeweils Spur 1) als Negativkontrolle, in (A) hingegen die CBF1 negative Zelllinie SM224.9. Die Detektion erfolgte mit dem CBF1 spezifischen Antikörper 7A11-161 in (A) und mit dem EBNA-2 spezifischen Antikörper R3-1-3 in (B) und (C).

Um physiologisch relevante Ergebnisse zu erhalten, war es wichtig, dass die TAP-Fusionsproteine auf physiologischem Level exprimiert wurden. Hierfür wurden 10 µg Proteinlysate der stabilen Zelllinien mit dem der Wildtyp-Protein exprimierenden Zelllinien in einer Western Blot Analyse mit spezifischen Antikörpern verglichen. Für TAP-CBF1 (AH276-1) erfolgte der Vergleich mit der EBV negativen Zelllinie DG75 und für TAP-EBNA-2 (AH304-9) mit der EBV positiven Zelllinie 721. Das Ergebnis ist in Abbildung 4.13 dargestellt. Hier lässt sich eindeutig feststellen, dass sowohl TAP-CBF1 (Abb. 4.13A), als auch TAP-EBNA-2 (Abb. 4.13B) jeweils ein gleich starkes Signal liefern wie die dazugehörigen wt Proteine.

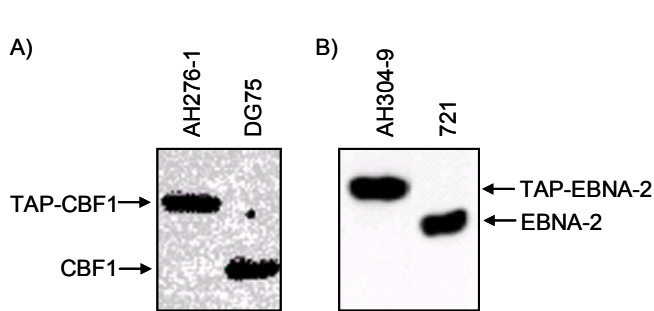


Abb. 4.13: Expression der TAP-Fusionsproteine auf physiologischem Level

Die etablierten, stabilen Zelllinien wurden auf die Expressionslevel ihrer TAP-Fusionsproteine untersucht. Hierzu wurden jeweils 10 µg des Proteinlysats der stabilen Zelllinien und der wt Protein exprimierenden Zelllinien auf einem 8%igem Polyacrylamidgel aufgetrennt. Als Vergleichszelllinie für TAP-CBF1 wurde die Zelllinie DG75 gewählt (A) und für TAP-EBNA-2 die EBV positive Zelllinie 721 (B). Die Detektion erfolgte in (A) mit dem CBF1 spezifischem Antikörper 7A11-161 und in (B) mit dem EBNA-2 spezifischen Antikörper R3-1-3.

Um sicherzustellen, dass die Zelllinien auch den TAP-tag exprimieren, wurde dies in einer Western Blot Analyse mit einem Antikörper nachgewiesen, der an den ProteinA-tag des TAP-tag bindet (Abb. 4.14). In den Spuren 2 und 3 ist ein deutliches Signal erkennbar, wohingegen die Negativkontrolle DG75 in Spur 1 kein Signal aufweist. AH276-1 und AH304-9, sowie AH305-9 (Western Blot nicht gezeigt) exprimieren somit das vollständige TAP-Fusionsprotein.

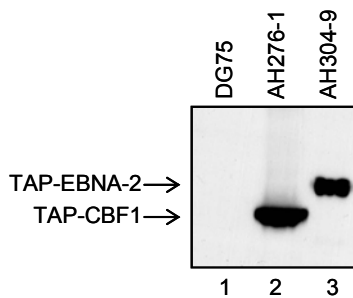


Abb. 4.14: Expression des TAP-tags in den stabilen Zelllinien AH276-1 und AH304-9

Die etablierten, stabilen Zelllinien wurden auf die Expression des TAP-tags untersucht. Hierzu wurden jeweils 10 µg des Proteinlysates auf einem 8%igem Polyacrylamidgel aufgetrennt. Als Negativkontrolle wurde die Zelllinie DG75 (Spur1) gewählt, da diese kein Fusionsprotein enthält. Die Detektion des TAP-tags (Spur 2 und 3) erfolgte mit dem PAP-Antikörper.

4.2.2 Etablierung der TAP-Reinigung

Die TAP-Reinigung wurde am EMBL von der Arbeitsgruppe Seraphin (Rigaut et al., 1999) entwickelt und ermöglicht eine spezifische Anreicherung von Multiproteinkomplexen. Die genaue Abfolge der einzelnen Schritte der TAP-Reinigung sind in der Einleitung in Kapitel 1.4.1 ausführlich beschrieben. Da diese Methode allerdings zur Aufreinigung nativer Komplexe in Hefezellen entwickelt wurde, war es notwendig, die Methode für die Anwendung in humanen B-Zellen zu optimieren.

4.2.2.1 Beeinträchtigt endogenes IgM die Effizienz der TAP-Reinigung?

Da im ersten Schritt der TAP-Reinigung eine Bindung von Protein A an IgG erfolgt, musste geklärt werden, ob Protein A auch mit dem in B-Zellen endogen exprimierten IgM interagiert. Hierzu wurde in den Zelllinien AH276-1 und AH304-9 eine Immunpräzipitation mit einem CBF1 spezifischen Antikörper durchgeführt und die erhaltenen Präzipitate anschließend in Western Blot Analysen untersucht. Bei einer Interaktion zwischen dem ProteinA-tag des TAP-tags mit IgM, würde IgM in einer Western Blot Analyse in der Spur des jeweiligen Präzipitates nachgewiesen werden können.

Um zu testen, ob die Immunpräzipitation erfolgreich verlief, wurde eine Western Blot Analyse mit einem CBF1 spezifischen Antikörper durchgeführt (Abb. 4.15). Im untersten Bild sind in Spur 1 und Spur 7 die Positivkontrollen für CBF1 zu sehen und in Spur 6 die Negativkontrolle. Die Lysate der beiden für die Immunpräzipitation verwendeten Zelllinien zeigen das erwartete Signal für CBF1 (Spur 2 und 4). Ebenfalls zeigen beide Präzipitate (Spur 3 und 5) ein CBF1-Signal. Es ist auch deutlich zu erkennen, dass TAP-CBF1 (Spur 2 und 3) im Vergleich zu endogenem CBF1 im Gel höher läuft. Die Ko-Immunpräzipitation von TAP-EBNA-2 in der Zelllinie AH304-9 ist in der mittleren Abbildung dargestellt. Hier wurde ein EBNA-2 spezifischer Antikörper verwendet, der ein deutliches Signal in der Positivkontrolle, der EBV positiven Zelllinie 721 (Spur 7), aufweist. Auch hier ist der Größenunterschied zwischen endogenem EBNA-2 (Spur 7) und TAP-EBNA-2 (Spur 4 und 5) deutlich zu erkennen. In dem Präzipitat (Spur 5) ist ein schwaches, aber deutliches TAP-EBNA-2-Signal erkennbar, was die Ko-Immunpräzipitation durch CBF1 bestätigt.

Im obersten Bild dieser Abbildung ist die Analyse zur IgM-Bindung dargestellt. So zeigt sich deutlich, dass die beiden Zelllinien DG75 (Spur 1) und SM224.9 (Spur 6), aus denen die hier verwendeten Zelllinien AH276-1 und AH304-9 etabliert wurden, eine große Menge an IgM exprimieren. Dies bestätigt sich auch in den Lysatspuren 2 und 4. Die beiden Präzipitatspuren 3 und 5 weisen jedoch kein IgM-Signal auf.

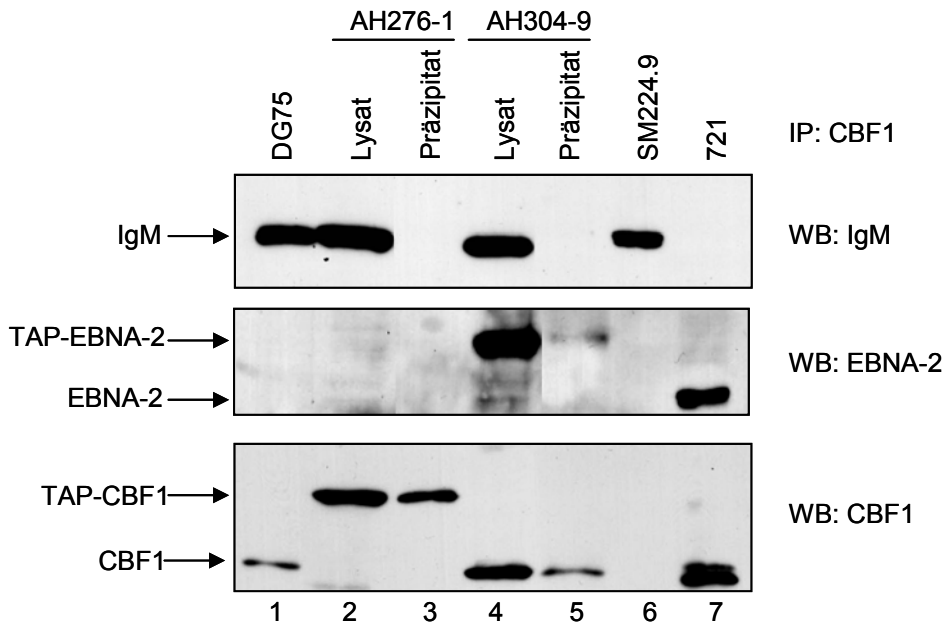


Abb. 4.15: Der Protein A-tag bindet nicht an endogenes IgM

Zur Untersuchung der Bindung des Protein A-tags an endogenes IgM wurde eine Immunpräzipitation durchgeführt. Hierzu wurden je 1×10^7 Zellen der Zelllinien AH276-1 und AH304-9 nach NP40-Lyse mit dem CBF1 spezifischen Antikörper (C-20; Santa Cruz) präzipitiert und auf einem 8%igen SDS-PAGE aufgetrennt. Als Kontrollzelllinien wurden die EBV negative Zelllinie DG75 (Spur 1), die CBF1 negative Zelllinie SM224.9 (Spur 6) und die EBV positive Zelllinie 721 (Spur 7) verwendet. Die Detektion erfolgte mit CBF1 (7A11-161), EBNA-2 (R3-1-3) und IgM spezifischen Antikörpern.

Dieses Experiment, das mit zwei verschiedenen TAP-Fusionsprotein exprimierenden Zelllinien durchgeführt worden ist, zeigt, dass der ProteinA-tag nicht an endogenes IgM bindet.

4.2.2.2 Optimierung des 1. Schrittes der TAP-Reinigung – Die ProtA/IgG-Bindung

Da die TAP-Reinigung zur Aufreinigung nativer Komplexe aus Hefezellen entwickelt wurde, musste überprüft werden, ob das Protokoll auch zur Aufreinigung von Komplexen aus humanen B-Zellen übernommen werden konnte.

Das im Labor von Seraphin entwickelte Protokoll sieht für den 1. Schritt der TAP-Reinigung eine 1stündige Inkubation des Zelllysates mit den IgG-Sepharose-Beads vor (Rigaut et al., 1999). In Abbildung 4.16 ist eine 1stündige Inkubation des Lysates mit den IgG-Beads für die TAP-CBF1 exprimierende Zelllinie AH276-1 dargestellt. Im Präzipitat in Spur 4 ist ein deutliches TAP-CBF1-Signal erkennbar. Allerdings weist auch der Überstand (Spur 3) noch ein deutliches TAP-CBF1-Signal auf. Dies zeigt, dass eine 1stündige Inkubation mit IgG-Beads nicht effektiv genug ist, um nahezu das gesamte exprimierte TAP-CBF1 an die Beads zu adsorbieren.

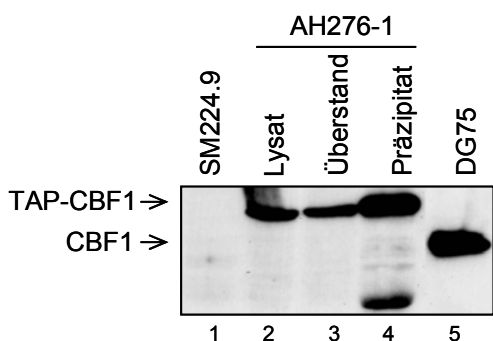


Abb. 4.16: 1stündige Inkubation mit IgG-Beads ist nicht effektiv genug

Das Lysat von 1×10^7 Zellen der Zelllinie AH276-1 wurde für 1 Stunde mit IgG-Beads inkubiert. Von allen Reinigungsschritten wurden Aliquots entnommen und Zelläquivalente auf einem 8%igen SDS-PAGE aufgetrennt. Als Negativkontrolle wurde die CBF1 negative Zelllinie SM224.9 (Spur 1) und als Positivkontrolle DG75 (Spur 5) gewählt. Die Detektion erfolgte mit dem CBF1 spezifischen Antikörper 7A11-161.

Um auszuschließen, dass es sich hierbei um ein proteinspezifisches Phänomen handelt, wurde das Optimierungsexperiment mit TAP-CBF1 und TAP-EBNA-2 durchgeführt.

Das Zelllysat der Zelllinien AH276-1 und AH304-9 wurde jeweils auf sechs Reaktionsgefäße aufgeteilt, mit IgG-Beads versetzt und für 1, 2, 4, 6 und 16 Stunden inkubiert. Nach Ablauf der jeweiligen Inkubationszeit wurden die Beads abzentrifugiert und vom Überstand getrennt. Zelläquivalente von Überstand und Beads wurden einer Western Blot Analyse unterzogen (Abb. 4.17). Vergleicht man die einzelnen TAP-CBF1-Signale der verschiedenen Inkubationszeiten in der oberen Hälfte von Abbildung 4.17A, so ist eine deutliche Anreicherung von TAP-CBF1 von 1 Stunde (Spur 1) bis hin zu 16 Stunden (Spur 5) erkennbar. In der unteren Hälfte zeigt sich das genau umgekehrte Bild. So nimmt die an die IgG-Beads gebundene Menge an TAP-CBF1 stetig von 1 Stunde (Spur 1) bis zu 16 Stunden (Spur 5) der Inkubationszeit zu. Ein sehr ähnliches Bild zeigt sich auch bei TAP-EBNA-2 in Abbildung 4.17B. Auch hier nimmt in den Überständen mit Zunahme der Inkubationszeit die Menge an detektierbarem TAP-EBNA-2 ab und an den IgG-Beads zu.

Diese Daten zeigen zum einen, dass die Dauer der notwendigen IgG-Inkubationszeit nicht proteinspezifisch ist und zum anderen, dass die optimale Inkubationszeit bei 16 Stunden liegt, was einer Inkubation über Nacht entspricht.

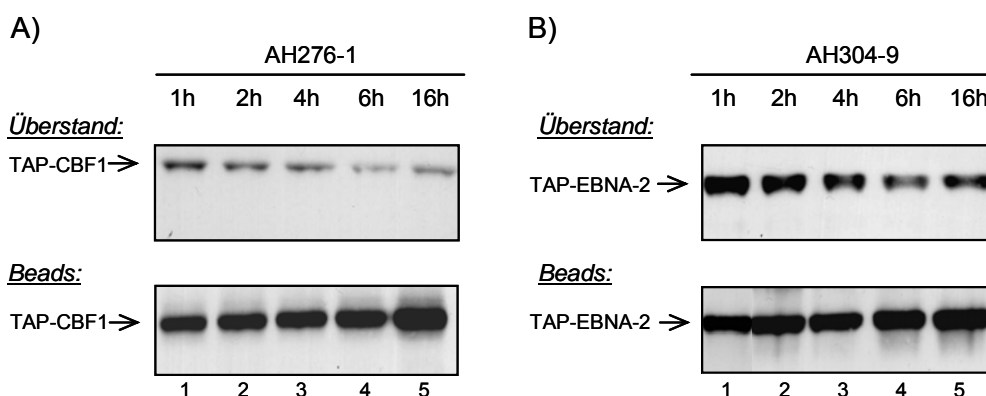


Abb. 4.17: Die optimale Inkubationszeit zur Bindung von ProtA an IgG beträgt 16 Stunden

Das Zelllysat von je 6×10^7 Zellen der Zelllinien AH276-1 (A) und AH304-9 (B) wurde auf fünf Reaktionsgefäße aufgeteilt, mit jeweils 20 μ l IgG-Beads (50% Suspension) versetzt und für 1, 2, 4, 6 und 16 Stunden inkubiert. Zelläquivalente von Überstand und Beads wurden auf einem 8%igen SDS-PAGE aufgetrennt und in einem Western Blot analysiert. Die Detektion von TAP-CBF1 erfolgte mit dem CBF1 spezifischen Antikörper 7A11-161 (A) und von TAP-EBNA-2 mit dem EBNA-2 spezifischen Antikörper R3-1-3 (B).

4.2.2.3 Optimierung der TEV-Spaltung

Das im Labor von Seraphin entwickelte Protokoll sieht für den 2. Schritt der TAP-Reinigung eine 3stündige TEV-Spaltung vor (Rigaut et al., 1999). Im Folgenden sollte überprüft werden, ob die in Hefe etablierte Inkubationszeit von 3 Stunden in humanen B-Zellen ein optimales Ergebnis liefert.

Die Elution des an die IgG-Beads gebundenen Fusionsproteins erfolgte durch eine TEV-Proteasespaltung, die unter nativen Bedingungen durchgeführt werden konnte. Der Erfolg der Spaltung lässt sich in einem Western Blot sehr einfach nachweisen, da das Fusionsprotein nach der Abspaltung des ProteinA-tags im Vergleich zu dem kompletten TAP-Fusionsprotein um ca. 15 kDa niedriger läuft.

Aufgrund der Erfahrung aus dem Optimierungstest für die ProtA/IgG-Bindung (siehe 4.2.2.2.), wurde auch für die TEV-Spaltung angenommen, dass eine etwas längere Inkubationszeit die Effizienz erhöht. Daher wurde die TEV-Spaltung bei 16°C für 8 Stunden durchgeführt. Das Ergebnis hierfür ist in der oberen Hälfte der Abbildung 4.18A dargestellt. Vergleicht man die TAP-CBF1-Signale vor (Spur 2) und nach (Spur 5) der TEV-Spaltung, so lässt sich der Erfolg der Spaltung an der nach der Spaltung (Spur 3, 4 und 5) auftretenden ca. 15 kDa kleineren Bande erkennen (bezeichnet als CBP-CBF1). In Spur 3 würde nur die Bande von CBP-CBF1 erwartet werden. Es lässt sich aber neben der CBP-CBF1-Bande noch eine etwas kleinere Bande erkennen, die wahrscheinlich ein Degradationsprodukt von CBF1 ist. Mit einem zusätzlichen Elutionsschritt (Spur 4) konnte nur wenig des noch an den IgG-Beads gebundenen CBP-CBF1 (Spur 5) eluiert werden.

Auch bei TAP-EBNA-2 (Abb. 4.18B obere Hälfte) konnte keine optimale TEV-Spaltung nach 8 Stunden erreicht werden. Zum einen konnte CBP-EBNA-2 im Eluat nicht nachgewiesen werden (Spur 3) und zum anderen war auch hier das CBP-EBNA-2 nach der Spaltung noch an die IgG-Beads gebunden (Spur 5).

Da eine TEV-Spaltung von 8 Stunden kein zufriedenstellendes Ergebnis lieferte, wurde diese, wie im Hefeprotokoll von Seraphin beschrieben, nur über einen Zeitraum von 3 Stunden durchgeführt (Abb. 4.18A und B jeweils untere Hälfte). In beiden TAP-Reinigungen lässt sich der Erfolg der TEV-Spaltung durch den Nachweis von CBP-CBF1 (A) und CBP-EBNA-2 (B) im Eluat (jeweils Spur 3) feststellen. Auch die Wiederholung des Elutionsschritts durch Zugabe von 500 µl Lysepuffer konnte die Effizienz der Elution erhöhen. Die im Eluat von CBP-CBF1 (A Spur 3 und 4 oben) nach einer 8stündigen Inkubation sichtbare zweite Bande, tritt nach einer 3stündigen Inkubation (A Spur 3 und 4 unten) nicht mehr auf. Nach der TEV-Spaltung lässt sich nur noch sehr wenig an die Beads gebundenes CBP-CBF1 (A) bzw. CBP-EBNA-2 (B) nachweisen (jeweils Spur 5). Möglicherweise kann sich zwischen den gespaltenen Fusionsproteinen CBP-CBF1 und CBP-EBNA-2 während der 8stündigen Spaltung eine unspezifische Bindung mit der Sepharose ausbilden. Warum sich nach einer 8stündigen TEV-Spaltung von TAP-EBNA-2 (Abb. 4.18B obere Hälfte; Spur 5) noch mehr ungespaltenes TAP-EBNA-2 an den Beads befindet, wie nach einer 3stündigen TEV-

Spaltung (Abb. 4.18B untere Hälfte; Spur 5) ist überraschend. Hierfür konnte keine plausible Erklärung gefunden werden.

Aufgrund der effizienten Spaltung und des Fehlens von Degradationsprodukten, wurde die Inkubationszeit für die TEV-Proteasespaltung auf 3 Stunden festgelegt.

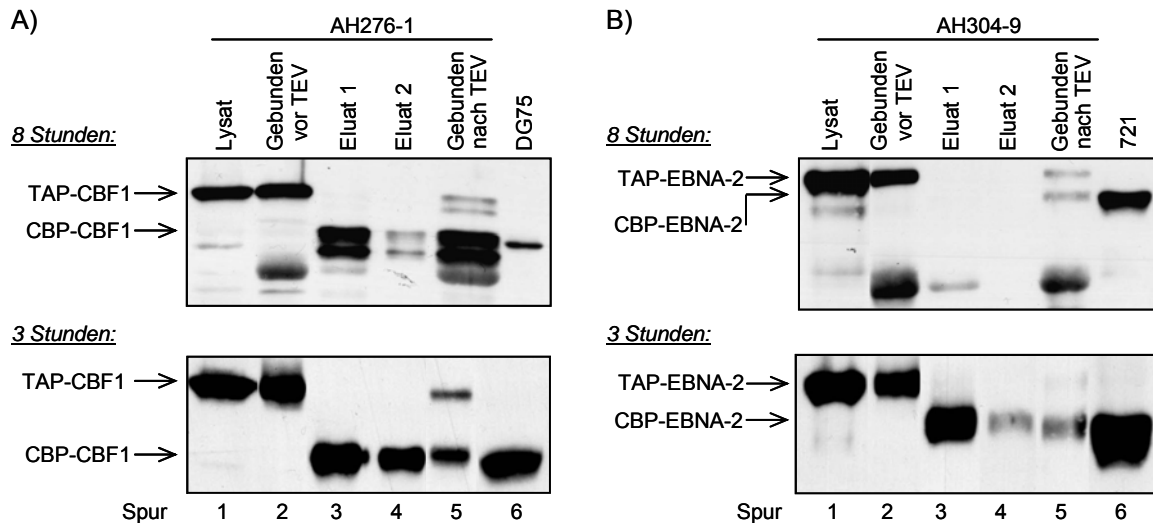


Abb. 4.18: Eine effiziente TEV-Proteasespaltung wird nach 3stündiger Inkubation erreicht

Je 1×10^8 Zellen der Zelllinien AH276-1 (A) und AH304-9 (B) wurden lysiert, über Nacht mit IgG-Beads inkubiert und anschließend einer TEV-Spaltung für 8 Stunden bei 16°C unterzogen (obere Hälfte von A und B). Im unteren Teil von (A) und (B) wurde die Reinigung wiederholt, jedoch mit einer TEV-Spaltung für 3 Stunden bei 16°C. Von den einzelnen Schritten wurden Aliquots entnommen und Zelläquivalente auf einem 10%igen (A) bzw. 8%igen (B) SDS-PAGE aufgetrennt. Die Detektion erfolgte mit dem CBF1 spezifischen Antikörper 7A11-161 (A) und dem EBNA-2 spezifischen Antikörper R3-1-3 (B).

4.2.2.4 Die TAP-Reinigung

Nachdem die TAP-Reinigung, wie in den vorangegangenen Kapiteln beschrieben, für die Anwendung in humanen B-Zellen optimiert worden war, konnte sie in größerem Maßstab durchgeführt werden.

4.2.2.4.1 Depletion von zellulären Proteinen im 1. Reinigungsschritt

Bei der Aufreinigung eines Proteinkomplexes kann es zu starken Verunreinigungen durch unspezifisch gebundene Proteine kommen, die bei der Identifikation zu sogenannten „falsch-positiven“ Ergebnissen führen können. Durch die Verwendung zweier Reinigungsschritte sollten diese unspezifischen Bindungen sehr gering sein. Um die Abreicherung von Proteinen des Zellsystems, die nicht mit EBNA-2 interagieren, nachzuweisen, wurde überprüft, ob das zelluläre, nicht mit EBNA-2 interagierende Protein GAPDH depletiert werden kann. In Abbildung 4.19 ist jedoch zu erkennen, dass das zelluläre Protein GAPDH bereits nach der Bindung an die IgG-Beads in einem Western Blot nicht mehr detektiert

werden konnte (Spur 3). In Spur 2, die ein Aliquot der ungebundenen Fraktion nach der IgG-Bindung repräsentiert, lässt sich nahezu das gesamte GAPDH wiederfinden. Als Kontrolle zur erfolgreichen Durchführung der TAP-Reinigung konnte das verwendete Fusionsprotein TAP-EBNA-2 über alle Schritte nachgewiesen werden. Aus diesem Ergebnis lässt sich schließen, dass es bereits im ersten Reinigungsschritt zu einer Depletion vieler Proteine kommt, die nicht spezifisch an die IgG-Beads binden oder nicht assoziierte Proteine des TAP-Fusionsproteins sind.

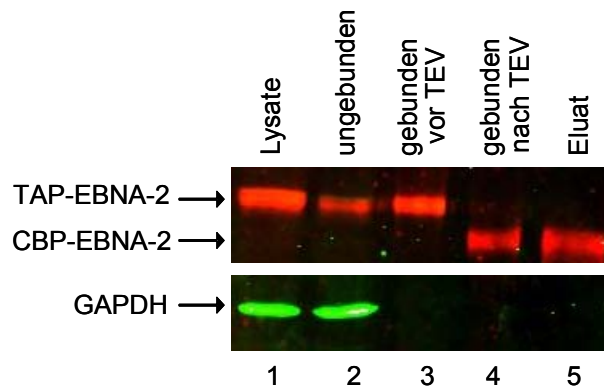


Abb. 4.19: Depletion von GAPDH als Beispiel für ein zelluläres Protein im 1. TAP-Reinigungsschritt
 1×10^9 Zellen der Zelllinie AH304-9 wurden einer TAP-Reinigung unterzogen. Es wurden Aliquots der einzelnen Reinigungsschritte entnommen und Zelläquivalente in einem 8%igen SDS-PAGE aufgetrennt. Die Detektion erfolgte mit dem EBNA-2 spezifischen Antikörper R3-1-3 und einem GAPDH spezifischen Antikörper.

4.2.2.4.2 TAP-Reinigung von TAP-EBNA-2 und dem assoziierten Protein

CBF1

Um eine ausreichende Menge an ko-gereinigten assoziierten Proteinen des TAP-Fusionsproteins im finalen Eluat für die anschließende massenspektrometrische Analyse zu erhalten, war es notwendig pro Reinigung 1×10^9 Zellen einzusetzen. Die nach der TAP-Reinigung erhaltenen Eluate wurden zur Volumeneinengung einer TCA-Fällung unterzogen und das daraus resultierende Pellet in einem 1x Laemmli-Puffer resuspendiert. Zur Überprüfung der erfolgreichen TAP-Reinigung wurden Aliquots der einzelnen Reinigungs- und Zwischenschritte auf einem 8%igen SDS-PAGE aufgetrennt und mit Hilfe der Western Blot Methode analysiert. In Abbildung 4.20 ist dies für die Reinigung von TAP-EBNA-2-Komplexen in DG75 (Zelllinie AH304-9) gezeigt. Da diese Zelllinie auch endogenes CBF1 exprimiert, war es möglich, das bereits bekannte EBNA-2 assoziierte Protein CBF1 über den gesamten Reinigungsverlauf zu verfolgen. Die aufgetragenen Proteinmengen sind in Zelläquivalenten angegeben, um einen objektiven Eindruck der Effizienz der einzelnen Schritte zu erhalten. Das EBNA-2 assoziierte Protein CBF1 kann in allen Schritten nachgewiesen werden und lässt sich auch im finalen Eluat (Spur 12 und 13) erkennen. Dies zeigt, dass *in vivo* Interaktionen von EBNA-2 mit seinen assoziierten Proteinen während der TAP-Reinigung Bestand hatten.

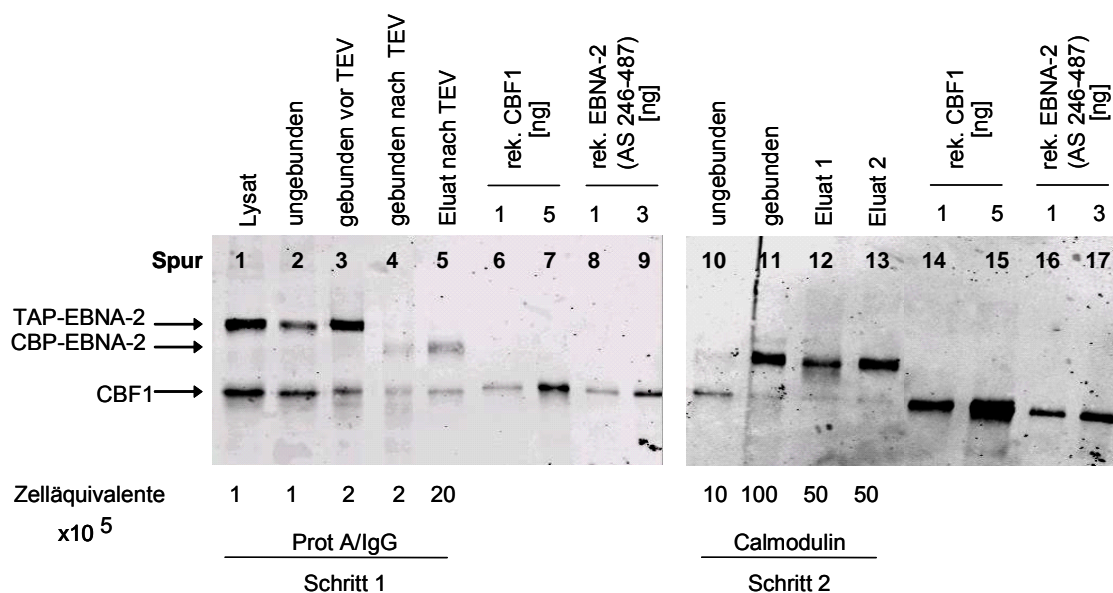


Abb. 4.20: Verlauf einer TAP-Reinigung von TAP-EBNA-2 in DG75

Für die Reinigung wurden 1×10^9 Zellen der Zelllinie AH304-9 verwendet und wie im Methodenteil beschrieben einer TAP-Reinigung unterzogen. Es wurden Aliquots der einzelnen Schritte entnommen und äquivalente Zellmengen auf einem 8%igen SDS-PAGE aufgetrennt. Die Detektion erfolgte mit dem EBNA-2 spezifischen Antikörper R3-1-3 und dem CBF1 spezifischen Antikörper 7A11-161 mit Hilfe des Odyssey Geräts.

Damit eine möglichst genaue Bestimmung der Proteinmengen erfolgen konnte (Abb. 4.21), wurde dieser Western Blot mit Hilfe des Odyssey Geräts durchgeführt. Dieses Gerät misst die Fluoreszenz eines Antikörpers mittels Infrarotscanner. Die bereits erwähnten, schwachen CBF1-Banden im Eluat (Spur 12 und 13) könnten darauf zurückzuführen sein, dass der in der Odyssey Entwicklung verwendete Fluoreszenz-gekoppelte Sekundärantikörper nicht so sensitiv ist, wie der ansonsten verwendete HRP-gekoppelte. In anderen mit Chemilumineszenz-System entwickelten Western Blots erschienen die Banden deutlicher (Western Blot nicht gezeigt).

Wie bereits erwähnt, wurde die Proteinmenge in den einzelnen Schritten der TAP-Reinigung mit Hilfe des Odyssey Geräts bestimmt. Hierfür wurden auf jedem Gel unterschiedliche Mengen von rekombinantem EBNA-2 (Spur 8, 9, 16 und 17) und CBF1 (Spur 6, 7, 14 und 15) als Bezugsgrößen aufgetragen und nach Bestimmung der Bandenintensitäten der eingesetzten Volumina auf die bei der Reinigung erhaltenen Volumina zurückgerechnet. Das Ergebnis ist in Abbildung 4.21 wiedergegeben. So wurde die Proteinmenge im Zelllysate für CBF1 und TAP-EBNA-2 jeweils auf 100% gesetzt. Nach dem ersten Reinigungsschritt konnten noch 15,1% TAP-EBNA-2 und 9,8% des assoziierten CBF1 nachgewiesen werden. Im finalen Eluat befanden sich dann noch 2,1% TAP-EBNA-2 und 0,27% CBF1. Im zweiten Reinigungsschritt, der Calmodulinbindung zeigte sich, dass ein Großteil von TAP-EBNA-2 entweder nicht an die Calmodulinbeads band (Spur 10), oder nicht von den Beads eluiert werden konnte (Spur 11).

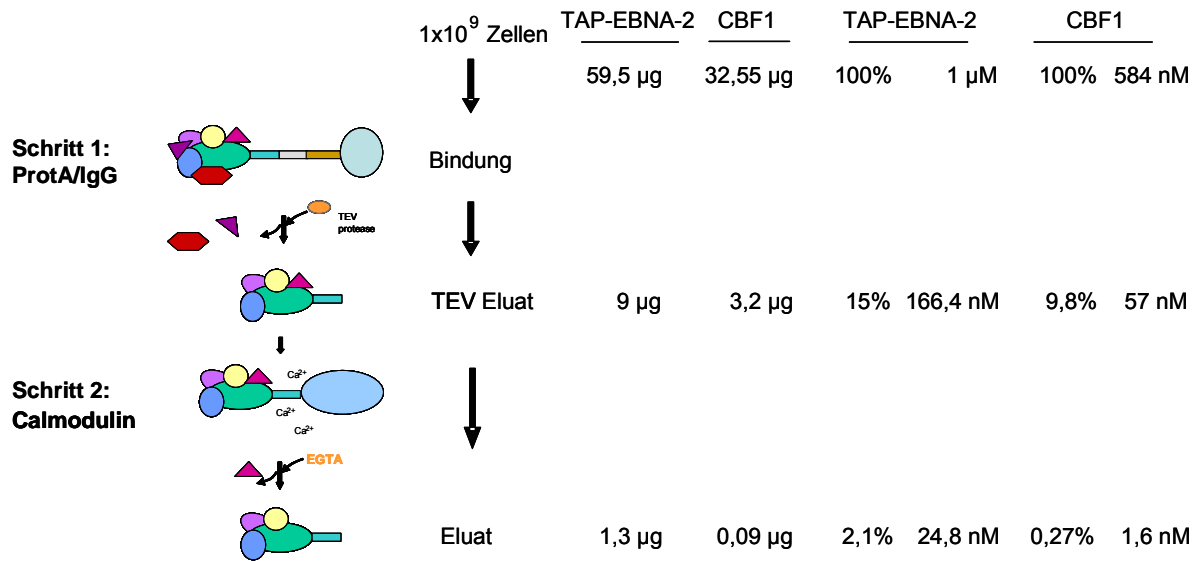


Abb. 4.21: Ausbeuten der TAP-Reinigung von TAP-EBNA-2 und dem EBNA-2 assoziierten Protein CBF1

Die Mengenbestimmung wurde für die in Abbildung 4.20 beschriebene TAP-Reinigung mit Hilfe des Odyssey Geräts durchgeführt. Als Bezugsgrößen wurden auf jedem Gel verschiedene Mengen von rekombinantem EBNA-2 und CBF1 aufgetragen.

All diese Ergebnisse stimmen mit in der Literatur angeführten Beobachtungen überein (Veraksa et al., 2005; Yang et al., 2006). Auch wenn die Ausbeuten auf den ersten Blick als äußerst gering erscheinen, sollten sie für eine massenspektrometrische Analyse ausreichen, da die Proteinmengen noch im nanomolaren Bereich liegen und für eine massenspektrometrische Analyse Mengen im femtomolaren Bereich ausreichend sind. In mehreren, unabhängig durchgeführten TAP-Reinigungen konnten die hier gezeigten Prozentwerte in ähnlichen Größenordnungen ermittelt werden.

Aliquots der finalen Eluate der TAP-Reinigung von TAP-EBNA-2 und TAP-CBF1 wurden auf einem 10%igen SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend einer Silberfärbung unterzogen. Das Ergebnis ist in Abbildung 4.22 dargestellt. In den Spuren von TAP-EBNA-2 (Spur 2) und TAP-CBF1 (Spur 3) lässt sich eine Vielzahl von Banden erkennen, die einen sehr weiten molekularen Bereich abdecken. Einige dieser Banden lassen sich in beiden Reinigungen erkennen, was aber nicht verwunderlich ist, da CBF1 ein assoziiertes Protein von EBNA-2 ist. Um sicherzustellen, dass es sich nicht nur um Kontaminanten handelt, die an den TAP-tag binden, wurde in Spur 4 ein Aliquot einer TAP-tag Kontrolle aufgetragen. Die relativ geringe Anzahl von Banden in dieser Negativkontrolle spiegelt die Stringenz der TAP-Reinigung wieder.

Bei der TAP-Kontrolle handelt es sich um eine Zelllinie, die stabil den TAP-tag exprimiert. Da es allerdings nicht gelang eine stabile Zelllinie mit dem TAP-tag in DG75 zu generieren, wurde freundlicherweise von Frau Stephanie Tobollik ein Aliquot einer TAP-Kontrolle zur

Verfügung gestellt. Die Expression des TAP-tags erfolgt hier in Raji-Zellen, einer humanen EBV positiven Burkitt-Lymphom-Zelllinie.

Dieses Silbergel zeigt, dass sich in den TAP-Eluaten eine relativ große Anzahl von ko-gereinigten, assoziierten Proteinen befindet und die Eluate somit massenspektrometrisch analysiert werden können.

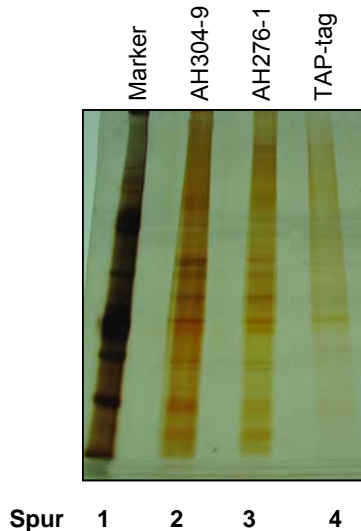


Abb. 4.22: Die finalen Eluate von TAP-EBNA-2 und TAP-CBF1 weisen ko-gereinigte assoziierte Proteine auf

Je 1×10^8 Zellen der finalen Eluate von TAP-EBNA-2 (AH204-9) und TAP-CBF1 (AH276-1), sowie der TAP-Kontrolle (Aliquot von S. Tobollik) wurden auf einem 10%igen SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine mit einer Silberfärbung sichtbar gemacht.

4.2.3 Weiterentwicklung der TAP-Reinigung zur Tandem Immunpräzipitation (TIP-Reinigung)

Da die Effizienz der TAP-Reinigung nicht zufriedenstellend war, wurde über Alternativen zur Effizienzsteigerung nachgedacht. Die Möglichkeit den Tag zu ändern wurde verworfen, da dies die Klonierung neuer Fusionsproteine, sowie deren Funktionalitätstest und die Etablierung neuer stabiler Zelllinien mit sich geführt hätte. So wurde die Möglichkeit in Betracht gezogen einen Schritt der TAP-Reinigung durch eine Immunpräzipitation zu ersetzen.

4.2.3.1 Vergleich der IgG-Affinitätsreinigung mit einer Immunpräzipitation

Zuerst wurde der erste Schritt der TAP-Reinigung, die Protein A-Bindung an IgG-Beads mit einer Immunpräzipitation verglichen. Hierzu wurde mit je 3×10^7 Zellen der TAP-EBNA-2-Zelllinie AH304-9 zum einen der erste Schritt der TAP-Reinigung bis zur Elution nach TEV-Spaltung durchgeführt und zum anderen eine Immunpräzipitation mit einem EBNA-2 spezifischen Antikörper durchgeführt.

Zelläquivalente aus Aliquots der einzelnen Zwischenschritte, sowie des finalen Eluats wurden auf einem SDS-PAGE aufgetragen und anschließend in einem Western Blot analysiert. Vergleicht man die Bandenintensitäten des finalen Eluats der TAP-Reinigung in Spur 5 und 6 (Abb. 4.23) mit dem IP-Eluat in Spur 10, so lassen sich kaum Unterschiede

feststellen. Das Ergebnis erweckt sogar den Eindruck, dass die ProtA/IgG-Bindung etwas effektiver ist als die Immunpräzipitation. Das EBNA-2 assoziierte Protein CBF1 konnte ebenfalls mit beiden Methoden im finalen Eluat in nahezu identischen Mengen angereichert werden.

Dieses Experiment zeigt, dass ein Austausch des ersten TAP-Reinigungsschritts gegen eine Immunpräzipitation keine Effizienzsteigerung mit sich bringen würde.

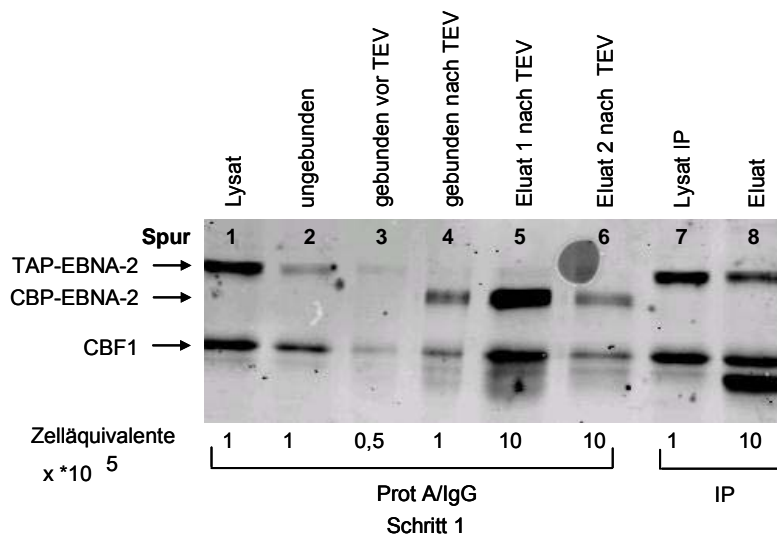


Abb. 4.23: Die Effizienz der ProtA/IgG-Bindung im Vergleich zur Immunpräzipitation ist nahezu identisch

Mit je 3×10^7 Zellen der TAP-EBNA-2-Zelllinie AH304-9 wurde entweder der erste TAP-Reinigungsschritt (ProtA/IgG-Bindung) durchgeführt oder eine Immunpräzipitation mit dem EBNA-2 spezifischen Antikörper 1E6. Zelläquivalente aus Aliquots der einzelnen Zwischenschritte, sowie dem finalen Eluat wurden auf einem 8%igen SDS-PAGE aufgetrennt. Die Detektion erfolgte mit dem EBNA-2 spezifischen Antikörper R3-1-3 und dem CBF1 spezifischen Antikörper 7A11-161.

4.2.3.2 Vergleich der Calmodulinaffinitätsreinigung mit einer Immunpräzipitation

Eine weitere Möglichkeit zur Effizienzsteigerung der TAP-Reinigung wäre ein Austausch des zweiten TAP-Reinigungsschritts, der Calmodulinbindung, mit einer Immunpräzipitation.

Mit 6×10^7 Zellen der TAP-EBNA-2-Zelllinie AH304-9 wurde die TAP-Reinigung bis zur Elution nach der TEV-Spaltung durchgeführt. Mit einem Teil des erhaltenen Eluats wurde die TAP-Reinigung mit der Calmodulinbindung fortgesetzt. Mit dem anderen Teil des Eluats wurde eine Immunpräzipitation mit einem EBNA-2 spezifischen Antikörper durchgeführt. Zelläquivalente aus Aliquots der einzelnen Zwischenschritte, sowie des finalen Eluats wurden auf einem SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend in einem Western Blot analysiert.

Durch die Bestimmung der Bandenintensitäten mit Hilfe des Odyssey Geräts war eine genaue Aussage des deutlich sichtbaren Effektivitätsunterschieds der finalen Eluate der beiden Methoden möglich (Abb. 4.24A Spur 3, 4 und 6). Da bei der Calmodulinbindung

zweimal eluiert wurde, wurden die gemessenen Intensitäten der jeweiligen EBNA-2-Banden in den beiden Eluaten (Spur 3 und 4) addiert. Somit ergab sich eine ca. 3fach höhere TAP-EBNA-2-Ausbeute bei der Immunpräzipitation im Vergleich zur Calmodulinbindung (Abb. 4.24B).

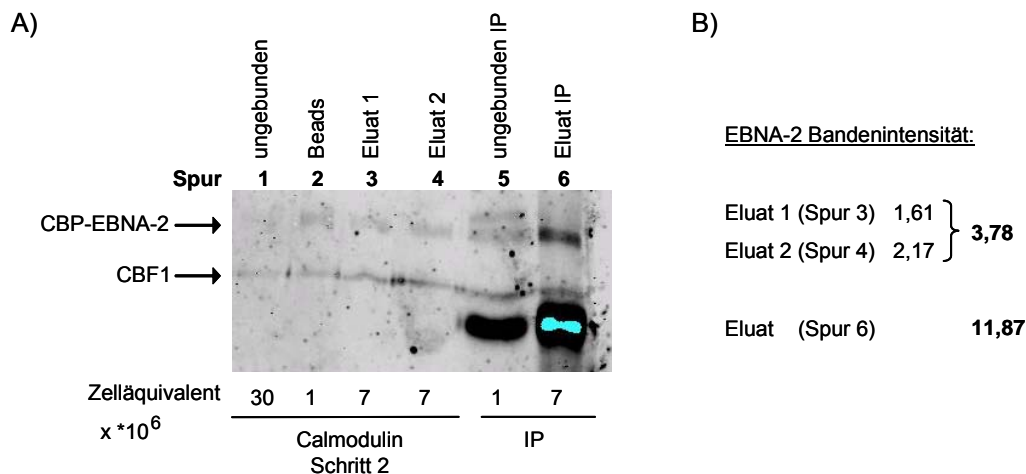


Abb. 4.24: Die Immunpräzipitation ist im Vergleich zur Calmodulinaffinitätsreinigung effektiver

Mit 6×10^7 Zellen der TAP-EBNA-2-Zelllinie AH304-9 wurde die Methode der TAP-Reinigung bis zur TEV-Elution durchgeführt. Mit einem Teil des Eluats wurde die TAP-Reinigung mit der Calmodulinbindung fortgesetzt. Der andere Teil wurde mit dem EBNA-2 spezifischen Antikörper 1E6 präzipitiert. (A) Vergleichbare Mengen der einzelnen Schritte wurden auf einem 8%igen SDS-PAGE aufgetrennt und mit dem Odyssey System detektiert. Hierfür wurde der EBNA-2 spezifische Antikörper R3-1-3 und der CBF1 spezifische Antikörper 7A11-161 verwendet. (B) Bestimmung des Effizienzunterschieds der beiden Methoden durch Bestimmung der Bandenintensitäten.

4.2.3.3 Die TIP-Reinigung

Aus den Ergebnissen von 4.2.3.1 und 4.2.3.2 konnte eine modifizierte Methode der TAP-Reinigung generiert werden, deren Effizienz etwa dreimal höher ist. Diese modifizierte TAP-Reinigung wird im Folgenden als Tandem Immunpräzipitation (TIP-Reinigung) bezeichnet. Das Prinzip der TIP-Reinigung ist in Abbildung 4.25 schematisch wiedergegeben. So entspricht Schritt 1, die ProtA/IgG-Bindung exakt dem 1. TAP-Reinigungsschritt. Als zweiter Schritt folgt eine Immunpräzipitation mit einem für das getaggte Protein spezifischen Antikörper.

Zur Bestätigung der im kleinen Maßstab erhaltenen Daten der TIP-Reinigung (siehe 4.2.3.1 und 4.2.3.2) wurden TAP-EBNA-2-Komplexe mit der TIP-Reinigung aus 1×10^9 AH304-9 Zellen aufgereinigt. Auch hier wurde die Zelllinie AH304-9 verwendet, die es ermöglicht das bereits bekannte EBNA-2 assoziierte Protein CBF1 über den gesamten Reinigungsverlauf zu verfolgen und eine Aussage über die Beständigkeit von *in vivo* Interaktionen mit EBNA-2 zu machen.

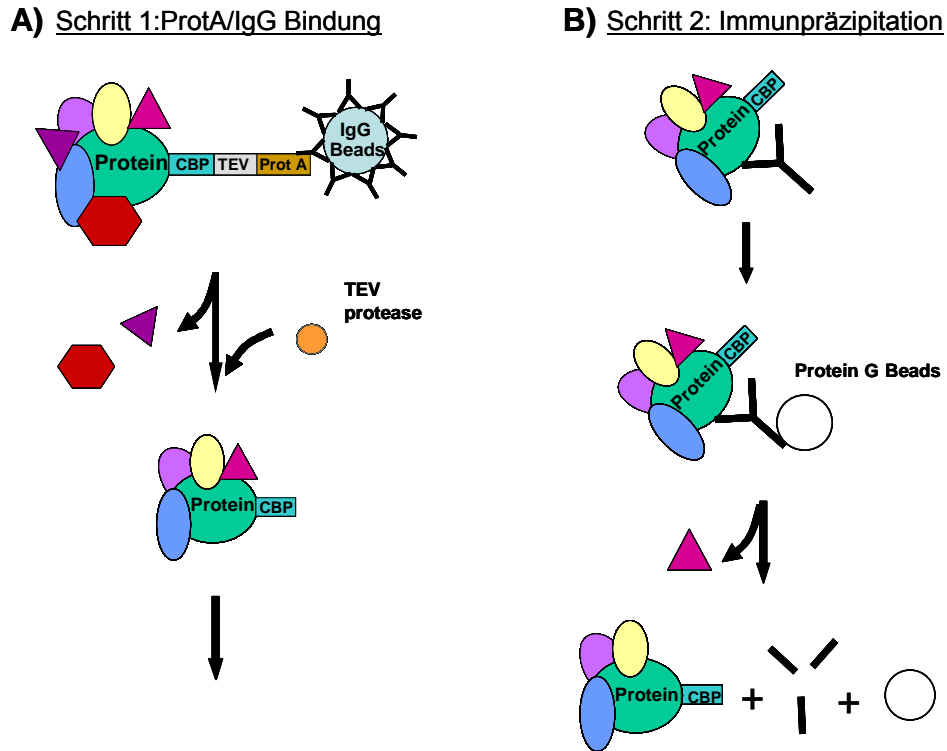


Abb. 4.25: Prinzip der TIP-Reinigung

In schematischer Form ist der Ablauf einer TIP-Reinigung dargestellt. Die Reinigung eines TAP-Fusionsproteins aus einem Zelllysate lässt sich in zwei Hauptschritte, der ProtA/IgG-Bindung (A) und der Immunpräzipitation (B) unterteilen. Im ersten Schritt (A) bindet der ProtA-tag an die mit IgG gekoppelten Sepharose-Beads. Durch die Zugabe der TEV-Protease wird der Proteinkomplex eluiert. Im zweiten Schritt (B) erfolgt eine Immunpräzipitation mit einem gegen das Fusionsprotein spezifischen Antikörper. Die Elution erfolgt durch Zugabe des Lämmli-Puffers und anschließendem Erhitzen.

Zur Mengenbestimmung wurden wiederum auf jedem Gel verschiedene Mengen von rekombinanten EBNA-2 und CBF1 als Bezugsgrößen aufgetragen, die Bandenintensitäten bestimmt und die Proteinmenge auf die bei der Reinigung erhaltenen Volumina zurückgerechnet.

Das Ergebnis ist in Abbildung 4.26 wiedergegeben. Die EBNA-2- bzw. CBF1-Proteinmenge im Zelllysate wurde jeweils auf 100% gesetzt. Nach dem ersten Reinigungsschritt konnten noch 14,7% TAP-EBNA-2 und 10,1% des assoziierten CBF1 nachgewiesen werden. Im finalen Eluat befanden sich dann noch 5,8% TAP-EBNA-2 und 1% CBF1. Dieses Ergebnis bestätigt, dass die Ausbeute bei einer TIP-Reinigung im Vergleich zur TAP-Reinigung effizienter ist. Bei dem Vergleich im kleinen Maßstab konnte eine ca. 3fach höhere TAP-EBNA-2-Ausbeute erreicht werden (4.2.3.2). Vergleicht man die Ausbeuten der TIP- und TAP-Reinigung im „normalen“ Maßstab so kann eine ca. 2,5fach höhere TAP-EBNA-2-Ausbeute erreicht werden. Dies zeigt, dass die Ausbeute bei einer TIP-Reinigung auch im „normalen“ Maßstab im Vergleich zur TAP-Reinigung besser ist.

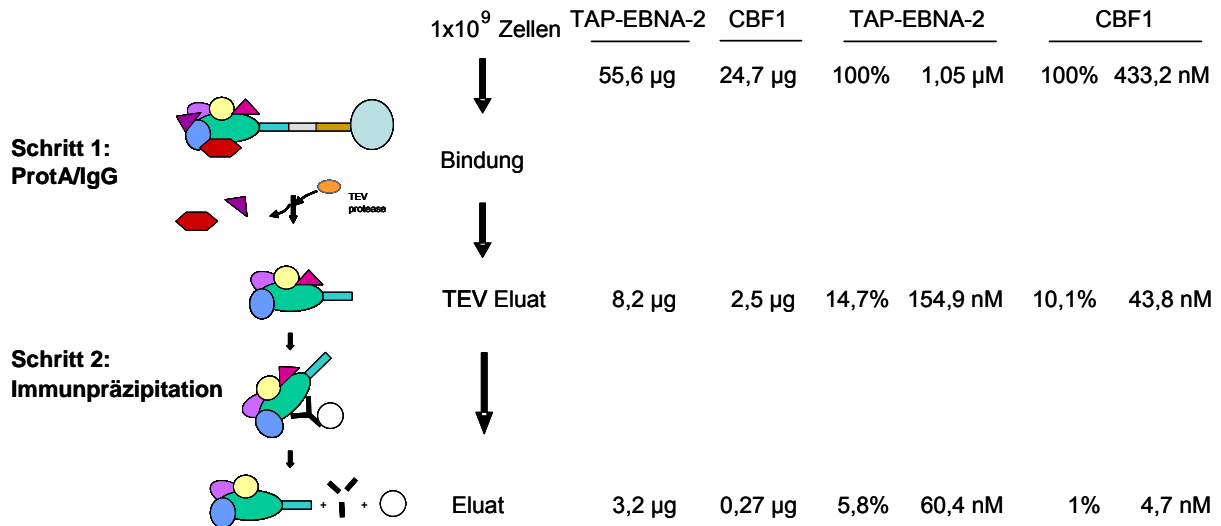


Abb. 4.26: Ausbeute der TIP-Reinigung von TAP-EBNA-2 und CBF1

Mit 1x10⁹ Zellen der Zelllinie AH304-9 wurde eine TIP-Reinigung durchgeführt. Aliquots der einzelnen Zwischenschritte wurden entnommen und Zelläquivalente auf einem 8%igen SDS-PAGE aufgetrennt. Die Mengenbestimmung wurde mit Hilfe des Odyssey Geräts durchgeführt. Als Bezugsgrößen wurden auf jedem Gel verschiedene Mengen von rekombinantem EBNA-2 und CBF1 aufgetragen.

4.2.4 Der GST pull down – eine weiteres Reinigungsprinzip

Die GST-Affinitätsreinigung, auch als „GST pull down“ bezeichnet, ist eine weitere Methode zur Identifikation von assoziierten Proteinen. Hierbei handelt es sich um eine weitverbreitete Einschrittreinigungs-Methode, bei der ein GST-Fusionsprotein mit einem Zelllysate inkubiert wird und anschließend eine GST-Reinigung stattfindet. Diese Methode wurde noch zusätzlich zur TAP-Reinigung und deren modifizierten TIP-Reinigung gewählt, da es, wie bereits unter 4.2.2.4.2 erwähnt, nicht möglich war eine DG75-Zelllinie zu generieren, die nur den TAP-tag exprimiert. Hier war es möglich, die Reinigung mit einem GST-Kontrollplasmid, das nur den GST-tag exprimiert, durchzuführen.

Da bei der TIP-Reinigung im zweiten Schritt eine Immunpräzipitation durchgeführt wird, können Proteine, die an den Bereich des Proteins binden, an den auch der Antikörper bindet, nicht identifiziert werden. Auch aus diesem Grund wurde der GST pull down noch durchgeführt. Da die beiden verwendeten GST-Fusionsproteine jeweils nur einen Teil des EBNA-2-Proteins enthielten, können möglicherweise mit dieser GST-Reinigung die Bindungsregion potentieller, neuer Interaktionspartner grob kartiert werden

Nach der massenspektrometrischen Analyse konnten Proteine, die nur an den GST-tag binden, als falsch-positiv behandelt werden. Für den „GST pull down“ wurden die beiden N-terminal getaggen GST-Konstrukte AH362 und KF214 verwendet. Beide Konstrukte beginnen mit Aminosäure (AS) 246 des EBNA-2-Proteins, KF214 endet bei AS 422, wohingegen AH362 bei AS 487 endet. Bevor der „GST pull down“ für jedes Konstrukt mit 6x10⁸ Zellen der Zelllinie DG75 durchgeführt wurde, wurde der Erfolg der Bindung des

Fusionsproteins an die Beads mittels Western Blot Analyse überprüft (Daten nicht gezeigt). Das Volumen der erhaltenen Lysate wurde jeweils mit der TCA-Fällung eingeeengt, in einem vorgegossenen SDS-Gel (im weiteren Text als NuPAGE Gel bezeichnet) über eine Strecke von ca. 1 cm elektrophoretisch aufgetrennt und jeweils zwei ca. 0,5 cm große Gelstücke ausgeschnitten. Die Gelstücke wurden dann „in Gel“ tryptisch verdaut und das daraus resultierende Peptidgemisch mit LC-MALDI-TOF/TOF analysiert.

4.2.5 Massenspektrometrische Analyse und Identifikation potentieller EBNA-2- und CBF1-Interaktionspartner

Ziel einer massenspektrometrischen Analyse ist es, durch Bestimmung der Sequenz der untersuchten Proteine und Peptide, Proteine zu identifizieren. Um dies zu erreichen, stehen zwei verschiedene Verfahren zur Verfügung, zum einen die „Peptide-Mass-Fingerprint“ (PMF)-Methode (Cottrell et al., 1994; Pappin et al., 1997) und zum anderen die MS-Sequenzierungs (MS/MS)-Technik (Steen und Mann, 2004).

Bei einer PMF-Analyse können Proteine allein aufgrund der Masse ihrer Peptide mit Hilfe einer Proteindatenbank identifiziert werden. Dabei ist es aber erforderlich, dass sich nur noch wenige Proteine in diesem Gemisch befinden. Wird ein Proteingemisch auf einem 1D- oder 2D-Gel aufgetrennt und gefärbt, können anschließend einzelne Proteinbanden bzw. Proteinspots ausgeschnitten und die darin enthaltenen Proteine nach tryptischem Verdau über ihre Peptide mittels PMF identifiziert werden.

Die MS/MS-Technik ermöglicht es, die Aminosäuresequenz einzelner Peptide zu bestimmen und kann zur Peptid-/Proteinidentifizierung verwendet werden. Bei dieser Technik wird ein einzelnes Peptid im Massenspektrometer isoliert und durch Kollision mit einem Inertgas in charakteristische Peptidfragmente zerschlagen. Anschließend werden die Massen der entstandenen Peptidfragmente bestimmt. Die am häufigsten auftretenden und aussagekräftigsten Bruchstücke entstehen durch Spaltung der Amidbindung und werden als y- und b-Ionen bezeichnet (siehe hierzu auch Kapitel 3.7.3).

Proteingemische können aber auch ohne vorheriges Auftrennen mit Trypsin verdaut werden, sei es in Lösung, oder in einem Gelstück, was in einem komplexen Peptidgemisch resultiert. Um die Komplexität dieses Peptidgemisches zu reduzieren, erfolgt eine chromatographische Auftrennung des Peptidgemisches. Diese Analysemethode ermöglichte sich erst mit Entwicklung der MS/MS-Technik, da hier die einzelnen Peptide, die viele unterschiedliche Proteine widerspiegeln, über ihre Aminosäuresequenzen identifiziert werden können.

An dem zur Verfügung stehenden Proteomanalyzer 4700 sollte im Folgenden mit Titrationsexperimenten getestet werden, ob das Ausschneiden einer Proteinbande aus einem 1D-Gel mit anschließender MALDI-MS/MS-Analyse (einer Kombination aus PMF- und MS/MS-Technik) oder die LC-MALDI-MS/MS-Analyse zu einem besseren Ergebnis führt.

4.2.5.1 Sensitivitätstest des vorhandenen MALDI-TOF/TOF-Gerätes

Rekombinantes CBF1 und Bovines Serumalbumin (BSA) wurden in verschiedenen Proteinmengen von 1000 ng bis zu 1 ng auf einem 12%igen NuPAGE aufgetrennt und mit colloidalem Coomassie gefärbt. Dabei konnte eine Nachweisgrenze von 50 ng für BSA (Spur 7) und von 100 ng für CBF1 (Spur 5) beobachtet werden (Abb. 4.27). Diese Banden wurden dann ausgeschnitten und tryptisch verdaut. Da Proben für eine massenspektrometrische Analyse möglichst salzfrei sein sollten (siehe auch 3.7.3.1), wurden die tryptisch verdauten Proben mit Hilfe von C18-Material enthaltenden Zip-Tips behandelt und dann mittels MALDI-TOF/TOF analysiert.

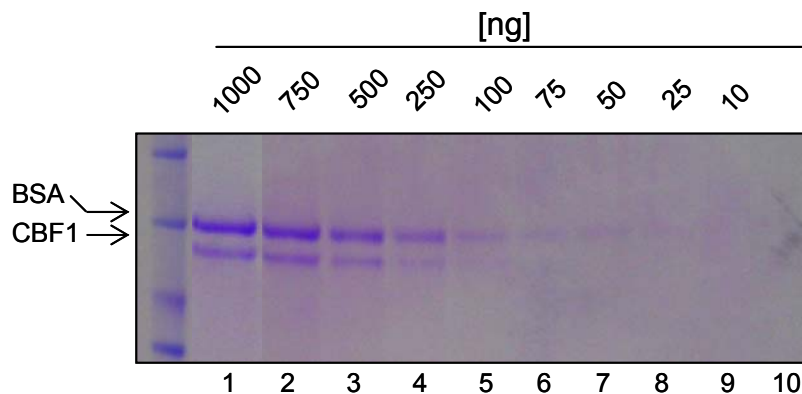


Abb. 4.27: BSA und CBF1 weisen unterschiedliche Nachweisgrenzen in einem Coomassie gefärbten Gel auf

Auf einem 12%igen NuPAGE Gel wurden verschiedenen Proteinmengen (1000 ng bis 1 ng) von BSA und rekombinantes CBF1 aufgetrennt. Die Proteine wurden anschließend durch eine colloidale Coomassie-Färbung sichtbar gemacht.

In Tabelle 4.1 sind die Ergebnisse der CBF1- und BSA-Titration zusammengefasst. Für BSA, in der Tabelle als ALBU_BOVIN bezeichnet, ergab sich eine Nachweisgrenze von 350 fM mit der MS/MS-Technik allein. Mit einer Kombination aus PMF- und MS/MS-Technik konnte eine Sensitivitätssteigerung erreicht werden, was einer Nachweisgrenze von 70 fM entspricht. Für das rekombinante CBF1, in der Tabelle mit SUH_HUMAN bezeichnet, lag die Nachweisgrenze mit der Kombination aus PMF- und MS/MS-Technik bei 664 fM. Die in der colloidalen Coomassie-Färbung (Abb. 4.27) beobachtete Tatsache, dass die Nachweisgrenze von BSA niedriger ist, als die von CBF1, wird hier ebenfalls bestätigt. Die Anzahl der jeweils gefundenen Peptide (Peptide count), die bei BSA deutlich höher war als bei CBF1, deutet daraufhin, dass die nach dem tryptischen Verdau von CBF1 erhaltenen Peptide schlechter ionisiert werden und somit weniger Peptide identifiziert werden können, was auch die etwas niedrigere Nachweisgrenze im Vergleich zu BSA erklären könnte.

Tabelle 4.1 MALDI-TOF/TOF-Analyse verschiedener Proteinmengen von BSA und CBF1

Serum albumin precursor (BSA) (P02769); MW 71,2 kDa						
BSA [ng]	Molarität	Accession Number	Peptide Count	Protein Score C.I. %	Total Ion Score C.I. %	Best Ion Score C.I. %
500	7 pM	ALBU_BOVIN	18	100,00	100,00	100,00
375	5,2 pM	ALBU_BOVIN	16	100,00	100,00	100,00
250	3,5 pM	ALBU_BOVIN	23	100,00	100,00	100,00
125	1,76 pM	ALBU_BOVIN	23	100,00	100,00	100,00
50	700 fM	ALBU_BOVIN	20	100,00	100,00	100,00
37,5	500 fM	ALBU_BOVIN	15	100,00	100,00	99,98
25	350 fM	ALBU_BOVIN	10	100,00	100,00	99,25
12,5	180 fM	ALBU_BOVIN	11	99,70		
5	70 fM	ALBU_BOVIN	13	95,73		
Recombining binding protein suppressor of hairless (J kappa-combination signal binding protein) (RBP-J kappa) (RBP-J) (RBP-JK) (CBF-1) (Q06330); MW 56,4kDa						
CBF1 [ng]	Molarität	Accession Number	Peptide Count	Protein Score C.I. %	Total Ion Score C.I. %	Best Ion Score C.I. %
500	8,9 pM	SUH_HUMAN	10	100,00	100,00	100,00
375	6,7 pM	SUH_HUMAN	10	100,00	100,00	100,00
250	4,4 pM	SUH_HUMAN	10	100,00	100,00	100,00
125	2,2 pM	SUH_HUMAN	9	100,00	100,00	99,98
50	886 fM	SUH_HUMAN	10	100,00	100,00	99,37
37,5	664 fM	SUH_HUMAN	10	99,98	99,16	99,16

Die Tabelle zeigt die Ergebnisse der MALDI-TOF/TOF-Analyse zur Nachweisgrenze von BSA und CBF1. Die einzelnen Spalten enthalten Informationen zur eingesetzten Menge, der entsprechenden Molarität, der Accession Number und der Anzahl der identifizierten Peptide (Peptide count). Die Spalte „Protein Score“ gibt die Wahrscheinlichkeit eines richtig identifizierten Proteins mit der Kombination aus PMF- und MS/MS-Technik wieder, wobei eine Identifizierung mit der MS/MS-Technik zur Berechnung des Scores nicht unbedingt stattgefunden haben muss. Der Total Ion Score gibt die Wahrscheinlichkeit eines richtig identifizierten Proteins mit der MS/MS-Technik an. Eine Wahrscheinlichkeit von > 95% ist sowohl im Protein Score, als auch im Total Ion Score statistisch signifikant. Der Best Ion Score gibt die Wahrscheinlichkeit über die richtige Identifizierung des besten gefundenen Peptids an.

4.2.5.2 LC-MALDI-TOF/TOF

Es sollte überprüft werden, ob eine LC-MALDI-TOF/TOF-Analyse verschiedener Proteinmengen von BSA und CBF1 zu einem sensitiveren Ergebnis im Vergleich zur MALDI-TOF/TOF-Analyse (4.2.5.1) führt. Hierbei kann allerdings nur eine massenspektrometrische Analyse mit der MS/MS-Technik (wie unter 4.2.5 beschrieben) angewandt werden.

Da eine Verbesserung der Sensitivität angestrebt wurde, wurden Proteinmengen von 25 ng, 19 ng und 12,5 ng verwendet. Die Proteinmengen wurden auf einem Gel aufgetragen und

anschließend tryptisch verdaut. Die so erhaltene Peptidlösung wurde jeweils mit Hilfe einer nano-Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (nanoHPLC) aufgetrennt. Für die Trennung wurde ein eindimensionaler Lauf über eine mit Reversed-Phase C18-Material gepackte Säule durchgeführt.

Mit der LC-MALDI-TOF/TOF-Analyse war es möglich, 180 fM BSA und 221 fM CBF1 mit jeweils signifikanten Total Ion Scores in % nachzuweisen (Tab. 4.2).

Somit liefert die LC-MALDI-TOF/TOF-Analyse eine niedrigere Nachweisgrenze im Vergleich zur MALDI-TOF/TOF-Analyse.

Tabelle 4.2 LC-MALDI-TOF/TOF-Analyse verschiedener Proteinmengen von BSA und CBF1

Serum albumin precursor (BSA) (P02769); MW 71,2 kDa					
BSA [ng]	Molarität	Accession Number	Peptide Count	Total Ion Score C.I. %	Best Ion Score C.I. %
25	350 fM	ALBU_BOVIN	8	100,00	100,00
19	267 fM	ALBU_BOVIN	2	100,00	100,00
12,5	180 fM	ALBU_BOVIN	5	100,00	99,94
Recombining binding protein suppressor of hairless (J kappa-combination signal binding protein) (RBP-J kappa) (RBP-J) (RBP-JK) (CBF-1) (Q06330); MW 56,4kDa					
CBF1 [ng]	Molarität	Accession Number	Peptide Count	Total Ion Score C.I. %	Best Ion Score C.I. %
25	443 fM	SUH_HUMAN	4	100,00	99,95
19	337 fM	SUH_HUMAN	4	100,00	94,99
12,5	221 fM	SUH_HUMAN	3	99,95	72,78

Die Tabelle enthält die Ergebnisse der LC-MALDI-TOF/TOF-Analyse zur Nachweisgrenze von BSA und CBF1. Die einzelnen Spalten enthalten Informationen zur eingesetzten Menge, der entsprechenden Molarität, der Accession Number und der Anzahl der identifizierten Peptide (Peptide count). Der Total Ion Score gibt die Wahrscheinlichkeit eines richtig identifizierten Proteins mit der MS/MS-Technik an. Eine Wahrscheinlichkeit von >95% ist sowohl im Protein Score, als auch im Total Ion Score statistisch signifikant. Der Best Ion Score gibt die Wahrscheinlichkeit über die richtige Identifizierung des besten gefundenen Peptids an.

4.2.5.3 Potentielle Interaktionspartner von TAP-EBNA-2 und TAP-CBF1

Aufgrund der niedrigeren Nachweisgrenzen der LC-MALDI-TOF/TOF-Analyse (siehe Kapitel 4.2.5.2) wurde die Identifikation der potentiellen Interaktionspartner von EBNA-2 und CBF1 mit der LC-MALDI-TOF/TOF-Analyse durchgeführt.

Ein weiterer Grund für diese Entscheidung war die Tatsache, dass nach Auftrennung eines finalen Eluats der TAP- oder TIP-Reinigung in einem SDS-PAGE und anschließender colloidalen Coomassie-Färbung nur sehr wenige und äußerst schwache Banden zu sehen waren. Das Ausschneiden einzelner Banden war somit nicht möglich bzw. brächte nicht den erwünschten Erfolg mit sich.

Für die LC-MALDI-TOF/TOF-Analyse hätte das nach der Reinigung von EBNA-2- und CBF1-Komplexen erhaltene Proteingemisch auch in Lösung tryptisch verdaut werden können. Da

aber eine Auftrennung über ein 1D-Gel zum einen die Komplexität der Probe weiter reduziert und zum anderen eventuell enthaltene Salze abtrennt, wurde eine andere Art der Probenvorbereitung gewählt.

Die nach der Reinigung von EBNA-2- bzw. CBF1-Komplexen erhaltenen Proteingemische wurden in einem 12%igen NuPAGE Gel ca. 1 cm weit elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend zwei ca. 0,5 cm große Gelstücke ausgeschnitten. Nachdem die Proteine „in-Gel“ tryptisch verdaut worden waren, wurde das erhaltene Peptidgemisch seiner Hydrophobizität entsprechend mittels nanoHPLC chromatographisch aufgetrennt. Mit Hilfe der Messung der Absorption bei 214 nm und 280 nm durch den UV-Detektor konnte die Trennung des Peptidgemisches verfolgt werden. Die aufgetrennten Peptide wurden mit Hilfe eines Pipettier-Roboters (Probot) automatisch mit Matrix gemischt und auf ein MALDI-Stahltarget aufgespottet (siehe 3.7.3.2). Zur Kalibrierung des MALDI-Geräts wurde auf sechs definierte Randpunkte des Targets ein Standard-Peptidgemisch aufgetragen. Das so vorbereitete MALDI-Stahltarget wurde dann massenspektrometrisch analysiert.

In Abbildung 4.28A ist exemplarisch ein MS-Spektrum dargestellt. Die Masse der einzelnen Peptide (von 900 Da bis 4000 Da) wird auf der x-Achse angegeben und die Intensität auf der y-Achse. Für die folgende MS/MS-Analyse werden aus diesem MS-Spektrum nach benutzerdefinierten Kriterien „Vorläufer“ (Precursor) ausgewählt. Die Precursor werden dann, wie unter 4.2.5 beschrieben, in charakteristische Fragmente durch Kollision mit einem Inertgas zerschlagen und analysiert. Für den in Abbildung 4.28A markierten Precursor mit einer Masse von 1090,54 Da ist in 4.28B das dazugehörige MS/MS-Spektrum dargestellt. Gezeigt ist das Fragmentmuster für das Peptid mit einer Masse von 1090,54 Da und den dazugehörigen charakteristischen Fragmenten der y- und b-Ionen Serien, die hier nahezu vollständig sind. Die einzelnen y- und b-Ionen Fragmente sind in Abbildung 4.28C in tabellarischer Form wiedergegeben.

Aufgrund benutzerdefinierter Kriterien werden pro Spot unterschiedlich viele Precursor gewählt. Hier sollten nur Precursor gewählt werden, die ein Signal-zu-Rauschverhältnis (S/N) von mehr als 20 aufwiesen; d.h. ihre Intensität ist deutlich höher als der Hintergrund. Da sich auf einem Spot nur eine definierte Menge an Probe befindet, die während der Messung durch Laserbeschuss abgetragen wird, wurde die maximale Precursorzahl auf 12 beschränkt, um auswertbare Spektren zu erhalten. Die aus der MALDI-TOF/TOF-Analyse gewonnenen MS/MS-Daten wurden in die Auswertesoftware (GPS-Explorer von ABI) geladen und dort mit Hilfe des integrierten MASCOT-Suchprogramms ausgewertet. Die Auswertung der MS/MS-Daten und die Identifizierung der Proteine, wurde ausschließlich mit einer Suche gegen die SwissProt-Proteindatenbank durchgeführt.

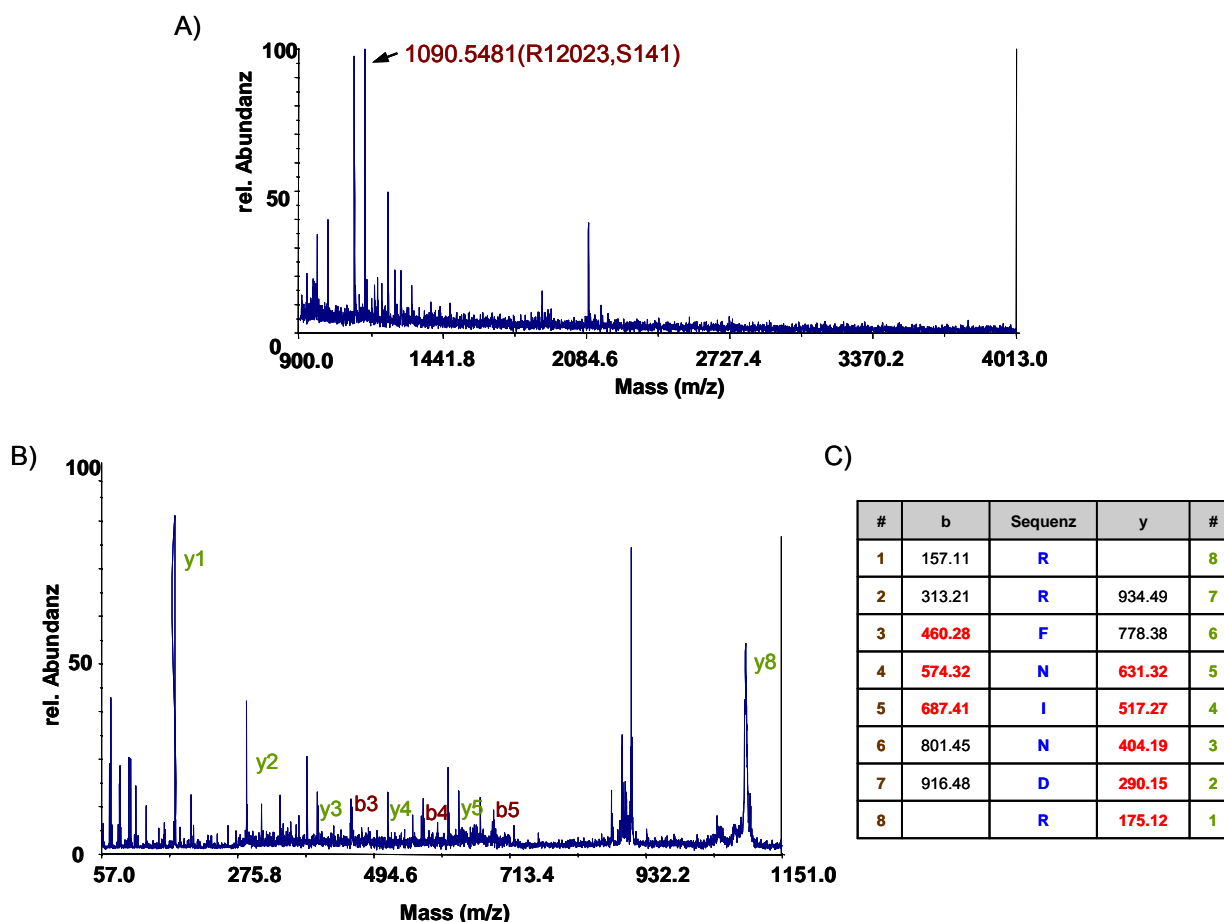


Abb. 4.28: MS- und MS/MS-Spektrum von TFE3

(A) MS-Spektrum einer 17 sek Fraktion einer nanoHPLC-Auftrennung eines tryptischen „in Gel“ Verdau einer TAP-Reinigung aus der Zelllinie AH304-9. Markiert ist das Peptid mit einer Masse von 1090,54 Da. (B) Gezeigt ist das MS/MS-Spektrum für das Peptid mit einer Masse von 1090,54 Da und den dazugehörigen charakteristischen Fragmenten der y- und b-Ionen Reihen. (C) Die einzelnen y- und b-Ionen Fragmente sind in tabellarischer Form aufgeführt. In rot sind die im Spektrum vorhandenen Fragmente hervorgehoben.

Bevor die Reinigungen mit Hilfe der LC-MS/MS-Technik analysiert wurden, wurden diese jeweils in einem Western Blot auf ihren Erfolg hin überprüft. Nur wenn das TAP-Fusionsprotein (TAP-EBNA-2 bzw. TAP-CBF1) im finalen Eluat nachgewiesen werden konnte, wurden die Reinigungen weiter verwendet.

Für die Identifikation von potentiellen EBNA-2- und/oder CBF1-Interaktionspartnern wurden mehrere unabhängige Reinigungen mit anschließender LC-MS/MS-Analyse durchgeführt. Die jeweiligen Ergebnisse sind in Tabellen zusammengefasst. Die einzelnen Listen wurden nach den im Methodenteil unter 3.7.4 beschriebenen Kriterien ausgewertet. Diese Kriterien sollen die mögliche Identifikation von sogenannten falsch-positiven Interaktionspartnern reduzieren. Bei der TIP-Reinigung wurden alle in der Kontrollreinigung signifikant identifizierten Proteine als falsch-positiv gewertet und aus der Liste der potentiellen Interaktionspartner ausgeschlossen. Auch bei den GST pull down-Reinigungen konnte durch Abgleich mit der Kontrollreinigung die Anzahl der falsch-positiven Interaktionen reduziert werden. Die erhaltenen Listen wurden auf bereits aus anderen TAP-Reinigungen bekannten Kontaminanten überprüft und diese gegebenenfalls aus der Kandidatenliste ausgeschlossen

(Shevchenko et al., 2002; Brajenovic et al., 2004; Benzinger et al., 2005). Auch offensichtliche Kontaminanten und hoch abundante Proteine wie Keratine oder Bestandteile der Immunglobuline, wurden nicht in die finalen Listen aufgenommen. Die Immunglobuline lassen sich auf den Einsatz der IgG-Beads oder der Antikörper bei der TIP-Reinigung zurückführen.

Des Weiteren wurden nur Proteine aufgelistet, die in mindestens zwei Reinigungen signifikant auftraten. Konnte ein Protein in nur einer Reinigung als signifikant gewertet werden, wurde überprüft, ob dieses Protein noch mindestens einmal signifikant in einer weiteren Reinigungen der verbleibenden „Zelllinie bzw. Reinigungsmethode“ (AH304-9, AH305-9, AH276-1 oder GST pull down) auftrat. War dies der Fall, wurden auch solche Proteine in die einzelnen Gesamtlisten aufgenommen. Ausnahmen stellen auch bereits bekannte Interaktionspartner dar. Traten diese nur einmal, aber signifikant auf, wurden auch sie in der jeweiligen Gesamtliste aufgeführt (in den einzelnen Listen farbig unterlegt).

4.2.5.3.1 TAP- und TIP-Reinigungen von TAP-EBNA-2 in der CBF1 positiven Zelllinie AH304-9

Für die Identifikation von potentiellen EBNA-2-Interaktionspartnern in der CBF1 positiven Zelllinie AH304-9 wurden insgesamt zwölf Experimente mit jeweils unabhängigen Zellextraktaufarbeitungen und Reinigungen mit anschließender LC-MS/MS-Analyse durchgeführt. Bei sieben der zwölf Reinigungen handelt es sich um TAP-Reinigungen, die restlichen fünf sind TIP-Reinigungen, wobei hier für jede einzelne Reinigung auch parallel eine Reinigung mit einer Isotypkontrolle durchgeführt wurde. Das Ergebnis aller Reinigungen ist in Tabelle 4.3 zusammengefasst. Die potentiellen EBNA-2-Interaktionspartner wurden in folgende funktionelle Gruppen eingeteilt, wobei die Anzahl der potentiellen Interaktionspartner in Klammern angegeben ist: Transkriptionsfaktoren (5), Transkription (1), Chromatin/Nukleus-Struktur (2), Histone (3), RNA-Metabolismus (9), Proteinfaltung – molekulare Chaperone (5), Protein Degradation (4), Signalwege (4), zelluläre Struktur und Transport (8), Zellproliferation (2), DNA-Reparatur (1) und in Sonstiges (22) für Proteine, die keiner Gruppe direkt zugeordnet werden konnten oder deren Funktion zum jetzigen Zeitpunkt unbekannt ist.

Die Tabelle enthält die Ergebnisse der TAP- und TIP-Reinigungen von TAP-EBNA-2 in der CBF1 positiven Zelllinie AH304-9 nach LC-MALDI-TOF/TOF-Analyse. Die einzelnen Spalten enthalten Informationen zum Proteinnamen, der Kurzform des Proteinnamens, der Accession Number und des Molekulargewichts. Des Weiteren ist der Total Ion Score in % für jede einzelne Reinigung angegeben. Die Ergebnisse wurden nach den unter 4.2.5.3 beschriebenen Kriterien ausgewertet. Die Gruppierung in funktionelle Klassen erfolgte nach den Angaben von Expasy (SwissProt) zu den einzelnen Proteinfunktionen.

Auffällig an den in Tabelle 4.3 gelisteten potentiellen EBNA-2-Interaktionspartnern ist, dass keine bereits beschriebenen Interaktionspartner gelistet sind. Tatsächlich konnten die beiden Proteine CBF1 und SNF5 (hSNF5/Ini1) in jeweils einer Reinigung mit einem Total Ion Score von 45% bzw. 52% gefunden werden, erfüllten jedoch nicht die im Methodenteil unter 3.7.4 beschriebenen Kriterien. Obwohl CBF1 in allen Western Blot Analysen nachgewiesen werden konnte, konnte es in der LC-MS/MS-Analyse nicht identifiziert werden. Bereits in den Titrationsexperimenten zeigte sich, dass für CBF1 im Vergleich zu BSA deutlich weniger Peptide identifiziert werden konnten (vgl. 4.2.5.1ff).

Mögliche Ursachen für das Nichtauftreten von bekannten Interaktionspartnern könnte zum einen in der Anzahl der entstehenden Peptide nach tryptischem Verdau liegen. Zum anderen werden möglicherweise die, nach tryptischem Verdau entstehenden, Peptide nicht so gut ionisiert.

Betrachtet man die in Tabelle 4.3 aufgeführten potentiellen Interaktionspartner näher, zeigt sich, dass nicht alle Proteine in beiden Reinigungsmethoden identifiziert werden konnten. Einige Proteine traten nur in der TAP-Reinigung auf, andere wiederum nur in der TIP-Reinigung. Möglicherweise ist die Interaktion von einigen in der TAP-Reinigung identifizierten Proteinen mit EBNA-2 genau an dem Epitop, an dem in der TIP-Reinigung die Bindung des Antikörpers an EBNA-2 erfolgt. Es ist auch möglich, dass Proteine in einer TAP-Reinigung nicht identifiziert werden konnten, da die Menge des assoziierten Proteins unter der Nachweisgrenze des MALDI-TOF/TOF-Geräts lag. Für die TIP-Reinigung konnte unter 4.2.3.3 eine ca. 2,5fach höhere Ausbeute des getaggtten Proteins im Vergleich zur TAP-Reinigung beschrieben werden. Daher ist es möglich, dass Proteine, die bei einer TAP-Reinigung unter der Nachweisgrenze lagen, bei einer TIP-Reinigung in einer ausreichenden Menge vorhanden waren und identifiziert werden konnten.

Es wird auch deutlich, dass kein Kandidatenprotein mit einer Reinigungsmethode in jedem Experiment nachgewiesen werden kann. Außerdem ist nicht auszuschließen, dass Proteine, deren Konzentration im Bereich der Nachweisgrenze liegt, nur in manchen Reinigungen identifiziert werden können. Auf die einzelnen hier aufgeführten Punkte wird in der Diskussion unter 5.3.2.2 genauer eingegangen.

Als letzter Punkt ist zu erwähnen, dass selbst bei der hohen Anzahl durchgeführter Experimente, aus dem nicht erfolgten Nachweis eines Proteins nicht unbedingt eine Schlussfolgerung gezogen werden kann.

4.2.5.3.2 TAP- und TIP-Reinigungen von TAP-EBNA-2 in der CBF1 negativen Zelllinie AH305-9

Mit der Reinigung von potentiellen EBNA-2-Interaktionspartnern in der CBF1 negativen Zelllinie AH305-9, sollte geklärt werden, welche potentiellen Interaktionspartner CBF1 abhängig oder unabhängig sind. Für die Identifikation dieser potentiellen EBNA-2-Interaktionspartner wurden insgesamt fünf Experimente mit jeweils unabhängigen Zellextraktaufarbeitungen und Reinigungen mit anschließender LC-MS/MS-Analyse durchgeführt. Bei drei der fünf Reinigungen handelt es sich um TAP-Reinigungen, die restlichen zwei sind TIP-Reinigungen, wobei hier für jede einzelne Reinigung auch parallel eine Reinigung mit einer Isotypkontrolle durchgeführt wurde. Das Ergebnis aller Reinigungen ist in Tabelle 4.4 zusammengefasst. Die potentiellen EBNA-2-Interaktionspartner wurden in folgende funktionelle Gruppen eingeteilt, wobei die Anzahl der potentiellen Interaktionspartner in Klammer angegeben ist: Transkriptionsfaktoren (2), Transkription (2), Chromatin/Nukleus-Struktur (1), Histone (1), RNA-Metabolismus (2), Protein Degradation (2), Signalwege (1), zelluläre Struktur und Transport (6), Zellproliferation (2), DNA-Reparatur (1) und in Sonstiges (17) für Proteine, die keiner Gruppe direkt zugeordnet werden konnten oder deren Funktion zum jetzigen Zeitpunkt unbekannt ist.

Wie schon in den Reinigungen von TAP-EBNA-2 in der CBF1 positiven Zelllinie AH304-9, konnten auch bei den Reinigungen in der CBF1 negativen Zelllinie AH305-9 keine bereits bekannten EBNA-2-Interaktionspartner identifiziert werden. Auch bei der Identifikation von potentiellen TAP-EBNA-2-Interaktionspartnern in Abwesenheit von CBF1 kann beobachtet werden, dass nicht alle Proteine in der TAP- und TIP-Reinigung nachgewiesen werden konnten. Als mögliche Erklärung für diese Beobachtungen können die bereits im vorherigen Abschnitt (4.2.5.3.1) aufgeführten Ursachen herangezogen werden.

Tabelle 4.4 - Fortsetzung - Potentielle EBNA-2-Interaktionspartner in der CBF1 negativen Zelllinie AH305-9

Kurzform	Proteinname	Accession number	Molekulargewicht [kDa]	Total Ion Score [%]						
				TAP-Reinigung			TIP-Reinigung			
				I	II	III	1	2		
	Sonstiges									
ABCA4	Retinal-specific ATP-binding cassette transporter	P78363	258,0			96,29				
ADA1A	Alpha-1A adrenergic receptor	P35348	53,0	90,36						
AMGO2	Amphoterin-induced protein 2 precursor (AMIGO-2)	Q86SJ2	59,0			97,98				89,19
APBA3	Amyloid beta A4 precursor protein-binding family A member 3	Q96018	62,1		93,45					
ASB2	Ankyrin repeat and SOCS box protein 2 (ASB-2)	Q96Q27	65,9			90,4			92,19	
CHL1	Neural cell adhesion molecule L1-like protein precursor	O00533	136,0	99,46		96,53				
C1055	Protein C9orf55	Q5VZ89	182,5							99,96
CN039	Hypothetical protein C14orf39	Q8N1H7	68,9						96,17	
DDEF2	Development and differentiation-enhancing factor 2	O43150	113,0		95,17					
ERBB3	Receptor tyrosine-protein kinase erbB-3 precursor	P21860	151,4	98,21		92,96				
HEATR	HEAT repeat containing protein 1 (Protein BAP28)	Q9H583	244,3						99,99	
OSBL6	Oxysterol-binding protein-related protein 6	Q9BZF3	107,4	86,1		97,12				
PEPD	Xaa-Pro dipeptidase	P12955	55,0	92,11						
SNX25	Sorting nexin-25	Q9H3E2	63,0			91,84			98,66	
SPIT2	Kunitz-type protease inhibitor 2 precursor	O43291	29,0	88,52	85,07	95,54				
WRB	Tryptophan-rich protein	O00258	19,9							82,75
XAB1	XPA-binding protein 1	Q9HCN4	41,8	85,87						

Die Tabelle enthält die Ergebnisse der TAP- und TIP-Reinigungen von TAP-EBNA-2 in der CBF1 negativen Zelllinie AH305-9 nach LC-MALDI-TOF/TOF-Analyse. Die einzelnen Spalten enthalten Informationen zum Proteinnamen, der Kurzform des Proteinnamens, der Accession Number und des Molekulargewichts. Des Weiteren ist der Total Ion Score in % für jede einzelne Reinigung angegeben. Die Ergebnisse wurden nach den unter 4.2.5.3 beschriebenen Kriterien ausgewertet. Die Gruppierung in funktionelle Klassen erfolgte nach den Angaben von Expasy (SwissProt) zu den einzelnen Proteinfunktionen.

4.2.5.3.3 GST pull down mit GST-EBNA-2-Fusionsproteinen

Da es, wie bereits unter 4.2.2.4.2 erwähnt, nicht möglich war eine DG75-Zelllinie zu generieren, die nur den TAP-tag exprimiert, wurde zusätzlich zu den TAP- und TIP-Reinigungen die Methode des GST pull downs gewählt. Hier war es möglich parallel zur Reinigung mit den beiden GST-EBNA-2-Fusionsproteinen, eine Kontrollreinigung mit einem Plasmid, das nur den GST-tag exprimiert, durchzuführen. Des Weiteren wurde der GST pull down als zusätzliche Methode gewählt, da bei der TIP-Reinigung im zweiten Schritt eine Immunpräzipitation durchgeführt wird und daher Proteine, die an das Epitop, an das der Antikörper bindet, nicht identifiziert werden können.

Für die Identifikation von potentiellen EBNA-2-Interaktionspartnern mit Hilfe der GST pull down Methode wurden insgesamt zwei Experimente mit unabhängigen Zellextrakt-aufarbeitungen und Reinigungen mit anschließender LC-MS/MS-Analyse durchgeführt. Es wurden jeweils eine Reinigung mit den unter 4.2.4 beschriebenen Konstrukten AH362 und KF214, sowie einer Kontrollreinigung mit dem GST-tag durchgeführt.

Das Ergebnis der einzelnen Reinigungen ist in Tabelle 4.5 zusammengefasst. Die potentiellen EBNA-2-Interaktionspartner wurden in folgende funktionelle Gruppen eingeteilt, wobei die Anzahl der potentiellen Interaktionspartner in Klammer angegeben ist: Transkriptionsfaktoren (3), Transkription (2), Chromatin/Nukleus-Struktur (1), Histone (1), RNA-Metabolismus (11), Proteinfaltung - molekulare Chaperone (5), Proteinmodifikation (1), zelluläre Struktur und Transport (3), Zellproliferation (1), DNA-Reparatur (1) und in Sonstiges (14) für Proteine, die keiner Gruppe direkt zugeordnet werden können oder deren Funktion zum jetzigen Zeitpunkt unbekannt ist.

Im Gegensatz zu den zuvor beschriebenen Reinigungen in den beiden Zelllinien AH304-9 und AH305-9, konnten im GST pull down in jeweils einer Reinigung die bekannten EBNA-2-Interaktionspartner SND1 (auch als p100 bezeichnet) mit einem Total Ion Score von 100% und TFIIB mit einem Total Ion Score von 83,76% nachgewiesen werden. Eine mögliche Erklärung dafür, dass einige Interaktionspartner im GST pull down nachgewiesen werden konnten, jedoch nicht in den TAP- oder TIP-Reinigungen, könnte an dem im Überschuss eingesetzten GST-Fusionsprotein liegen. In einem GST pull down wird daher nicht mit einer physiologisch vergleichbaren Menge des Proteins gearbeitet. So ist nicht auszuschließen, dass bei einer TAP- oder TIP-Reinigung die Menge der assoziierten Proteine für eine signifikante LC-MS/MS-Analyse nicht ausreichend war.

Tabelle 4.5 Potentielle EBNA-2-Interaktionspartner, die and den Bereich von AS 246 bis AS 422 bzw. AS 487 binden

Kurzform	Proteinname	Accession number	Molekulargewicht [kDa]	Total Ion Score [%]							
				AH362		KF214					
				1	2	I	II				
	Transkriptionsfaktoren										
SND1	Staphylococcal nuclease domain-containing protein 1	Q7KZF4	102,62	100							
TFE3	Transcription factor E3	P19532	80,59		91,26						
TFEB	Transcription factor EB	P19484	52,89		94,43						
	Transkription										
TF2B	Transcription initiation factor IIB (General transcription factor TFIIB)	Q00403	35,30		83,76						
TMF1	TATA element modulatory factor (TMF)	P82094	123,67		98,8						
	Chromatin/Nukleus-Struktur										
NUMA1	Nuclear mitotic apparatus protein 1 (NuMA protein)	Q14980	239,21							95,52	97,25
	Histone										
H2AC	Histone H2A, c/d/i/n/p (H2A.1)	POC0S8	14,0		89,82						
	RNA Metabolismus										
DDX21	Nucleolar RNA helicase 2 (DEAD box protein 21)	Q9NR30	87,80							100	
DDX5	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX5	P17844	69,62		92,82					100	
DHX9	ATP-dependent RNA helicase A (Nuclear DNA helicase II)	Q08211	142,10		100					100	
HNRH1	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H (hnRNP H)	P31943	49,35		99,97					100	
HNRH2	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H' (hnRNP H')	P55795	50		92,45						88,22
HNRPG	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein G (hnRNP G)	P38159	42,31		100					99,93	
HNRPK	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K (hnRNP K)	P61978	51,23		98,77					97,16	
ROA1	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	P09651	38,81		100					100	
ROA2	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1 (hnRNP A2 / hnRNP B1)	P22626	37,46		100					100	
ROA3	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3 (hnRNP A3)	P51991	39,80		99,99					100	
YBOX1	Nuclease sensitive element-binding protein 1(DNA-binding protein B)	P67809	35,9		90,99						
	Proteinfaltung -molekulare Chaperone										
CRTC	Calreticulin precursor (CRP55)	P27797	48,28		99,98						99,84
DNJA1	DnaJ homolog subfamily A member 1 (Heat shock 40 kDa protein 4)	P31689	45,58		100						
DNJBB	DnaJ homolog subfamily B member 11 precursor	Q9UBS4	40,77		100					100	
GRP78	78 kDa glucose-regulated protein precursor (GRP 78)	P11021	72,40		100					100	
HSP71	Heat shock 70 kDa protein 1 (HSP70.1)	P08107	70,29		100					100	
	Proteinmodifikation										
MEP50	Methylosome protein 50 (WD-repeat protein 77)	Q9BQA1	37,44							100	100
	Protein Degradation										
MYCB2	Probable ubiquitin ligase protein MYCBP2 (Myc binding protein 2)	O75592	518		93,58						

Tabelle 4.5 - Fortsetzung - Potentielle EBNA-2-Interaktionspartner, die and den Bereich von AS 246 bis AS 422 bzw. AS 487 binden

Kurzform	Proteinname	Accession number	Molekulargewicht [kDa]	Total Ion Score [%]					
				AH362		KF214			
				1	2	I			
	zelluläre Struktur und Transport								
KIF5A	Neuronal kinesin heavy chain	Q12840	118,2		98,51				
MACF4	Microtubule-actin crosslinking factor 1, isoform 4	Q96PK2	674,0	98,83					
TBB3	Tubulin beta-3 chain	Q13509	50,86	100	99,96	100			
	Zellproliferation								
KI67	Antigen KI-67	P46013	360,80		99,78				
	DNA Reparatur								
PRKDC	DNA-dependent protein kinase catalytic subunit	P78527	473,75	89,27					
	Sonstiges								
4F2	4F2 cell-surface antigen heavy chain (CD98 antigen)	P08195	58,02	99,96	99,98				
ALDOA	Fructose-bisphosphate aldolase A	P04075	39,72	100		99,91			
ATPA	ATP synthase alpha chain, mitochondrial precursor	P25705	59,83	100		99,95			
ATPB	ATP synthase beta chain, mitochondrial precursor	P06576	56,52	100		100			
COR1A	Coronin-1A (Coronin-like protein p57)	P31146	51,68	97,01	99,14				
DLL1	Delta-like protein 1 precursor (H-Delta-1)	O00548	81,90	94,15		83,63			
ENOA	Alpha-enolase	P06733	47,35	100		100			
GCN1L	GCN1-like protein 1 (HsGCN1)	Q92616	294,82	90,87	99,98				
GNAI3	Guanine nucleotide-binding protein G(k), alpha subunit	P08754	40,95		99,02			99,81	
ITPR3	Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 3	Q14573	306,75					99,43	87,51
KPYM	Pyruvate kinase, isozymes M1/M2	P14618	58,34	100	99,98			99,93	100
MA32	Complement component 1, Q subcomponent binding protein, mitochondrial precursor (hyaluronan-binding protein 1)	Q07021	31,74					100	100
SDF2L	Stromal cell-derived factor 2-like protein 1 precursor	Q9HCN8	23,81	100	100				
SERA	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	O43175	57,22	99,46	95,02				

Die Tabelle enthält die Ergebnisse des GST pull downs mit den Fusionsproteinen AH362 und KF214 nach LC-MALDI-TOF/TOF-Analyse. Die einzelnen Spalten enthalten Informationen zum Proteinnamen, der Kurzform des Proteinens, der Accession Number und des Molekulargewichts. Des Weitern ist der Total Ion Score in % für jede einzelne Reinigung angegeben. Die Ergebnisse wurden nach den unter 4.2.5.3 beschriebenen Kriterien ausgewertet. Die Gruppierung in funktionelle Klassen erfolgte nach den Angaben von Expasy (SwissProt) zu den einzelnen Proteinfunktionen. Bereits bekannte Interaktionspartner sind farbig unterlegt.

Die Methode des GST pull downs wurde auch gewählt, um die Bindestelle von potentiellen EBNA-2-Interaktionspartnern grob kartieren zu können. So wurde erwartet, dass es Proteine gibt, die mit AH362 (AS 246-487) interagieren, jedoch nicht mehr mit dem kürzeren KF214 (AS 246-422). Die beiden bekannten Interaktionspartner SND1 und TFIIIB können erwartungsgemäß an dem kürzeren KF214 nicht mehr identifiziert werden. Beide Proteine binden an die Transaktivierungsdomäne von EBNA-2, die in KF214 nicht mehr enthalten ist. Auch bei 18 weiteren Proteinen, darunter auch TFE3, TFEB, KI67 und PRKDC konnte dies beobachtet werden. Des Weiteren konnte eine Reihe von Proteinen identifiziert werden, die mit beiden GST-Konstrukten interagierten.

Die Anzahl der durchgeführten Experimente ist jedoch zu gering, um aus einem nicht erfolgten Nachweis eines Proteins eine Schlussfolgerung zu ziehen. So können die hier erhaltenen Ergebnisse lediglich einen Hinweis auf einen eventuellen Interaktionsbereich geben.

4.2.5.3.4 TAP- und TIP-Reinigungen von TAP-CBF1 in der CBF1 negativen Zelllinie AH276-1

Um potentielle Interaktionspartner von CBF1 zu identifizieren, wurden Reinigungen in der CBF1 negativen Zelllinie AH276-1 durchgeführt. Da diese Zelllinie kein endogenes CBF1 exprimiert, kommt es nicht zur Konkurrenz der möglichen CBF1-Bindungspartner zwischen dem TAP-getaggten CBF1 und dem endogenen CBF1. Da CBF1 ein Interaktionspartner von EBNA-2 ist, können in diesen Reinigungen auch Proteine identifiziert werden, die entweder mit EBNA-2 und CBF1 interagieren oder über eine Interaktion mit CBF1 indirekt mit EBNA-2 interagieren.

Für die Identifikation von potentiellen CBF1-Interaktionspartnern in der CBF1 negativen Zelllinie AH276-1 wurden insgesamt fünf Experimente mit unabhängigen Zellextrakt-aufarbeitungen und Reinigungen mit anschließender LC-MS/MS-Analyse durchgeführt. Bei zwei der fünf Reinigungen handelt es sich um TAP-Reinigungen, die restlichen drei sind TIP-Reinigungen, wobei hier für jede einzelne Reinigung auch parallel eine Reinigung mit einer Isotypkontrolle durchgeführt wurde. Das Ergebnis aller Reinigungen ist in Tabelle 4.6 zusammengefasst. Die potentiellen EBNA-2-Interaktionspartner wurden in folgende funktionelle Gruppen eingeteilt, wobei die Anzahl der potentiellen Interaktionspartner in Klammer angegeben ist: Translation (2), Transkription (4), Chromatin/Nukleus-Struktur (3), Histone (4), RNA-Metabolismus (8), Proteinfaltung – molekulare Chaperone (5), Proteinsynthese (4) Protein Degradation (2), Signalwege (1), zelluläre Struktur und Transport (13) und in Sonstiges (21) für Proteine, die keiner Gruppe direkt zugeordnet werden können oder deren Funktion zum jetzigen Zeitpunkt unbekannt ist.

Tabelle 4.6 - Fortsetzung - Potentielle CBF1-Interaktionspartner in der CBF1 negativen Zelllinie AH276-1

Kurzform	Proteinname	Accession number	Molekulargewicht [kDa]	TAP-Reinigung			Total Ion Score [%]		
				I	II	a	b	c	
									TIP-Reinigung
IL17E	Interleukin-17E precursor (IL-25) Signalwege	Q9H293	21	96,98			97,95	99,58	
	zelluläre Struktur und Transport								
ACTG	Actin, cytoplasmic 2	P63261	42			100	100	100	
ACTS	Actin, alpha skeletal muscle	P68133	42,4			100		100	
DYH9	Ciliary dynein heavy chain 9	Q9NYC9	515,7		97,20				
KIF5A	Kinesin heavy chain neuron-specific 1(NKHC)	Q12840	118,2						
MLRM	Myosin regulatory light chain 2, nonsarcomeric	P19105	19,7				100	100	
MOES	Moesin	P26038	67,8			100		99,97	
MYH10	Myosin-10	P35580	229,8				100	100	
MYH11	Myosin-11	P35749	228				99,97	100	
MYH9	Myosin-9	P35579	227,5			100	100	100	
TBA8	Tubulin alpha-8 chain	Q9NY65	51			100		100	
TBB2C	Tubulin beta-2C chain	P68371	50,3			100	100	100	
TPM1	Tropomyosin 1 alpha chain	P09493	32,7		93,48			88,61	
TPM3	Tropomyosin alpha 3 chain	P06753	32,9		93,48			88,61	
	Sonstiges								
ABCA4	Retinal-specific ATP-binding cassette transporter	P78363	258				97,01	98,98	
AKAP9	A-kinase anchor protein 9	Q99996	45,6		98,19			95,93	
ATPA	ATP synthase alpha chain, mitochondrial precursor	P25705	59,8			100		94,47	
ATPB	ATP synthase beta chain, mitochondrial precursor	P06576	56,5			100		99,82	
CAPZB	F-actin capping protein beta subunit (CapZ beta)	P47756	31,5		80,77			100	
CLH1	Clathrin heavy chain 1 (CLH-17)	Q00610	193			100		100	
COA2	Acetyl-CoA carboxylase 2	O00763	281,5				98,32	85,36	
COR1A	Coronin-1A	P31146	51,7			97,01		98,98	
DSC1	Desmocollin-1 precursor	Q08554	101,4		98,07				
DLG5	Discs large homolog 5	Q8TDM6	203,6		99,4			96,41	
GRAP1	GRIP1-associated protein 1 (GRASP-1)	Q4V328	96,3				98,97	99,99	
GRN	Granulins precursor	P28799	68,5				99,5	100	
HBA	Hemoglobin alpha subunit	P69905	15,2				99,86	100	
ITA11	Integrin alpha-11 precursor	Q9UKX5	13,5				99,95	98,96	
KPYM	Pyruvate kinase, isozymes M1/M2	P14618	58,3			100		100	
LSP1	Lymphocyte-specific protein 1	P33241	37,4				100	99,96	
MBB1A	Myb-binding protein 1A	Q9EQG0	149,7			89,29		96,51	
MPCP	Phosphate carrier protein, mitochondrial precursor (PTP)	Q00325	40,5			99,74		98,17	
SNX25	Sorting nexin-25	Q9H3E2	63		99,92		98,05		
TCPA	T-complex protein 1, alpha subunit (TCP-1-alpha)	P17987	60,8			99,18		99,23	
Y0552	Hypothetical protein KIAA0552	O60299	72,3				96,85	96,53	

Die Tabelle enthält die Ergebnisse der TAP- und TIP-Reinigungen von TAP-CBF1 in der CBF1 negativen Zelllinie AH276-1 nach LC-MALDI-TOF/TOF-Analyse. Die einzelnen Spalten enthalten Informationen zum Proteinnamen, der Kurzform des Proteinnamens, der Accession Number und des Molekulargewichts. Des Weiteren ist der Total Ion Score in % für jede einzelne Reinigung angegeben. Die Ergebnisse wurden nach den unter 4.2.5.3 beschriebenen Kriterien ausgewertet. Die Gruppierung in funktionelle Klassen erfolgte nach den Angaben von ExPasy (SwissProt) zu den einzelnen Proteinfunktionen. Bereits bekannte Interaktionspartner sind farbig unterlegt.

In den in Tabelle 4.6 gelisteten potentiellen CBF1-Interaktionspartnern, konnten in jeweils zwei der fünf Reinigungen die bekannten CBF1-Interaktionspartner MINT mit einem Total Ion Score von 100% bzw. 98,97% und MAML3 mit einem Total Ion Score von 97,95% bzw. 99,35% nachgewiesen werden. Auch HDAC2 konnte einmal mit einem Total Ion Score von 91,74% nachgewiesen werden. Dies zeigt, dass sich die Methode mit ihren etablierten Reinigungsbedingungen zur Identifikation von Interaktionspartnern eignet. Die Tatsache, dass einige Interaktionspartner nicht identifiziert werden können, ist neben den unter 4.2.5.3.1 aufgeführten Ursachen auch auf die proteinspezifischen Eigenschaften eines jeden Proteins zurückzuführen.

Wie schon bei den Reinigung von TAP-EBNA-2 in den Zelllinien AH304-9 und AH305-9 beobachtet werden konnte, zeigt sich auch hier, dass nicht alle Proteine in der TAP- und TIP-Reinigung nachgewiesen werden konnten. Die Gründe hierfür wurden bereits unter 4.2.5.3.1 beschrieben.

4.2.6 Gruppierung der potentiellen Interaktionspartner nach verschiedenen Gesichtspunkten

Vergleicht man die Gesamtlisten der Reinigungen von TAP-EBNA-2 in der CBF1 positiven Zelllinie AH304-9, von TAP-EBNA-2 in der CBF1 negativen Zelllinie AH305-9, von TAP-CBF1 in der CBF1 negativen Zelllinie AH276-1 und dem GST pull down, können die potentiellen Interaktionspartner teilweise in verschiedene Gruppen eingeteilt werden. So gibt es Proteine, die sowohl mit EBNA-2, als auch mit CBF1 interagieren. Des Weiteren können Aussagen über die CBF1-Abhängigkeit einzelner Interaktionspartner getroffen werden. Zuletzt lässt sich die Binderegion von einigen Interaktionspartnern an EBNA-2 grob kartieren. Allerdings handelt es sich hier nur um Hinweise eines möglichen Interaktionsbereichs, da, wie bereits unter 4.2.5.3.3 erwähnt, die Anzahl der durchgeführten Experimente zu gering ist, um aus einem nicht erfolgten Nachweis eines Proteins eine Schlussfolgerung zu ziehen.

4.2.6.1 Gemeinsame potentielle Interaktionspartner von EBNA-2 und CBF1

Die ersten drei in Tabelle 4.7 aufgeführten Proteine können in allen vier Gesamtlisten nachgewiesen werden. Da sie auch in dem GST pull down auftreten, ist eine eventuelle Bindung an den TAP-tag auszuschließen. Möglicherweise handelt es sich um Proteine, die sowohl mit CBF1, als auch mit EBNA-2 interagieren. Da die Proteine in allen Reinigungen nachgewiesen werden, könnten diese Proteine auch möglicherweise falsch-positive

Interaktionspartner sein. Wird davon ausgegangen, dass es sich tatsächlich um EBNA-2 oder CBF1-Interaktionspartner handelt, so findet die Interaktion mit EBNA-2 für NUMA1 möglicherweise im Bereich von AS 246-422 statt, für H2AC und KIF5A im Bereich von AS 246-487.

Die acht weiteren Proteine scheinen auch mit EBNA-2 und CBF1 zu interagieren. Ihre Interaktion mit EBNA-2 findet möglicherweise im N-terminalen Bereich statt, also von AS 1-246, da die Proteine im GST pull down nicht identifiziert werden konnten.

Tabelle 4.7 Potentielle gemeinsame Interaktionspartner von EBNA-2 und CBF1

zelluläre Lokalisation	Kurzform	Proteinname	AH304-9 CBF1 pos.		AH305-9 CBF1 neg.		GST pull down CBF1 pos.		AH276-1 CBF1 neg.	
			TAP	TIP	TAP	TIP	AH362	KF214	TAP	TIP
N	NUMA1	Nuclear mitotic apparatus protein 1	6/7	3/5	2/3	1/2		2/2	2/2	
N	H2AC	Histone H2A.c/d/i/n/p (H2A.1)	1/7	1/5		1/2	1/2	1/2		3/3
C	KIF5A	Kinesin heavy chain neuron-specific 1 (NKHC)	5/7	2/5	1/3		1/2		1/2	
	IL25	Interleukin 17E precursor	1/7	1/5	1/3				1/2	2/3
C	ACTG	Actin, cytoplasmic 2 (Gamma-actin)		3/5		1/2				3/3
	MYCB2	Probable ubiquitin ligase protein MYCBP2 (Myc binding protein 2)		2/5		1/2				3/3
N	SNX25	Sorting nexin-25	5/7	1/5	1/3	1/2			1/2	1/3
	DYH9	Ciliary dynein heavy chain 9	2/7		1/3				1/2	
	TPM1	Tropomyosin 1 alpha chain	2/7		1/3				1/2	1/3
	TPM3	Tropomyosin alpha 3 chain	2/7		1/3				1/2	1/3
M	ABCA4	Retinal-specific ATP-binding cassette transporter	6/7	2/5	1/3					2/3

Die Tabelle gibt an in welchen Reinigungen ein Kandidatenprotein identifiziert werden konnte. Des Weiteren ist angegeben in wie vielen Reinigungen des gleichen Typs ein Protein identifiziert werden konnte. Die zelluläre Lokalisation gibt an, in welcher Kompartiment der Zelle das Protein hauptsächlich vorkommt. Die Angaben beruhen auf Informationen von Expasy (SwissProt). N= Nukleus, C= Cytoplasma, M= Membran, ER= Endoplasmatisches Retikulum

4.2.6.2 Potentielle CBF1 abhängige EBNA-2-Interaktionspartner

In Tabelle 4.8 sind Proteine gelistet, bei denen es sich möglicherweise um CBF1 abhängige EBNA-2-Interaktionspartner handelt. Diese Proteine konnten in Gegenwart von CBF1 angereichert werden (AH304-9), binden jedoch nicht an CBF1 (AH276-1).

Da die Proteine auch im GST pull down nachgewiesen werden konnten, findet die Interaktion mit EBNA-2 eventuell im C-terminalen Bereich zwischen AS246 und AS487 statt. Auch die potentiellen EBNA-2-Interaktionspartner, die nur in den Reinigungen der Zelllinie AH304-9 identifiziert werden konnten, sind möglicherweise CBF1 abhängig (vgl. hierzu Tabelle 4.3).

Tabelle 4.8 Potentielle CBF1 abhängige EBNA-2-Interaktionspartner

zelluläre Lokalisation	Kurzform	Proteinname	AH304-9 CBF1 pos.		AH305-9 CBF1 neg.		GST pull down CBF1 pos.		AH276-1 CBF1 neg.	
			TAP	TIP	TAP	TIP	AH362	KF214	TAP	TIP
N	TFE3	Transcriptionfactor E3	4/7				1/2			
N	TFEB	Transcriptionfactor EB	1/7				1/2			
N	DDX21	Nucleolar RNA helicase 2 (DEAD box protein 21)	2/7					1/2		
N/C	YBOX1	Nuclease sensitive element-binding protein 1 (DNA-binding protein B)		2/5			1/2			
N	HNRH1	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H (hnRNP H)	1/7				1/2	1/2		

Die Tabelle gibt an in welchen Reinigungen ein Kandidatenprotein identifiziert werden konnte. Des Weiteren ist angegeben in wie vielen Reinigungen des gleichen Typs ein Protein identifiziert werden konnte. Die zelluläre Lokalisation gibt an, in welcher Kompartiment der Zelle das Protein hauptsächlich vorkommt. Die Angaben beruhen auf Informationen von Expasy (SwissProt). N= Nukleus, C= Cytoplasma, M= Membran, ER= Endoplasmatisches Retikulum

4.2.6.3 Potentielle CBF1 unabhängige EBNA-2-Interaktionspartner

In Tabelle 4.9 sind potentielle Interaktionspartner zusammengefasst, die in den Reinigungen der CBF1 positiven Zelllinie AH304-9 und der CBF1 negativen Zelllinie AH305-9, sowie teilweise im GST pull down identifiziert werden konnten. Es könnte sich somit um potentielle CBF1 unabhängige EBNA-2-Interaktionspartner handeln, da sie in der Zelllinie AH305-9, die kein CBF1 exprimiert, nachgewiesen werden konnten. Lediglich die letzten vier Proteine der Tabelle 4.9 können im GST pull down nachgewiesen werden. Dies lässt vermuten, dass die EBNA-2-Interaktion dieser vier Proteine eventuell im C-terminalen Bereich von AS246 bis AS487 von EBNA-2 stattfindet. Die restlichen in Tabelle 4.9 gelisteten Proteine können nur in Reinigungen in der CBF1 positiven Zelllinie AH304-9 und der CBF1 negativen Zelllinie AH305-9 identifiziert werden, jedoch nicht im GST pull down. Diese Proteine interagieren möglicherweise mit EBNA-2 im N-terminalen Bereich bis zur Aminosäureposition AS 246 von EBNA-2.

Tabelle 4.9 Potentielle CBF1 unabhängige EBNA-2-Interaktionspartner

zelluläre Lokalisation	Kurzform	Proteinname	AH304-9 CBF1 pos.		AH305-9 CBF1 neg.		GST pull down CBF1 pos.		AH276-1 CBF1 neg.	
			TAP	TIP	TAP	TIP	AH362	KF214	TAP	TIP
N	SOX5	Transcription factor SOX-5	4/7		1/3					
N	NOL1	Proliferating-cell nucleolar antigen p120	5/7		3/3					
C	DDEF2	Development and differentiation-enhancing factor 2	5/7	1/5	1/3					
	PEPD	Xaa-Pro dipeptidase	4/7		1/3					
M	SPIT2	Kunitz-type protease inhibitor 2 precursor	6/7	1/5	3/3					
N	WRB	Tryptophan-rich protein	4/7			1/2				
M	ADA1A	Alpha-1A adrenergic receptor (Alpha 1 ^o -adrenoceptor)	3/7		1/3					

zelluläre Lokalisation	Kurzform	Proteinname	AH304-9 CBF1 pos.		AH305-9 CBF1 neg.		GST pull down CBF1 pos.		AH276-1 CBF1 neg.	
			TAP	TIP	TAP	TIP	AH362	KF214	TAP	TIP
C/M	AMGO2	Amphoterin-induced protein 2 precursor (AMIGO-2)	4/7	1/5	1/3	1/2				
C/N	APBA3	Amyloid beta A4 precursor protein-binding family A member 3	2/7		1/3					
N	HEATR	HEAT repeat containing protein 1 (BAP 28)	1/7	1/5		1/2				
C	XAB1	XPA-binding protein 1	4/7		1/3					
M	CI055	Protein C9orf55	1/7	1/5		1/2				
	CN039	Hypothetical protein C14orf39	1/7	2/5		1/2				
N	SOX6	Transcription factor SOX-6	1/7		1/3					
	STALP	AMSH-like protease	1/7	2/5	1/3					
	ASB2	Ankyrin repeat and SOCS box protein 2 (ASB-2)	4/7		1/3					
	ERBB3	Receptor tyrosine-protein kinase erbB-3 precursor	2/7		2/3					
N	PRKDC	DNA-dependent protein kinase catalytic subunit	1/7	1/5		1/2	1/2			
N	TMF	TATA element modulatory factor (TMF)		3/5		1/2	1/2	1/2		
N	KI67	Antigen KI-67	2/7		1/3	1/2	1/2			
C	MACF4	Microtubule-actin crosslinking factor1, isoform 4	3/7	1/5	1/3		1/2			

Die Tabelle gibt an in welchen Reinigungen ein Kandidatenprotein identifiziert werden konnte. Des Weiteren ist angegeben in wie vielen Reinigungen des gleichen Typs ein Protein identifiziert werden konnte. Die zelluläre Lokalisation gibt an, in welcher Kompartiment der Zelle das Protein hauptsächlich vorkommt. Die Angaben beruhen auf Informationen von ExPasy (SwissProt). N= Nukleus, C= Cytoplasma, M= Membran, ER= Endoplasmatisches Retikulum

4.2.6.4 Potentielle CBF1-Interaktionspartner

Alle in Tabelle 4.10 aufgeführten Kandidatenproteine konnten im Komplex mit CBF1 oder im Komplex mit CBF1 und EBNA-2 angereichert werden. Bei diesen Kandidatenproteinen handelt es sich daher möglicherweise um CBF1-Interaktionspartner, die auch indirekt über EBNA-2 angereichert werden können. Aufgrund des Auftretens von Proteinen im GST pull down können die Proteine in zwei Gruppen eingeteilt werden: Die erste Teil der Tabelle 4.10 interagiert möglicherweise mit EBNA-2 im Bereich von AS246-422. Der zweite Teil, der im GST pull down nicht mehr identifiziert werden konnte, interagiert eventuell im N-terminalen Bereich bis AS246 mit EBNA-2.

Tabelle 4.10 Potentielle CBF1-Interaktionspartner

zelluläre Lokalisation	Kurzform	Proteinname	AH304-9 CBF1 pos.		AH305-9 CBF1 neg.		GST pull down CBF1 pos.		AH276-1 CBF1 neg.	
			TAP	TIP	TAP	TIP	AH362	KF214	TAP	TIP
N	DDX5	Probable ATP-dependent RNA helicase 5	1/7				1/2	1/2		2/3
N	HNRH2	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H' (hnRNP H')	1/7	1/5			1/2	1/2		2/3
N	HNRPG	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein G (hnRNP G)		2/5			1/2	1/2		3/3
ER	GRP78	78 kDa glucose-regulated protein precursor (GRP 78)		2/5			1/2	1/2		2/3
N	HNRPM	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M (hnRNP M)	1/7	1/5					1/2	1/3
C	TBA8	Tubulin alpha-8 chain	1/7	2/5						2/3
	TRAP1	Heat shock protein 75 kDa, mitochondrial precursor (HSP 75)		1/5						2/3
N	EDD1	Ubiquitin-protein ligase EDD1	2/7						1/2	
N	H4	Histone H4	1/7	2/5						2/3
C	HSP7C	Heat shock cognate 71 kDa protein	2/7	2/5					1/2	1/3

Die Tabelle gibt an in welchen Reinigungen ein Kandidatenprotein identifiziert werden konnte. Des Weiteren ist angegeben in wie vielen Reinigungen des gleichen Typs ein Protein identifiziert werden konnte. Die zelluläre Lokalisation gibt an, in welcher Kompartiment der Zelle das Protein hauptsächlich vorkommt. Die Angaben beruhen auf Informationen von Expasy (SwissProt). N= Nukleus, C= Cytoplasma, M= Membran, ER= Endoplasmatisches Retikulum

4.2.7 Bestätigung der Interaktion von TFE3 mit EBNA-2

Die Bestätigung einer Interaktion eines potentiellen Interaktionspartners erfolgt mit einer unabhängigen Methode. Dadurch wird überprüft, ob das Kandidatenprotein durch das getaggte Proteine spezifisch angereichert wird, oder ob es sich um eine Kontamination handelt, die an den TAP-tag bindet.

Zur Bestätigung eines potentiellen EBNA-2-Interaktionspartners wurde hier, das in den Reinigungen in den CBF1 positiven Zelllinien AH304-9 und im GST pull down identifizierte Protein TFE3 gewählt. Da TFE3, wie bereits erwähnt, auch im GST pull down nachgewiesen werden konnte, ist eine Interaktion zwischen TFE3 und dem TAP-tag unwahrscheinlich. Würde es sich bei TFE3 um eine Kontamination durch Bindung an den TAP-tag handeln, hätte TFE3 auch in den TAP-CBF1-Reinigungen in der Zelllinie AH276-1 nachgewiesen werden müssen, was jedoch nicht der Fall war.

Auch die nähere Betrachtung der y- und b-Ionen Serien in den MS/MS-Spektren, weist auf eine spezifische Interaktion hin. Bei dem unter 4.2.5.3 abgebildeten MS/MS-Spektrum (Abb. 4.28B) handelt es sich um ein Peptid des TFE3-Proteins. In dem MS/MS-Spektrum weist die b-Ionen Serie einige Fragmente auf, die y-Ionen Serie hingegen ist nahezu vollständig.

4.2.7.1 TFE3 bindet nicht an den TAP-tag

Wie bereits erwähnt, war es nicht gelungen eine Zelllinie zu generieren, die stabil nur den TAP-tag exprimiert. Somit konnte nicht ausgeschlossen werden, dass TFE3 an den TAP-tag bindet. Um die Interaktion zwischen TFE3 und dem TAP-tag eindeutig auszuschließen, wurde eine Immunpräzipitation nach transienter Transfektion durchgeführt. Die Plasmide, die für den TAP-tag bzw. TAP-EBNA-2 kodieren, wurden jeweils transient in die DG75-Zelllinie transfiziert und für zwei Tage kultiviert.

In den mit dem TAP-EBNA-2-Konstrukt transfizierten Zellen wurde zum einen eine Immunpräzipitation (IP) mit den IgG-Beads durchgeführt und zum anderen eine IP mit einem EBNA-2 spezifischen Antikörper und einer geeigneten Isotypkontrolle. Die erhaltenen Präzipitate wurden anschließend in einer Western Blot Analyse untersucht. Das Ergebnis ist in Abbildung 4.29A dargestellt. Im oberen Teil der Abbildung ist das Ergebnis der Detektion des Western Blots mit einem TFE3 spezifischen Antikörper dargestellt. Das ko-immunpräzipitierte TFE3 lässt sich im Lysat (Spur 1), im Präzipitat der IP mit den IgG-Beads (Spur 2) und im Präzipitat der IP mit EBNA-2 (Spur 3) nachweisen. Die IP mit der Isotypkontrolle (Spur 4) weist keine Bande auf. Da der ProteinA-tag des TAP-tags mit dem Fc-Teil fast aller Antikörper reagiert, kann in diesem Blot auch TAP-EBNA-2 detektiert werden. In den Spuren 1 bis 3 kann erwartungsgemäß EBNA-2 nachgewiesen werden, jedoch nicht in der Isotypkontrolle (Spur 4). Des Weiteren wurde eine Detektion mit dem PAP-Antikörper, der den ProtA-tag des TAP-tags erkennt, durchgeführt. Im unteren Teil von Abbildung 4.29A ist das dazugehörige Ergebnis dargestellt, das mit dem bereits für EBNA-2 beschriebenen Ergebnis übereinstimmt. Die Resultate der beiden TAP-EBNA-2-Detektion zeigen, dass die Transfektion und die einzelnen IPs erfolgreich verliefen.

Hiermit konnte die Anreicherung von TFE3 durch Bindung an TAP-EBNA-2 in einer IP gezeigt werden.

In den TAP-tag exprimierenden Zellen wurde die Immunpräzipitation mit IgG-Beads durchgeführt. Zur Kontrolle wurde auch eine Immunpräzipitation in untransfizierten DG75-Zellen mit IgG-Beads durchgeführt. Die erhaltenen Präzipitate wurden anschließend in Western Blot Analysen untersucht. Das Resultat ist in Abbildung 4.29B dargestellt. Im oberen Bild ist der Western Blot mit einem TFE3 spezifischen Antikörper detektiert worden. Lediglich im Lysat der mit dem TAP-tag transfizierten Zellen ist eine Bande sichtbar (Spur 1). In den folgenden Spuren sind die nach der Immunpräzipitation in den transfizierten Zellen (Spur 2) bzw. der Kontrollzelllinie DG75 (Spur 3) erhaltenen Präzipitate aufgetragen. In beiden Spuren ist keine TFE3-Bande erkennbar. Um zu überprüfen, ob die Transfektion und die Immunpräzipitation erfolgreich verliefen, wurde der Western Blot mit dem bereits beschriebenen PAP-Antikörper detektiert (Abb. 4.29B unteres Bild). In Spur 2 und 3 ist eine deutliche Bande erkennbar. Dies zeigt, dass sowohl die Transfektion, als auch die Immunpräzipitation erfolgreich waren. Erwartungsgemäß kann in der Kontrollzelllinie in Spur 3 keine Bande nachgewiesen werden.

Zusammenfassend kann mit den hier beschriebenen Experimenten eine Bindung von TFE3 an den TAP-tag oder die IgG-Beads ausgeschlossen werden.

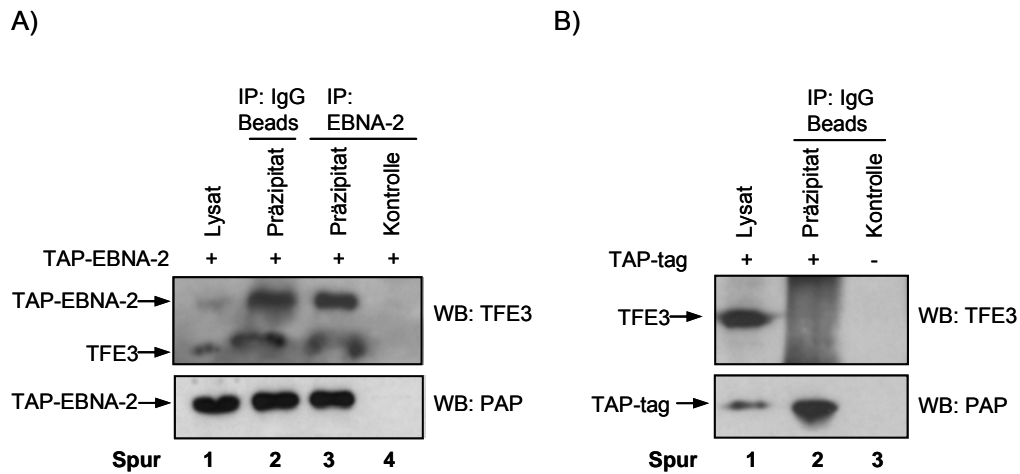


Abb. 4.29: TFE3 bindet nicht an den TAP-tag, sondern spezifisch an EBNA-2

Zur Überprüfung, ob es sich bei TFE3 um eine spezifische Interaktion mit EBNA-2 handelt, wurden Plasmide, die für den TAP-tag bzw. TAP-EBNA-2 kodieren, jeweils transient in DG75-Zellen transfiziert. Pro 1×10^7 Zellen wurden 5 μ g Plasmid transfiziert. Nach zwei Tagen wurden mit je 6×10^7 Zellen nach NP40-Lyse verschiedene Immunpräzipitationen durchgeführt. (A) Die TAP-EBNA-2 transfizierten Zellen wurden mit IgG-Beads und einem EBNA-2 spezifischen Antikörper, sowie einer geeigneten Isotypkontrolle (GST-Antikörper) immunpräzipitiert. (B) Die TAP-tag transfizierten Zellen wurden mit IgG-Beads immunpräzipitiert. Zur Kontrolle wurde eine Immunpräzipitation mit IgG-Beads in untransfizierten DG75-Zellen durchgeführt. Die Präzipitate und das jeweilige Lysat wurden auf einem 8%igen (TFE3-AK) bzw. 12%igen (PAP-AK) SDS-PAGE aufgetragen und einer Western Blot Analyse unterzogen. Die Detektion erfolgte mit einem TFE3 spezifischen (oberes Bild) und einem PAP-Antikörper (unteres Bild).

4.2.7.2 Bestätigung der TFE3/EBNA-2-Interaktion in einer TAP negativen Zelllinie

Im Folgenden sollte überprüft werden, ob die TFE3/EBNA-2-Interaktion auch in der Zelllinie SM295 nachgewiesen werden kann, die kein TAP-EBNA-2 exprimiert. Bei der Zelllinie SM295 handelt es sich um die humane Burkitt-Lymphom-Zelllinie DG75, die stabil mit dem ER/EBNA-2-Konstrukt transfiziert worden ist. Durch Östrogenzugabe kann EBNA-2 seine aktive Konformation einnehmen, ohne zuerst synthetisiert zu werden.

Nach einer 24stündigen Östrogeninkubation der Zelllinie SM295, wurde mit einem EBNA-2 spezifischen Antikörper und einer geeigneten Isotypkontrolle eine Immunpräzipitation durchgeführt. Die Präzipitate der Immunpräzipitationen wurden mit Hilfe der Western Blot Technik analysiert.

Um zu überprüfen, ob die Immunpräzipitation erfolgreich verlief, wurde eine Western Blot Analyse mit einem EBNA-2 spezifischen Antikörper durchgeführt (Abb. 4.30 oberes Bild).

ER/EBNA-2 und EBNA-2 können sowohl im Lysat (Spur 1), als auch im Präzipitat (Spur 2), jedoch nicht in der Isotypkontrolle in Spur 3 nachgewiesen werden. Der Nachweis der EBNA-2-Bande lässt sich auf eine Degradation des ER/EBNA-2-Konstrukts zurückführen.

Die Detektion des Western Blots mit einem TFE3 spezifischen Antikörper ergab eine ca. 72 kDa große Bande im Lysat. Diese Bande kann auch im Präzipitat (Spur 2) nachgewiesen werden, nicht aber in der Isotypkontrolle (Spur 3).

Dieses Ergebnis bestätigt die TFE3/EBNA-2-Interaktion und schließt eindeutig aus, dass die TFE3/EBNA-2-Interaktion auf die Anwesenheit des TAP-tags zurückzuführen ist. Einschränkend muss gesagt werden, dass nur ein sehr geringer Teil von TFE3 an EBNA-2 gebunden vorliegt. Des Weiteren wird EBNA-2 in der hier verwendeten Zelllinie SM295 in einer hohen Konzentration exprimiert.

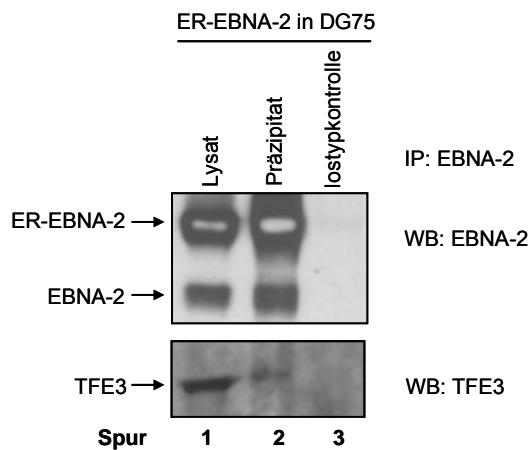


Abb. 4.30: Nachweis der TFE3/EBNA-2-Interaktion in der Zelllinie SM295

Je 3×10^7 Zellen der Zelllinie SM295 wurden nach NP40-Lyse mit einem EBNA-2 spezifischen Antikörper, sowie einer geeigneten Isotypkontrolle präzipitiert. Das Lysat und die Präzipitate wurden auf einem 8%igen SDS-PAGE aufgetrennt. Die Detektion erfolgte mit einem EBNA-2 und einem TFE3 spezifischen Antikörper.

Da in den verschiedenen massenspektrometrischen Analysen eine Identifikation von TFE3 nur in der CBF1 positiven Zelllinie AH304-9 und im GST pull down erfolgte und nicht in der CBF1 negativen Zelllinie AH305-9, ist zu vermuten, dass die TFE3-Interaktion mit EBNA-2 CBF1 abhängig ist. Auch dies kann mit einer Immunpräzipitation untersucht werden.

Hierzu wurde eine Immunpräzipitation mit einem EBNA-2 spezifischen Antikörper in der Zelllinie SM296 durchgeführt. Diese Zelllinie ist stabil mit dem bereits erwähnten ER/EBNA-2 Konstrukt transfiziert, exprimiert aber, im Gegensatz zu der oben beschriebenen Zelllinie SM295, kein CBF1. Der Nachweis einer Interaktion zwischen EBNA-2 und TFE3 ist in dieser Zelllinie bisher nicht gelungen (Daten nicht gezeigt).

Dieses Ergebnis entspricht den Ergebnissen der massenspektrometrischen Analysen und gibt einen weiteren Hinweis darauf, dass es sich bei der TFE3/EBNA-2-Interaktion, um eine CBF1 abhängige Interaktion handelt.

Abschließend ist zu erwähnen, dass ein endogener Nachweis der TFE3/EBNA-2-Interaktion in der EBV positiven Zelllinie 721 nach einer Immunpräzipitation bisher noch nicht gelungen ist (Daten nicht gezeigt).

5 Diskussion

5.1 Analyse des molekularen Mechanismus der Zielgenaktivierung durch EBNA-2

Die Analyse der EBNA-2 regulierten viralen Promotoren hat in der Vergangenheit wesentliche Beiträge zum Verständnis des molekularen Mechanismus der EBNA-2-Funktionen geleistet. Ein gemeinsames Kennzeichen der viralen C-, LMP1- und LMP2-Promotoren ist mindestens eine CBF1-Bindestelle, die wichtig für die EBNA-2 abhängige Transaktivierung ist. Hinzu kommen Bindestellen für AUF1 im C-Promotor, sowie CREB und PU.1 im LMP1-Promotor (Übersicht: Kieff und Rickinson, 2007). Die Bindung von EBNA-2 an die CBF1-Bindeelemente konnte für Cp und LMP1p zunächst in Gelretardations-experimenten und kürzlich auch in Chromatinimmunpräzipitations-Studien belegt werden.

In dieser Arbeit sollte der molekulare Mechanismus der Transaktivierung zellulärer Zielgene durch EBNA-2 eingehender untersucht werden. Vor Beginn dieser Arbeit war vor allem der CD23a-Promotor bereits gut untersucht. Dieser Promotor weist in Position -172 bp eine CBF1-Bindestelle nahe dem Transkriptionsstart auf. In Promotor-Reporter-Gen-Studien konnte gezeigt werden, dass ein CD23-Genfragment im Bereich von -335 bp bis +465 bp die EBNA-2 abhängige Transaktivierung vermittelt und eine multimerisierte CBF1-Bindestelle in Position -172 bp EBNA-2/CBF1-Komplexe binden kann (Ling et al., 1994; Wang et al., 1991). Eine systematische Deletionsanalyse des CD23a-Promotors zur Kartierung EBNA-2 responsiver Regionen ist in der Literatur nicht beschrieben. Da die CBF1-Bindestelle im CD23a-Promotor nahe dem Transkriptionsstart liegt, ähnelt dieser Promotor in struktureller Hinsicht den viralen Promotoren LMP1p und LMP2p.

5.1.1 Die Aktivität der Gene SLAMF1, DNASE1L3 und CCL3 korreliert mit dem Modifikationsstatus des Chromatins

Für diese Arbeit wurden drei weitere zelluläre EBNA-2-Zielgene ausgewählt, die von EBNA-2 CBF1 abhängig reguliert werden. Diese Gene unterscheiden sich hinsichtlich der relativen Position der CBF1-Bindestellen zum Transkriptionsstart, sowie in dem Grad der Voraktivierung.

Die Acetylierung von Histonen verändert die Chromatinstruktur und macht diese für Transkriptionsfaktoren zugänglich. Eine verstärkte Acetylierung der Histone H3 und H4 und die Dimethylierung von Lysin 4 im Histon H3 korreliert in der Regel mit einer erhöhten transkriptionellen Genaktivität. Der Acetylierungszustand der Histone H3 und H4, sowie der Methylierungszustand von Lysin 4 im Histon H3 wurde in den drei zellulären EBNA-2-Zielgenen SLAMF1, DNASE1L3 und CCL3 untersucht.

Da es sich bei SLAMF1 um ein voraktiviertes Gen handelt, war die relative Zunahme der Acetylierung bei EBNA-2-Anwesenheit sehr gering. Unabhängig vom EBNA-2-Status war eine deutlich verstärkte Acetylierung der Histone H3 und H4 ab dem Transkriptionsstart zu erkennen (vgl. 4.1.2.1).

Im Vergleich zu den Genen SLAMF1 und CCL3 wies das Gen DNASE1L3 insgesamt eine schwache Acetylierung der Histone H3 und H4 auf, die in Abwesenheit von EBNA-2 auf einem sehr niedrigen Niveau lag. Durch EBNA-2 war zwar eine deutliche Zunahme der Acetylierung der Histone H3 und H4 zu beobachten, blieb aber im Vergleich zu den beiden anderen Genen auf einem niedrigen Niveau. Neben einer Acetylierung ab dem Transkriptionsstart, konnte vor EBNA-2-Induktion interessanterweise auch eine stärkere Acetylierung an der potentiellen CBF1-Bindestelle bei Position -2622 bp nachgewiesen werden. Somit war das Chromatin bei -2622 bp schon im transkriptionell inaktiven Zustand nicht so stark kondensiert und für Transkriptionsfaktoren leichter zugänglich. EBNA-2 induzierte eine verstärkte Acetylierung der Histone H3 und H4 (vgl. 4.1.2.2).

In Abwesenheit von EBNA-2 wies das, durch CBF1 reprimierte Gen CCL3 eine Acetylierung der Histone H3 und H4 auf einem relativ gleichbleibenden Niveau auf, die jedoch ab dem Transkriptionsstart etwas zunahm. EBNA-2 bewirkte hier eine sehr starke Acetylierung der Histone H3 und H4, die nicht wie in den beiden anderen Genen ab dem Transkriptionsstart, sondern bereits ab der Position -900 bp relativ zum Transkriptionsstart deutlich verstärkt wurde (vgl. 4.1.2.3).

Untersuchungen über den Acetylierungszustand der Histone H3 und H4 an den viralen LMP- und C-Promotoren des EBV-Genoms zeigten, dass der Acetylierungszustand, sowie die Lokalisation der Acetylierung vom Promotor abhängig ist (Alazard et al., 2003). Für den LMP-Promotor ergab sich eine verstärkte Acetylierung an Histon H3, jedoch nicht an Histon H4. Im C-Promotor wurde eine sehr starke lokale Acetylierung von Histon H4 in dem Bereich beobachtet, in dem EBNA-2 bindet. An Histon H3 erfolgte die Zunahme der Acetylierung über den gesamten betrachteten Bereich. Im Unterschied zu diesen Studien der Arbeitsgruppe Manet, konnte in den drei untersuchten zellulären Genen keine Fokussierung der Acetylierung an bestimmten Bereich oder einem Histon beobachtet werden.

Möglicherweise wurde der Mechanismus der Transaktivierung durch EBNA-2 bei viralen Genen durch die Evolution optimiert. Die Arbeitsgruppe Lieberman konnte zeigen, dass CTCF an Bereiche zwischen dem oriP und den CBF1 responsiven Elementen im C-Promotor von EBV bindet (Chau et al., 2006). CTCF ist ein DNA bindendes Phosphoprotein, das die Aktivität eines Enhancers blockieren kann und dadurch ein „gene silencing“ bewirkt. Möglicherweise wird durch eine CTCF-Bindung eine strikte Abgrenzung zwischen den Genen erreicht, die während der verschiedenen Lebenszyklen von EBV transaktiviert werden. In den drei untersuchten zellulären Genen scheint diese Bindung im betrachteten Bereich nicht stattzufinden, da die Acetylierung der Histone nicht auf bestimmte Bereiche fokussiert war.

5.1.2 EBNA-2 bindet am Transkriptionsstart und rekrutiert die an Serin 5 phosphorylierte Polymerase II

5.1.2.1 Nachweis einer EBNA-2-Bindung am Transkriptionsstart

Es wurden Chromatinimmunpräzipitationen durchgeführt, die zunächst die Bindung von EBNA-2 an Genfragmente von SLAMF1, DNASE1L3 und CCL3 nachwiesen (vgl. 4.1.1 und 4.1.2). Erstaunlicherweise konnte EBNA-2 in allen hier untersuchten Genen unmittelbar am Transkriptionsstart nachgewiesen werden, obwohl die potentiellen CBF1-Bindestellen bis zu -2622 bp entfernt waren. Für das Gen SLAMF1 konnte die EBNA-2-Bindung sogar nur am Transkriptionsstart, nicht jedoch an der CBF1-Bindestelle nachgewiesen werden, obwohl dieses Gen CBF1 abhängig durch EBNA-2 reguliert wird. Nachweisbar war EBNA-2 hingegen an einer potentiellen CBF1-Bindestellen bei -346 bp im CCL3-Gen, sowie an einer Promotor-distal gelegenen potentiellen CBF1-Bindestelle bei -2622 bp im DNASE1L3-Gen und an einer potentiellen CBF1-Bindestelle im ersten Intron bei +422 bp. Damit konnte erstmals der Nachweis erbracht werden, dass EBNA-2 auch an intronische CBF1-Bindestellen rekrutiert werden kann.

Die Arbeitsgruppe Tolnay konnte bei der Analyse des FcRH5-Gens eine EBNA-2-Bindung im Bereich des Transkriptionsstarts beobachten (Mohan et al., 2006). Da sich jedoch im Bereich des Transkriptionsstart bei Position -129 bp eine CBF1-Bindestelle befindet, ist die beobachtet EBNA-2-Bindung wahrscheinlich auf die Bindung an CBF1 zurückzuführen.

Auch im CD23-Gen konnte eine EBNA-2-Bindung am Transkriptionsstart nicht nachgewiesen werden, da sich die CBF1-Bindestelle bei Position -172 bp zu nahe am Transkriptionsstart befindet. Sowohl im CD23-Gen, als auch im FcRH5-Gen wird eine mögliche EBNA-2-Bindung an den Transkriptionsstart durch Effekte der jeweils nahegelegenen CBF1-Bindestelle überdeckt.

Die Arbeitsgruppe Manet konnte zwar eine EBNA-2-Bindung am Transkriptionsstart des LMP- und C-Promotors von EBV beobachten, jedoch ist auch diese sehr wahrscheinlich auf die jeweils nahe dem Transkriptionsstart lokalisierte CBF1-Bindestelle zurückzuführen (Alazard et al., 2003).

Die Arbeitsgruppe West konnte bei den durchgeführten Chromatinimmunpräzipitationen am C-Promotor von EBV keine EBNA-2-Bindung am Transkriptionsstart nachweisen (Bark-Jones et al., 2005). Hier wäre eine EBNA-2-Bindung an den Transkriptionsstart nicht durch die CBF1-Bindestelle bei Position -430 bp überdeckt worden.

5.1.2.2 Das Modell der EBNA-2/CBF1-Interaktion

Für das Gen CCL3 wurde auch die Bindung von CBF1 an die vorhergesagten CBF1-Bindestellen experimentell überprüft. Unerwarteter Weise konnte eine CBF1-Bindung an der CBF1-Bindestelle bei Position -346 bp nur nach EBNA-2-Aktivierung nachgewiesen werden (vgl. 4.1.2.3). Diese Bindung war zwar spezifisch im Bereich der vorhergesagten CBF1-

Bindestelle erhöht, erreichte jedoch insgesamt nur sehr niedrige Werte. Eine ähnliche Beobachtung wurde von der Arbeitsgruppe Tolnay beschrieben (Mohan et al., 2006). Hier kam es nach EBNA-2-Aktivierung zu einer Rekrutierung von CBF1 an das FcRH5-Gen. Damit erscheint die CBF1-Bindung an die DNA möglicherweise durch EBNA-2 unterstützt oder stabilisiert zu werden. Dieses Ergebnis steht nicht in Einklang mit dem herkömmlichen Modell, demzufolge CBF1 EBNA-2 an die DNA rekrutiert. Einschränkend muss jedoch gesagt werden, dass es sich bei dem Gen CCL3, um ein durch CBF1 schwach reprimiertes Gen handelt (Maier et al., 2006). Es erscheint daher paradox, dass CBF1 nicht auch in Abwesenheit von EBNA-2 nachweisbar ist.

5.1.2.3 Die Rekrutierung der Polymerase II weist Unterschiede auf

Die Rekrutierung der Polymerase II war an den drei untersuchten Genen SLAMF1, DNASE1L3 und CCL3 unterschiedlich (vgl. 4.1.2.1ff). Bei dem Gen SLAMF1 konnte eine Polymerase II-Rekrutierung ab dem Transkriptionsstart beobachtet werden. Da es sich hier um ein voraktiviertes Gen handelt (Maier et al., 2006), fand die Rekrutierung auch in Abwesenheit von EBNA-2 statt, wurde jedoch durch EBNA-2 deutlich verstärkt.

Eine Rekrutierung der Polymerase II zum Transkriptionsstart des CCL3-Gens konnte nur in Anwesenheit von EBNA-2 nachgewiesen werden. Da CCL3 ein durch CBF1 reprimiertes Gen ist (Maier et al., 2006), war dieses bei EBNA-2-Abwesenheit nicht transaktiviert. Daher wurde vor EBNA-2-Induktion auch keine Polymerase II-Rekrutierung zum Transkriptionsstart erwartet.

Auch bei dem Gen DNASE1L3 konnte eine Rekrutierung der Polymerase II nur in Anwesenheit von EBNA-2 beobachtet werden. Interessanterweise konnte auch eine Polymerase II-Rekrutierung an die potentielle CBF1-Bindestelle bei -2622 bp nachgewiesen werden. An dieser potentiellen CBF1-Bindestelle konnte auch eine EBNA-2-Bindung gezeigt werden. Möglicherweise handelt es sich bei dieser Stelle um einen Enhancer. EBNA-2 könnte an diese potentielle CBF1-Bindestelle binden und über die Bildung einer Chromatinschleife mit dem Transkriptionsstart interagieren.

Die Phosphorylierung des Serin 5 am CTD-Bereich der Polymerase II korrelierte in allen drei Genen mit der Polymerase II-Rekrutierung. Bei dem Gen SLAMF1 konnte eine verstärkte Phosphorylierung von Serin 5 am CTD-Bereich in Anwesenheit von EBNA-2 beobachtet werden. Die Phosphorylierung von Serin 5 am CTD-Bereich ist ein Zeichen für die Transkriptionsinitiation.

Die Arbeitsgruppe West führte ähnliche Experimente am C-Promotor des EBV-Genoms durch und zeigte, dass durch EBNA-2 die Phosphorylierung von Serin 5 am CTD-Bereich der Polymerase II unterstützt wird (Bark-Jones et al., 2006). Aufgrund der Ergebnisse postulieren sie, dass CDK9 durch EBNA-2 rekrutiert oder aktiviert wird und dadurch Serin 5 am CTD-Bereich der Polymerase II phosphoryliert wird. Da bei den untersuchten zellulären Zielgenen jeweils nach EBNA-2-Induktion eine Phosphorylierung bzw. verstärkte Phosphorylierung von

Serin 5 am CTD-Bereich beobachtet werden konnte, rekrutiert oder aktiviert EBNA-2 möglicherweise auch bei zellulären Zielgenen CDK9 und unterstützt somit die Serin 5 Phosphorylierung.

Zusammenfassend zeigte sich, dass der Status der Chromatinmodifikation mit dem Aktivierungszustand der EBNA-2-Zielgene korrelierte.

5.1.2.4 Überprüfung der EBNA-2-Bindung am Transkriptionsstart -ein Ausblick

Als nächster Schritt soll geklärt werden, ob die EBNA-2-Bindung am Transkriptionsstart CBF1 abhängig ist, obwohl sich dort keine potentiellen CBF1-Bindestellen befinden. In der CBF1 negativen Zelllinie SM224.9 (Maier et al., 2005) kann mit Chromatin-immunpräzipitationen überprüft werden, ob eine EBNA-2-Bindung am Transkriptionsstart nachweisbar ist. Des Weiteren können verschiedene Chromatinimmunpräzipitationen darüber Aufschluss geben, ob es ebenfalls zur Rekrutierung einiger Faktoren der Transkriptionsmaschinerie kommt, obwohl keine Transaktivierung des Gens durch EBNA-2 in Abwesenheit von CBF1 erfolgt.

5.1.3 Regulation des CCL3-Promotors durch EBNA-2 und Notch

5.1.3.1 Die Bindung an die CBF1-Bindestelle allein, reicht nicht für eine Transaktivierung durch EBNA-2 bzw. Notch aus

In den ChIP-Experimenten konnte in dem Gen CCL3 eine EBNA-2-Bindung an die CBF1-Bindestelle bei Position -346 bp nachgewiesen werden. Des Weiteren wurde eine EBNA-2-Bindung am Transkriptionsstart beobachtet. Da aber an der Regulation von Genen meistens eine Vielzahl von Faktoren beteiligt ist, wurde der Promotorbereich von -400 bp bis zum Transkriptionsstart in einer Promotor-Reporter-gen-Studie näher untersucht, um neue Erkenntnisse über die Regulationsmechanismen durch EBNA-2 zu erhalten (vgl. 4.1.3).

Überraschender Weise konnte in der Reporter-gen-Studie für CCL3 sowohl bei EBNA-2, als auch bei Notch beobachtet werden, dass die Bindung an die CBF1-Bindestelle bei -346 bp allein für die Transaktivierung nicht ausreichend war. Erst mit dem Konstrukt K1, das den Bereich von -400 bp bis zum Transkriptionsstart umfasst, konnte eine deutliche Transaktivierung nachgewiesen werden. Der Promotorbereich des CCL3-Gens zwischen -100 bp und dem Transkriptionsstart beeinflusste die EBNA-2 vermittelte Transaktivierung deutlich. Da auch mit den Konstrukten K2 (-400 bp bis -101 bp) und K3 (-400 bp bis -201 bp) eine, wenn auch schwächer, Transaktivierung erreicht werden konnte, handelt es sich bei dem Bereich von -100 bp bis -1 bp nicht um einen essentiellen Bereich. Dies lässt vermuten, dass die Sequenz von -100 bp bis zum Transkriptionsstart Bindestellen für andere Transkriptionsfaktoren enthält, die mit EBNA-2 bzw. Notch kooperieren. Möglicherweise wird die Interaktion von EBNA-2 bzw. Notch mit CBF1 durch einen im Bereich von -100 bp bis zum Transkriptionsstart bindenden Faktor beeinflusst.

Alternativ könnte EBNA-2 möglicherweise auch direkt mit der DNA in der dem Transkriptionsstart nahen Region interagieren. In der Arbeitsgruppe Kempkes konnte gezeigt werden, dass EBNA-2 direkt mit der DNA über einen PolyG-Bereich im LMP1-Promotor interagieren kann (unveröffentlichte Daten). Ob eine Bindung von EBNA-2 an die DNA auch in zellulären Genen möglich ist, wurde bis jetzt noch nicht untersucht. Allerdings konnten im Bereich des Transkriptionsstarts in den Genen SLAMF1, DNASE1L3 und CCL3 keine PolyG-Bereiche gefunden werden.

5.1.3.2 Beeinflusst der Bereich des Transkriptionsstarts die EBNA-2 bzw.

Notch vermittelte Transaktivierung?

Eine deutliche Transaktivierung durch EBNA-2 bzw. Notch konnte erst, wie bereits erwähnt, mit dem Konstrukt K1 (-400 bp bis -1 bp) erreicht werden. Im Gegensatz zu den anderen drei Promotorfragment-Konstrukten enthält K1 (-400 bp bis -1 bp) noch zusätzlich den Bereich des Transkriptionsstarts des CCL3-Gens, sowie die vorhergesagte TATA-Box des CCL3-Gens. In den ChIP-Experimenten konnte zwar eine EBNA-2-Bindung an die CBF1-Bindestelle bei -346 bp nachgewiesen werden, die stärkere EBNA-2-Bindung fand jedoch im Bereich des Transkriptionsstarts statt. Es ist allerdings nicht auszuschließen, dass die EBNA-2-Bindung am Transkriptionsstart in Chromatinimmunpräzipitationen besser nachweisbar ist, als die EBNA-2-Bindung an CBF1-Bindestellen. Auch in den beschriebenen Promotor-Reporter-Gen-Studien zeigte sich, dass der Bereich des Transkriptionsstarts einen entscheidenden Einfluss auf die EBNA-2 vermittelte Transaktivierung hat. Da sich die Ergebnisse der Promotor-Reporter-Gen-Studie mit EBNA-2 und Notch sehr ähneln, könnte es auch zwischen Notch und dem Bereich des Transkriptionsstarts eine Verbindung geben.

Einen weiteren Hinweis für das Zusammenspiel von EBNA-2 und dem Bereich des Transkriptionsstarts geben Ergebnisse der Arbeitsgruppe Farrell. Die Arbeitsgruppe konnte in Promotor-Reporter-Gen-Studien für das Gen Cyclin D2 eine EBNA-2 vermittelte Transaktivierung zeigen. Die Reporter-Gen-Studie wurde mit verschiedenen langen Sequenzen des Promotors durchgeführt. Interessanterweise konnte mit einem Konstrukt, das den Promotorbereich von -66 bp bis +240 bp umfasste noch eine Transaktivierung durch EBNA-2 beobachtet werden (Spender et al., 2001). Das Konstrukt von -66 bp bis +240 bp enthält den Transkriptionsstart, jedoch keine CBF1-Bindestelle, über die EBNA-2 mit der DNA in Kontakt treten könnte. Die Reporter-Gen-Studie wurde nicht nur mit wtEBNA-2 durchgeführt, sondern auch mit einer EBNA-2-Mutante, die nicht mehr an CBF1 binden kann. Obwohl sich in dem betrachteten Bereich des Cyclin D2-Gens keine CBF1-Bindestelle befand, konnte mit wtEBNA-2 eine bessere Transaktivierung erreicht werden, als mit der EBNA-2-Mutante. Möglicherweise ist eine EBNA-2-Interaktion mit CBF1 nicht nur für die DNA-Bindung notwendig, sondern auch für die Aktivität oder Stabilität von Faktoren, die in dem Mechanismus der EBNA-2 vermittelten Transaktivierung wichtig sind.

5.1.3.3 Kartierung des für die EBNA-2 bzw. Notch vermittelte Transaktivierung wichtigen Bereichs

Um den Bereich, der für die EBNA-2 bzw. Notch vermittelte Transaktivierung im CCL3-Gen wichtig ist, genauer eingrenzen zu können, müssen weitere Promotor-Reporter-Gen-Studien durchgeführt werden. So sollte als erstes überprüft werden, ob der Bereich zwischen -300 bp und -101 bp für die Transaktivierung durch EBNA-2 bzw. Notch benötigt wird. Der Bereich von -100 bp bis -1 bp sollte weiter deletiert werden, um den für die Transaktivierung benötigten Bereich weiter einzugrenzen.

Des Weiteren könnte die DNA-Sequenz des CCL3-Gens von -100 bp bis zum Transkriptionsstart und eine Kombination aus dieser DNA-Sequenz und der die CBF1-Bindestelle enthaltenden Sequenz (-400 bp bis -301 bp) zur Affinitätsreinigung von spezifisch gebundenen Proteinen eingesetzt werden, die anschließend massenspektrometrisch identifiziert werden können.

5.2 Identifikation von weiteren assoziierten Proteinen des EBNA-2 /CBF1-Multiproteinkomplexes

Die meisten der bisher bekannten EBNA-2-Interaktionspartner wurden mit Hilfe von GST pull downs oder dem Yeast Two-Hybrid System identifiziert. Das Yeast Two-Hybrid System weist allerdings zwei große Nachteile auf, die für die Identifikation neuer Interaktionspartner limitierende Faktoren darstellen. So können nur binäre Interaktionen zwischen einem Protein und seinem Interaktionspartner nachgewiesen werden. Die Identifikation der einzelnen Komponenten eines Multiproteinkomplexes ist daher kaum möglich. Der zweite Nachteil liegt in der Verwendung der Hefe. In diesem Organismus könnten einzelne Kofaktoren, die eine Interaktion beispielsweise stabilisieren, nicht exprimiert werden. Des Weiteren ist es möglich, dass aufgrund fehlender posttranslationaler Modifikationen eine Interaktion zweier Proteine nicht ausgebildet werden kann.

Auch der GST pull down weist Nachteile auf. Da das Protein in Bakterien exprimiert wird, könnten auch möglicherweise wichtige posttranslationale Modifikationen nicht ausgebildet werden. Komplexe zwischen dem GST-Fusionsprotein und einem Interaktionspartner können sich erst nach Zugabe eines Zellextrakts ausbilden. Auch wird das GST-Fusionsprotein im Überschuss zum Zellextrakt zugegeben.

Um Proteininteraktionen mit vergleichbaren endogenen Proteinkonzentrationen nachzuweisen, wird häufig eine Ko-Immunpräzipitation durchgeführt. Hierbei kann der endogene Proteinkomplex aufgereinigt werden. Doch sowohl bei einer Immunpräzipitation, als auch bei einem GST pull down, handelt es sich um eine Einschrittreinigung, die eine erhöhte Anzahl an nicht-spezifischen Bindungen liefern kann.

Nicht-spezifische Bindungen können jedoch durch den Einsatz von Reinigungstechniken, die auf zwei unabhängigen Reinigungsschritten basieren, verringert werden. In der

Arbeitsgruppe Seraphin wurde daher eine Technik zur Aufreinigung nativer Komplexe aus Hefezellen entwickelt, die sogenannte „Tandem affinity purification“ (TAP-Reinigung) (Rigaut et al., 1999).

5.2.1 Etablierung der TAP-Reinigung, sowie der modifizierten TAP-Reinigung (= TIP-Reinigung) in B-Zellen

Da mit der TAP-Reinigung Proteinkomplexe aus einem Zellysate unter nativen Bedingungen aufgereinigt werden können, sollte diese Methode zur Identifikation von neuen EBNA-2- bzw. CBF1-Interaktionspartnern verwendet werden. Bei einer TAP-Reinigung erfolgen alle Elutionsschritte der beiden sehr spezifischen Reinigungsschritte unter nativen Bedingungen und verhindern somit, dass weniger stabile Proteininteraktionen durch den Einsatz von Hochsalzpuffern, wie es in anderen Reinigungstechniken notwendig ist, wieder zerstört werden. Die TAP-Reinigung wurde mittlerweile in einigen Organismen erfolgreich angewandt. Auch in Säugetierzellen konnten erste Erfolge erzielt werden. Allerdings wurden die Reinigungen in HEK293-Zellen (Bouwmeester et al., 2004; Brajenovic et al., 2004; Westermarck et al., 2002; Benzinger et al., 2005; Daulat et al., 2007) oder Cos-7-Zellen (Basu et al., 2003) durchgeführt. Häufig wurde die Reinigung auch nach transienter Transfektion vollzogen. Da es bei einer transienten Transfektion zu einer Überexpression des Proteins kommt, werden eine Vielzahl von Heat Shock Proteinen oder Chaperonen identifiziert, die vorzugsweise an missgefaltete oder überexprimierte Proteine binden. In stabilen Transfektionen kann dies nicht beobachtet werden (Gingras et al., 2005).

In humanen B-Zelllinien kam die TAP-Reinigung bisher noch nicht zum Einsatz. In dieser Arbeit konnten in der humanen EBV negativen Burkitt-Lymphom-Zelllinie DG75 und der humanen CBF1 knock out Burkitt-Lymphom-Zelllinie SM224.9 nach stabiler Transfektion Einzelzellklone expandiert werden, die jeweils das Fusionsprotein TAP-EBNA-2 bzw. TAP-CBF1 auf einem Niveau exprimieren, das in etwa dem endogenen Expressionslevel entspricht.

Wie alle Proteinreinigungstechniken weist auch die TAP-Reinigung einen Nachteil auf, der hier in dem ca. 24 kDa großen TAP-tag liegt. Das alleinige Anhängen des TAP-tags könnte eine sterische Behinderung zur Folge haben, die die Funktion des Fusionsproteins beeinträchtigen kann. Die mit den TAP-Fusionsproteinen durchgeführten Promotor-Reporter-Gen-Studien zeigten, dass alle drei Konstrukte funktionell aktiv waren. Da zwischen dem N- und C-terminal getaggten CBF1 keine großen Unterschiede bezüglich ihrer Funktionalität beobachtet wurden, wurde für die TAP-Reinigungen das N-terminal getaggte Fusionsprotein verwendet. Diese Entscheidung wurde auch durch in der Literatur publizierte Daten beeinflusst, da meistens N-terminal getaggte Fusionsproteine für Reinigungen verwendet werden. C-terminal getaggte Fusionsproteine sind hingegen häufig nicht funktionell. Mitarbeiter der Cellzome AG versahen essentielle Hefe-Proteine mit einem C-

terminalen TAP-tag und wiesen nach, dass ca. 18% davon in nicht lebensfähigen Hefestämmen resultierten. Eventuell interferiert der TAP-tag am C-terminalen Bereich eines Proteins mit wichtigen Proteinfunktionen (Gavin et al., 2002).

Es zeigte sich, dass das in der Hefe angewandte TAP-Reinigungsprotokoll nicht auf die Reinigung in B-Zellen übertragen werden konnte. Erst nach der Optimierung der beiden Reinigungsschritte der TAP-Reinigung, konnte diese in den etablierten, stabilen humanen B-Zelllinien AH304-9 (TAP-EBNA-2 in DG75), AH305-9 (TAP-EBNA-2 in SM224.9) und AH276-1 (TAP-CBF1 in SM224.9) relativ erfolgreich durchgeführt werden.

5.2.2 Weiterentwicklung der TAP-Reinigung zur TIP-Reinigung

Mit der TAP-Reinigung konnten allerdings nur sehr geringe Ausbeuten erzielt werden. Für TAP-Reinigungen in der Zelllinie AH304-9 konnten ca. 2% des eingesetzten TAP-EBNA-2 im finalen Eluat nach dem zweiten Reinigungsschritt nachgewiesen werden. Die Arbeitsgruppe Krause konnte nach TAP-Reinigung in *Drosophila* Gewebe mit drei verschiedenen getaggten Fusionsproteinen jeweils lediglich 1% des eingesetzten Fusionsproteins im finalen Eluat nachweisen (Yang et al., 2006). Auch die Arbeitsgruppe von Artavanis-Tsakonas konnte nach TAP-Reinigungen mit zwei unterschiedlichen Fusionsproteinen in *Drosophila* nur eine Ausbeute von 2% bzw. 6% erreichen (Veraksa et al., 2005). Dies zeigt, dass die TAP-Reinigung auch in anderen Arbeitsgruppen nur eine geringe Ausbeute erzielte.

Um die Effizienz der Reinigung zu erhöhen, wurde die TAP-Reinigung weiterentwickelt. Die Berechnung der Ausbeute der TAP-Reinigung zeigte, dass während des zweiten Reinigungsschritts, der Calmodulinbindung, der Verlust des Fusionsproteins sehr hoch war. Durch einen Vergleich der beiden Reinigungsschritte mit einer Immunpräzipitation, konnte die Vermutung bestätigt werden, dass die Calmodulinbindung äußerst ineffizient ist. Mit dem Austausch der Calmodulinbindung gegen einen Immunpräzipitationsschritt konnte eine ca. 3fach höhere Ausbeute des Fusionsproteins erreicht werden. Diese modifizierte TAP-Reinigung wurde als Tandem Immunpräzipitation (TIP-Reinigung) bezeichnet. Durch den Austausch des zweiten Reinigungsschrittes, konnten die bereits etablierten Zelllinien zur Proteinaufreinigung weiterverwendet werden. Allerdings kann die TIP-Reinigung nur angewandt werden, wenn ein spezifischer Antikörper zur Verfügung steht. Da für EBNA-2 bereits ein in Immunpräzipitationen getesteter Antikörper vorhanden war, konnte die TIP-Reinigung für die Aufreinigung von TAP-EBNA-2-Komplexen angewandt werden. Nachdem auch für CBF1 während dieser Arbeit in Zusammenarbeit mit Elisabeth Kremmer ein Antikörper generiert wurde, konnte die TIP-Reinigung auch zur Aufreinigung von TAP-CBF1-Komplexen verwendet werden. Da allerdings in einer TIP-Reinigung Proteine, die an den Bereich des Proteins binden, an den auch der Antikörper bindet, nicht mitaufgereinigt werden können, können mit der TIP-Reinigung nicht alle möglichen Interaktionspartner identifiziert werden.

In letzter Zeit wurde in einigen Laboren die ursprüngliche TAP-Reinigung modifiziert, da in den meisten Fällen die Ausbeute zu gering war und dies häufig, wie auch in dieser Arbeit gezeigt, an der Calmodulinbindung lag. Um eine Effizienzsteigerung zu erhalten wurde der TAP-tag selbst modifiziert. So wurde der CBP-tag durch einen FLAG-tag (Knuesel et al., 2003), einem Protein C-Epitop (Schimanski et al., 2005) oder einem „Biotinylation-tag“ (Drakas et al., 2005) ersetzt. Die Arbeitsgruppe Moon behielt den CBP-tag bei und ersetzte den ProtA-tag durch einen Streptavidin-tag (Angers et al., 2006).

Der ursprüngliche ProtA-CBP-tag wurde mit einem modifizierten FLAG-His-tag verglichen. Um Proteinspezifitäten auszuschließen, führte die Arbeitsgruppe einen Vergleich von drei verschiedenen Proteinen durch. Bei den Aufreinigungen mit dem ProtA-CBP-tag wurde eine Ausbeute von ca.1% erzielt. Mit dem FLAG-His-tag hingegen konnten Ausbeuten zwischen 11% und 19% erreicht werden (Yang et al., 2006).

Warum allerdings der CBP-tag des ursprünglichen TAP-tags in einigen Reinigungen erfolgreich eingesetzt werden kann und in anderen nicht, ist nicht geklärt. Möglicherweise bindet endogenes Calmodulin an den CBP-tag und verhindert dadurch die Bindung des zu reinigenden Proteinkomplexes an die Calmodulinbeads. Die erfolgreiche Durchführung einer TAP-Reinigung würde dann von der endogenen Calmodulinkonzentration abhängen (Schimanski et al., 2005).

5.2.3 Identifizierung der Interaktionspartner mittels MALDI-TOF/TOF

5.2.3.1 Sensitivitätstest des verwendeten Massenspektrometers

Die Reduktion der Komplexität einer Probe ist für eine erfolgreiche massenspektrometrische Analyse essentiell. Mit Hilfe der TAP-Reinigung oder der modifizierten TAP-Reinigung (TIP-Reinigung) konnten spezifische Proteine angereichert und die Komplexität der Probe stark reduziert werden. Zwei Möglichkeiten standen zur Verfügung, die nach der Reinigung erhaltene Probe für die MALDI-TOF/TOF-Analyse vorzubereiten. Zum einen konnten die gereinigten Proteinkomplexe in einem SDS-PAGE aufgetrennt und nach Färbung des Gels einzelne sichtbare Proteinbanden ausgeschnitten werden. Die in den Banden enthaltenen Proteine werden im Gel tryptisch gespalten. Die daraus resultierenden Peptide werden entsalzt und anschließend mittels MALDI-TOF/TOF-Analyse identifiziert. Zum anderen ist es möglich, Proteine in Lösung („in solution“) tryptisch zu verdauen. In dieser Arbeit wurde aber anstelle des „in solution“ tryptischen Verdauens eine andere Möglichkeit gewählt. Die gereinigten Proteinkomplexe wurden in einem SDS-Gel über eine kurze Strecke aufgetrennt und in zwei Gelstücken ausgeschnitten. Die Gelstücke, die keine definierten Banden enthielten, wurden dann „in Gel“ tryptisch verdaut. Durch die kurze Auftrennung im SDS-Gel können zum einen in der Probe vorhandene Salze abgetrennt und zum anderen die Komplexität der Probe weiter reduziert werden. Die in dem Peptidgemisch enthaltenen Peptide werden anschließend mittels nanoHPLC ihrer Hydrophobizität entsprechend

aufgetrennt und mittels MALDI-TOF/TOF analysiert. Die chromatographische Auftrennung der Peptide stellt einen Schritt zur Reduktion der Komplexität der Probe dar.

An dem zur Verfügung stehenden Proteomanalyser 4700 wurde mit Titrationsexperimenten getestet, mit welcher der beiden eben erwähnten Methoden eine niedrigere Nachweisgrenze erreicht und daher für die gereinigten Proteinkomplexe angewandt werden kann. Die Titrationsexperimente wurden mit kommerziell erhältlichem, gereinigtem bovinem Serumalbumin (BSA) und rekombinantes CBF1 durchgeführt. Für beide Proteine konnte gezeigt werden, dass die Kombination aus nanoHPLC und MALDI-TOF/TOF-Analyse zu einer höheren Sensitivität führte (vgl. 4.2.5.2ff). So konnten 221 fM rekombinantes CBF1 und 180 fM BSA nachgewiesen werden. Ohne eine vorherige nanoHPLC Auftrennung konnten lediglich 664 fM rekombinantes CBF1 nachgewiesen werden. Für die Identifikation neuer EBNA-2- und/oder CBF1-Interaktionspartner wurde daher die LC-MALDI-TOF/TOF-Analyse gewählt.

5.2.3.2 Massenspektrometrische Identifizierung potentieller EBNA-2- und CBF1-Interaktionspartner

Für die MALDI-TOF/TOF-Analysen wurde der Massenbereich von 900 Da bis 2000 Da gewählt, da Peptide dieser Größen mit der MALDI-TOF/TOF-Technik am Besten detektiert und anschließend sequenziert werden können. Peptide mit einer kleineren Molekülmasse als 900 Da werden zwar gut ionisiert, können aber nicht eindeutig identifiziert werden, da in dem Bereich bis 900 Da Matrixmolekül-Cluster sehr dominant sind. Bei der MS/MS-Analyse in einem MALDI-TOF/TOF-Gerät liefern Peptide mit einer Molekülmasse >2000 Da nur wenig struktursignifikante Fragmente, die eine Identifizierung des zugehörigen Moleküls erschweren, da die Intensitäten mit zunehmender Masse deutlich kleiner werden (Lottspeich und Zorbas, 2006). Da bei einer MALDI-TOF/TOF-Analyse die Proben offline gemessen werden können, hat man keine zeitliche Limitierung bei der Precursorwahl, wie bei der online LC-ESI-MS-Kopplung. Dadurch ist es zum einen möglich, mehr Precursor zu analysieren und zum anderen kann ein MS/MS-Spektrum für eine Precursormasse optimiert und dadurch die Proteinidentifizierung ermöglicht werden.

Die beiden getaggtten Proteine EBNA-2 und CBF1, sowie CBF1 als bekannter EBNA-2-Interaktionspartner, konnten nur in wenigen LC-MS/MS-Analysen nachgewiesen werden, obwohl ihr Vorhandensein in Western Blot Analysen bestätigt werden konnte. Beide Proteine konnten in keiner Liste aufgeführt werden, da ihr Total Ion Score nicht die geforderten Kriterien erfüllte (siehe 3.4.7). Eine Erklärung könnte in der Anzahl der entstehenden Peptide nach tryptischem Verdau liegen. Verdaut man EBNA-2 *in silico* mit Trypsin und einer Fehlsplaltung von 0, erhält man 4 theoretische Peptide im analytisch wichtigen Massenbereich von 900 Da bis 2000 Da.

Obwohl es für CBF1 in dem Bereich von 900 Da bis 2000 Da nach einem tryptischen Verdau immerhin 14 theoretische Peptide gibt, scheinen diese nicht sehr gut ionisiert zu werden.

Einen Hinweis hierfür lieferten die Ergebnisse der Titrationsexperimente mit rekombinantem CBF1, da hier im Vergleich zu BSA deutlich weniger Peptide identifiziert werden konnten.

In allen durchgeführten Reinigungen und der anschließenden massenspektrometrischen Analyse konnten nur wenige, der bereits bekannten EBNA-2- oder CBF1-Interaktionspartner identifiziert werden. Verdaut man EBNA-2- oder CBF1-Interaktionspartner *in silico* mit Trypsin und einer Fehlsplaltung von 0, erhält man für einige der EBNA-2- oder CBF1-Interaktionspartner lediglich zwischen 4 und 15 theoretische Peptide im analytisch wichtigen Massenbereich von 900 Da bis 2000 Da. Hierbei handelt es sich um eine relativ geringe Anzahl von Peptiden im Vergleich zu ihrer Größe. Ein tryptischer Verdau mit Albuminserum, das in etwa der Größe von CBF1 entspricht, liefert für den betrachteten Bereich 27 theoretisch mögliche Peptide.

Mit der MALDI-Technik können einige Proteine nicht identifiziert werden, da die nach tryptischem Verdau entstehenden Peptide mit der verwendeten Ionisierungstechnik nicht ionisiert werden können. Diese Proteine könnten mit Hilfe einer anderen für Biomoleküle „sanften“ Ionisierungstechnik, die der Electrospray-Ionisierung (ESI-Technik) zugrunde liegt, identifiziert werden.

Es ist auch nicht auszuschließen, dass Proteine, deren Konzentration im Bereich der Nachweisgrenze liegt, nur in manchen Reinigungen identifiziert werden können. Dies erklärt unter anderem auch, warum ein potentieller Interaktionspartner in einer Reinigung auftritt, in einer anderen aber nicht. Auch der tryptische Verdau kann unterschiedliche Ergebnisse liefern, was zu einer unterschiedlichen Identifikation von Proteinen nach der MALDI-TOF/TOF-Analyse führt. Aus diesen Gründen sollte eine Reinigung mehrmals wiederholt werden.

Bei der hier verwendeten Reinigungstechnik und der anschließenden massenspektrometrischen Analyse handelt es sich nicht um eine quantitative Methode. Die Häufigkeit, mit der ein Protein in den Reinigungen identifiziert werden konnte, gibt somit keine Auskunft über die Menge des gebundene Proteins. Um dies zu klären, müssen andere Techniken (z.B. SILAC, ICAT, ICPL) gewählt werden, die eine Quantifizierung ermöglichen.

Allerdings konnten in den durchgeführten Reinigungen und der anschließenden massenspektrometrischen Analyse einige der bereits bekannten EBNA-2- oder CBF1-Interaktionspartner identifiziert werden. In TAP-CBF1-Reinigungen konnten die Interaktionspartner MINT, MAML3 und HDAC2 nachgewiesen werden. Des Weiteren konnten in EBNA-2-Reinigungen die Interaktionspartner TFIIIB und SND1, auch als p100 bezeichnet, identifiziert werden. Die Interaktion von EBNA-2 mit p100 wurde von der Arbeitsgruppe Kieff nachgewiesen (Tong et al., 1995b). Für p100 konnte erst kürzlich von der Arbeitsgruppe Scott gezeigt werden, dass es sich bei diesem Protein um eine Komponente des RISC-Komplexes (RNA-induced silencing complex) handelt (Murashov et al., 2007). Des Weiteren konnte auch das bereits bekannte EBNA-2 assoziierte Protein DP103 (Barth et al., 2003) als Komponente des RISC-Komplexes identifiziert werden. Möglicherweise kann EBNA-2 über diese beiden Interaktionspartner an den RISC-Komplex

binden und dessen Funktion blockieren. Um dies zu überprüfen, könnte eine transiente Transfektion mit einem Promotor-Reporter-Gen-Konstrukt, das die Luziferasegen enthält, und einer siRNA der Luziferase RNA durchgeführt werden. Blockiert EBNA-2 die Funktion des RISC-Komplexes, ist zu erwarten, dass die siRNA nicht zerstört werden kann und somit keine Luziferaseaktivität gemessen werden kann.

Um weitere Interaktionspartner, die in den molekularen Mechanismus der EBNA-2 vermittelten Transaktivierung involviert sind, zu identifizieren, sollte die Analyse von potentiellen EBNA-2-Interaktionspartnern mit einer Electrospray-Ionisierung (ESI-Technik) wiederholt werden.

5.2.3.3 Potentielle neue EBNA-2-Interaktionspartner und ihre möglichen

Funktionen in Kombination mit EBNA-2

Die massenspektrometrische Analyse ergab eine Vielzahl möglicher neuer EBNA-2-Interaktionspartner. Die Proteine konnten aufgrund ihrer Funktion in folgende verschiedene Gruppen eingeteilt werden: Transkription, Transkriptionsfaktoren, Chromatin/Nukleus-Struktur, Histone, RNA-Metabolismus, Zellproliferation, DNA-Reparatur, Proteinfaltung, Proteinsynthese, Proteinmodifikation, Proteindegradation, Signalwege, zelluläre Struktur und Sonstige.

Es ist nicht auszuschließen, dass es sich bei einigen der gelisteten Proteine um Kontaminanten handelt; d.h. um Proteine, die im Proteingemisch vorhanden waren, jedoch nicht spezifisch an EBNA-2 bzw. CBF1 gebunden haben. Einige Proteine konnten aus den Listen ausgeschlossen werden. Das Ausschlusskriterium hierfür war, dass dieselben Proteine auch in Kontrollreinigungen nachgewiesen wurden oder von anderen Arbeitsgruppen als mögliche TAP bindende Proteine beschrieben wurden. Da jedoch die TAP-Reinigung in einer B-Zelllinie bisher in der Literatur nicht beschrieben wurde, fehlen weitere Vergleichsdaten. In der Arbeitsgruppe Jungnickel wurde die TAP-Reinigung mittlerweile in der Raji-B-Zelllinie etabliert. Einige der in dieser Arbeit identifizierten potentiellen Interaktionspartner, wie TFE3, TFEB, EDD1, TMF1, HNRH1, HNRH2 und IL25 konnten auch in Reinigungen von dieser Arbeitsgruppe nachgewiesen werden. Grundsätzlich ist es nicht auszuschließen, dass es sich bei einigen dieser Proteine eventuell um unspezifische Interaktionspartner handelt. Allerdings gelang in dieser Arbeitsgruppe die Etablierung einer Zelllinie, die lediglich den TAP-tag exprimiert. In diesen Negativkontrollen, konnte keines der eben erwähnten Proteine identifiziert werden, was dagegen spricht, dass es sich um unspezifisch gebundene Proteine handelt (unveröffentlichte Daten).

Die folgende Diskussion von einigen Kandidatenproteine beschränkt sich auf potentielle EBNA-2-Interaktionspartner. Die CBF1-Interaktionspartner werden im Folgenden nicht näher besprochen. Die Auswahl der potentiellen EBNA-2-Interaktionspartner erfolgte aufgrund ihrer zellulären Lokalisation im Nukleus und ihres Auftretens in den zwei verschiedenen Reinigungstechniken, der TAP- bzw. TIP-Reinigung und der GST pull down-Reinigung. Die

einzigste Ausnahme bilden die SOX-Proteine, da diese nicht im GST pull down identifiziert werden konnten. Grundsätzlich kann eine Interaktion von einem Protein mit einem anderen entweder zu einer Verstärkung der Funktion führen, oder die Funktion stören. Des Weiteren ist es möglich, dass eine Interaktion auch die Stabilität eines anderen Proteins unterstützt.

Transkriptionsfaktoren (SOX5, SOX6, TFEB und TFE3):

Eine Interaktion von EBNA-2 mit einem weiteren Transkriptionsfaktor, könnte zur Klärung des molekularen Mechanismus der EBNA-2 vermittelten Transaktivierung oder Repression beitragen. Ein sehr interessantes Protein aus dieser Gruppe ist TFE3. TFE3 konnte in vier von sieben TAP-Reinigungen in der CBF1 positiven Zelllinie AH304-9 und in einer von zwei GST pull down-Reinigungen mit dem Konstrukt AH362, das die AS246-487 von EBNA-2 umfasst, identifiziert werden. TFEB konnte in einer von sieben TAP-Reinigungen in der CBF1 positiven Zelllinie AH304-9 und in einer von zwei GST pull down-Reinigungen mit dem Konstrukt AH362 identifiziert werden. Sowohl TFE3, als auch TFEB scheinen CBF1 abhängige Proteine zu sein. In Abschnitt 5.2.4 wird auf diese beiden Proteine ausführlicher eingegangen.

SOX5 konnte in vier von sieben TAP-Reinigungen in der CBF1 positiven Zelllinie AH304-9 und in einer von drei TAP-Reinigungen in der CBF1 negativen Zelllinie AH305-9 identifiziert werden. SOX6 konnte in einer von sieben TAP-Reinigungen in der CBF1 positiven Zelllinie AH304-9 und einer von drei TAP-Reinigungen in der CBF1 negativen Zelllinie AH305-9 identifiziert werden. Möglicherweise handelt es sich daher um potentielle CBF1 unabhängige EBNA-2-Interaktionspartner.

Wie in der Einleitung beschrieben, kann EBNA-2 nicht an die DNA binden und benötigt daher ein Adapterprotein. Das bis jetzt am besten charakterisierte Adapterprotein ist CBF1 (vgl. 1.2.2.1). Möglicherweise können auch SOX-Proteine, die zu einer Familie von DNA bindenden Proteinen mit einer HMG („high mobility group“)-Domäne gehören, diese Funktion übernehmen, indem sie mit EBNA-2 interagieren. SOX-Proteine sind in die Regulation von Entwicklungsprozessen, wie Organentwicklung oder Zelltypspezifikation involviert. Im Gegensatz zu den meisten anderen Transkriptionsfaktoren binden SOX-Proteine an die kleine Furche der DNA an AT-reiche Regionen. Die beiden potentiellen Interaktionspartner SOX5 und SOX6 gehören neben SOX13 der D-Subfamilie, einer von sechs Subfamilien, an. SOX-Gene der D-Subfamilie exprimieren zwei alternative Spleißformen, eine lange und eine kurze. Die kurze Form ist eine Komponente der langen Form, der die charakteristische N-terminale Domäne fehlt. Das lange Transkript von SOX6 wird in verschiedenen Geweben exprimiert, das kurze hingegen hauptsächlich in den Testis. Auch das kurze Transkript von SOX5 wird hauptsächlich in den Testis exprimiert.

In der Maus konnte eine Interaktion von SOX6 mit der langen Form von SOX5 gezeigt werden. Die Interaktion erfolgt über die coiled-coil Domäne (Übersicht: Cohen-Barak et al.,

2001 und Ikeda et al., 2002). Möglicherweise interagiert EBNA-2 mit dem SOX5/SOX6-Dimer.

TMF1:

Ein weiteres interessantes Protein ist TMF1 (TATA modulatory factor). TMF1 konnte in drei von fünf TIP-Reinigungen in der CBF1 positiven Zelllinie AH304-9 und in einer von zwei TIP-Reinigungen in der CBF1 negativen Zelllinie AH305-9, sowie jeweils in einer von zwei GST pull down-Reinigungen mit den Konstrukten AH362 und KF214 identifiziert werden. TMF1 scheint ein potentieller CBF1 unabhängiger EBNA-2-Interaktionspartner zu sein. TMF1 bindet an die TATA-Box und verhindert dadurch die Bindung von TBP, dessen Bindung an die TATA-Box für die Transkriptionsinitiation kritisch ist (Garcia et al., 1992). Möglicherweise kann EBNA-2 durch eine Interaktion mit TMF1 in der Nähe des Transkriptionsstarts binden und dann weitere Faktoren, wie beispielsweise die Polymerase II an den Transkriptionsstart rekrutieren.

Mit Hilfe von siRNA Experimenten könnte untersucht werden, ob über den Mechanismus der TMF1/EBNA-2-Interaktion eine Transaktivierung von EBNA-2-Zielgenen erfolgt.

Ki67:

Ki67 konnte in zwei von sieben TAP-Reinigungen in der CBF1 positiven Zelllinie AH304-9 und in einer von drei TAP-Reinigungen, sowie in einer von zwei TIP-Reinigungen in der CBF1 negativen Zelllinie AH305-9 identifiziert werden. Des Weiteren war es möglich Ki67 in einer von zwei GST pull down-Reinigungen mit dem Konstrukt AH362 zu identifizieren. Möglicherweise handelt es sich bei Ki67 um einen potentiellen CBF1 unabhängigen EBNA-2-Interaktionspartner.

Ki67 ist ein Proliferationsmarker, da seine Expression mit Zellproliferation korreliert. Aus diesem Grund wird Ki67 auch für die Prognose bei Tumorerkrankungen verwendet. Der Färbungsindex von Ki67 steht bei Tumorzellen in Zusammenhang mit dem klinischen Verlauf einer Tumorerkrankung. Von Ki67 existieren zwei Spleißformen von 320 kDa und 359 kDa, die sich in der Region, die von Exon 7 kodiert wird, unterscheiden. Die Struktur von Ki67 weist zwei Kernlokalisationssignale (NLS), ein C-terminales ATP/GTP-Bindestellen-Motiv A (P-loop) und eine N-terminale FHA-Domäne („forkhead –associated domain“) auf.

Die genaue biologische Funktion von Ki67 ist bisher noch nicht bekannt. Da Ki67 im N-terminalen Bereich eine FHA-Domäne besitzt und dies ein gemeinsames Kennzeichen vieler Proteine ist, die in die Zellzykluskontrolle involviert sind, könnte auch Ki67 in der Zellzykluskontrolle eine Rolle spielen (Übersicht: Scholzen and Gerdes, 2000).

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die C-terminale Domäne von Ki67 alle drei Mitglieder der HP-1 (Mammalian Heterochromatin Protein 1)-Familie bindet. Möglicherweise besitzt Ki67 eine Funktion in der Kontrolle der Chromatinstruktur (Scholzen et al., 2002).

Da EBNA-2 ein Schlüsselprotein bei der Immortalisierung und der Aufrechterhaltung der B-Zelltransformation nach einer EBV-Infektion ist, wäre es äußerst interessant, wenn EBNA-2 mit einem Protein, das in den Proliferationsmechanismus einer Zelle involviert ist, interagiert.

PRKDC:

PRKDC konnte in einer von sieben TAP-Reinigungen, sowie in einer von fünf TIP-Reinigungen in der CBF1 positiven Zelllinie AH304-9 und in einer von zwei TIP-Reinigungen in der CBF1 negativen Zelllinie AH305-9, sowie in einer von zwei GST pull down-Reinigungen mit dem Konstrukt AH362 identifiziert werden. PRKDC scheint aufgrund dieser Ergebnisse ein potentieller CBF1 unabhängiger EBNA-2-Interaktionspartner zu sein.

PRKDC ist die katalytische Untereinheit der DNA-Proteinkinase (DNA-PK). DNA-PK ist eine Serin/Threonin-Proteinkinase und besitzt eine molekulare Masse von 470 kDa. Der Komplex der DNA-PK ist aus der bereits erwähnten katalytischen Untereinheit PRKDC und der regulatorischen Untereinheit, die die Proteine Ku70 und Ku80 enthält, zusammengesetzt. Aufgrund der Aminosäure Sequenz der PRKDC wird vorgeschlagen, dass sie ein Mitglied der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI-3-K)-Superfamilie ist.

Die Hauptaufgabe von DNA-PK liegt in der Reparatur von Doppelstrangbrüchen. So ist die DNA-PK in das „Nonhomologous end-joining“ (NHEJ) involviert. Es wird vermutet, dass die DNA-PK eine Art molekularen Sensor für DNA-Schäden besitzt und das Signal eines DNA-Doppelstrangbruches mittels Phosphorylierung weitergeben kann.

Des Weiteren hat DNA-PK auch eine Funktion in der Regulation der Transkription. Zum einen interagiert DNA-PK mit c-fos und c-jun und zum anderen mit der Polymerase II. Die Interaktion mit der Polymerase II resultiert in einer Repression der Polymerase. Dies zeigt, dass DNA-PK auch die Genexpression regulieren kann.

Die katalytische Untereinheit PRKDC kann zum einen mit den an die DNA gebundenen Ku Proteine interagieren, um den Komplex der DNA-PK zu aktivieren, zum anderen kann PRKDC auch direkt mit der DNA interagieren. Eine Aufgabe der PRKDC ist es, DNA-Stränge nach Brüchen zu schützen und zugleich die Strangenden zusammenzuführen. Dies kann in Kombination mit einem Multiproteinkomplex geschehen oder aber auch allein. Für alle Untereinheiten der DNA-PK konnte gezeigt werden, dass sie an die Chromosomenden binden. Vermutlich spielt PRKDC eine Rolle bei der Aufrechterhaltung der Telomerstabilität.

Der Mechanismus der DNA-Reparatur kann von einigen Viren inhibiert werden, um die virale Infektion zu erhöhen. So konnte für die Proteine ICP0 des Herpes simplex Virus (HSV-1) und E4-34k des Adenovirus Serotyp 5 (Ad5) eine Bindung an PRKDC gezeigt werden. Diese Bindung resultiert in einer raschen Ubiquitin-vermittelten Degradation von PRKDC. Des Weiteren inhibiert die Interaktion von E4-34k des Ad5 mit PRKDC die V(D)J-Rekombination. Möglicherweise wird durch diese Interaktion die virale Replikation erhöht und die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen durch die Reparaturmaschinerie der Wirtszelle verhindert (Übersicht: Collis et al., 2005).

Da PRKDC mehrerer Funktionen besitzt, ist es interessant zu untersuchen, welche Funktion von PRKDC durch eine Interaktion mit EBNA-2 beeinflusst wird. Möglicherweise resultiert die Interaktion von EBNA-2 mit PRKDC in einer Kontrolle der Genexpression. Denkbar wäre aber auch ein Einfluss von EBNA-2 auf die DNA-Reparatur.

YBOX-1:

Das YBOX-1-Protein, auch als YB-1 bezeichnet, konnte in zwei von fünf TIP-Reinigungen der CBF1 positiven Zelllinie AH304-9 und einer von zwei GST pull down-Reinigungen mit dem Konstrukt AH362 identifiziert werden. Aufgrund der Ergebnisse der Reinigungen, könnte YB-1 ein potentieller CBF1 abhängiger EBNA-2-Interaktionspartner sein.

YB-1 ist das evolutionär am stärksten konservierte Nukleinsäure-Bindeprotein, das bisher bekannt ist. Es ist ein Mitglied der cold-shock domain (CSD) Protein Superfamilie. Die Struktur von YB-1 ist dreigeteilt. Es besitzt neben der CSD-Domäne, eine Alanin/Prolin reiche N-terminale Domäne, die eine Transaktivierungsdomäne darstellt. Die C-terminale Domäne scheint in Protein-Protein Interaktionen involviert zu sein. YB-1 wurde aufgrund seiner Bindung an die Y-Box des MHC Klasse II Promotors benannt. Die Konsensussequenz, an die YB-1 bindet, ist mit dem Motiv der CCAAT-Box identisch. Die Expression von YB-1 ist mit der Zellproliferation assoziiert. Im Allgemeinen ist YB-1 in Tumorzellen überexprimiert. Es konnte nachgewiesen werden, dass c-myc das YB-1-Gen transaktivieren kann. Möglicherweise wird die Zellproliferation durch das Expressionslevel von YB-1 reguliert. YB-1 spielt auch eine Rolle bei der mRNA-Translation und schützt die mRNA vor Degradation (Übersicht: Kohno et al., 2003).

Möglicherweise kann EBNA-2 die Expression von YB-1 regulieren. Um zu überprüfen, welchen Effekt eine EBNA-2/YB-1-Interaktion mit sich bringt, könnten siRNA-Experimente durchgeführt werden. Denkbar wäre aber auch, dass EBNA-2 über YB-1 an die DNA binden kann. Dies kann zum einen mit Promotor-Reporter-Gen-Studien untersucht werden, und zum anderen mit Hilfe von EMSA-Experimenten.

DDX21 und DDX5, Proteine des RNA-Metabolismus:

Das DEAD-Box Protein DDX20, auch als DP103 bezeichnet, wurde bereits als EBNA-2-Interaktionspartner von der Arbeitsgruppe Grasser beschrieben (Grundhoff et al., 1999). Unter den potentiellen EBNA-2-Interaktionspartnern konnten weitere Mitglieder der DEAD-Box-Proteine, die eine wichtige Rolle im RNA-Metabolismus spielen, identifiziert werden. Die DEAD-Box-Familie ist durch neun konservierte Motive gekennzeichnet. Das Motiv II besitzt die charakteristische Aminosäure Sequenz D-E-A-D. Die Motive II, I, VI und das Q-Motiv sind für die ATP-Bindung und Hydrolyse verantwortlich. Die weniger charakteristischen Motive Ia, Ib, III, IV und V sind möglicherweise in die Interaktion mit der RNA involviert. Insgesamt gibt es 32 Subfamilien der DEAD-Box-Proteine, deren Mitglieder in verschiedene funktionelle Mechanismen, wie Transkription, pre-mRNA-Spleißen, Ribosomen-Biogenese, RNA-Export, RNA-Translation und Degradation involviert sind (Übersicht: Linder, 2006).

Das DEAD-Box-Protein DDX5 wird auch als p68 bezeichnet. DDX5 konnte in einer von sieben TAP-Reinigungen der CBF1 positiven Zelllinie AH304-9 und in jeweils einer von zwei GST pull down-Reinigungen mit den Konstrukten AH362 und KF214, sowie in zwei von drei TIP-Reinigungen in der CBF1 negativen TAP-CBF1-Zelllinie AH276-1 identifiziert werden. Möglicherweise handelt es sich bei DDX5 um einen indirekten EBNA-2-Interaktionspartner. Die Expression von p68 ist wachstumsreguliert und korreliert mit der Organdifferenzierung. Da p68 in einer massenspektrometrischen Analyse mit dem Spleißosom-Komplex koreinigt werden konnte, spielt es vermutlich eine Rolle beim RNA-Spleißen. Für p68 konnte gezeigt werden, dass es neben p72 wichtig für das alternative Spleißen von c-H-ras und CD44 ist. Interessanterweise besitzt p68 auch eine Funktion als transkriptioneller Koaktivator. Dies konnte für den nukleären Östrogen Rezeptor alpha (ER α) gezeigt werden. Vermutlich agiert p68 als Brücke zwischen Transkriptionsfaktoren. Des Weiteren konnte eine Interaktion von p68 mit CBP/p300 und der RNA-Polymerase II gezeigt werden. Es wurde auch eine Rekrutierung von p68 an das ER α -Zielgen pS2 beschrieben. Eine Rekrutierung von p68 konnte auch an p53 responsive Elemente beobachtet werden. Möglicherweise ist p68 somit in die transkriptionelle Initiation involviert, indem es die Rekrutierung weiterer Transkriptionsfaktoren erleichtert. Überraschenderweise wird die RNA-Helikaseaktivität von p68 für die Funktion bei der transkriptionellen Regulation nicht benötigt (Übersicht: Fuller-Pace, 2006).

Das DEAD-Box Protein DDX21, auch als RHII/Gua bezeichnet, gehört der Subfamilie DEVD an. DDX21 konnte in zwei von sieben TAP-Reinigungen in der CBF1 positiven Zelllinie AH304-9 und einer von zwei GST pull down-Reinigungen mit dem Konstrukt AH362 identifiziert werden. Möglicherweise ist DDX21 ein potentieller CBF1 abhängiger EBNA-2-Interaktionspartner. Für DDX21 konnte eine Interaktion mit c-Jun beschrieben werden. Hierbei kommt es zur Interaktion der C-terminalen Domäne mit der N-terminalen Transaktivierungsdomäne von c-Jun. Vermutlich ist DDX21 für die transkriptionelle Aktivität von c-Jun wichtig. Des Weiteren konnte für DDX21 eine Rolle bei der rRNA-Prozessierung der 20S rRNA zur 18S rRNA beschrieben werden (Übersicht: Fuller-Pace, 2006).

Möglicherweise kommt es auch zwischen der Transaktivierungsdomäne von EBNA-2 und der C-terminalen Domäne von DDX21 zur Interaktion, die in einer transkriptionellen Aktivität resultiert.

Für den bereits bekannten EBNA-2-Interaktionspartner DP103 wird mittlerweile auch vermutet, dass es als Adapter zwischen Koaktivatoren und Faktoren der Transkriptionsmaschinerie agiert (Fuller-Pace, 2006). So könnten sowohl p68, als auch DP103 als Adapter zwischen EBNA-2 und Faktoren der Transkriptionsmaschinerie dienen.

Um dies zu überprüfen, könnten Promotor-Reporter-Gen-Studien mit den einzelnen DEAD-Box-Proteinen durchgeführt werden. Der Einfluss der DEAD-Box-Proteine auf die transkriptionelle Aktivität von EBNA-2, sollte dann im Vergleich zu Transfektionen ohne

DEAD-Box-Proteine deutlich erkennbar sein. Hierbei kann auch überprüft werden, ob der Effekt durch ein Zusammenspiel der einzelnen DEAD-Box-Proteine verstärkt wird.

Als nächster Schritt müssen die neu identifizierten potentiellen EBNA-2-Interaktionspartner in unabhängigen Experimenten, wie beispielsweise einer Immunpräzipitation von endogenen Komplexen oder nach transienter Transfektion, bestätigt werden. Anschließend kann die biologische Relevanz der EBNA-2-Interaktion mit dem jeweiligen Kandidatenprotein untersucht werden. Die einzelnen Experimente hierfür, wurden bereits bei der Diskussion der einzelnen potentiellen Interaktionspartner erwähnt.

Des Weiteren kann nach der Bestätigung der Interaktion von EBNA-2 mit einem potentiellen Interaktionspartner die jeweilige Bindungsstelle durch Mutationsanalysen bestimmt werden.

5.2.4 TFE3 und seine mögliche Rolle als EBNA-2-Interaktionspartner

Der potentielle EBNA-2-Interaktionspartner TFE3 konnte mit zwei verschiedenen Reinigungstechniken in B-Zellen identifiziert werden. Dieser konnte in vier von sieben TAP-EBNA-2 Reinigungen in der CBF1 positiven Zelllinie AH304-9 und in einer von zwei GST pull down-Reinigungen mit dem Konstrukt AH362 nachgewiesen werden. Da es, wie bereits erwähnt, nicht möglich war eine DG75-Zelllinie zu etablieren, die den TAP-tag alleine exprimiert, konnten keine Negativkontrollreinigungen durchgeführt werden.

Nach transienter Transfektion von TAP-EBNA-2 in die EBV negative Zelllinie DG75 konnte in einer EBNA-2-Immunpräzipitation TFE3 angereichert werden. Mit weiteren transienten Transfektionen des TAP-tags in DG75 und anschließender Immunpräzipitation konnte ausgeschlossen werden, dass es sich bei TFE3 um ein Protein handelt, das unspezifisch an den TAP-tag bindet. Des Weiteren war es möglich, TFE3 in einer TAP-tag negativen Zelllinie (SM295), die stabil mit dem ER/EBNA-2-Konstrukt transfiziert war, in einer Ko-Immunpräzipitation zu bestätigen. Bisher gelang es jedoch nicht, die TFE3/EBNA-2-Interaktion in der EBV positiven Zelllinie 721 nachzuweisen. Möglicherweise liegt die Menge des immunpräzipitierten TFE3 unterhalb der Detektionsgrenze im Western Blot. Einen Hinweis hierfür geben die Resultate der Immunpräzipitation in der Zelllinie SM295, da nur eine sehr schwache TFE3-Bande im Western Blot sichtbar war. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die TFE3/EBNA-2-Interaktion, den Ergebnisse der MALDI-TOF/TOF-Analysen entsprechend, CBF1 abhängig war.

TFE3 ist neben TFEB, TFEC und Mitf ein Mitglied der MIT-Transkriptionsfaktoren. Diese Subfamilie gehört zur großen Familie der basischen Helix-Loop-Helix Leucin Zipper (bHLHZIP)-Transkriptionsfaktoren. Die Mitglieder dieser Familie besitzen eine basische DNA-Bindedomäne, eine Dimerisierungsdomäne und eine Leucin-Zipper-Domäne, die für die Stabilisierung der Dimerisierung wichtig ist. Die Bindung an die DNA erfolgt als Homo- oder

Heterodimer, wobei eine Dimerisierung nur mit Mitgliedern einer Subfamilie beobachtet werden kann (Beckmann et al., 1990; Zhao et al., 1993).

Bei TFE3 handelt es sich um ein ubiquitär exprimiertes Protein, das an die μ E3-Motive des intronischen Enhancers des schweren Immunglobulinketten-Lokus bindet. Des Weiteren konnte eine Bindung an den Immunglobulin kappa Enhancer und einige Promotoren der Immunglobulin H variablen Regionen beschrieben werden (Beckmann et al., 1990; Roman et al., 1992). Für TFE3 existieren *in vivo* zwei Isoformen (TFE3S und TFE3L), die durch differentielles Spleißen entstehen und sich in ihrem Aktivierungspotential unterscheiden (Roman et al., 1991). Die Arbeitsgruppe Calame konnte zeigen, dass die längere Isoform von TFE3 (TFE3L) zusätzlich zur C-terminalen Aktivierungsdomäne eine Aktivierungsdomäne am N-Terminus besitzt. Vergleicht man die mRNA-Level der beiden Isoformen, so entsprechen lediglich 2-18%, abhängig von Gewebe und Zelllinie, der kürzeren Form TFE3S (Artandi et al., 1995).

Wie TFE3 ist der Transkriptionsfaktor TFEB ubiquitär exprimiert. Eine Bindung von TFEB an ein E-Box-Element im adenoviralen „major late promoter“ (MLP) konnte von der Arbeitsgruppe Sharp beschrieben werden (Carr and Sharp, 1990; Rehli et al., 1999). Im Gegensatz zu TFE3 defizienten Mäusen sterben TFEB defiziente Mäuse bereits an Tag 10 im Uterus. Möglicherweise liegt die Ursache in einem Defekt der Vaskularisierung der Plazenta, die zu einer allgemeinen Unterversorgung des Embryos führt (Steingrimsson et al., 1998).

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, ist das Gen der schwere Immunglobulin Kette IgM ein EBNA-2-Zielgen, das durch EBNA-2 reprimiert wird. Möglicherweise stellt TFE3 eine Verbindung zu diesem Phänomen dar. So könnte durch eine TFE3/EBNA-2-Interaktion die Bindung von TFE3 an das μ E3-Motiv in den Immunglobulin-Loci blockiert und somit deren Expression herunterreguliert werden.

Ein Hinweis hierfür zeigt sich auch in Experimenten in TFE3 knock out Mäusen. Diese Mäuse entwickeln zwar B- und T-Zellen, weisen aber eine geringe B-Zellaktivierung auf. Das IgM-Serumlevel ist 2fach reduziert, die IgG- und IgA-Level 3 bis 6fach. Des Weiteren kann auf der Oberfläche von peripheren B-Zellen eine reduzierte Expression von CD23 nachgewiesen werden (Merrell et al., 1997).

Wenn die Bindungsstelle von TFE3 an EBNA-2 kartiert ist, kann eine EBNA-2-Mutante generiert werden, die nicht mehr mit TFE3 interagieren kann. Durch Expression dieser EBNA-2-Mutante in einer EBV negativen Zelllinie, kann untersucht werden, ob durch die TFE3/EBNA-2-Interaktion die Repression von IgM verursacht wird.

Des Weiteren kann auch in EMSAs überprüft werden, ob EBNA-2 eine Bindung von TFE3 an das μ E3-Motiv blockieren kann.

Welche Funktion die Interaktion von TFEB mit EBNA-2 hat, ist unklar. Denkbar wäre auch, dass TFEB nur aufgrund einer Heterodimerbildung mit TFE3 identifiziert werden konnte und eine Interaktion von EBNA-2 nur mit TFE3 stattfindet. Da TFEB im Gegensatz zu TFE3 in

nur zwei Reinigungen identifiziert werden konnte, ist möglicherweise eine Homodimerbildung von TFE3 häufiger zu beobachten.

5.3 EBNA-2 vermittelte Transaktivierung von zellulären Zielgenen

Da die potentiellen CBF1-Bindestellen in den drei betrachteten Genen SLAMF1, DNASE1L3 und CCL3 an unterschiedlichen Stellen lokalisiert sind, konnte vermutet werden, dass es unterschiedliche molekulare Mechanismen gibt, über die eine EBNA-2 vermittelte Transaktivierung stattfindet. In dem Gen DNASE1L3 konnte eine intronische EBNA-2-Bindung nachgewiesen werden, im CCL3-Gen dagegen eine Bindung im Promotor. Allen drei Genen war eine EBNA-2-Bindung am Transkriptionsstart gemeinsam. Möglicherweise ergänzen sich verschiedene Mechanismen der Transaktivierung, um ein optimales Ergebnis zu erhalten.

Die EBNA-2-Bindung an den Transkriptionsstart scheint einen alternativen, eigenständigen molekularen Mechanismus der EBNA-2 vermittelten Transaktivierung darzustellen, da im Gen SLAMF1 nur dieser Mechanismus beobachtet werden konnte. Obwohl es sich auch hier um eine CBF1 abhängige Transaktivierung durch EBNA-2 handelt, konnte keine EBNA-2-Bindung an potentielle CBF1-Bindestellen nachgewiesen werden.

Möglicherweise ist eine EBNA-2-Interaktion mit CBF1 nicht nur für die DNA-Bindung notwendig, sondern für die Aktivität oder Stabilität von Faktoren, die in den Mechanismus der EBNA-2 vermittelten Transaktivierung involviert sind.

In den Genen DNASE1L3 und CCL3 können beide möglichen Mechanismen beobachtet werden. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass eine EBNA-2-Bindung an CBF1 stattfinden muss, wenn ein Gen neu angeschaltet wird. Ist es bereits ein voraktiviertes Gen, wie beispielsweise SLAMF1, reicht die EBNA-2-Bindung an den Transkriptionsstart aus, um die Transaktivierung zu verstärken. Eventuell handelt es sich bei der EBNA-2-Bindung an den Transkriptionsstart um einen Mechanismus, der eine Transaktivierung verstärkt, jedoch allein nicht ausreicht, um eine Transaktivierung zu starten.

Wie dieser mögliche molekulare Mechanismus der Verstärkung der Transaktivierung abläuft, kann aus den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten nur vermutet werden. Denkbar wäre eine Bindung von EBNA-2 an eine Komponente des Mediatorkomplexes, beispielsweise MED12. MED12 ist neben MED13, CDK8 und CycC eine Komponente des Kinase-Moduls des Mediatorkomplexes (Übersicht: Blazek et al., 2005). Da allerdings Med12 in nur einer Reinigung als potentieller Interaktionspartner identifiziert werden konnte, wird auf dieses Protein nicht ausführlich eingegangen.

Eventuell erfolgt die EBNA-2-Bindung auch über eine Komponente der basalen Transkriptionsmaschinerie. Die Interaktion von EBNA-2 mit einigen Komponenten der basalen Transkriptionsmaschinerie, darunter auch TFIID oder TFIIB, ist bereits beschrieben (Tong et al., 1995a; Tong et al., 1995c). Die Interaktion von EBNA-2 mit p100 ist ebenfalls von der Arbeitsgruppe Kieff nachgewiesen worden (Tong et al., 1995b). Da STAT6 über eine

Bindung an p100 mit der Polymerase II interagieren kann (Yang et al., 2002), könnte möglicherweise auch EBNA-2 über p100 mit der Polymerase II interagieren. Dies würde die EBNA-2-Bindung am Transkriptionsstart erklären.

Da der potentielle EBNA-2-Interaktionspartner TMF1 an die TATA-Box bindet, könnte auch EBNA-2 über die Interaktion mit TMF1 in der Nähe des Transkriptionsstarts binden. Eine direkte Bindung von EBNA-2 an das TATA-Box binding protein (TBP) konnte bereits von der Arbeitsgruppe Kieff ausgeschlossen werden (Tong et al., 1995c).

Des Weiteren könnte die EBNA-2-Bindung an den Transkriptionsstart auch über PRKDC, der katalytischen Untereinheit von DNA-PK erfolgen. Möglicherweise kommt die Interaktion auch durch p68 (DDX5) oder DP103 (DDX20) zustande, für die eine mögliche Funktion als Adapter zwischen Transkriptionsfaktoren beschrieben wurde (siehe hierzu Kapitel 5.2.3).

Denkbar wäre auch, dass EBNA-2 über das YBOX-1 an die DNA binden kann. Wie bereits in Kapitel 5.1.3.2 erwähnt, erwies eine detaillierte Studie des CCL3-Gens, dass eine nahe dem Transkriptionsstart gelegene Region entscheidend zur EBNA-2 vermittelten Transaktivierung beiträgt. Diese Region enthält nahe dem Transkriptionsstart eine CCAAT-Box, an die das YBOX-1-Protein bindet. Möglicherweise wird die Transaktivierung durch eine Bindung von EBNA-2 an das YBOX-1-Protein beeinflusst. Der Promotorbereich von CCL3 weist eine weitere CCAAT-Box auf, die sich im Bereich von -201 bp bis -300 bp befindet. Eventuell bindet EBNA-2 auch über das YBOX-1-Protein an beide Bindestellen.

Des Weiteren wäre denkbar, dass EBNA-2 über eine Interaktion mit Proteinen der SOX-Familie an die DNA binden kann.

Eine weitere Möglichkeit der EBNA-2-Bindung am Transkriptionsstart wäre über eine direkte Interaktion von EBNA-2 mit der DNA. In der Arbeitsgruppe Kempkes konnte gezeigt werden, dass EBNA-2 direkt mit der DNA über einen PolyG-Bereich im LMP1-Promotor interagieren kann (unveröffentlichte Daten). Ob eine Bindung von EBNA-2 an die DNA auch in zellulären Genen möglich ist, wurde bis jetzt noch nicht untersucht. Allerdings konnten im Bereich des Transkriptionsstarts in den Genen SLAMF1, DNASE1L3 und CCL3 keine PolyG-Bereiche gefunden werden.

Für die, durch Real Time PCR bestätigten, zellulären EBNA-2-Zielgene konnte in unserem Labor eine CBF1-Abhängigkeit nachgewiesen werden (Maier et al., 2006). Eventuell ist die CBF1-Abhängigkeit darauf zurückzuführen, dass es durch die EBNA-2-Interaktion mit CBF1 zur Stabilisierung oder Aktivierung von Faktoren kommt, die für den molekularen Mechanismus der Transaktivierung durch EBNA-2 essentiell sind.

EBNA-2 könnte auch indirekt an den Transkriptionsstart binden, indem es an CBF1-Bindestellen im Promotor bzw. ersten Intron bindet und über eine Chromatinschleifenbildung an den Transkriptionsstart bindet. Dies könnte bei den untersuchten Genen CCL3 und DNASE1L3 möglich sein, da in diesen Genen eine EBNA-2-Bindung an CBF1-Bindestellen im Promotor bzw. ersten Intron nachgewiesen werden konnte.

6 Abkürzungen

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
Abb.	Abbildung
AIDS	Acquired immune deficiency syndrome
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
APS	Aminoperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BL	Burkit Lymphom
bp	Basenpaar
CBF1	C _P -Promotor Bindungsfaktor 1
cDNA	komplementäre DNA
ChIP	Chromatinimmunpräzipitation
cm	Zentimeter
Cp	Crossing point
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	2'-Desoxyribonukleinsäure
dNTP	3'-Desoxyribonukleotid-5'-phosphat
EBER	Epstein-Barr Virus kodierte RNA
EBNA	Epstein-Barr Virus nukleäres Antigen
EBV	Epstein-Barr Virus
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N,N-tetra-acetat
EGTA	Ethylenglycol-bis-(2-aminoethylether-)-N,N,N,N-tetra-acetat
ESI	Electrospray-Ionisierung
fM	Femtomolar
g	Erdbeschleunigung
h	Stunde
HCl	Hydrogenchlorid
HPLC	Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie
IP	Immunpräzipitation
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LB	Luria-Bertani
LC	Flüssigkeitschromatographie
LCL	Lymphoblastoide Zelllinie (primäre mit EBV infizierte B-Zelle)
LMP	latentes Membranprotein
M	Mol
mA	Milliampere
MALDI	Matrix unterstützte Laserdesorption/Ionisation
min	Minute
ml	Milliliter
mM	millimolar
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem Massenspektrometrie
MW	Molekulargewicht
m/z	Masse zu Ladung
NaCl	Natriumchlorid
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NuPAGE	pre-cast SDS-Gel von Invitrogen
OD	optische Dichte
ORF	Offener Leserahmen
PBS	Phosphat gepufferte Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
pM	Picomolar
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat

SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacryamidgelelektrophorese
sec	Sekunden
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-acetat-EDTA
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N, N, N, N, Tetramethylethyldiamin
TFA	Trifluoressigsäure
TOF	Time of flight
TOF/TOF	Time of flight/Time of flight
Tris Base	Tris-(hydroxymethyl)-ammoniummethan
Trp	Tryptophan
U	Einheit der Enzymaktivität (Unit)
UV	Ultraviolett
V	Volt

7 Literatur

- Abdellah** (2004). Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* 431, 931-945.
- Abbot, S. D., Rowe, M., Cadwallader, K., Ricksten, A., Gordon, J., Wang, F., Rymo, L., and Rickinson, A. B.** (1990). Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 induces expression of the virus-encoded latent membrane protein. *J Virol* 64, 2126-2134.
- Aebersold, R., and Mann, M.** (2003). Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* 422, 198-207.
- Alazard, N., Gruffat, H., Hiriart, E., Sergeant, A., and Manet, E.** (2003). Differential hyperacetylation of histones H3 and H4 upon promoter-specific recruitment of EBNA2 in Epstein-Barr virus chromatin. *J Virol* 77, 8166-8172.
- Angers, S., Thorpe, C. J., Biechele, T. L., Goldenberg, S. J., Zheng, N., MacCoss, M. J., and Moon, R. T.** (2006). The KLHL12-Cullin-3 ubiquitin ligase negatively regulates the Wnt-beta-catenin pathway by targeting Dishevelled for degradation. *Nat Cell Biol* 8, 348-357.
- Ansieau, S., and Leutz, A.** (2002). The conserved Mynd domain of BS69 binds cellular and oncoviral proteins through a common PXLXP motif. *J Biol Chem* 277, 4906-4910.
- Artandi, S. E., Merrell, K., Avitahl, N., Wong, K. K., and Calame, K.** (1995). TFE3 contains two activation domains, one acidic and the other proline-rich, that synergistically activate transcription. *Nucleic Acids Res* 23, 3865-3871.
- 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.
- Bannister, A. J., Schneider, R., and Kouzarides, T.** (2002). Histone methylation: dynamic or static? *Cell* 109, 801-806.
- Bark-Jones, S. J., Webb, H. M., and West, M. J.** (2006). EBV EBNA 2 stimulates CDK9-dependent transcription and RNA polymerase II phosphorylation on serine 5. *Oncogene* 25, 1775-1785.
- Barth, S., Liss, M., Voss, M. D., Dobner, T., Fischer, U., Meister, G., and Grasser, F. A.** (2003). Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 binds via its methylated arginine-glycine repeat to the survival motor neuron protein. *J Virol* 77, 5008-5013.
- Basu, S., Totty, N. F., Irwin, M. S., Sudol, M., and Downward, J.** (2003). Akt phosphorylates the Yes-associated protein, YAP, to induce interaction with 14-3-3 and attenuation of p73-mediated apoptosis. *Mol Cell* 11, 11-23.
- Beckmann, H., Su, L. K., and Kadesch, T.** (1990). TFE3: a helix-loop-helix protein that activates transcription through the immunoglobulin enhancer muE3 motif. *Genes Dev* 4, 167-179.
- Ben-Bassat, H., Goldblum, N., Mitrani, S., Goldblum, T., Yoffey, J. M., Cohen, M. M., Bentwich, Z., Ramot, B., Klein, E., and Klein, G.** (1977). Establishment in continuous culture of a new type of lymphocyte from a "Burkitt like" malignant lymphoma (line D.G.-75). *Int J Cancer* 19, 27-33.
- Benzinger, A., Muster, N., Koch, H. B., Yates, J. R., 3rd, and Hermeking, H.** (2005). Targeted proteomic analysis of 14-3-3 sigma, a p53 effector commonly silenced in cancer. *Mol Cell Proteomics* 4, 785-795.
- Berger, S. L.** (2002). Histone modifications in transcriptional regulation. *Curr Opin Genet Dev* 12, 142-148.
- Blazek, E., Mittler, G., and Meisterernst, M.** (2005). The mediator of RNA polymerase II. *Chromosoma* 113, 399-408.
- Boccellato, F., Anastasiadou, E., Rosato, P., Kempkes, B., Frati, L., Faggioni, A., and Trivedi, P.** (2006). EBNA2 interferes with the germinal center phenotype by downregulating BCL6 and TCL1 in Non Hodgkin's lymphoma cells. *J Virol* 81, 2274-2282.
- Bornkamm, G. W., and Hammerschmidt, W.** (2001). Molecular virology of Epstein-Barr virus. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 356, 437-459.
- Borza, C. M., and Hutt-Fletcher, L. M.** (2002). Alternate replication in B cells and epithelial cells switches tropism of Epstein-Barr virus. *Nat Med* 8, 594-599.

- Bouwmeester, T., Bauch, A., Ruffner, H., Angrand, P. O., Bergamini, G., Croughton, K., Cruciat, C., Eberhard, D., Gagneur, J., Ghidelli, S., et al.** (2004). A physical and functional map of the human TNF- α /NF- κ B signal transduction pathway. *Nat Cell Biol* 6, 97-105.
- Brajenovic, M., Joberty, G., Kuster, B., Bouwmeester, T., and Drewes, G.** (2004). Comprehensive proteomic analysis of human Par protein complexes reveals an interconnected protein network. *J Biol Chem* 279, 12804-12811.
- 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.
- Calender, A., Cordier, M., Billaud, M., and Lenoir, G. M.** (1990). Modulation of cellular gene expression in B lymphoma cells following in vitro infection by Epstein-Barr virus (EBV). *Int J Cancer* 46, 658-663.
- Carr, C. S., and Sharp, P. A.** (1990). A helix-loop-helix protein related to the immunoglobulin E box-binding proteins. *Mol Cell Biol* 10, 4384-4388
- Chau, C. M., Zhang, X. Y., McMahon, S. B., and Lieberman, P. M.** (2006). Regulation of Epstein-Barr virus latency type by the chromatin boundary factor CTCF. *J Virol* 80, 5723-5732.
- Cohen, J. I., Wang, F., Mannick, J., and Kieff, E.** (1989). Epstein-Barr virus nuclear protein 2 is a key determinant of lymphocyte transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 9558-9562.
- Cohen-Barak, O., Hagiwara, N., Arlt, M. F., Horton, J. P., and Brilliant, M. H.** (2001). Cloning, characterization and chromosome mapping of the human SOX6 gene. *Gene* 265, 157-164.
- Collis, S. J., DeWeese, T. L., Jeggo, P. A., and Parker, A. R.** (2005). The life and death of DNA-PK. *Oncogene* 24, 949-961
- Cordier, M., Calender, A., Billaud, M., Zimmer, U., Rousselet, G., Pavlish, O., Banchereau, J., Tursz, T., Bornkamm, G., and Lenoir, G. M.** (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.
- Crawford, D. H.** (2001). Biology and disease associations of Epstein-Barr virus. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 356, 461-473.
- Daulat, A. M., Maurice, P., Froment, C., Guillaume, J. L., Broussard, C., Monsarrat, B., Delagrangé, P., and Jockers, R.** (2007). Purification and identification of G protein-coupled receptor protein complexes under native conditions. *Mol Cell Proteomics* 6, 835-844.
- Drakas, R., Prisco, M., and Baserga, R.** (2005). A modified tandem affinity purification tag technique for the purification of protein complexes in mammalian cells. *Proteomics* 5, 132-137.
- Fahraeus, R., Jansson, A., Ricksten, A., Sjöblom, A., and Rymo, L.** (1990). Epstein-Barr virus-encoded nuclear antigen 2 activates the viral latent membrane protein promoter by modulating the activity of a negative regulatory element. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 7390-7394.
- Fenn, J. B., Mann, M., Meng, C. K., Wong, S. F., and Whitehouse, C. M.** (1989). Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* 246, 64-71.
- Folk, P., Puta, F., and Skrzyny, M.** (2004). Transcriptional coregulator SNW/SKIP: the concealed tie of dissimilar pathways. *Cell Mol Life Sci* 61, 629-640.
- Forler, D., Kocher, T., Rode, M., Gentzel, M., Izaurralde, E., and Wilm, M.** (2003). An efficient protein complex purification method for functional proteomics in higher eukaryotes. *Nat Biotechnol* 21, 89-92.
- Fuchs, K. P., Bommer, G., Dumont, E., Christoph, B., Vidal, M., Kremmer, E., and Kempkes, B.** (2001). Mutational analysis of the J recombination signal sequence binding protein (RBP-J)/Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 (EBNA2) and RBP-J/Notch interaction. *Eur J Biochem* 268, 4639-4646.
- Fuller-Pace, F. V.** (2006). DExD/H box RNA helicases: multifunctional proteins with important roles in transcriptional regulation. *Nucleic Acids Res* 34, 4206-4215.

- Garcia, J. A., Ou, S. H., Wu, F., Lusic, A. J., Sparkes, R. S., and Gaynor, R. B.** (1992). Cloning and chromosomal mapping of a human immunodeficiency virus 1 "TATA" element modulatory factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 9372-9376.
- Gavin, A. C., Bosche, M., Krause, R., Grandi, P., Marzioch, M., Bauer, A., Schultz, J., Rick, J. M., Michon, A. M., Cruciat, C. M., et al.** (2002). Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. *Nature* 415, 141-147.
- Ghosh, D., and Kieff, E.** (1990). cis-acting regulatory elements near the Epstein-Barr virus latent-infection membrane protein transcriptional start site. *J Virol* 64, 1855-1858.
- Gingras, A. C., Aebersold, R., and Raught, B.** (2005). Advances in protein complex analysis using mass spectrometry. *J Physiol* 563, 11-21.
- Gohring, F., and Fackelmayer, F. O.** (1997). The scaffold/matrix attachment region binding protein hnRNP-U (SAF-A) is directly bound to chromosomal DNA in vivo: a chemical cross-linking study. *Biochemistry* 36, 8276-8283.
- Gordadze, A. V., Peng, R., Tan, J., Liu, G., Sutton, R., Kempkes, B., Bornkamm, G. W., and Ling, P. D.** (2001). Notch1IC partially replaces EBNA2 function in B cells immortalized by Epstein-Barr virus. *J Virol* 75, 5899-5912.
- Grabusic, K., Maier, S., Hartmann, A., Mantik, A., Hammerschmidt, W., and Kempkes, B.** (2006). The CR4 region of EBNA2 confers viability of Epstein-Barr virus-transformed B cells by CBF1-independent signalling. *J Gen Virol* 87, 3169-3176.
- Grant, P. A., and Berger, S. L.** (1999). Histone acetyltransferase complexes. *Semin Cell Dev Biol* 10, 169-177.
- Grossman, S. R., Johannsen, E., Tong, X., Yalamanchili, R., and Kieff, E.** (1994). The Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 transactivator is directed to response elements by the J kappa recombination signal binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 7568-7572.
- Grundhoff, A. T., Kremmer, E., Tureci, O., Glieden, A., Gindorf, C., Atz, J., Mueller-Lantzsch, N., Schubach, W. H., and Grasser, F. A.** (1999). Characterization of DP103, a novel DEAD box protein that binds to the Epstein-Barr virus nuclear proteins EBNA2 and EBNA3C. *J Biol Chem* 274, 19136-19144.
- Hammerschmidt, W., and Sugden, B.** (1989). Genetic analysis of immortalizing functions of Epstein-Barr virus in human B lymphocytes. *Nature* 340, 393-397.
- Haque, T., and Crawford, D. H.** (1998). Role of donor versus recipient type Epstein-Barr virus in post-transplant lymphoproliferative disorders. *Springer Semin Immunopathol* 20, 375-387.
- Hayward, S. D.** (2004). Viral interactions with the Notch pathway. *Semin Cancer Biol* 14, 387-396.
- Hillenkamp, F., Karas, M., Beavis, R. C., and Chait, B. T.** (1991). Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of biopolymers. *Anal Chem* 63, 1193A-1203A.
- Hofelmayer, H., Strobl, L. J., Marschall, G., Bornkamm, G. W., and Zimmer-Strobl, U.** (2001). Activated Notch1 can transiently substitute for EBNA2 in the maintenance of proliferation of LMP1-expressing immortalized B cells. *J Virol* 75, 2033-2040.
- Hsieh, J. J., and Hayward, S. D.** (1995). Masking of the CBF1/RBPJ kappa transcriptional repression domain by Epstein-Barr virus EBNA2. *Science* 268, 560-563.
- 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.
- Ikeda, T., Zhang, J., Chano, T., Mabuchi, A., Fukuda, A., Kawaguchi, H., Nakamura, K., and Ikegawa, S.** (2002). Identification and characterization of the human long form of Sox5 (L-SOX5) gene. *Gene* 298, 59-68.
- Jenuwein, T.** (2001). Re-SET-ting heterochromatin by histone methyltransferases. *Trends Cell Biol* 11, 266-273.
- Jin, X. W., and Speck, S. H.** (1992). Identification of critical cis elements involved in mediating Epstein-Barr virus nuclear antigen 2-dependent activity of an enhancer located upstream of the viral BamHI C promoter. *J Virol* 66, 2846-2852.

- 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.
- Johansen, L. M., Deppmann, C. D., Erickson, K. D., Coffin, W. F., 3rd, Thornton, T. M., Humphrey, S. E., Martin, J. M., and Taparowsky, E. J.** (2003). EBNA2 and activated Notch induce expression of BATF. *J Virol* 77, 6029-6040.
- Kaiser, C., Laux, G., Eick, D., Jochner, N., Bornkamm, G. W., and Kempkes, B.** (1999). The proto-oncogene c-myc is a direct target gene of Epstein-Barr virus nuclear antigen 2. *J Virol* 73, 4481-4484.
- Kao, H. Y., Ordentlich, P., Koyano-Nakagawa, N., Tang, Z., Downes, M., Kintner, C. R., Evans, R. M., and Kadesch, T.** (1998). A histone deacetylase corepressor complex regulates the Notch signal transduction pathway. *Genes Dev* 12, 2269-2277.
- Kavathas, P., Bach, F. H., and DeMars, R.** (1980). Gamma ray-induced loss of expression of HLA and glyoxalase alleles in lymphoblastoid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77, 4251-4255.
- Kempkes, B., Pawlita, M., Zimmer-Strobl, U., Eissner, G., Laux, G., and Bornkamm, G. W.** (1995a). 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., Rottenberger, C., Bornkamm, G. W., and Hammerschmidt, W.** (1995b). 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., Strobl, L.J., Bornkamm, G.W., Zimmer-Strobl, U.** (2005). EBNA-2 and Notch Signalling, In Epstein-Barr Virus, E. Robertson, ed. (Norfolk: Caister Academic Press), pp. 463-500.
- Kempkes, B., Zimmer-Strobl, U., Eissner, G., Pawlita, M., Falk, M., Hammerschmidt, W., and Bornkamm, G. W.** (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.
- Khan, G., Miyashita, E. M., Yang, B., Babcock, G. J., and Thorley-Lawson, D. A.** (1996). Is EBV persistence in vivo a model for B cell homeostasis? *Immunity* 5, 173-179.
- Kieff, E., and Rickinson, A. B.** (2007). Epstein-Barr virus and its replication, In Fields Virology, D. M. Knipe, P. M. Howley, D. E. Griffin, R. A. Lamb, M. A. Martin, B. Roizmann, and S. E. Strauss, eds. (Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins), pp. 2511-2574.
- Knuesel, M. P., Wan, Y., Xiao, Z., Holinger, E. P., Lowe, N., Wang, W., and Liu, X.** (2003). Identification of novel protein-protein interactions using a versatile mammalian TAP expression system. *Mol Cell Proteomics* 2, 1225-1233.
- Kohno, K., Izumi, H., Uchiumi, T., Ashizuka, M., and Kuwano, M.** (2003). The pleiotropic functions of the Y-box-binding protein, YB-1. *Bioessays* 25, 691-698.
- Kovall, R. A., and Hendrickson, W. A.** (2004). Crystal structure of the nuclear effector of Notch signaling, CSL, bound to DNA. *Embo J* 23, 3441-3451.
- Krauer, K. G., Kienzle, N., Young, D. B., and Sculley, T. B.** (1996). Epstein-Barr nuclear antigen-3 and -4 interact with RBP-2N, a major isoform of RBP-J kappa in B lymphocytes. *Virology* 226, 346-353.
- Kuppers, R.** (2002). Molecular biology of Hodgkin's lymphoma. *Adv Cancer Res* 84, 277-312.
- Kuppers, R.** (2003). B cells under influence: transformation of B cells by Epstein-Barr virus. *Nat Rev Immunol* 3, 801-812.
- Kuppers, R., Klein, U., Schwering, I., Distler, V., Brauninger, A., Cattoretti, G., Tu, Y., Stolovitzky, G. A., Califano, A., Hansmann, M. L., and Dalla-Favera, R.** (2003). Identification of Hodgkin and Reed-Sternberg cell-specific genes by gene expression profiling. *J Clin Invest* 111, 529-537.

- Kuppers, R., Rajewsky, K., Zhao, M., Simons, G., Laumann, R., Fischer, R., and Hansmann, M. L.** (1994). Hodgkin disease: Hodgkin and Reed-Sternberg cells picked from histological sections show clonal immunoglobulin gene rearrangements and appear to be derived from B cells at various stages of development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 10962-10966.
- Kuroda, K., Han, H., Tani, S., Tanigaki, K., Tun, T., Furukawa, T., Taniguchi, Y., Kurooka, H., Hamada, Y., Toyokuni, S., and Honjo, T.** (2003). Regulation of marginal zone B cell development by MINT, a suppressor of Notch/RBP-J signaling pathway. *Immunity* 18, 301-312.
- Kurth, J., Spieker, T., Wustrow, J., Strickler, G. J., Hansmann, L. M., Rajewsky, K., and Kuppers, R.** (2000). EBV-infected B cells in infectious mononucleosis: viral strategies for spreading in the B cell compartment and establishing latency. *Immunity* 13, 485-495.
- Kwiatkowski, B., Chen, S. Y., and Schubach, W. H.** (2004). CKII site in Epstein-Barr virus nuclear protein 2 controls binding to hSNF5/Ini1 and is important for growth transformation. *J Virol* 78, 6067-6072.
- Lander, E. S., Linton, L. M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M. C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W., et al.** (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409, 860-921.
- Laux, G., Adam, B., Strobl, L. J., and Moreau-Gachelin, F.** (1994a). 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.** (1994b). 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.
- Lee, J. M., Lee, K. H., Weidner, M., Osborne, B. A., and Hayward, S. D.** (2002). Epstein-Barr virus EBNA2 blocks Nur77- mediated apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 11878-11883. Epub 12002 Aug 11823.
- 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.
- Li, H., Kolluri, S. K., Gu, J., Dawson, M. I., Cao, X., Hobbs, P. D., Lin, B., Chen, G., Lu, J., Lin, F., et al.** (2000). Cytochrome c release and apoptosis induced by mitochondrial targeting of nuclear orphan receptor TR3. *Science* 289, 1159-1164.
- Linder, P.** (2006). Dead-box proteins: a family affair--active and passive players in RNP-remodeling. *Nucleic Acids Res* 34, 4168-4180.
- Ling, P. D., and Hayward, S. D.** (1995). Contribution of conserved amino acids in mediating the interaction between EBNA2 and CBF1/RBPJk. *J Virol* 69, 1944-1950.
- Ling, P. D., Hsieh, J. J., Ruf, I. K., Rawlins, D. R., and Hayward, S. D.** (1994). EBNA-2 upregulation of Epstein-Barr virus latency promoters and the cellular CD23 promoter utilizes a common targeting intermediate, CBF1. *J Virol* 68, 5375-5383.
- Ling, P. D., Rawlins, D. R., and Hayward, S. D.** (1993). The Epstein-Barr virus immortalizing protein EBNA-2 is targeted to DNA by a cellular enhancer-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 9237-9241.
- Lottspeich, F.** (1999). Proteome Analysis: A Pathway to the Functional Analysis of Proteins. *Angew Chem Int Ed Engl* 38, 2476-2492.
- Lottspeich, F.** (2006). In Lottspeich, F. & Zorbas, H. (Hrsg.) *Bioanalytik*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- Maier, S., Santak, M., Mantik, A., Grabusic, K., Kremmer, E., Hammerschmidt, W., and Kempkes, B.** (2005). A somatic knockout of CBF1 in a human B-cell line reveals that induction of CD21 and CCR7 by EBNA-2 is strictly CBF1 dependent and that downregulation of immunoglobulin M is partially CBF1 independent. *J Virol* 79, 8784-8792.
- Maier, S., Staffler, G., Hartmann, A., Hock, J., Henning, K., Grabusic, K., Mailhammer, R., Hoffmann, R., Wilmanns, M., Lang, R., et al.** (2006). Cellular target genes of epstein-barr virus nuclear antigen 2. *J Virol* 80, 9761-9771.

- Makar, K. W., Pham, C. T., Dehoff, M. H., O'Connor, S. M., Jacobi, S. M., and Holers, V. M.** (1998). An intronic silencer regulates B lymphocyte cell- and stage-specific expression of the human complement receptor type 2 (CR2, CD21) gene. *J Immunol* *160*, 1268-1278.
- Makar, K. W., Ulgiati, D., Hagman, J., and Holers, V. M.** (2001). A site in the complement receptor 2 (CR2/CD21) silencer is necessary for lineage specific transcriptional regulation. *Int Immunol* *13*, 657-664.
- Mann, M., Ong, S. E., Gronborg, M., Steen, H., Jensen, O. N., and Pandey, A.** (2002). Analysis of protein phosphorylation using mass spectrometry: deciphering the phosphoproteome. *Trends Biotechnol* *20*, 261-268.
- Manolov, G., and Manolova, Y.** (1972). Marker band in one chromosome 14 from Burkitt lymphomas. *Nature* *237*, 33-34.
- Marmorstein, R.** (2001). Structure of histone deacetylases: insights into substrate recognition and catalysis. *Structure* *9*, 1127-1133.
- Medzihradzsky, K. F., Campbell, J. M., Baldwin, M. A., Falick, A. M., Juhasz, P., Vestal, M. L., and Burlingame, A. L.** (2000). The characteristics of peptide collision-induced dissociation using a high-performance MALDI-TOF/TOF tandem mass spectrometer. *Anal Chem* *72*, 552-558.
- Merrell, K., Wells, S., Henderson, A., Gorman, J., Alt, F., Stall, A., and Calame, K.** (1997). The absence of the transcription activator TFE3 impairs activation of B cells in vivo. *Mol Cell Biol* *17*, 3335-3344.
- Middeldorp, J. M., Brink, A. A., van den Brule, A. J., and Meijer, C. J.** (2003). Pathogenic roles for Epstein-Barr virus (EBV) gene products in EBV-associated proliferative disorders. *Crit Rev Oncol Hematol* *45*, 1-36.
- Mohan, J., Dement-Brown, J., Maier, S., Ise, T., Kempkes, B., and Tolnay, M.** (2006). Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 induces FcRH5 expression through CBF1. *Blood* *107*, 4433-4439.
- Morra, M., Simarro-Grande, M., Martin, M., Chen, A. S., Lanyi, A., Silander, O., Calpe, S., Davis, J., Pawson, T., Eck, M. J., et al.** (2001). Characterization of SH2D1A missense mutations identified in X-linked lymphoproliferative disease patients. *J Biol Chem* *276*, 36809-36816.
- Mumm, J. S., and Kopan, R.** (2000). Notch Signaling: From the Outside In. *Dev Biol* *228*, 151-165.
- Murashov, A. K., Chintalgattu, V., Islamov, R. R., Lever, T. E., Pak, E. S., Sierpinski, P. L., Katwa, L. C., and Van Scott, M. R.** (2007). RNAi pathway is functional in peripheral nerve axons. *Faseb J* *21*, 656-670.
- Nemerow, G. R., McNaughton, M. E., and Cooper, N. R.** (1985). Binding of monoclonal antibody to the Epstein Barr virus (EBV)/CR2 receptor induces activation and differentiation of human B lymphocytes. *J Immunol* *135*, 3068-3073.
- Nishioka, K., Chuikov, S., Sarma, K., Erdjument-Bromage, H., Allis, C. D., Tempst, P., and Reinberg, D.** (2002). Set9, a novel histone H3 methyltransferase that facilitates transcription by precluding histone tail modifications required for heterochromatin formation. *Genes Dev* *16*, 479-489.
- Orlando, V.** (2000). Mapping chromosomal proteins in vivo by formaldehyde-crosslinked-chromatin immunoprecipitation. *Trends Biochem Sci* *25*, 99-104.
- Orlando, V., Strutt, H., and Paro, R.** (1997). Analysis of chromatin structure by in vivo formaldehyde cross-linking. *Methods* *11*, 205-214.
- Oswald, F., Kostezka, U., Astrahantseff, K., Bourteele, S., Dillinger, K., Zechner, U., Ludwig, L., Wilda, M., Hameister, H., Knochel, W., et al.** (2002). SHARP is a novel component of the Notch/RBP-Jkappa signalling pathway. *Embo J* *21*, 5417-5426.
- Pandey, A., and Mann, M.** (2000). Proteomics to study genes and genomes. *Nature* *405*, 837-846.
- Perkins, D. N., Pappin, D. J., Creasy, D. M., and Cottrell, J. S.** (1999). Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* *20*, 3551-3567.
- Philips, A., Lesage, S., Gingras, R., Maira, M. H., Gauthier, Y., Hugo, P., and Drouin, J.** (1997). Novel dimeric Nur77 signaling mechanism in endocrine and lymphoid cells. *Mol Cell Biol* *17*, 5946-5951.
- Popp, C.** (2002) Analyse der Regulation von Zielgenen des viralen Onkoproteins EBNA-2 (Epstein-Barr-Virus nukleäres Antigen 2), Diplomarbeit, Ludwig-Maximilians Universität, München.

- Rehli, M., Lichanska, A., Cassady, A. I., Ostrowski, M. C., and Hume, D. A.** (1999). TFEC is a macrophage-restricted member of the microphthalmia-TFE subfamily of basic helix-loop-helix leucine zipper transcription factors. *J Immunol* *162*, 1559-1565.
- Restle, A., Janz, C., and Wiesmuller, L.** (2005). Differences in the association of p53 phosphorylated on serine 15 and key enzymes of homologous recombination. *Oncogene* *24*, 4380-4387.
- Richards, E. J., and Elgin, S. C.** (2002). Epigenetic codes for heterochromatin formation and silencing: rounding up the usual suspects. *Cell* *108*, 489-500.
- Rickinson, A. B., and Kieff, E.** (2007). Epstein-Barr Virus, In *Fields Virology*, D. M. Knipe, P. M. Howley, D. E. Griffin, R. A. Lamb, A. Malcolm, B. Roizmann, and S. E. Strauss, eds. (Philadelphia - New York: Lippincott-Williams and Raven), pp. 2575-2627.
- Rigaut, G., Shevchenko, A., Rutz, B., Wilm, M., Mann, M., and Seraphin, B.** (1999). A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nat Biotechnol* *17*, 1030-1032.
- Roepstorff, P., and Fohlman, J.** (1984). Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. *Biomed Mass Spectrom* *11*, 601.
- Roman, C., Cohn, L., and Calame, K.** (1991). A dominant negative form of transcription activator mTFE3 created by differential splicing. *Science* *254*, 94-97.
- Roman, C., Matera, A. G., Cooper, C., Artandi, S., Blain, S., Ward, D. C., and Calame, K.** (1992). mTFE3, an X-linked transcriptional activator containing basic helix-loop-helix and zipper domains, utilizes the zipper to stabilize both DNA binding and multimerization. *Mol Cell Biol* *12*, 817-827.
- Rowe, D. T., Rowe, M., Evan, G. I., Wallace, L. E., Farrell, P. J., and Rickinson, A. B.** (1986). Restricted expression of EBV latent genes and T-lymphocyte-detected membrane antigen in Burkitt's lymphoma cells. *Embo J* *5*, 2599-2607.
- Sakai, T., Taniguchi, Y., Tamura, K., Minoguchi, S., Fukuhara, T., Strobl, L. J., Zimmer-Strobl, U., Bornkamm, G.W., and Honjo, T.** (1998). Functional replacement of the intracellular region of the Notch1 receptor by Epstein-Barr virus nuclear antigen 2. *J Virol* *72*, 6034-6039.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T.** (1989). *Molecular Cloning. A laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
- Santos-Rosa, H., Schneider, R., Bannister, A. J., Sherriff, J., Bernstein, B. E., Emre, N. C., Schreiber, S. L., Mellor, J., and Kouzarides, T.** (2002). Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3. *Nature* *419*, 407-411.
- Schimanski, B., Nguyen, T. N., and Gunzl, A.** (2005). Highly efficient tandem affinity purification of trypanosome protein complexes based on a novel epitope combination. *Eukaryot Cell* *4*, 1942-1950.
- Scholzen, T., Endl, E., Wohlenberg, C., van der Sar, S., Cowell, I. G., Gerdes, J., and Singh, P. B.** (2002). The Ki-67 protein interacts with members of the heterochromatin protein 1 (HP1) family: a potential role in the regulation of higher-order chromatin structure. *J Pathol* *196*, 135-144.
- Scholzen, T., and Gerdes, J.** (2000). The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol* *182*, 311-322.
- Shevchenko, A., Schaft, D., Roguev, A., Pijnappel, W. W., Stewart, A. F., and Shevchenko, A.** (2002). Deciphering protein complexes and protein interaction networks by tandem affinity purification and mass spectrometry: analytical perspective. *Mol Cell Proteomics* *1*, 204-212.
- Sims, R. J., 3rd, Nishioka, K., and Reinberg, D.** (2003). Histone lysine methylation: a signature for chromatin function. *Trends Genet* *19*, 629-639.
- Sjoblom, A., Jansson, A., Yang, W., Lain, S., Nilsson, T., and Rymo, L.** (1995a). 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., Nerstedt, A., Jansson, A., and Rymo, L.** (1995b). Domains of the Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 (EBNA2) involved in the transactivation of the latent membrane protein 1 and the EBNA Cp promoters. *J Gen Virol* *76*, 2669-2678.

- 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.
- Skare, J. C., Milunsky, A., Byron, K. S., and Sullivan, J. L.** (1987). Mapping the X-linked lymphoproliferative syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 2015-2018.
- Spear, P. G., and Longnecker, R.** (2003). Herpesvirus entry: an update. *J Virol* 77, 10179-10185.
- Spencer, V. A., and Davie, J. R.** (1999). Role of covalent modifications of histones in regulating gene expression. *Gene* 240, 1-12.
- Spender, L. C., Cornish, G. H., Rowland, B., Kempkes, B., and Farrell, P. J.** (2001). Direct and indirect regulation of cytokine and cell cycle proteins by ebna-2 during epstein-barr virus infection. *J Virol* 75, 3537-3546.
- Spender, L. C., Cornish, G. H., Sullivan, A., and Farrell, P. J.** (2002). Expression of transcription factor AML-2 (RUNX3, CBF(alpha)-3) is induced by Epstein-Barr virus EBNA-2 and correlates with the B-cell activation phenotype. *J Virol* 76, 4919-4927.
- Steingrimsson, E., Tessarollo, L., Reid, S. W., Jenkins, N. A., and Copeland, N. G.** (1998). The bHLH-Zip transcription factor Tfeb is essential for placental vascularization. *Development* 125, 4607-4616.
- Strahl, B. D., and Allis, C. D.** (2000). The language of covalent histone modifications. *Nature* 403, 41-45.
- 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.
- Sung, N. S., Kenney, S., Gutsch, D., and Pagano, J. S.** (1991). EBNA-2 transactivates a lymphoid-specific enhancer in the BamHI C promoter of Epstein-Barr virus. *J Virol* 65, 2164-2169.
- Suzuki, S., Suzuki, N., Mirtsos, C., Horacek, T., Lye, E., Noh, S. K., Ho, A., Bouchard, D., Mak, T. W., and Yeh, W. C.** (2003). Nur77 as a survival factor in tumor necrosis factor signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 8276-8280.
- Taniguchi, Y., Furukawa, T., Tun, T., Han, H., and Honjo, T.** (1998). LIM protein KyoT2 negatively regulates transcription by association with the RBP-J DNA-binding protein. *Mol Cell Biol* 18, 644-654.
- Thorley-Lawson, D. A.** (2001). Epstein-Barr virus: exploiting the immune system. *Nature Rev Immunol* 1, 75-82.
- Tischer, C., and Bastiens, P. I.** (2003). Lateral phosphorylation propagation: an aspect of feedback signalling? *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 971-974.
- Tobollik, S., Meyer, L., Buettner, M., Klemmer, S., Kempkes, B., Kremmer, E., Niedobitek, G., and Jungnickel, B.** (2006). Epstein-barr-virus nuclear antigen 2 inhibits AID expression during EBV-driven B cell growth. *Blood* 108, 3859-3864.
- Tong, X., Drapkin, R., Reinberg, D., and Kieff, E.** (1995a). The 62- and 80-kDa subunits of transcription factor IIIH mediate the interaction with Epstein-Barr virus nuclear protein 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 3259-3263.
- Tong, X., Drapkin, R., Yalamanchili, R., Mosialos, G., and Kieff, E.** (1995b). The Epstein-Barr virus nuclear protein 2 acidic domain forms a complex with a novel cellular coactivator that can interact with TFIIIE. *Mol Cell Biol* 15, 4735-4744.
- Tong, X., Wang, F., Thut, C. J., and Kieff, E.** (1995c). The Epstein-Barr virus nuclear protein 2 acidic domain can interact with TFIIIB, TAF40, and RPA70 but not with TATA-binding protein. *J Virol* 69, 585-588.
- Tun, T., Hamaguchi, Y., Matsunami, N., Furukawa, T., Honjo, T., and Kawaichi, M.** (1994). Recognition sequence of a highly conserved DNA binding protein RBP-J kappa. *Nucleic Acids Res* 22, 965-971.
- Turner, B. M.** (2000). Histone acetylation and an epigenetic code. *Bioessays* 22, 836-845.
- Venter, J. C., Adams, M. D., Myers, E. W., Li, P. W., Mural, R. J., Sutton, G. G., Smith, H. O., Yandell, M., Evans, C. A., Holt, R. A., *et al.*** (2001). The sequence of the human genome. *Science* 291, 1304-1351.
- Veraksa, A., Bauer, A., and Artavanis-Tsakonas, S.** (2005). Analyzing protein complexes in Drosophila with tandem affinity purification-mass spectrometry. *Dev Dyn* 232, 827-834.

- Voss, M. D., Hille, A., Barth, S., Spurk, A., Hennrich, F., Holzer, D., Mueller-Lantzsch, N., Kremmer, E., and Grasser, F. A.** (2001). Functional cooperation of Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 and the survival motor neuron protein in transactivation of the viral LMP1 promoter. *J Virol* 75, 11781-11790.
- Wagner, H. J., Cheng, Y. C., Huls, M. H., Gee, A. P., Kuehnle, I., Krance, R. A., Brenner, M. K., Rooney, C. M., and Heslop, H. E.** (2004). Prompt versus preemptive intervention for EBV lymphoproliferative disease. *Blood* 103, 3979-3981.
- Wang, F., Gregory, C. D., Rowe, M., Rickinson, A. B., Wang, D., Birkenbach, M., Kikutani, H., Kishimoto, T., and Kieff, E.** (1987). Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 specifically induces expression of the B-cell activation antigen CD23. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 3452-3456.
- Wang, F., Kikutani, H., Tsang, S. F., Kishimoto, T., and Kieff, E.** (1991). Epstein-Barr virus nuclear protein 2 transactivates a cis-acting CD23 DNA element. *J Virol* 65, 4101-4106.
- Wang, F., Tsang, S. F., Kurilla, M. G., Cohen, J. I., and Kieff, E.** (1990). Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 transactivates latent membrane protein LMP1. *J Virol* 64, 3407-3416.
- 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.
- Westermarck, J., Weiss, C., Saffrich, R., Kast, J., Musti, A. M., Wessely, M., Ansoerge, W., Seraphin, B., Wilm, M., Valdez, B. C., and Bohmann, D.** (2002). The DEXD/H-box RNA helicase RHIII/Gu is a co-factor for c-Jun-activated transcription. *Embo J* 21, 451-460.
- Wu, D. Y., Kalpana, G. V., Goff, S. P., and Schubach, W. H.** (1996). Epstein-Barr virus nuclear protein 2 (EBNA2) binds to a component of the human SNF-SWI complex, hSNF5/Ini1. *J Virol* 70, 6020-6028.
- Wu, D. Y., Tkachuck, D. C., Roberson, R. S., and Schubach, W. H.** (2002). The human SNF5/INI1 protein facilitates the function of the growth arrest and DNA damage-inducible protein (GADD34) and modulates GADD34-bound protein phosphatase-1 activity. *J Biol Chem* 277, 27706-27715.
- Wu, L., Aster, J. C., Blacklow, S. C., Lake, R., Artavanis-Tsakonas, S., and Griffin, J. D.** (2000). MAML1, a human homologue of Drosophila mastermind, is a transcriptional co-activator for NOTCH receptors. *Nat Genet* 26, 484-489.
- Yalamanchili, R., Tong, X., Grossman, S., Johannsen, E., Mosialos, G., and Kieff, E.** (1994). Genetic and biochemical evidence that EBNA 2 interaction with a 63-kDa cellular GTG-binding protein is essential for B lymphocyte growth transformation by EBV. *Virology* 204, 634-641.
- Yang, J., Aittomaki, S., Pesu, M., Carter, K., Saarinen, J., Kalkkinen, N., Kieff, E., and Silvennoinen, O.** (2002). Identification of p100 as a coactivator for STAT6 that bridges STAT6 with RNA polymerase II. *Embo J* 21, 4950-4958.
- Yang, P., Sampson, H. M., and Krause, H. M.** (2006). A modified tandem affinity purification strategy identifies cofactors of the Drosophila nuclear receptor dHNF4. *Proteomics* 6, 927-935.
- Young, D. B., Krauer, K., Kienzle, N., and Sculley, T.** (1997). Both A type and B type Epstein-Barr virus nuclear antigen 6 interact with RBP-2N. *J Gen Virol* 78 (Pt 7), 1671-1674.
- Yue, W., Davenport, M. G., Shackelford, J., and Pagano, J. S.** (2004). Mitosis-specific hyperphosphorylation of Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 suppresses its function. *J Virol* 78, 3542-3552.
- Zhao, B., Marshall, D. R., and Sample, C. E.** (1996). A conserved domain of the Epstein-Barr virus nuclear antigens 3A and 3C binds to a discrete domain of Jkappa. *J Virol* 70, 4228-4236.
- Zhao, G. Q., Zhao, Q., Zhou, X., Mattei, M. G., and de Crombrughe, B.** (1993). TFEC, a basic helix-loop-helix protein, forms heterodimers with TFE3 and inhibits TFE3-dependent transcription activation. *Mol Cell Biol* 13, 4505-4512.
- 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., Suentzenich, K. O., Laux, G., Eick, D., Cordier, M., Calender, A., Billaud, M., Lenoir, G. M., and Bornkamm, G. W.** (1991). Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 activates transcription of the terminal protein gene. *J Virol* 65, 415-423.

Danksagung

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

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

Prof. Dr. Georg Bornkamm für die Möglichkeit, an seinem Institut meine Doktorarbeit anfertigen zu können.

Dr. Hakan Sarioglu, der mir nicht nur die unergründlichen Tiefen der Massenspektrometrie näher brachte, sondern auch immer mit Rat und Tat zur Seite stand. Nicht zu vergessen sind auch unsere diversen Schwimm- und Cocktailabende zusammen mit **Melanie**, die eine super Abwechslung zum grauen Alltag waren.

Stephi Tobollik, mit der ich die eine oder andere Stunde an der MALDI oder LC verbrachte, oftmals zu äußerst unchristlichen Zeiten. Vielen Dank auch für die vielen tollen Gespräche und Diskussion bei diversen Tassen (Frust-) Kaffee.

Allen restlichen MALDI Usern **Janine Griese, Melanie Schulz, Karsten Boldt** und **Thomas Knöfel**, die immer ein offenes Ohr für Probleme und Diskussionen hatten.

Meinen Laborkolleginnen **Sabine Petermann, Marie Hertle, Claudia Popp, Kathi Heinzelmann, Iris Peröbner, Barbara Scholz** und meiner Praktikantin **Luise Weigand**, sowie meinen Ex-Kolleginnen **Gabi Staffler, Dr. Sabine Maier, Kristina Grabusic, Julia Höck, Sarah Valencia, Maja Santak, Anja Mantik** und **Konstanze Pechloff** für die freundschaftliche und humorvolle Arbeitsatmosphäre im Labor und der Unterstützung bei allen großen und kleinen Laborproblemen. Nicht zu vergessen sind unsere diversen „Laborausflüge“ zum Cocktailtrinken, Altstadtfest, Wandern, ...

Dr. Elisabeth Kremmer für die Hilfe und Bereitstellung vieler Antikörper.

Den Firmen **Aventis-Sanofi** und **GlaxoSmithKline**, sowie den **Freunden und Förderern der GSF** für die finanzielle Unterstützung, mit deren Hilfe es mir ermöglicht wurde am 30. Internationalen Herpesvirus Workshop in Turku, Finnland teilzunehmen.

Allen anderen **Kollegen der KMOLBI** für ihre Hilfsbereitschaft und das tolle Arbeitsklima und den vielen schönen „Lunch Clubs“.

Meinen Korrekturlesern **Sabine P.** und **Hakan**.

Meinen Eltern, die immer für mich da waren und mich in jeder nur erdenklichen Hinsicht unterstützt haben, sowie fürs Korrekturlesen, auch wenn man nur jedes fünfte Worte versteht.

Ehrenwörtliche Versicherung

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

München, den 5. März 2007

(Andrea Hartmann)

Curriculum vitae

Persönliche Daten

Name	Andrea Hartmann
Geburtsdatum	30. Januar 1979
Geburtsort	Friedberg
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch

Schulischer Bildungsweg

1985 – 1989	Grundschule, Friedberg
1989 – 1998	Wernher-von-Braun Gymnasium Friedberg
1998	Abitur

Wissenschaftlicher Werdegang

1998 - 2003	Studium der Biologie an der Ludwig-Maximilians-Universität
Okt. 2002 – Juli 2003	Diplomarbeit in der Gruppe von Dr. Bettina Kempkes am Institut für Klinische Molekularbiologie und Tumorgenetik, GSF - Nationales Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit, München Thema: Inhibition wachstumsrelevanter Signalwege in Epstein-Barr Virus immortalisierten B-Zellen
Juli 2003	Abschluß des Studiums: Diplom Biologin
Sep. 2003 – Feb. 2007	Promotion (Dr. rer. nat.) in der Gruppe von Dr. Bettina Kempkes am Institut für Klinische Molekularbiologie und Tumorgenetik, GSF - Nationales Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit, München Thema: Untersuchung molekularer Mechanismen der EBNA-2 vermittelten Transaktivierung