

Funktionelle und genetische Analyse des Latenten Membranproteins 1 des Epstein-Barr Virus

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

von

Ulrike Dirmeier

München, April 2002

Erstgutachter: Prof. Dr. Dirk Eick

Zweitgutachter: Prof. Dr. Michael Boshart

Tag der mündlichen Prüfung: 19.7.02

Wesentliche Teile dieser Arbeit sind in Vorbereitung zur Veröffentlichung:

Dirmeier, U., Kilger, E., Neuhierl, B., Reisbach, G., Sandberg, ML. and Hammerschmidt, W. (2002) Latent membrane protein 1 is critical for efficient growth transformation of human B cells by Epstein-Barr virus (eingereicht)

Dirmeier, U., Hoffmann, R., Kilger, E., Schultheiß, U., Gires, O., Dudziak, D., Kieser, A., Eick, D., Sugden, B. and Hammerschmidt, W. Target genes of CD40 and latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus in human B cells. (in Vorbereitung)

Dudziak, D., Kieser, A., Dirmeier, U., Marschall, G., Berchtold, S., Steinkasser, A., Bornkamm, G. and Laux, G. The latent membrane protein 1 (LMP1) induces the expression of CD83 by the NF- κ B signaling pathway. (in Vorbereitung)

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	4
1.1 Das Epstein-Barr Virus	4
1.1.1 Latenz und lytische Phase von EBV	4
1.1.2 EBV-Assoziation mit malignen Erkrankungen	5
1.1.3 <i>In vitro</i> Infektion von primären humanen B-Zellen als Modellsystem	5
1.2 Das Latente Membranprotein 1 (LMP1)	8
1.3 Der CD40-Rezeptor	10
1.4 Aufgabenstellung	13
2. Material	14
2.1 Antikörper	14
2.2 Oligonukleotide	15
2.3 Plasmide	15
2.4 Bakterien	17
2.5 Zelllinien	17
2.6 Chemikalien, Enzyme, Geräte und sonstiges	18
3. Methoden	22
3.1 Bakterienkultur	22
3.1.1 Vermehrung und Aufbewahrung von Bakterien	22
3.1.2 Transformation und Elektroporation von <i>E.coli</i>	22
3.1.3 Fermentation von <i>E.coli</i>	23
3.2 Zellkultur und Analyse von Zellen	23
3.2.1 Zellkulturbedingungen	23
3.2.2 Aufbewahrung von Zellen	24
3.2.3 Präparation primärer B-Zellen	25
3.2.4 Transfektion von Zellen und Selektion stabiler Zellklone mit Hygromycin	25
3.2.5 Produktion infektiöser Viruspartikel und Titerquantifizierung	26
3.2.6 Infektion von primären B-Zellen mit Maxi-EBVs und Bestimmung der Immortalisationsfrequenz	26
3.2.7 Immunfluoreszenzanalysen	27
3.2.8 FACS-Analysen	27
3.2.9 Zellzyklus-Analysen von B2264-19/3- bzw. 721-Zellen	28
3.2.10 Extraktion zellulärer DNA	29

3.3 DNA-Arbeitstechniken	29
3.3.1 Rekombinante Plasmide	29
3.3.2 Homologe Rekombination in <i>E.coli</i> zur Konstruktion von Maxi-EBV-Mutanten	32
3.3.3 Präparation von EBV-Plasmid-DNA aus <i>E.coli</i>	32
3.3.4 Southernblot-Analyse	33
3.3.5 Radioaktive Markierung von DNA	34
3.3.6 PCR-Analysen	34
3.3.7 Gelretentionsanalysen	35
3.4 RNA-Arbeitstechniken	36
3.4.1 Isolierung von gesamtzellulärer DNA	36
3.4.2 Nukleärer Run-On	36
3.5 Proteinarbeitstechniken	38
3.5.1 Immunoblot Analyse	38
3.5.2 Immunpräzipitation	39
3.6 Analyse von cDNA Microarrays	40
3.7 Analyse von Oligonukleotid-Arrays (Affymetrix Chips)	41
3.7.1 Herstellung von cDNA	41
3.7.2 Herstellung Biotin-markierter cRNA	41
3.7.3 Hybridisierung und Waschen der Chips	41
3.7.4 Beschreibung der Affymetrix Chips	42
3.7.5 Scannen des Chip	43
3.7.6 Auswertung der Affymetrix Chips	43
3.8 Mäuse	46
4. Ergebnisse	47
4.1. Herstellung rekombinanter EBVs	47
4.1.1 Homologe Rekombination in <i>E.coli</i> BJ5183	48
4.1.2 Das Rekombinationssystem in <i>E.coli</i> DH10B	49
4.2 LMP1-Mutanten auf der Basis von Maxi-EBV	50
4.3 Herstellung von mutanten EBVs	55
4.3.1 Etablierung stabiler und permissiver EBV-positiver 293-Zelllinien	56
4.3.2 Induktion des lytischen Zyklus und Bestimmung von Virustitern	56
4.4 Infektion von primären humanen B-Zellen mit LMP1 mutierten Maxi-EBVs und Bestimmung der Immortalisationsfrequenzen	57
4.4.1 Infektion von humanen B-Lymphozyten mit Maxi-EBV in Flüssigkultur	57
4.4.2 Infektion von humanen B-Lymphozyten mit Maxi-EBV in Softagar	58
4.4.3 Immortalisations-Effizienzen von LMP1 mutierten EBVs im Vergleich zu 2089	59

4.4.4 Charakterisierung von lymphoblastoiden Zelllinien mit mutiertem LMP1	61
4.4.5 Untersuchung des onkogenen Potentials von LCLs <i>in vivo</i>	65
4.6 Untersuchung von LMP1-Zielgenen in humanen B-Zellen mit Hilfe eines konditionalen LMP1-Proteins	68
4.6.1 Expression des konditionalen NGF-R:LMP1 Proteins in primären B-Zellen	69
4.6.2 Nachweis der Induzierbarkeit des konditionalen Zellsystems	72
4.6.3 LMP1-Aktivierung induziert B-Zellproliferation	77
4.6.4 Analyse von LMP1- und CD40-regulierten Genen mit der Run-on-Technik	79
4.6.5 Analyse von LMP1- und CD40-regulierten Genen mit DNA-Chip-Technologie	83
5. Diskussion	93
5.1 Die Funktion von LMP1 bei der Initiation und Aufrechterhaltung des immortalen Phänotyps in EBV infizierten humanen B-Zellen	93
5.2 Das konditionale Zellsystem	98
5.3 LMP1 Aktivierung induziert B-Zellproliferation	101
5.4 Zielgene von LMP1 und CD40	102
6. Zusammenfassung	107
7. Abkürzungen	109
8. Literatur	111
9. Anhang I	129

1. Einleitung

1.1 Das Epstein-Barr Virus

1.1.1 Latenz und lytische Phase von EBV

Das Epstein-Barr Virus ist ein humanes γ -Herpesvirus, das in der Lage ist, nach Primärinfektion im Wirt lebenslang in einem latenten Zustand zu persistieren. In diesem Zustand liegt das EBV-Genom als zirkuläres, kovalent geschlossenes, doppelsträngiges DNA-Genom mit einer Größe von 172kb vor. Der Lebenszyklus von EBV weist wie anderer Herpesviren eine lytische und eine latente Phase auf. Die Primärinfektion verläuft über Epithelzellen des Oropharynx und ist gekennzeichnet durch lytische DNA-Replikation, Expression nahezu aller viraler Gene, Virusproduktion und Lyse der befallenen Zellen. Diese akute Phase der EBV-Infektion verläuft in der Regel im frühen Kindesalter ohne Symptome.

Im weiteren Verlauf der Virus-Wirts-Beziehung herrscht eine latente Infektion vor, die nur zeitweilig von einer lytischen Phase der Virusproduktion unterbrochen wird. Während der Latenz werden nur noch elf der ca. 90 viralen Gene exprimiert. In diesem Zustand, der als Latenz III bezeichnet wird, verändern sich die infizierten B-Zellen zu proliferierenden lymphoblastoiden Zellen und induzieren in der Folge eine massive humorale und zelluläre Immunantwort des Wirts. Proliferierende B-Zellen werden auf diese Weise eliminiert und es entsteht ein EBV-spezifisches immunologisches Gedächtnis. In einigen B-Zellen, vermutlich Gedächtnis-B-Zellen, ändert EBV das Muster seiner Genexpression zur sogenannten Latenz I oder II. Es werden nur noch ein oder zwei virale Gene exprimiert, die Zellen ändern sowohl ihren Phänotyp als auch die Expression von zellulären Oberflächenproteinen und hören auf zu proliferieren. Diese Latenz I oder Latenz II B-Zellen entgehen der Überwachung durch das Immunsystem und können somit im Wirt lebenslang persistieren. Die Frequenz infizierter B-Zellen im peripheren Blut liegt im Bereich von 1-30 infizierten Zellen pro 5×10^6 Zellen. Sporadisch kann es zu erneuter Aktivierung lytischer Gene und der Proliferation solcher Zellen kommen, die in der Regel sofort durch das Immunsystem eliminiert werden. In Fällen von geschwächter Immunabwehr wie z.B. bei einer HIV-Infektion oder nach Immunsuppression im Verlauf von allogenen Transplantationen kann EBV jedoch an der Entstehung von B-Zell-Tumoren beteiligt sein.

1.1.2 EBV-Assoziation mit malignen Erkrankungen

EBV ist ätiologisch eng mit einer Reihe von Krebserkrankungen assoziiert, wie z.B. dem Burkitt-Lymphom, dem Hodgkin-Lymphom, dem Nasopharynx-Karzinom, bestimmten T-Zell-Lymphomen und dem Immunoblastischen Lymphom (Übersichtsartikel: Kieff und Rickinson, 2001). Die Tumoren entstehen oft erst viele Jahre nach der primären EBV-Infektion, was auf einen mehrstufigen Entstehungsprozess hinweist. Burkitt-Lymphome zeichnen sich durch spezifische chromosomale Translokationen des Protoonkogens *c-myc* aus, die zu einer permanenten Aktivierung des Gens führen. Die in Afrika endemische Form des Burkitt-Lymphoms ist zu 100% mit EBV assoziiert, während sporadische auftretende und AIDS-assoziierte Formen eine weniger regelmässige Assoziation mit EBV aufweisen. Das Hodgkin-Lymphom ist das in der westlichen Welt am häufigsten auftretende maligne Lymphom. Es zeichnet sich durch eine veränderte Struktur des betroffenen Lymphknotens und die Anwesenheit mononukleärer Hodgkin- und Reed-Sternberg Zellen aus. Reed-Sternberg Zellen sind wenig differenzierte, transformierte B-Zellen, die die eigentliche maligne Population bei diesem Tumor darstellen. Nasopharynxkarziome sind epitheliale Tumore des Nasen-Rachenraums. Sie treten besonders gehäuft in China auf, was eine zusätzliche genetische oder umweltbedingte Komponente vermuten läßt. Das Risiko Immunoblastischer Lymphome besteht besonders bei immunsupprimierten Patienten z.B. nach HIV-Infektion oder Transplantationen. Diese Lymphome stehen in einem engen Zusammenhang mit einer fehlenden Immunabwehr gegen proliferierende, EBV-infizierte B-Zellen. Generell variiert die Expression der viralen Gene zwischen den verschiedenen Tumoren. Das Expressionsmuster der Latenz III, d.h. die Expression aller elf viralen latenten Gene, ist charakteristisch für Immunoblastische B-Zell-Lymphome. Die Expression von EBNA1 und der latenten Membranproteine LMP1, LMP2A und 2B entspricht der Latenz II. Diese tritt auf in Nasopharynxkarzinomen, Hodgkin- und T-Zell-Lymphomen. Burkitt-Lymphome exprimieren nur EBNA1 (EBV nukleäres Antigen) und zwei kurze, nicht kodierende virale RNAs, ein Zustand, der der Latenz I entspricht.

1.1.3 *In vitro* Infektion von primären humanen B-Zellen als Modellsystem

Das Verständnis der molekularen Mechanismen, die bei der Immortalisation von B-Zellen durch EBV greifen, ist von großer Bedeutung für therapeutische Ansätze. Die Kenntnis der

beteiligten Proteine und deren Wirkung könnte zur Entwicklung von spezifischen Inhibitoren beitragen. Die Kontrolle der Zellproliferation durch virale Proteine ist zudem ein interessantes Thema im Bereich der molekularen und zellulären Grundlagenforschung. Virale Onkogene sind in der Lage, zelluläre Proteine außer Kraft zu setzen bzw. permanente, konstitutive Signale zu induzieren, die zur Zellproliferation beitragen. Beispielsweise reagieren die adenoviralen Proteine E1A und E1B mit den Zellzyklusregulatoren p53 und Rb. Es kommt dadurch zum Verlust von p53 Funktionen und zum Sequestrieren von Rb. Die Folge sind unkontrolliertes Überlaufen von Kontrollpunkten im Zellzyklus und ein Verlust der Zellproliferationskontrolle (Jones, 1990; Moran, 1993). Ähnlich könnten auch EBV-kodierte Onkogene bei dem unkontrollierten Wachstum von B-Zellen und der EBV-assoziierten Tumorentstehung eine entscheidende Rolle spielen. Interessanterweise weist keines der in der Latenz exprimierten Gene von EBV Ähnlichkeiten zu den Onkogenen auf, die bei den sogenannten kleinen DNA-Tumoviren zur Identifikation des onkogenen Prinzips mit Rb und p53 beigetragen haben.

Als *in vitro* Modell für die latente EBV-Infektion und die pathogenetischen Mechanismen bei der Tumorentstehung werden lymphoblastoide Zelllinien, sogenannte LCLs, angesehen, die durch Immortalisierung primärer B-Zellen mit EBV leicht *in vitro* etabliert werden können (Thorley-Lawson und Mann, 1985). LCLs entsprechen der Latenzstufe III und exprimieren elf der über 90 EBV-kodierten Gene (Übersichtsartikel: Young et al., 2000). Diese Gene kodieren für die EBV nukleären Antigene EBNA1, 2, 3A, 3B, 3C und EBNA-LP, sowie für die drei latent Membranproteine LMP1, 2A und 2B. Zusätzlich wurde in LCLs auch die Expression von kleinen, nicht-polyadenylierten RNAs, EBER1 und 2, nachgewiesen. Nicht alle der genannten Gene sind absolut notwendig für den Prozess der B-Zell-Immortalisierung. EBERs und EBNA3B scheinen keine Rolle zu spielen, EBNA-LP und LMP2A und 2B verbessern lediglich die Effizienz der Immortalisierung (Übersichtsartikel: Young et al., 2000). Die molekularen Funktionen der Gene, die für die B-Zell-Immortalisierung als essentiell angesehen werden, werden im Folgenden kurz charakterisiert.

EBNA1 ist ein DNA-bindendes Kernprotein, das eine zentrale Rolle bei der Aufrechterhaltung der latenten Phase spielt. Es bindet an den latenten Replikationsursprung der viralen DNA, *oriP*, und vermittelt die Rekrutierung des zellulären „origin recognition complex“ (ORC) (Chaudhuri et al., 2001; Schepers et al., 2001). Zudem ist EBNA1 für die korrekte Segregation der EBV-Episomen bei der Zellteilung verantwortlich (Aiyar et al.,

1998; Yates et al., 1985). Eine herausragende Eigenschaft von EBNA1 ist seine nahezu fehlende Immunogenität. Dies beruht auf einer repetitiven Sequenz, die ausschliesslich aus Glycin und Alanin besteht und die proteolytische Degradation von EBNA1 durch den Proteasomen-Komplex und somit die Präsentation von Antigenen auf der Zelloberfläche durch MHCI verhindert (Levitskaya et al., 1995; Levitskaya et al., 1997).

Ähnlich wie EBNA1 kommt EBNA2 eine zentrale Rolle bei der Immortalisierung von B-Zellen zu. EBNA2 wirkt als Koaktivator bei der Transkription von zellulären und viralen Genen. Es induziert die Expression der B-Zell-Aktivierungsmarker CD23 und CD21 (Calender et al., 1987; Wang et al., 1990), der zellulären Tyrosinkinase c-fgr (Knutson, 1990), der viralen Gene LMP1, 2A und 2B und des viralen C-Promotors (Cp) (Abbot et al., 1990; Jin und Speck, 1992; Sung et al., 1991; Zimmer-Strobl et al., 1991). Die Interaktion von EBNA2 mit der basalen Transkriptionsmaschinerie erfolgt über eine saure Transaktivierungsdomäne und führt letztlich zur Transkription von Genen, deren Promotoren EBNA2 responsive Elemente enthalten. Die Bindung von EBNA2 an DNA-Sequenzen wird durch den zellulären Transkriptionsfaktor RBP-Jκ (Rekombinationssignal-Bindeprotein-Jκ) vermittelt (Grossman et al., 1994; Henkel et al., 1994; Waltzer et al., 1994). EBNA2 interagiert zudem mit dem Transkriptionsfaktor PU.1, der für die Transaktivierung von LMP1 durch EBNA2 benötigt wird (Johannsen et al., 1995; Laux et al., 1994). Kürzlich wurde gezeigt, dass das wahrscheinlich wichtigste Ziel, das durch EBNA 2 reguliert ist, das Onkogen *c-myc* ist. Dieser Effekt dürfte eine entscheidende Rolle bei der EBV-vermittelten B-Zell-Proliferation spielen (Jayachandra et al., 1999; Jochner et al., 1996; Kaiser et al., 1999).

Aus der Familie der EBNA3-Gene gelten nur EBNA3A und 3C als essentiell für die *in vitro* Immortalisation von B-Zellen durch EBV (Tomkinson et al., 1993). Die EBNA3 Gene befinden sich in Tandemanordnung auf dem EBV-Genom und sind vermutlich durch Verdoppelungen eines gemeinsamen Vorläufergens entstanden. EBNA 3A und 3C sind an der transkriptionellen Regulation viraler und zellulärer Gene beteiligt (Allday et al., 1993; Silins und Sculley, 1994; Wang et al., 1990). Alle EBNA3 Proteine können mit RBP-Jκ interagieren und verhindern damit die Bindung des EBNA2/RBP-Jκ-Komplexes an DNA (Robertson et al., 1995). Man nimmt deshalb an, dass EBNA3-Proteine eine Rolle bei der Feinregulation von zellulären und viralen Promotoren spielen, die eine Jκ-Erkennungssequenz enthalten. Zudem wurde eine Inaktivierung des Retinoblastom-Tumorsuppressorproteins (Rb) durch

EBNA3C beobachtet, was möglicherweise zu einer Steigerung der Immortalisations-Effizienz durch EBV beiträgt (Parker et al., 1996).

Da die Funktion des LMP1 Onkogens bei der Immortalisation von humanen B-Lymphozyten Gegenstand meiner Arbeit war, soll im weiteren auf die Struktur und bekannte Funktionen von LMP1 näher eingegangen werden.

1.2 Das Latente Membranprotein 1 (LMP1)

LMP1 ist eines der Gene, dessen Expression für den Prozess der B-Zell-Immortalisierung als absolut essentiell angesehen wird (Kieff und Rickinson, 2001; Kilger et al., 1998). LMP1 konnte auch *in vivo* als virales Onkogen identifiziert werden (Kulwichit et al., 1998; Wang et al., 1985; Wilson et al., 1990) und ist als einziges EBV-Protein in der Lage, auch in nicht lymphoiden Zelllinien wie z.B. Nager-Fibroblasten die charakteristischen Merkmale der Zelltransformation zu vermitteln (Baichwal und Sugden, 1988; Moorthy und Thorley-Lawson, 1993a; Wang et al., 1985). Eine ganze Reihe von weiteren LMP1-Effekten sind bereits bekannt. Dazu zählen die Induktion und Expression von anti-apoptotischen Genen wie Bcl-2, A20, Mcl-1 und Bfl-1 (D'Souza et al., 2000; Henderson et al., 1991; Laherty et al., 1992), von Zytokinen wie IL-6, IL-8 und IL-10 (Eliopoulos et al., 1999; Eliopoulos et al., 1997; Nakagomi et al., 1994), von Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1 und LFA-3 (Rowe et al., 1995; Wang et al., 1990) und B-Zell-Aktivierungsmarkern wie CD21, CD23, CD39, CD40 und CD58 (Wang et al., 1988; Wang et al., 1990), sowie die Induktion des Epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors EGFR (Miller et al., 1997) und der Matrix-Metalloprotease MMP-9 (Takeshita et al., 1999; Yoshizaki et al., 1998).

LMP1 ist ein 63kDa großes integrales Membranprotein, das aus einem zytoplasmatischen N-Terminus (Aminosäuren (As) 1-24), sechs hydrophoben Transmembrandomänen (As 25-186) und einem 200 As langen zytoplasmatischen C-Terminus besteht (Abb.1.1). Es wurde gezeigt, dass LMP1 als konstitutiv aktiver Rezeptor agiert (Gires et al., 1997), der eine Reihe von Charakteristika mit Mitgliedern der Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor (TNF-R)-Familie gemeinsam hat. Die Transmembrandomäne von LMP1 ist für die spontane Aggregation von LMP1-Molekülen in der Plasmamembran verantwortlich. Diese Oligomerisierung ist notwendige und hinreichende Voraussetzung, um Signaltransduktionsvorgänge am C-Terminus von LMP1 auszulösen (Floettmann und Rowe, 1997; Gires et al., 1997; Kaykas et al., 2001).

Der zytoplasmatische N-Terminus von LMP1 scheint essentiell zu sein für die korrekte Insertion des Moleküls in die Plasmamembran und dessen Interaktion mit dem Zytoskelett (Coffin et al., 2001; Izumi et al., 1994). Zudem trägt dieser Teil von LMP1 zur Ubiquitinierung und damit kontrollierten Degradation des Moleküls in Proteasomen bei (Aviel et al., 2000), ein Prozess, der zusätzlich durch Phosphorylierung beeinflusst wird (Moorthy und Thorley-Lawson, 1993b). Der N-Terminus ist zusammen mit der Transmembrandomäne verantwortlich für die Lokalisation von LMP1 in sogenannten „Rafts“ (Higuchi et al., 2001; Kaykas et al., 2001). „Rafts“ sind lipidreiche Strukturen in der Plasmamembran, die als „hot spots“ signaltransduzierender Moleküle bekannt sind.

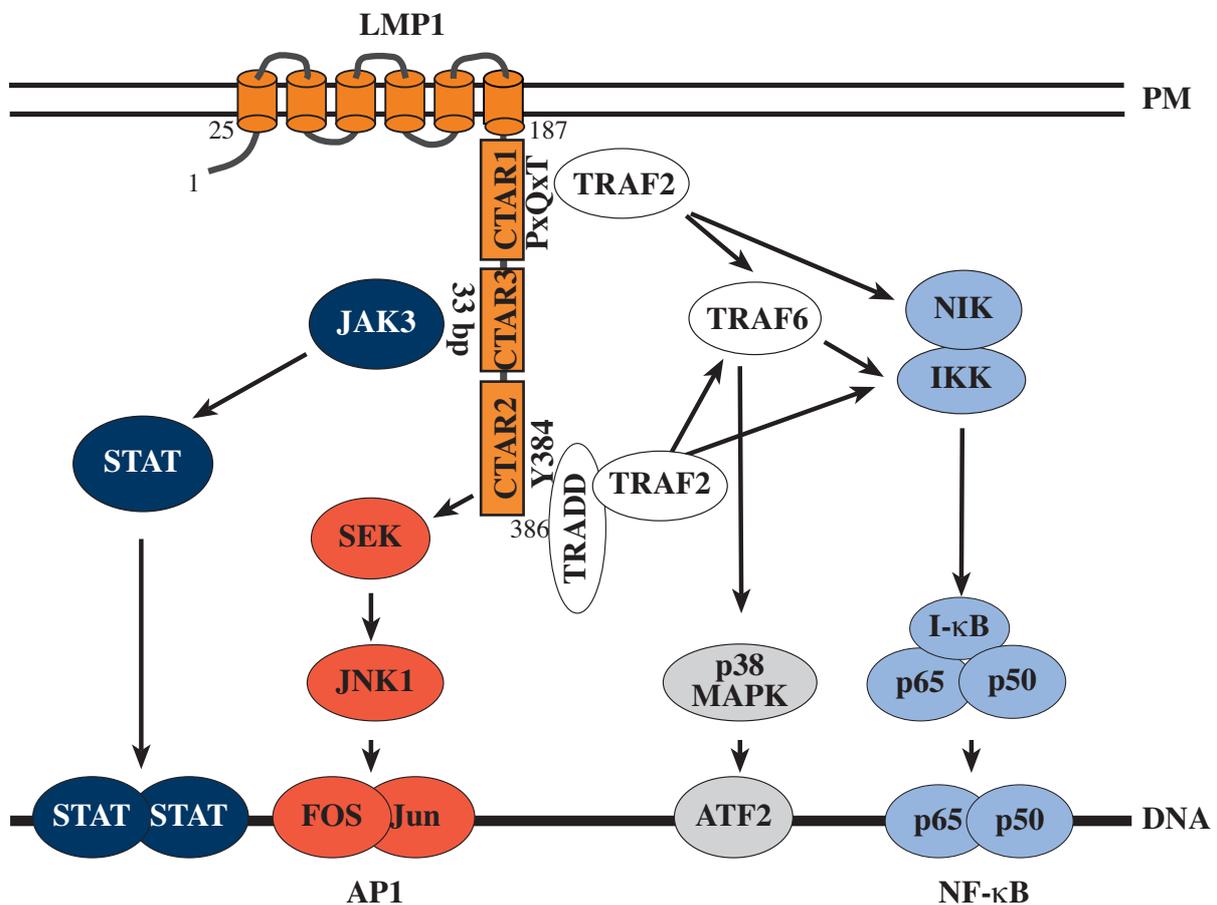


Abb.1.1: Schematische Darstellung des LMP1-Moleküls mit Signaldomänen und induzierten Signalwegen.

LMP1 besteht aus einem kurzen zytoplasmatischen N-Terminus (As1-24), sechs Transmembrandomänen (161 As) und einem 200 As langen, zytoplasmatischen C-Terminus. Der C-Terminus umfaßt die drei funktionellen Domänen CTAR1, 2 und 3, die für die Aktivierung von Signalkaskaden verantwortlich sind. Innerhalb von CTAR1 (As 194-231) binden TRAF-Moleküle an das PxQxT-Motiv. CTAR2 (As 332-386) interagiert mit TRADD und RIP und diese Domäne ist auch für die Aktivierung von JNK/AP1 essentiell. Eine Aktivierung von NF-κB wird durch CTAR1 und CTAR2 vermittelt. CTAR3 enthält zwei Box1-Motive (As 275-280/302-307) innerhalb eines „33bp-repeats“ und ein Box2-Motiv (As 320-330), die die Bindung und Autophosphorylierung der Kinase JAK3 vermitteln. Als Folge kommt es zur Phosphorylierung und Aktivierung von STAT-Proteinen.

Die wichtigsten Domänen hinsichtlich der Signaltransduktion von LMP1 finden sich im zytoplasmatischen C-Terminus des Proteins (Abb.1.1). Dieser Bereich ist verantwortlich für die Interaktion mit TRADD (TNF-R associated death domain protein) (Izumi et al., 1994; Kieser et al., 1999), sowie Mitgliedern der TRAF (TNF-R associated factor)-Familie (Brodeur et al., 1997; Devergne et al., 1998; Devergne et al., 1996; Izumi und Kieff, 1997; Mosialos et al., 1995; Schultheiss et al., 2001).

Abgesehen von NF- κ B (Huen et al., 1995) induziert LMP1 die p38 MAPK (mitogen activated protein kinase)- und JNK1/AP1 (c-Jun N-terminal kinase 1/ activator protein 1)-Signalkaskade (Kieser et al., 1999; Kieser et al., 1997). Verantwortlich für die beiden Signalwege NF- κ B und p38 MAPK sind zwei Subdomänen, die als CTAR1 und 2 (C-terminal activator regions) bezeichnet werden und die als essentiell bei der Transformation von B-Zellen gelten (Huen et al., 1995; Izumi et al., 1997; Izumi und Kieff, 1997; Moorthy und Thorley-Lawson, 1993a). Eine dritte Domäne, CTAR3, liegt zwischen CTAR1 und 2, interagiert mit JAK3 (Janus kinase 3) und induziert dessen Autophosphorylierung und die nachfolgende Aktivierung von STATs (signal transducers and activators of transcription) (Gires et al., 1999). Hinsichtlich seiner phänotypischen Effekte bei der Zelldifferenzierung, Proliferation und Expression von Oberflächenmolekülen scheint LMP1 einen aktivierten CD40-Rezeptor zu imitieren (Kilger et al., 1998; Uchida et al., 1999; Zimmer-Strobl et al., 1996).

1.3 Der CD40-Rezeptor

Der CD40-Rezeptor ist ein 43-47 kDa großes, transmembranes Typ-1-Glykoprotein, das auf Antigen-präsentierenden Zellen, wie B-Zellen, dendritischen Zellen, Makrophagen oder hämatopoetischen Progenitorzellen sowie Epithelzellen exprimiert wird. CD40 besteht aus einer extrazellulären Domäne von 177 As, die die charakteristischen vier Cystein-reichen, repetitiven Motive der TNF-R Proteinfamilie trägt. Die 22 As lange, singuläre Transmembrandomäne wird gefolgt von einem zytoplasmatischen C-Terminus (As 215-277), der mit verschiedenen Signalmediatoren interagiert (Abb.1.2). Ein 22 As langes Signalpeptid wird beim Transport im Zytoplasma vor der Insertion des Moleküls in die Plasmamembran abgespalten. Durch Interaktion von CD40 mit seinem trimeren Liganden, der hauptsächlich auf aktivierten CD4⁺ T-Zellen exprimiert ist, wird der Rezeptor multimerisiert und die CD40-

vermittelte Signaltransduktion initiiert (van Kooten und Banchereau, 2000). Neuere Studien weisen allerdings darauf hin, dass CD40 möglicherweise wie TNF-R1 bereits über eine „preligand association domain“ (PLAD) in trimerer Form vorliegt und nach Ligandenbindung aufgrund einer Konformationsänderung aktiviert wird (Chan et al., 2000). In stimulierter Form findet sich CD40 wie LMP1 bevorzugt in „lipid rafts“ (Hostager et al., 2000; Vidalain et al., 2000).

Die CD40-Stimulation von aktivierten B-Zellen spielt eine wichtige Rolle für den Immunglobulin-„class switch“ (Zan et al., 1998), wobei kontrovers diskutiert wird, ob Zytokine wie IL-2, IL-4 und IL-10 dabei essentiell sind oder nur die Effizienz des Prozesses erhöhen (Übersichtsartikel: Schönbeck und Libby, 2001). *In vivo* spielt CD40-Induktion eine entscheidende Rolle bei der Bildung von „germinal centers“ in lymphoiden Follikeln und der IL-2 bzw. IL-10 abhängigen Differenzierung in Gedächtnis-B-Zellen oder Plasma-Zellen (Arpin et al., 1995; Kindler und Zubler, 1997; MacLennan, 1994). Aktiviertes CD40 induziert unter Zugabe von IL-4 auch *in vitro* dauerhafte Proliferation von primären B-Lymphozyten unter Beibehaltung ihres ursprünglichen Phänotyps (Crawford und Catovsky, 1993; Planken et al., 1996; Rousset et al., 1995; Spriggs et al., 1992).

Wie auch LMP1 interagiert der zytoplasmatische C-Terminus von CD40 mit der Kinase JAK3 (Jabara et al., 1998) und über zwei PxQxT-Motive mit Mitgliedern der TRAF-Familie (Hanissian und Geha, 1997; Ishida et al., 1996; Pullen et al., 1999; Rothe et al., 1995). Auf Grund der Liganden-abhängigen Rekrutierung dieser Moleküle kommt es zur Aktivierung von Signalmediatoren wie JNK, p38 MAPK, STAT und Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B, AP1, JunB, JunD, NF-AT und ATF2 (Übersichtsartikel: Schönbeck und Libby, 2001). Auch die Expression von B-Zell-Aktivierungsmarkern und Adhäsionsmolekülen wie CD23, CD30, CD80, CD86, MHCII, LFA-1, LFA-3 und ICAM, sowie von löslichen Zytokinen (IL-6, IL-10, TNF- α , TNF- β) wird durch die Stimulation des CD40-Rezeptors induziert (Übersichtsartikel: Schönbeck und Libby, 2001). Nahezu alle der hier aufgelisteten CD40-Zielgene und Signalmediatoren wurden auch als Zielgene von LMP1 (siehe 1.2) definiert.

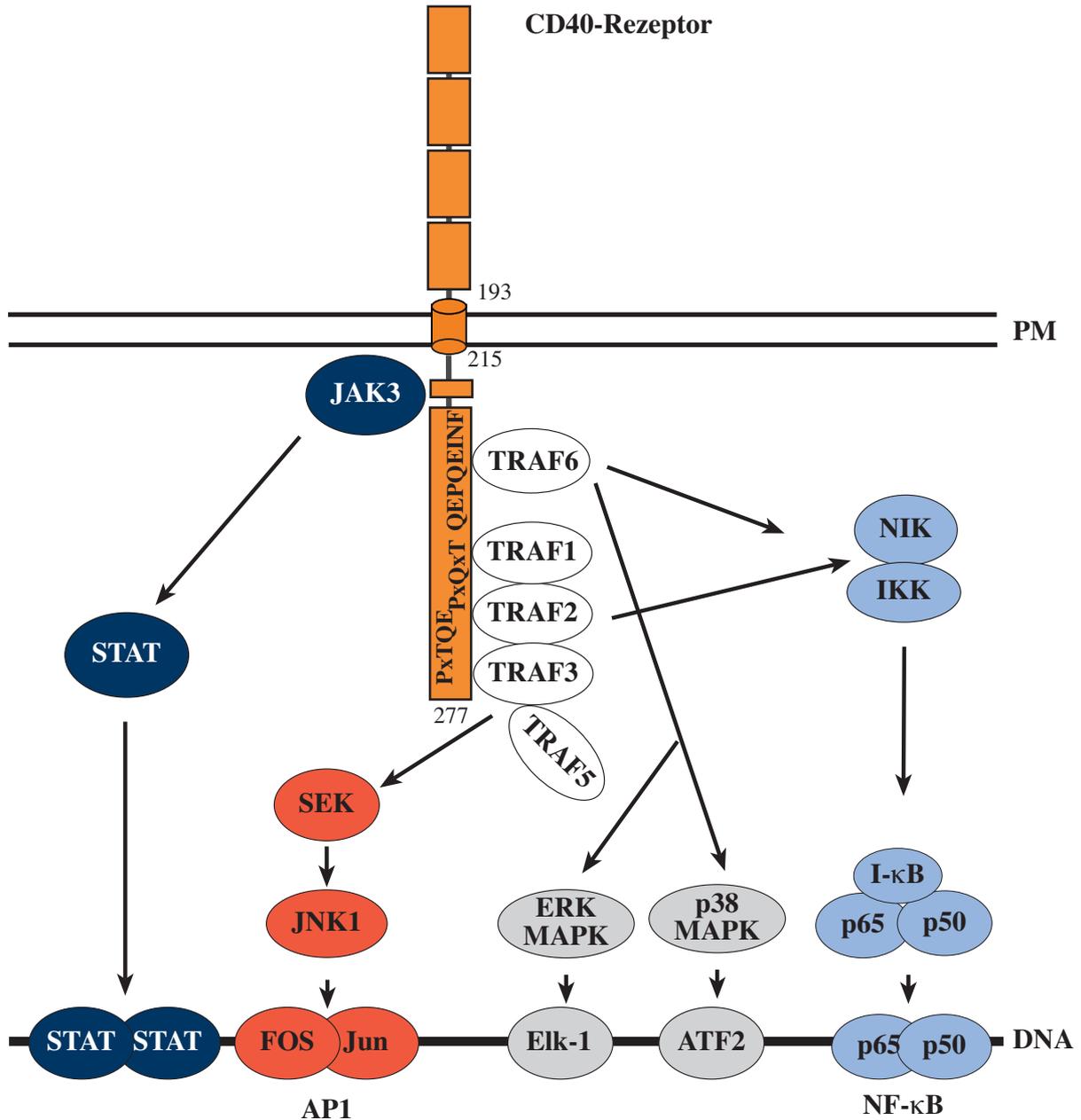


Abb.1.2: Schematische Darstellung des CD40-Moleküls mit Signaldomänen und induzierten Signalwegen.

CD40 besteht aus einem 171 As langen, extrazellulären N-Terminus, einer singulären Transmembrandomäne (22 As) und einem 62 As langen, zytoplasmatischen C-Terminus. Der extrazelluläre N-Terminus von CD40 enthält vier Cystein-reiche Motive und vermittelt durch Bindung an seinen trimeren Liganden CD154 die Aktivierung des Rezeptors (aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht dargestellt). Der zytoplasmatische C-Terminus ist für die Induktion verschiedener Signalkaskaden verantwortlich. Innerhalb einer membrannahen prolinreichen Sequenz (As 222-229) bindet JAK3, das nach Induktion des Rezeptors die Phosphorylierung und Aktivierung von STAT-Proteinen vermittelt. Die Interaktion von TRAF6 mit dem Peptid QEPQEINF (As 231-237) resultiert in der Signaltransduktion via NF-κB und MAP-Kinasen (ERK/p38). TRAF1, 2 und 3 interagieren mit dem C-terminalen PxQxT- (As 250-255) und PxTQE-Motiv (As 260-265) und aktivieren sowohl NF-κB als auch JNK/AP1. Die Bindung von TRAF5 erfolgt nicht direkt an den C-Terminus des Proteins, sondern indirekt durch Interaktion mit TRAF3.

1.4 Aufgabenstellung

Das virale Onkogen LMP1 wurde als essentielles Gen bei der B-Zell-Immortalisation beschrieben (Kieff und Rickinson, 2001; Kilger et al., 1998). Da die bisherigen genetischen Studien die Feinstruktur des Moleküles nicht berücksichtigen (Higuchi et al., 2002; Izumi et al., 1994; Izumi et al., 1997; Kaye et al., 1993; Kaye et al., 1999; Kaye et al., 1995), war nach wie vor unklar, welches die wirklich entscheidenden Domänen für diesen Prozess sind. Die Domänenstruktur von LMP1 allerdings war bereits sehr genau definiert. Die Signalmediatoren, die mit diesen Domänen interagieren, sollten in verschiedenem Maße zur Effizienz der Immortalisierung von humanen B-Lymphozyten beitragen. Ziel dieser Arbeit war es, den Beitrag der verschiedenen LMP1-Domänen zum Immortalisationsprozess zu quantifizieren. Zu diesem Zweck habe ich zehn EBV-Mutanten mit speziellen Veränderungen im LMP1 Genlokus etabliert und deren Phänotyp bei der Immortalisierung von humanen B-Zellen untersucht. Als methodische Grundlage diente das Maxi-EBV-System (Delecluse et al., 1998), das es erstmals erlaubte, Mutationen im Kontext des gesamten EBV-Genoms zu analysieren.

Da das komplexe Netzwerk der Signalmediatoren von LMP1 und besonders die Zielgene des viralen Onkogens nur unzureichend charakterisiert sind, sollte als zweites Ziel meiner Arbeit eine umfassende Katalogisierung der zellulären Zielgene von LMP1 erfolgen. Zunächst war es Ziel, ein konditionales LMP1-System in humanen B-Zellen zu etablieren, das es erlaubt, LMP1-Signaltransduktion innerhalb eines möglichst kurzen, definierten Zeitraums zu induzieren und differentiell exprimierte Gene zu untersuchen. Da LMP1 und der CD40-Rezeptor in B-Lymphozyten hinsichtlich phänotypischer Effekte und Signalmediatoren starke Homologien aufweisen, sollten vergleichende Untersuchungen zu CD40-regulierten Genen durchgeführt werden. Die Analyse beider Rezeptoren konnte in dem selben Zellsystem erfolgen, da CD40 auf humanen B-Zellen konstitutiv exprimiert ist und erst durch Interaktion mit seinem Liganden aktiviert wird.

2. Material

2.1 Antikörper

phosphospezifische Antikörper

α Phospho-JNK (Thr183/Tyr185); Kaninchen;	New England Biolabs
α Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182); Kaninchen	New England Biolabs
α Phosphotyrosin-Mix (1:1): PY20; Maus	Transduction Laboratories
4G10; Maus	Upstate Biotechnologies

gekoppelte Antikörper

α Maus IgG; Meerrettich-Peroxidase gekoppelt; Ziege	Promega
α Kaninchen IgG; Meerrettich-Peroxidase gekoppelt; Ziege	Promega
α Maus IgG; PE-gekoppelt; Esel	Dianova
α Maus IgG; Cy5-gekoppelt; Ziege	Dianova
α Maus IgG; Cy3-gekoppelt; Ziege	Dianova
α CD83; PE-gekoppelt; Maus	Immunotech
α CD69; PE-gekoppelt; Maus	Exalpha
α CD19; PE-gekoppelt; Maus	Diatec

sonstige Antikörper

α LMP1 (CS1-4); Maus	Dako
α LMP1 (OT22CN); Maus	J.Middeldorp, Amsterdam
α NGF-R; Hybridom Zelllinie HB8737 (ATCC)	E.Kremmer, GSF
α EBNA2 (R3+1E6); Ratte	E.Kremmer, GSF
α Maus IgG+IgM(H+L); Ziege	Dianova
α STAT1; STAT1 p84/p91 C-136; Maus	Santa Cruz Biotechnology
α gp125/VCA; Maus	Chemicon
α BrdU; Maus	Amersham, Pharmacia
α CD40 (G28.5); Maus	H.Engelmann, LMU
α CD44; Maus	Becton Dickinson
α His ₆ ; Maus	Roche
α p65 (sc-109); Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology

2.2 Oligonukleotide

Die Synthesen der verwendeten Oligonukleotide wurden bei den Firmen ARK Scientific, Darmstadt und Metabion, München in Auftrag gegeben. Die Sequenzen der Oligonukleotide sind in 5'-3'-Orientierung angegeben.

- Primer für die Amplifikation des LMP1 Genlokus:

LMP1-F1: CGG AGT CTG GCA ACG CC

LMP1-B2: CCG CAA ATC CCC CCG

LMP1-F17-C-Term.: TGT GGT CCC CCG CTG GTA TG

LMP1-B7-C-Term.: GCT GCT TTT GGG TTC TTC TG

LMP1-F3-N-Term.: AGT AAG CAC CCG AAG ATG AAC

- Primer für die Amplifikation der LMP1-cDNA/Klonierung Δ lytisches LMP1:

LMP1-F4-cDNA: GCC CCC TTC TTT CCT CAA CTG

LMP1-B3-cDNA: GGG GGG AGA TCT TAC CAA GTA AGC ACC CGA AGA TG

*Bgl*III-site

- Oligonukleotide für Gelretentionsanalysen/ Bindesequenz für Proteine der NF- κ B-Familie:

NF- κ B1: TCG ACA GAG GGG GAT TTC CAA GAG GCC

NF- κ B2: TCG AGG CCT CTT GGA AAT CCC CCT CTG

2.3 Plasmide

Ein Teil der folgenden Plasmide waren bereits in der Arbeitsgruppe vorhanden oder wurden freundlicherweise von anderen Arbeitsgruppen zur Verfügung gestellt. Die mit einem Stern (*) gekennzeichneten Plasmide wurden von mir hergestellt. Die folgende Auflistung gibt alle verwendeten Plasmide als Auszug aus der Datenbank der Abteilung Genvektoren wieder.

p509	pCMV:BZLF1 (Hammerschmidt und Sugden, 1988)
p1778.16	LMP1:CD40, chimärer Rezeptor, exprimiert unter SV40 Promotor
p2507	CMV β -p300-CHA, C-Terminus von p300 mit His-tag/CMV-Promotor
p2670	pCMV:BALF4
p2167.1	B95.8-Sequenz (#163,473-#649) (Baer et al., 1984), LMP1, LMP2, pCP15-Fragment mit Kanamycingen (siehe Abb.4.1)

p2316.1	Δ TM-LMP1 in p2167.1
p2430*	LMP1:CD40 in p2167.1
p2434.5*	LMP1-Fragment (<i>XhoI/XhoI</i>) aus p2167.1 in pBluescriptIISK ⁻
p2442.1a*	LMP1 Δ Intron 1 via Oligoinserion in pCRII
p2444.6*	LMP1-Fragment (<i>StuI/BglII</i>) aus p2442.1a in p2434.5
p2446.5*	LMP1 Δ Intron 1 in p2167.1
p2594.7*	LMP1 in pBluescriptIISK ⁻ , <i>BamHI/SalI</i> -Fragment aus p2167.1 in pBluescriptIISK ⁻
p2595*	Δ LMP1 in pBluescriptIISK ⁻ , p2594.7 <i>Bpu1102/BsuI</i> geschnitten, Klenow, Religation
p2596*	Δ LMP1 in p2167.1
p2601.1	LMP1 As 1-190 mit 6x His-tag via Oligo-Insertion in pBluescriptIISK ⁻
p2603.1*	LMP1 As 1-190 mit 6x His-tag in p2167.1
p2650	<i>recA/redγ</i> in pST76-amp
pBluescriptIISK ⁻	Stratagene
pCRII	Invitrogen

Maxi-EBV-Plasmide

p2089	Wildtyp-Maxi-EBV: F-Plasmid (pMBO131) mit <i>eGFP</i> Gen und Hygromycin-Resistenzgen in B95.8 DNA (Delecluse et al., 1998)
p2262	Δ PxQxT-LMP1, LMP1 Δ As 204-208, Kanamycin-Resistenzgen
p2263	P12-15-16-19-20A-LMP1, Kanamycin-Resistenzgen
p2264	NGF-R:LMP1, NGF-R As 1-283 fusioniert mit LMP1 As 191-386, Kanamycin-Resistenzgen
p2265	Y384G-LMP1, Kanamycin-Resistenzgen
p2276	P9-10-15A-LMP1, Kanamycin-Resistenzgen
p2318.2*	Δ TM-LMP1, LMP1 Δ As 26-213, Kanamycin-Resistenzgen
p2319	Δ JAK3-LMP1, LMP1 Δ As 250-307, Kanamycin-Resistenzgen
p2433*	LMP1:CD40, LMP1 As 1-190, CD40 As 223-280, Kanamycin-Resistenzgen
p2447*	Δ lytisches LMP, Δ Promotor EDL1A, Kanamycin-Resistenzgen
p2597*	Δ LMP1, Δ As 1-386, Kanamycin-Resistenzgen
p2614.7*	Δ C-LMP1, LMP1 As 1-190 mit 6x His-tag, Kanamycin-Resistenzgen

2.4 Bakterien

<i>E. coli</i> DH5 α	F ⁻ , <i>lac</i> 1 ⁻ , <i>recA</i> 1, <i>endA</i> 1, <i>hsdR</i> 17, Δ (<i>lacZYA-argF</i>), U169, F80d <i>lacZ</i> Δ M15, <i>supE</i> 44, <i>thi</i> -1, <i>gyrA</i> 96, <i>relA</i> 1 (Hanahan, 1985)
<i>E. coli</i> DH10B	F ⁻ , <i>mcrA</i> , Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>), Φ 80d <i>lacZ</i> Δ M15, Δ <i>lacX</i> 74, <i>deoR</i> , <i>recA</i> 1, <i>endA</i> 1, <i>araD</i> 139, Δ (<i>ara, leu</i>)7697, <i>galU</i> , <i>galK</i> , λ ⁻ , <i>rpsL</i> , <i>nupG</i> (GibcoBRL)
<i>E. coli</i> BJ5183	F ⁻ , <i>endA</i> , <i>sbcB</i> ⁻ , <i>recBC</i> ⁻ , <i>galK</i> , <i>met</i> ⁻ , <i>str</i> ^R , <i>thi</i> -1, <i>bioT</i> , <i>hsdR</i> (<i>r</i> _K ⁻ , <i>m</i> _K ⁺), λ ⁻ (Hanahan, 1983)

2.5 Zelllinien

Die verwendeten Zelllinien stammen, wenn nicht anders vermerkt, aus der Sammlung der Abteilung Genvektoren oder wurden von mir im Rahmen dieser Arbeit etabliert (mit * gekennzeichnet).

HEK 293	humane embryonale Nierenepithel-Zelllinie, die durch die Gene E1a und E1b von Adenovirus Typ 5 transformiert wurde (Graham et al., 1977)
HB8737	Maushybridom-Zelllinie (ATCC), E. Kremmer, GSF
WI38	humane Fibroblasten-Zelllinie (ATCC)
B95.8	lymphoblastoide Affen-Zelllinie (Miller et al., 1972)
Raji	humane EBV-positive Burkitt-Lymphom-Zelllinie (Pulvertaft, 1964)
721	lymphoblastoide Zelllinie, immortalisiert mit EBV aus B95.8, B.Sugden, Madison, USA

293-Zelllinien, stabil transfiziert mit Maxi-EBV Plasmiden

2089	p2089, Wildtyp-LMP1
2262	p2262, Δ PxQxT-LMP1
2263	p2263, P12-15-16-19-20A-LMP1
2264	p2264, NGF-R:LMP1
2265	p2265, Y384G-LMP1
2276	p2276, P9-10-15A-LMP1
2318*	p2318.2, Δ TM-LMP1
2319	p2319, Δ JAK3-LMP1

2433*	p2433, LMP1:CD40
2447*	p2447, Δ lytisches LMP1
2597*	p2597, Δ LMP1
2614*	p2614.7, Δ C-LMP1

Lymphoblastoide Zelllinien, immortalisiert mit den angegebenen Maxi-EBVs aus den jeweiligen 293-Zelllinien

B2089*	etabliert mit 2089-EBV
B2262*	etabliert mit 2262-EBV
B2263*	etabliert mit 2263-EBV
B2264-19/3*	etabliert mit 2264-EBV
B2265*	etabliert mit 2265-EBV
B2276*	etabliert mit 2276-EBV
B2318*	etabliert mit 2318-EBV
B2319*	etabliert mit 2319-EBV
B2433*	etabliert mit 2433-EBV
B2447*	etabliert mit 2447-EBV
B2597*	etabliert mit 2597-EBV
B2614*	etabliert mit 2614-EBV

2.6 Chemikalien, Enzyme, Geräte und sonstiges

Alle hier nicht aufgeführten Chemikalien wurden von der Firma Merck, Darmstadt, in reinster Form pro analysis bezogen.

Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg

HybondTM-ECL-Zellulosemembran, HybondTM-N+-Nylonmembran, α ³²P-dCTP (3000 Ci/mmol), α ³²P-CTP (800 Ci/mmol), ECLTM-Western blotting analysis System, G50 und G25-Sepharose-Säulen („Nick columns“)

Affymetrix, Santa Clara, Calif., USA

Human Genome U95Av2-Chip, BioArray RNA Transcript Labeling Kit, GeneArrayTM Scanner, Fluidics Station 400, Hybridization Oven 640

Becton Dickinson GmbH, Heidelberg

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

Biochrom KG, Berlin

Newborn Calf Serum (Seromed®)

Bio-Rad Lab., Richmond, Calif., USA

Gene Pulser™

Calbiochem GmbH, Frankfurt/Main

Dithiothreitol (DTT), Hygromycin B

Clontech, Palo Alto, Calif., USA

Atlas Array Filtersets: Human cancer 1.2, Human 1.2 I-III

Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA

Bacto-Agar, Hefeextrakt, Trypton

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

Röntgenfilme XAR5

Eppendorf Gerätebau, Hamburg

Tischzentrifuge 5415, Reaktionsgefäße verschiedener Größe, BioPhotometer

Eurogentec, Seraing

Goldstar-Polymerase

Fuji PhotoFilm Co., Ltd. Japan

PhosphoImager Fujix Bio-imaging Analyser System (BAS-1000)

Genomed, Bad Oeynhausen

Maxi-Präparations-Kit für Plasmidpräparationen (Jetstar)

Gibco BRL, Life Technologies, Eggenstein

Amphotericin B (Fungizone), Fötale Kälberserum, HEPES, 1 Kb DNA-Leiter, L-Glutamin, Lipofectamin Transfektionsreagenz, Natrium-Pyruvat, Optimem I, Penicillin, Streptomycin, Trypsin-EDTA (1x), Trypton, Zellkulturmedium RPMI 1640, Superscript™ II-Reverse Transkriptase, BenchMark™ Prestained Protein Ladder

Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, USA

Mighty Small II Gel Elektrophorese Einheit

SemiPhor, Semidry Blottingsystem

Immunotech, Marseille Cedex, Frankreich

IntraPrep™ Permeabilization reagent

Infors GmbH, Einsbach

Labfors®, Klein Fermenter System

MBI Fermentas, St. Leon-Rot

Restriktionsenzyme

Merck-Eurolab GmbH

Glycerin, Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), Ammoniumperoxodisulfat (APS), Essigsäure, Ethidumbromid, Ethanol, Glucose, Glyzin, Glyzylglyzin, Isopropanol, Kaliumacetat, Kaliumchlorid, Kaliumdihydrogenphosphat, Lithiumchlorid, Magnesiumchlorid, Magnesiumsulfat, Natriumacetat, Natriumchlorid, Natriumdihydrogenphosphat, Natriumdodecylsulfat (SDS), Natrium-Orthovanadat, Salzsäure, Saccharose, Tetramethylendiamin (TEMED), Triton-X-100,

Nunc GmbH, Wiesbaden

Cryotubes 3 ml, Impfösen, Plastikpetrischalen, Zellkulturflaschen, Zellkulturschalen

New England Biolabs, Schwalbach

Restriktionsenzyme

Pall Gelman Sciences, Dreieich

Acrodisc Syringe Filter, 0,8µm

PE Biosystems, Weiterstadt

PCR-Reaktionsgefäße

Peqlab, Erlangen

Reaktionsgefäße, Elektroporationsküvetten (1 cm Plattenabstand), dNTPs, Elektrophorese-Kammern, dNTPs

Pierce, Rockford

BCA Protein Assay

QIAGEN, Hilden

RNeasy-Kit

Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

dNTPs, NTPs, Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS), alkalische Phosphatase, DNase I, RNase I, Klenow-Fragment, Restriktionsenzyme, Random primed DNA labeling kit, cDNA-Synthese-System, In situ cell proliferation kit (FLUOS), Protein A-Agarose

Roth, Karlsruhe

Natriumdodecylsulfat, Phenol, Roti-Block, Acrylamid

Sigma Chemie, München

Ampicillin, Bromphenolblau, β -Glyzerophosphat, DMSO, Dithiothreitol (DTT), Glyzin, HEPES, Harnstoff, Lachsspermien-DNA, Lysozym, Natriumfluorid, Natriummolybdat, Natriumorthovanadat, Natriumpyrophosphat, Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), Glutathion-Sepharose, Triton X-100, Monolaurat (Tween-20), Prestained SDS Molecular Weight Marker, Protein A Sepharose, Rinderserumalbumin (BSA)

Stratagene, Heidelberg

Robocycler

Schleicher & Schuell, Dassel

Filtereinheit 1,2 μm

Zeiss, Oberkochen

Axiovert 10 Fluoreszenzmikroskop

3. Methoden

3.1 Bakterienkultur

3.1.1 Vermehrung und Aufbewahrung von Bakterien

Bakterien wurden als Suspensionskultur in LB-Medium oder zur Vereinzelnung von Kolonien auf LB-Agar-Platten kultiviert. Bei Selektion auf Resistenz gegen Antibiotika wurden dem LB-Medium Ampicillin (100 µg/ml), Chloramphenicol (30µg/ml) oder Kanamycin (30µg/ml) zugegeben. Zur Lagerung von Bakterien über längere Zeiträume wurde eine dicht gewachsene Bakterienkultur mit 50% Glycerin bei -80°C aufbewahrt.

LB-Medium: 1 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 0,5 % NaCl
LB-Agar-Platten: 15 g Bacto-Agar ad 1 l LB-Medium

3.1.2 Transformation und Elektroporation von *E.coli*

Transformation:

Die Herstellung transformationskompetenter *E.coli* Stämme erfolgte nach einem Protokoll von Hanahan (Hanahan, 1983). Die kompetenten Bakterien wurden bei -80°C aufbewahrt. Für eine Transformation wurden 100 µl dieser Bakterien zusammen mit ca. 50 ng eines Ligationsansatzes 20 – 30 min. auf Eis inkubiert und anschließend für 1 min. 30 sec auf 42°C im Wasserbad erwärmt. Nach Zugabe von SOC-Medium und einer 60-minütigen phänotypischen Expression bei 37°C wurde die Zellsuspension auf Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

SOC-Medium: 2% Trypton; 0,5% Hefeextrakt; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl₂; 10 mM MgSO₄; 0,2% Glukose

Elektroporation:

EBV Plasmid-DNA wurde durch Elektroporation mit einem Gene-Pulser (Bio-Rad) in BJ5183 bzw. DH10B *E. coli* transfiziert. Die Herstellung elektrokompeter DH10B Bakterien erfolgte nach einem Protokoll von Sheng et al. (Sheng et al., 1995). 50 µl kompetente Bakterien wurden mit 1 µg Plasmid-DNA 5 min. lang auf Eis inkubiert und anschließend in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (0,1 cm Elektrodenabstand) überführt. Die Elektroporation erfolgte bei 1,8 kV, 100 Ω und 25 µF mit einer Zeitkonstante

von 2 sec. Die Bakterien wurden sofort in SOC-Medium überführt und nach einer 60-minütigen phänotypischen Expression bei 37°C bzw. im Falle des temperatursensitiven Rekombinationssystems bei 30°C auf Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37°C bzw. 42°C.

3.1.3 Fermentation von *E.coli*

Zur Gewinnung von EBV Plasmid-DNA wurden DH10B Bakterien in einem 5 l Tischfermenter (LABFORS) kultiviert. 800 ml einer stationär gewachsenen Vorkultur wurden in den Fermenter überführt und 3,8 l LB-Medium, 300 ml 5M NaCl, 100 ml 87%-iges Glycerin und die entsprechenden Antibiotika (siehe Endkonzentrationen unter 3.1.1) hinzugegeben. Die Kultivierung erfolgte bei 37°C, pH 7,0 und einer Rührerdrehzahl von 400 rpm. Die Werte der einzelnen Parameter wurden durch entsprechende Elektroden und Sensoren gemessen und vom digitalen Meß- und Regelsystem der Fermenterkonsole erfasst und reguliert (Handbuch 1.4, LABFORS Klein Fermenter System). Die Antischaum-Zugabe wurde ebenfalls durch eine entsprechende Antischaum-Elektrode geregelt. Die Belüftung des Fermenters erfolgte durch ein Begasungsrohr mit einer konstanten Begasungsrate von 1 Vol. Luft/Vol. Kultur x min. Die Kultivierung der DH10B *E.coli* Bakterien erfolgte bis zu einer OD₆₀₀ von 4 bis 5. Nach Erreichen dieser Zelldichte wurden die Bakterien für die anschließende DNA-Präparation geerntet (siehe 3.3.3).

3.2 Zellkultur und Analyse von Zellen

3.2.1 Zellkulturbedingungen

Alle Zellen wurden in einem Inkubator bei 37°C unter einer Atmosphäre von 5 % CO₂ kultiviert. Das Kulturmedium RPMI 1640 wurde mit 10% Kälberserum (Seromed®), 2 mM L-Glutamin, 100 µg/ml Streptomycin, 100 IE/ml Penicillin, 0,5 µg/ml Amphotericin B, 1 mM Natriumpyruvat und 5 mM HEPES versetzt.

Adhärente Zelllinien

Die adhärente Fibroblastenzelllinie WI38 wurde in 10%-igem RPMI vermehrt und alle 2-3 Tage 1:8 gesplittet. Für eine Kokultur mit primären B-Lymphozyten oder zur Proliferation von "feeder layer" abhängigen B-Zelllinien, wurden die WI38-Zellen einer 50Gy γ -Bestrahlung ausgesetzt, um deren Proliferation zu stoppen. Zum Ablösen und Verdünnen von adhären Zellen wurde den Zellen Trypsin zugesetzt, so dass sie gerade vollständig benetzt

waren. Nach 1 bis 3-minütiger Inkubation bei RT wurden die Zellen ab gespült und in größere Kulturgefäße überführt.

B64-19/3-Zellen

Diese mit einem Maxi-EBV Plasmid etablierte B-Zelllinie wurde zur Vermehrung in RPMI versetzt mit 10% fötalem Kälberserum und in Kokultur mit WI38-Zellen gehalten. WI38 ist eine Fibroblastenzelllinie, die vor der Kokultur mit B64-19/3-Zellen durch γ -Strahlung inaktiviert wurde. Bei einer Zellzahl von ca. 10^6 Zellen/ml wurden die Zellen mit frischem Kulturmedium versetzt bzw. ein Teil in neue Kulturgefäße mit WI38 überführt. Vor der Induktion der NGF-R:LMP1-Aktivität durch Antikörperstimulierung wurden die Zellen der WI38 Kokultur entnommen und bei einer Zelldichte von 10^5 Zellen/ml für 72 h bei 37°C inkubiert.

Induktion der NGF-R:LMP1 bzw. CD40-Signaltransduktion

Die Induktion von NGF-R:LMP1 bzw. des CD40-Rezeptors in B2264-19/3-Zellen erfolgte in einer Zellkonzentration von 5×10^5 /ml in Kulturmedium. Für die Quervernetzung von NGF-R:LMP1 wurden der Zellsuspension 25 μ l Kulturüberstand der Hybridom-Zelllinie HB8737 (enthält ca. 20-40 μ g/ml α NGF-R-Antikörper/ ml) zugesetzt. Nach 15-minütiger Inkubation bei 37°C wurde die Signaltransduktion durch Zugabe von 5 μ g/ml Sekundärantikörper (Ziege- α Maus, IgG+IgM(H+L)) initiiert. Für die Quervernetzung des CD40-Rezeptors wurden dem Kulturmedium 1,7 μ g/ml α CD40-Antikörper (G28.5) zugesetzt. Nach 15-minütiger Inkubation bei 37°C wurde die Signaltransduktion durch Zugabe von 5 μ g/ml Sekundärantikörper (Ziege- α Maus, IgG+IgM(H+L)) initiiert. Die Induktionen erfolgten für 30, 60 und 180 min.

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte in einer Neubauer Zählkammer. Um tote von lebenden Zellen unterscheiden zu können, wurde die Zellsuspension mit einem Volumen einer 0,1%-igen Eosin-Lösung (in PBS) gemischt. Tote Zellen nehmen den Farbstoff auf und sind deshalb im Mikroskop an ihrer Rotfärbung im Gegensatz zu vitalen Zellen zu erkennen.

3.2.2 Aufbewahrung von Zellen

Zellen können in Gegenwart von DMSO in flüssigem Stickstoff eingefroren und über längere Zeit gelagert werden. Zum Einfrieren wurden etwa 10^7 Zellen abzentrifugiert (1200 rpm, 5 min., 20°C) und in 1 ml RPMI-Medium mit 50 % FKS und 10 % DMSO resuspendiert und in 2 ml-Gefäß (NUNC-Cryotube™) pipettiert. Um die Zellen schonend abzukühlen, wurde das

Röhrchen in mehrere Lagen Papierhandtücher gewickelt und bei -80°C tiefgefroren. Zur längeren Lagerung wurden die Zellen anschließend in flüssigen Stickstoff überführt.

Zur Wiederverwendung wurden die Zellen in einem 37°C warmen Wasserbad schnell aufgetaut. Anschließend wurden die Zellen vorsichtig in vorgewärmten Kulturmedium gewaschen und in ein Kulturgefäß überführt.

3.2.3 Präparation primärer B-Zellen

Humane primäre B-Zellen wurden aus Routineentnahmen von Adenoiden oder Nabelschnurblutproben gewonnen. Aus den Adenoiden wurde durch mechanisches Zerkleinern eine Einzelzellsuspension hergestellt. Diese Zellsuspension bzw. jeweils 10 ml Nabelschnurblut wurden mit PBS auf ein Volumen von 35 ml aufgefüllt. Durch Zugabe von 0,5 ml Schafblut wurden T-Lymphozyten für 15 min. bei Raumtemperatur rosettiert. Die Proben wurden anschließend über einen 30%-igen Ficoll-Gradienten (Ficoll-Dichte 1.077) aufgereinigt. Dafür wurden je 15 ml Ficoll mit 35 ml Zellsuspension überschichtet. Es folgte eine Zentrifugation bei 1850 rpm (750g) für 45 min. bei 10°C . Die Interphase des Gradienten, die fast ausschließlich B-Lymphozyten enthält, wurde abgenommen und Ficollreste und restliche Thrombozyten durch dreimaliges fraktioniertes Waschen der Zellen (Zentrifugationen: 1700 rpm, 1500 rpm, 1200 rpm, je 7 min. bei 10°C) mit PBS entfernt. Anschließend wurden die primären B-Zellen in Kulturmedium suspendiert und meist direkt verwendet. Die Zellen können auch über Nacht bei 37°C im Inkubator aufbewahrt und am nächsten Tag für Experimente eingesetzt werden.

3.2.4 Transfektion von Zellen und Selektion stabiler Zellklone mit Hygromycin

Die zu transfizierenden Zellen wurden in 6-Loch-Platten bis zu einer 70%-igen Konfluenz kultiviert. Die Transfektion mit LipofectaminTM in serumfreiem Medium (Optimem I, GibcoBRL, Life Technologies) wurde nach Angaben des Herstellers (GibcoBRL, Life Technologies) durchgeführt (6 μl LipofectaminTM-Reagenz pro 1 μg transfizierter DNA). Für die Etablierung EBV-positiver stabiler Zelllinien wurden 293 Zellen in 6-Loch-Platten mit 1 μg DNA des entsprechenden Maxi-EBV Plasmids transfiziert. Am nächsten Tag wurden die Zellen in Zellkulturschalen (Durchmesser 140 mm) überführt und Hygromycin (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Endkonzentration) dem Kulturmedium hinzugegeben. Drei bis vier Wochen später wurden

auswachsene Zellklone, die sich mittels Fluoreszenzmikroskopie als positiv für die GFP Expression erwiesen, geerntet und einzeln expandiert.

3.2.5 Produktion infektiöser Viruspartikel und Titerquantifizierung

293-Zellklone, die die verschiedene Maxi-EBV Plasmide trugen, wurden in 6-Loch-Platten mit Expressionsplasmiden für BZLF1 (p509; 0,5 µg/Loch), BALF4 (p2670; 0,5 µg/Loch) und die Histonacetyltransferase p300 (p2507; 0,5 µg/Loch) transfiziert, um den lytischen Zyklus zu induzieren. Nach 72h Kultivierung bei 37°C wurden die Überstände geerntet und filtriert, um Zelltrümmer abzutrennen (Porengröße 0,8 µm). Die Quantifizierung verschiedener Virusüberstände erfolgte mit Hilfe der GFP-Expression von infizierten Raji-Zellen. 3×10^5 Raji-Zellen wurden mit definierten Aliquots der Kulturüberstände für 72h bei 37°C in 24-Loch-Platten inkubiert. Am Tag zwei nach Infektion wurde das Medium gewechselt. Nachdem die Zellen am Tag drei in Kulturmedium gewaschen wurden, wurde der Prozentsatz GFP-positiver Zellen durch UV-Mikroskopie bestimmt. Basierend auf diesen Daten wurden „grüne Raji-Einheiten“ pro ml als Maß für die absolute Zahl infektiöser Maxi-EBV-Partikel in verschiedenen Virusstocks definiert.

3.2.6 Infektion von primären B-Zellen mit Maxi-EBVs und Bestimmung der Immortalisationsfrequenz

Primäre humane B-Lymphozyten aus Adenoiden oder Nabelschnurblut wurden mit verschiedenen Verdünnungen angeglicherer Virusüberstände infiziert. Die Infektion erfolgte in 96-Loch-Platten auf γ -bestrahlten WI38-Zellen als “feeder layer”. 1×10^5 B-Zellen wurden in einem Volumen von 100 µl pro Loch ausplattiert und einmal wöchentlich gefüttert. Nach 4-6 Wochen konnte der Prozentsatz immortalisierter Zellklone bestimmt und einzelne Klone weiter expandiert werden. Für die Bestimmung der Immortalisationsfrequenzen verschiedener Maxi-EBVs wurden nur Verdünnungsstufen in die Kalkulation einbezogen, die die statistischen Voraussetzungen einer „one hit“-Kinetik erfüllten (Frisan et al., 2001). Das ist der Fall bei einer 63%-igen (oder kleineren) Häufigkeit positiver Ereignisse bzw. bewachsener Löcher.

Als alternative Methode wurden infizierte B-Zellen in Softagar kultiviert, wie bereits beschrieben (Sugden und Mark, 1977). Primäre B-Zellen wurden ebenfalls mit verschiedenen Verdünnungen angeglicherer Virusüberstände infiziert. Pro Verdünnungsstufe wurden 6×10^5 Zellen in je 1 ml Volumen in 24-Loch-Platten über Nacht bei 37°C inkubiert. Letal bestrahlte

WI38-Feeder-Zellen in 6-Loch-Platten wurden mit 1 ml 0,5%-iger Agarose in Kulturmedium überschichtet und zum Aushärten der Agarose 15 min. lang bei 4°C inkubiert. Nach Supplementation der infizierten B-Zellsuspension mit Agarose (0,3% in Medium) wurden diese auf der bereits soliden Agaroseschicht ausplattiert. Dabei wurden pro Loch 3×10^5 Zellen in 2 ml Volumen ausgesät. Nach kurzer Inkubation bei 4°C wurden die Zellen bei 37°C kultiviert und einmal wöchentlich mit 0,3% agarosehaltigem Medium gefüttert (0,8 ml/Loch). Nach 4-6 Wochen konnte die Immortalisationsfrequenz anhand der Anzahl der ausgewachsenen B-Zellkolonien bestimmt und einzelne Klone in Suspension weiter expandiert werden.

3.2.7 Immunfluoreszenzanalysen

Die Expression des lytisch induzierten EBV-Proteins gp125, ein Mitglied des VCA-Komplexes, in induzierten 293-Zellen wurde durch Immunfärbungen nachgewiesen. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und für 20 min. mit Aceton fixiert. Fixierte Zellen wurden mit spezifischem monoklonalen Antikörper für 30 min. bei 37°C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen der Objektträger mit PBS in einer Glasküvette wurden die Zellen mit einem zweiten, Cy3-konjugierten α Maus Antikörper für weitere 30 min. bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und in einer 10%-igen PBS/Glyzerin-Lösung eingebettet. Zur Analyse wurden die gefärbten Zellen mit Licht der Wellenlänge 546 nm bestrahlt und mit einem invertierten Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Axiovert 10) mit dem geeigneten Filtersatz mikroskopiert.

3.2.8 FACS-Analysen

Einzelzellen einer Zellsuspension können durch Durchflußzytometrie in einem FACS™-Gerät analysiert werden. Nach Färbung von Zellen mit Antikörpern, die mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt sind, kann man in der FACS-Analyse auf der Basis einzelner Zellen bestimmen, wieviele Zellen einer Population ein bestimmtes Protein exprimieren und welches relative Expressionsniveau erreicht wird. Erkennt der verwendete Antikörper ein Antigen, das sich im Zytoplasma befindet, müssen die Zellen vor der Färbung permeabilisiert werden.

Nachweis von Oberflächenmolekülen

Für die Detektion von verschiedenen Oberflächenproteinen (NGF-R, CD40, CD44) wurden ca. 5×10^5 Zellen dreimal in kaltem PBS/3%FCS gewaschen und mit spezifischen Antikörpern

20 min. lang auf Eis inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in PBS/3%FCS wurden die Zellen mit entsprechendem PE- bzw. C5-konjugiertem Sekundärantikörper für 20 min. auf Eis im Dunklen inkubiert. FITC-konjugierte Sekundärantikörper kamen bei allen Zellen, die bereits aufgrund ihrer Transfektion oder Infektion mit Maxi-EBVs GFP exprimierten, nicht zum Einsatz, da die Emissionsspektren von FITC und GFP im FACS nicht zu trennen sind. Zellen, die anstelle des spezifischen Erstantikörpers mit einem irrelevanten Antikörper gleichen Isotyps (z.B. im Falle von humanen B-Zellen α CD4) oder nur mit Sekundärantikörper inkubiert wurden, wurden als Negativkontrolle eingesetzt.

Für die Detektion von CD19, CD69 und CD83 wurden direkt markierte, PE-konjugierte monoklonale Antikörper verwendet. Nach 20-minütiger Inkubation wurden die Zellen dreimal in PBS/3%FCS gewaschen und konnten sofort im FACS analysiert werden.

Intrazellulärer Nachweis von Proteinen

Für die Detektion des zytoplasmatischen C-Terminus von LMP1 wurden die Zellen unter Anwendung des „IntraPrepTM Permeabilization Reagent“ von Immunotech permeabilisiert und für 15 min. bei Raumtemperatur mit α LMP1(CS1-4)-Antikörper (6 μ g/100 μ l) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in PBS/3%FCS erfolgte die Inkubation mit PE-konjugiertem Esel- α Maus-Sekundärantikörper für 20 min. bei Raumtemperatur. Die Zellen wurden dreimal gewaschen und im FACS analysiert.

3.2.9 Zellzyklus-Analysen von B2264-19/3- bzw. 721-Zellen

Die Messung des Einbaus von Bromdeoxyuridin (BrdU) und des DNA-Gehalts einer Zelle erlaubt die Zuordnung zur Zellzyklusphase, in der sich die Zelle befindet. Um das Zellzyklusprofil einer Zellsuspension zu bestimmen, wurde 2-3x10⁶ Zellen BrdU (10 mM BrdU in PBS, pH7,4; In Situ Cell Proliferation Kit, Roche) im Verhältnis 1:1000 zum Kulturmedium zugesetzt und die Zellen vier Stunden lang bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal in Medium gewaschen (Zentrifugation: 1200 rpm, 5 min.) und in 500 μ l PBS resuspendiert. Zur Fixierung wurde die Zellsuspension in 5 ml „Fixativ“ (70% Ethanol/ 50 mM Glycin pH2) eingetropt und für 30 min. bei 4°C inkubiert (dieser Schritt kann auch über Nacht durchgeführt werden). Die Zellen wurden abzentrifugiert (1200 rpm, 5 min.), zur Denaturierung der DNA in 500 μ l 4M HCl resuspendiert und für 10-20 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Neutralisation wurden der Zellsuspension 2 ml Medium zugegeben, die Zellen abzentrifugiert (1500 rpm, 10 min.) und zweimal in 2 ml Medium gewaschen (Zentrifugation: 1500 rpm, 10 min.). Die Zellen wurden in 1 ml Inkubationspuffer

(PBS, 0,5% BSA, 0,1% Tween 20; In Situ Cell Proliferation Kit, Roche) resuspendiert und für 20 min. bei 4°C inkubiert (dieser Schritt kann auch über Nacht durchgeführt werden). Nach Zentrifugation (1500 rpm, 5 min.) wurde das Zellpellet in 50 µl DNase/BrdU-Antikörper („Cell Proliferation Kit“, Amersham) resuspendiert und für 45 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS/3%FCS erfolgte die Inkubation mit Cy5-konjugiertem Ziege- α Maus-Sekundärantikörper (1:50 in PBS/3%FCS) für 20 min. bei Raumtemperatur im Dunklen. Nach dreimaligem Waschen folgte zur Entfernung der zellulären RNA bei Raumtemperatur ein 15-minütiger RNase Verdau (RNase, DNase frei, Roche #1119915; Endkonzentration 10µg/ml in 1ml PBS/3%FCS). Zuletzt wurden der Zellsuspension 50 µg/ml Propidiumiodid (PI) zur Bestimmung des zellulären DNA-Gehalts zugesetzt. Nach 15 min. konnte die Analyse im FACS erfolgen.

3.2.10 Extraktion zellulärer DNA

Ca. 1×10^7 Zellen wurden abzentrifugiert, mit PBS gewaschen, in 2,1 ml TE aufgenommen und durch Zugabe von 1% SDS lysiert. Das Lysat wurde für 2 h bei 50°C mit Proteinase K (50µg/ml Endkonzentration) verdaut. Nach Zusetzen von 1 ml 5M NaCl wurde die Suspension kräftig geschüttelt und für 30 min. bei 15300 rpm in einer Sigma Zentrifuge abzentrifugiert. Der Überstand wurde mit zweifachem Volumen Ethanol präzipitiert, das Pellet mit 70%-igem Ethanol gewaschen und in einem geeigneten Volumen TE resuspendiert.

3.3 DNA-Arbeitstechniken

Die Anwendung allgemein üblicher Techniken, die im Umgang mit Nukleinsäuren benutzt wurden, wie z.B. Phenolextraktion, Ethanolpräzipitation, Konzentrationsbestimmung im Spektralphotometer, Auftrennung bzw. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen, enzymatische Restriktionshydrolyse, Dephosphorylierung von DNA mit alkalischer Phosphatase, Behandlung von DNA-Fragmenten mit Klenow-Polymerase, Ligierung freier DNA-Enden, Präparation von Plasmid-DNA über alkalische Lyse, Affinitätsmatrices oder durch Ultrazentrifugation in einem Cäsiumchlorid-Ethidiumbromid-Gradienten, etc. erfolgte in Anlehnung an Standardprotokolle (Sambrook et al., 1989).

3.3.1 Rekombinante Plasmide

Alle Mutationen im LMP1-Genlokus wurden über konventionelle Klonierungstechniken in Plasmid p2167.1 eingeführt (siehe Abb.4.1), das die Nukleotidkoordinaten #163,473 bis #649

aus dem EBV-Stamm B95.8 (Baer et al., 1984) trägt. Derivate von p2167.1, die die verschiedenen LMP1-mutierten Allele tragen, dienten als Vorkonstrukte für den Transfer linearer Fragmente in das Wildtyp-Maxi-EBV p2089. Alle LMP1-Mutanten im Kontext von p2167.1 stehen unter Kontrolle des unmodifizierten Wildtyp-Promotors. Die folgende Auflistung gibt die verschiedenen Klonierungsschritte zur Generierung aller benutzter Maxi-EBV-Mutanten wieder. Ein Teil der im Anschluß aufgeführten Plasmide war bereits in der Arbeitsgruppe vorhanden oder wurden freundlicherweise von anderen Arbeitsgruppen zur Verfügung gestellt. Die mit einem Stern (*) gekennzeichneten Plasmide wurden von mir hergestellt. Alle Plasmide sind in die Datenbank der Abteilung Genvektoren eingetragen.

p2262 (Δ PxQxT-LMP1):

p1967M (Δ PxQxT-LMP1 unter SV40 Promotor, Labor Bill Sugden, Madison); *Bst*1107I/*Nhe*I-Fragment in p2167.1 inseriert → p2220.1; lineares *Sal*I/*Sac*I-Fragment für Rekombination in p2089 eingesetzt → p2262 Maxi-EBV

p2263 (P12-15-16-19-20A-LMP1):

1.) Vorbereitung der Klonierung durch Einführen einer *Hpa*I-Schnittstelle „upstream“ des LMP1-Gens:

p2167.1; *Nhe*I/*Sal*I-Fragment in pBR322 → p2212.1

p2167.1 als „template“ für PCR (Primer: 2167-F1, 2167-B1); Insertion in pCRII → p2167.13 (*Hpa*I-Schnittstelle eingeführt, LMP1-Promotor rekonstruiert); *Bpu*1102I/*Mlu*I-Fragment in p2212.1 → p2213.1

2.) Einführen der P12-15-16-19-20A-Mutation:

p1626M (Bloss et al., 1999) als „template“ für PCR (Primer: 1626M-F13, 1626M-B2) → Insertion via *Hpa*I/*Bpu*1102I in p2213.1 → p2235.1; *Nhe*I/*Sal*I-Fragment in p2167.1 → p2238.4; lineares *Sal*I/*Sac*I-Fragment für Rekombination in p2089 eingesetzt → p2263 Maxi-EBV

p2264 (NGF-R:LMP1):

p397 *Sal*I/*Xba*I-Fragment in p575 → p581 (LMP1 unter SV40-Promotor)

1737.32 (NGF-R: As 1-279 fusioniert mit LMP1: As 191-386 unter CMV-Promotor); *Taq*I/*Xba*I-Fragment in p581 → 1755.1; *Eco*47III/*Bpu*1102I-Fragment via *Hpa*I/ *Bpu*1102I-Schnittstelle in p2213.1 (s.o.) → p2231.1; *Nhe*I/*Sal*I-Fragment in p2167.1 → p2240.1; lineares *Sal*I/*Sac*I-Fragment für Rekombination in p2089 eingesetzt → p2264 Maxi-EBV

p2265 (Y384G-LMP1):

p288.1 (Baichwal und Sugden, 1988) als „template“ für PCR (Primer: 288-F2, 288-B6); Insertion via *Bpu1102I/XmaI* in p288.1 → p2196.1; *Bst1107I/NheI*-Fragment in 2167.1 → p2221.1; lineares *EcoRV/Psp1406I*-Fragment für Rekombination in p2089 eingesetzt → p2265 Maxi-EBV

p2276 (P9-10-15A-LMP1):

p1626M (P9-10-15A-LMP1 unter SV40 Promotor, Labor Bill Sugden, Madison) als „template“ für PCR (Primer: 1626M-F13, 1626M-B2); Insertion via *HpaI/Bpu1102I* in p2213.1 (siehe p2263) → p2234.5; *NheI/SalI*-Fragment in p2167.1 → p2239.2; lineares *SalI/SacI*-Fragment für Rekombination in p2089 eingesetzt → p2276 Maxi-EBV

p2318* (ΔTM-LMP1):

p419.23 (Hammerschmidt et al., 1989) als „template“ für PCR; Insertion in pCRII (Invitrogen) → p2307.1; *MluI/MunI*-Fragment in 2212.1 (siehe p2263) → p2314.1; *NheI/SalI*-Fragment in 2167.1 → 2316.1; lineares *SalI/SacI*-Fragment für Rekombination in p2089 eingesetzt → p2318* Maxi-EBV

p2319 (ΔJAK3-LMP1):

p2232 (Flag-LMP1Δ33bp) (Gires et al., 1999) als „template“ für PCR (Primer: LMP1-F5, LMP1-B26); Insertion in pCR2.1 (Invitrogen) → p2308.1; *MluI/MunI*-Fragment in p2212.1 (siehe p2263) → p2315.1; *NheI/SalI*-Fragment in p2167.1 → p2317.1; lineares *SalI/SacI*-Fragment für Rekombination in p2089 eingesetzt → p2319 Maxi-EBV

p2433*(CD40:LMP1):

p1778.16 (Gires et al., 1997) *Bst1107I/XbaI*-Fragment in p2167.1 → p2430*; lineares *SalI/SacI*-Fragment für Rekombination in p2089 eingesetzt → p2433* Maxi-EBV

p2447*(Δ lytisches LMP1):

p2167.1 *XhoI/XhoI*-Fragment in pBluescriptIISK⁻ → p2434.5*

RT-PCR (RNA aus 721-Zellen, Oligo dT-Primer) → PCR Primer: LMP1-F4-cDNA, LMP1-B3-cDNA); Insertion in pCRII (Invitrogen) → p2442.1a* (Δ Intron 1-LMP1-Fragment); *StuI/BglII*-Fragment in p2434.5 → p2444.6*; *Bst1107I/NheI*-Fragment in p2167.1 → p2446.5*; lineares *SalI/SacI*-Fragment für Rekombination in p2089 eingesetzt → p2447* Maxi-EBV

p2597*(Δ LMP1):

p2167.1; *Bam*HI/*Sal*I-Fragment in pBluescriptIISK⁻ → p2594.7*; *Bpu*1102/*Bsu*36I-Restriktion, überhängende Enden mit Klenow aufgefüllt, Religation → p2595*; *Nhe*I/*Sal*I-Fragment in p2167.1 → p2596*; lineares *Sal*I/*Sac*I-Fragment für Rekombination in p2089 eingesetzt → p2597* Maxi-EBV

p2614.7*(Δ C-LMP1):

p2167.1; *Xho*I/*Xho*I-Fragment in pBluescriptIISK⁻ → p2434.5*; Oligoinserterion 6x His-tag (Primer: LMP1C-upper, LMP1C-lower) via *Nco*I/*Bpu*1102 → p2601.1; *Nhe*I/*Bst*1107I-Fragment in p2167.1 → p2603.1*; lineares *Sal*I/*Sac*I-Fragment für Rekombination in p2089 eingesetzt → p2614.7* Maxi-EBV

3.3.2 Homologe Rekombination in *E.coli* zur Konstruktion von Maxi-EBV-Mutanten

Lineare Fragmente aus Derivaten von p2167.1, die die verschiedenen LMP1 mutierten Allele trugen, wurden in *E.coli* DH10B bzw. BJ5183 durch Elektroporation (3.1.2) transformiert. Beide *E.coli*-Stämme trugen das Rezipienten-Maxi-EBV Plasmid p2089. Die Methode in dem *recA*-positiven, *recBC*-negativen *E.coli* BJ5183 wurde bereits beschrieben (Janz et al., 2000). Das temperatursensitive Rekombinationssystem in *E.coli* DH10B wurde während dieser Arbeit daraus entwickelt (B. Neuhierl, Abt.Genvektoren, GSF). Der verwendete *recA*-negative Stamm *E.coli* DH10B enthält zusätzlich zu p2089 das Plasmid p2650, das unter Kontrolle eines temperatursensitiven Replikationsursprungs für die Rekombinase RecA und den Exonukleaseinhibitor Red γ kodiert. Nach Transformation des linearen DNA-Fragments und dreistündiger phänotypischer Expression bei 30°C wurden doppelresistente Klone (30 μ g/ml Chloramphenicol, 30 μ g/ml Kanamycin) bei 42°C stabil propagiert.

3.3.3 Präparation von EBV-Plasmid-DNA aus *E.coli*

Die 5 l Fermenterkultur wurden für 15 min. bei 5000 rpm und Raumtemperatur in einer Heraeus Sepatech Zentrifuge abzentrifugiert. Die Bakterienlyse und DNA-Präparation erfolgte nach dem Prinzip der alkalischen Lyse. Anschließend wurde die gewonnene DNA in insgesamt 100 ml TE aufgenommen. 110 g CsCl wurden hinzugegeben und aufgelöst. Diese Mischung wurde auf 4 Ultrazentrifugenröhrchen (Sorvall, 35 ml), in denen je 800 μ l

Ethidiumbromid (1%, Merck) vorgelegt wurde, verteilt. Die UZ-Röhrchen wurden mit 1,55 g/ml CsCl-Lösung aufgefüllt. Die Zentrifugation erfolgte für 72 h bei 35000 rpm und 20°C in einem TFT 70.38 Festwinkelrotor einer Beckmann L-60 Ultrazentrifuge. Nach dieser Zeit wurden die DNA-Banden unter UV-Licht (365 nm) sichtbar gemacht und die jeweils unteren Banden, die der Plasmid-DNA entsprechen, mit einer Einmalkanüle (2,1x38 mm, BOVI•VET) abgezogen. Die Plasmid-DNA Mischung wurde in zwei neue 11,5 ml UZ-Röhrchen überführt und diese mit 1,55 g/ml CsCl-Lösung aufgefüllt. Nach erneuter Zentrifugation in einem 70 TI-Festwinkelrotor für 48 h bei 35000 rpm wurden die Plasmid-DNA-Banden abgezogen und das restliche Ethidiumbromid durch Zugabe von H₂O und CsCl-gesättigtem Isopropanol extrahiert. Nach Zugabe von TE und DNA-Präzipitation mit Isopropanol wurde die EBV Plasmid-DNA in TE aufgenommen.

3.3.4 Southernblot-Analyse

10 µg zellulärer DNA wurden mit entsprechenden Restriktionsenzymen gespalten und in einem 0,7%-igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Die DNA wurde nach der Gelelektrophorese durch Färbung mit Ethidiumbromid (40 ng/ml in 1 x TAE-Puffer) sichtbar gemacht. Anschließend wurde das Gel 10 min. lang mit 0,25 M HCl behandelt, um Strangbrüche in den DNA-Fragmenten zu induzieren. Danach wurde die DNA in 1,5 M NaCl/1,5 N NaOH denaturiert und durch kapillaren Transfer auf eine Nylon-Membran (Hybond N+) übertragen. Der Transfer wurde nach 1 h beendet (nach Southern, 1975). Die Membran wurde 30 min. in 2xSSC gewaschen und anschließend für die Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten Probe verwendet. Die Prähybridisierung erfolgte in 10 ml Hybridisierungspuffer nach Church für 60 min. bei 65°C (Church und Gilbert, 1984). Nach dieser Zeit wurde der Puffer erneuert, die radioaktiv markierte Probe (4x10⁷ dpm/ml) zugegeben und die Hybridisierung an homologe DNA-Bereiche über Nacht bei 65°C durchgeführt. Die hybridisierten Nylonfilter wurden bei 65°C in 0,1xSSC; 1% SDS gewaschen, getrocknet und bei -80°C autoradiographiert. Die Dauer der Exposition richtete sich nach der Intensität der Signale.

<u>1xTAE-Puffer:</u>	40 mM Tris-HCl (pH8,0); 5 mM NaAc; 1mM EDTA
<u>2xSSC:</u>	300 mM NaCl, 30 mM Natriumcitrat
<u>Church-Puffer:</u>	400 mM Na ₂ HPO ₄ , 100 mM NaH ₂ PO ₄ , 7% SDS, 1 mM EDTA (pH 7,2)

3.3.5 Radioaktive Markierung von DNA

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

Doppelsträngige Oligonukleotide mit 5'-überhängenden Enden, die als Probe in Gelretentionsanalysen eingesetzt wurden, wurden durch Klenow-Enzym katalysierte Auffüllreaktionen radioaktiv markiert. 2 µg des Oligonukleotids wurden mit 1 µl 20 mM dNTP-Mix (dATP, dGTP, dTTP), 2 µl 10xKlenow-Puffer, 50 µCi $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP und 5U Klenow-Polymerase in einem Volumen von 20 µl für 1h bei 37°C inkubiert. Freie Nukleotide wurden über eine Sephadex-G25 Säule (Nick Column, Amersham Pharmacia) abgetrennt.

10xKlenow-Puffer: 100 mM Tris -HCl, 100 mM MgCl₂, 10 mM DTT, pH 7,0

3.3.6 PCR-Analysen

„Goldstar“ DNA-Polymerase und der dazugehörige Puffer wurden von der Firma Eurogentec bezogen und die PCR-Analysen nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Das Temperaturprofil der PCR richtete sich nach den Schmelztemperaturen der Oligonukleotide und der Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragmentes. In der Regel wurden 35 Zyklen in einem Robocycler der Firma Stratagene durchlaufen.

Standardprotokoll für die Amplifikation von Fragmenten aus dem LMP1-Genlokus:

Reaktionsansatz:

100 ng Maxi-EBV Plasmid-DNA bzw. 2 µg zelluläre Gesamt-DNA

2 µl MgCl (Eurogentec-Goldstar)

1 µl dNTP-Mix (10 mM)

je 1 µl Primer (10 pm)

5 µl Goldstar-Puffer

0,2 µl Goldstar-Polymerase

H₂O ad 50 µl

PCR-Programm: 95°C/ 5 min.; 35 Zyklen: 95°C/ 1,5 min., 53°C/ 1,5 min., 72°C/ 3 min.; 72°C/ 10 min., 4°C

Reverse Transkriptase (RT)-PCR

Jeweils 1 µg gesamtzelluläre RNA der Zelllinie 721 wurde mit 100 pmol Oligo-(dT₁₅)-Primern 10 min. lang bei 70°C denaturiert und sofort auf Eis gestellt. Die Elongationsreaktion mit Superscript™ II-Reverse Transkriptase (GibcoBRL, Life Technologies) erfolgte nach Angaben des Herstellers. In die anschließende PCR-Reaktion wurden 2 µl aus 20 µl RT-Reaktionsansatz eingesetzt. Um Kontaminationen der RNA-Präparation mit genomischer DNA zu kontrollieren, wurden zusätzlich 0,1 µg RNA der Zelllinien in der PCR-Reaktion getestet, die nicht der Reaktion mit reverser Transkriptase unterzogen worden war.

3.3.7 Gelretentionsanalysen

Wechselwirkungen zwischen Proteinen und DNA können durch Gelretentionsanalysen untersucht werden. Der Versuch basiert darauf, dass DNA-Proteinkomplexe bei der Elektrophorese durch native Polyacrylamid-Gele stabil bleiben und ein anderes Laufverhalten als freie DNA zeigen (Fried und Crothers, 1981). Für Gelretentionsversuche wurden nukleäre Extrakte aus B2264-19/3-Zellen vor bzw. nach 30-minütiger Induktion des chimären NGF-R:LMP1 verwendet. Ca. 5×10^7 Zellen wurden abzentrifugiert, mit kaltem PBS gewaschen und im vierfachen Volumen kaltem Puffer I suspendiert. Alle weiteren Schritte erfolgten bei 4°C. Die Zellen wurden 30 min. auf Eis inkubiert, so dass die Zellmembranen aufgebrochen wurden, die Kerne jedoch intakt blieben. Die Zellkerne wurden abzentrifugiert (10000 rpm, 5 min., 4°C) und in 1,5 ml Puffer I gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (13000 rpm, 2min., 4°C) wurde der Überstand sorgfältig abgesaugt und die Kerne in einem Volumen Niedrigsalz-Puffer II suspendiert. Anschließend wurde ein Volumen Hochsalz-Puffer II zugegeben und die Ansätze im Kühlraum 30-60 min. in einem Überkopfschüttler gemischt, um die in den Zellkernen enthaltenen Proteine zu extrahieren. Nach einer anschließenden Zentrifugation (15300 rpm, 60 min., 4°C) wurde der proteinhaltige Überstand in vorgekühlte Reaktionsgefäße zu je 20 µl aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Kernextrakte wurden bei -80°C gelagert und zur Verwendung auf Eis aufgetaut. Der Proteingehalt wurde mit dem „BCA Protein Assay“ (Pierce, Rockford) nach Angaben des Herstellers bestimmt. Für jede Reaktion zur Gelretentionsanalyse wurde eine 6-7 µg Protein enthaltende Menge an Kernextrakt mit 1 µg Poly-dGdC, 1,2 µg Kalbsthymus-DNA, 3,5 µg BSA, 25 mM KCl, 1 µl einer radioaktiv markierten Probe (20000 dpm) und 10-15 µl Puffer III in einem Volumen von 20 µl gemischt und 20 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Während dieser Zeit bilden sich spezifische Protein-DNA-Komplexe aus, wenn im Kernextrakt Proteine vorhanden sind, die an das als Probe verwendete Oligonukleotid binden

können. In „Supershift“ Reaktionen wurden nach 10 min. 1 µl αp65-Antikörper (sc-109, Santa Cruz) zugegeben und für weitere 20 min. inkubiert. Als Probe wurde ein doppelsträngiges Oligonukleotid verwendet, das eine Bindesequenz für Transkriptionsfaktoren der NF-κB-Familie enthält und durch Aneinanderlagern der einzelsträngigen Oligonukleotide 5'-TCG ACA GAG GGG GAT TTC CAA GAG GCC-3' / 5'-TCG AGG CCT CTT GGA AAT CCC CCT CTG-3' hergestellt wurde. Die Probe wurde mit α³²P-dCTP (Amersham Pharmacia) unter Verwendung von Klenow-Enzym (Roche) radioaktiv markiert wie unter 3.3.5 beschrieben. Die Protein-DNA Komplexe wurden in einem 7,5%-igen nicht-denaturierenden Polyacrylamid-Gel aufgetrennt, das 0,2 x TBE enthält. Als Laufpuffer diente 0,2 x TBE. Das Gel wurde nach der Elektrophorese in einem Gelrockner getrocknet und autoradiographiert.

<u>Puffer I:</u>	10 mM HEPES pH7,9; 10 mM KCl; 1,5mM MgCl ₂ ; 0,1mM EDTA; 0,5 mM DTT; 0,5 mM Phenylmethylsulfonylfluorid
<u>Niedrigsalz-Puffer II:</u>	20 mM HEPES pH7,9; 25% Glycerin; 1,5 mM MgCl ₂ ; 0,2 mM EDTA; 0,5 mM DTT; 0,5 mM Phenylmethylsulfonylfluorid
<u>Hochsalz-Puffer II:</u>	20 mM HEPES pH7,9; 25% Glycerin; 0,8 M NaCl; 1,5 mM MgCl ₂ ; 0,2 mM EDTA; 0,5 mM DTT; 0,5 mM Phenylmethylsulfonylfluorid
<u>Puffer III:</u>	20 mM HEPES pH7,9; 20% Glycerin; 20 mM KCl; 1 mM MgCl ₂ ; 0,5 mM DTT; 0,5 mM Phenylmethylsulfonylfluorid
<u>1 x TBE:</u>	89 mM Tris; 89 mM Borat; 2 mM EDTA

3.4 RNA-Arbeitstechniken

3.4.1 Isolierung von gesamtzellulärer DNA

Die Isolierung gesamtzellulärer RNA erfolgte mit dem „RNeasy Midi“- bzw. „Mini-Kit“ der Firma QIAGEN. Alle Puffer und Lösungen sind Bestandteil des Kits und die Präparation erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

3.4.2 Nukleärer Run-On

Zur Hybridisierung von cDNA-Filterarrays (siehe 3.6) wurden RNAs eingesetzt, die in einem sogenannten Run-on-Verfahren radioaktiv markiert wurden. Bei dieser Methode werden Kerne isoliert und eingefroren, wobei die Transkription der RNA-Polymerase-Komplexe

stoppt. Nach dem Auftauen und Inkubation in Gegenwart von Nukleotidtriphosphaten, wird die Transkription fortgesetzt und radioaktive Nukleotide werden in die naszierende RNA eingebaut. Diese RNA wird isoliert und direkt mit den Filtern hybridisiert. In der Run-On-Reaktion markierte RNA gibt Aufschluß darüber, auf welchen Genen die Transkription von RNA-Polymerase stattfindet. Die Run-On-Methode gibt daher einen Hinweis auf die Dichte der RNA-Polymerase II-Moleküle eines bestimmten Gens zu einem bestimmten Zeitpunkt.

3.4.2.1 Isolierung von Zellkernen

Zur Präparation von Kernen wurden 3×10^7 Zellen abzentrifugiert (1200 rpm, 7 min., 4°C), das Zellsediment in 40 ml kaltem PBS gewaschen, erneut zentrifugiert und anschließend in 40 ml kaltem Lysepuffer 10 min. lang auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellkerne durch Zentrifugation (1500 rpm, 7 min., 4°C) pelletiert, vorsichtig in 100 µl TMEG-Puffer resuspendiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

Lysepuffer: 10 mM Tris-HCl (pH 7,5); 10 mM MgCl₂; 10 mM NaCl; 0,5 % (v/v) NP40
TMEG-Puffer: 50 mM Tris-HCl (pH 8,3); 5 mM MgCl₂; 0,1 mM EDTA/NaOH pH 8,0;
 40 % (v/v) Glycerin

3.4.2.2 Run-On-Reaktion

Eine Zellkernpräparation mit 3×10^7 Kernen wurde auf Eis aufgetaut, mit 100 µl 2 x Run-On-Puffer und 100 µCi α -³²P-CTP (800 Ci/mmol, 10 mCi/ml) versetzt und gut durchmischt. Die Transkriptionsreaktion erfolgte für 15 min. bei 28 °C. Danach wurden 50 U DNase I (RNase-frei) zugemischt und weitere 10 min. bei RT inkubiert. Die Behandlung mit DNase I wurde wiederholt, wenn Sarkosyl im Run-on-Puffer vorhanden war. Die Lösung wurde nun mit 20 µl Proteinase K/SDS behandelt und für mindestens 1 h bei 37 °C inkubiert. Die nicht eingebauten Nukleotide wurden über eine Sephadex G50-Säule (Laufpuffer: TE-Puffer) von den höhermolekularen Transkripten abgetrennt und diese in 400 µl TE-Puffer eluiert. Der radioaktive Einbau wurde in einem Benchtop Radioisotop Counter in cpm/ml bestimmt.

4 x Run-on-Puffer : 600 mM KCl; 10 mM MgCl₂; je 1 mM ATP, UTP, GTP;
 20 mM Tris-HCl (pH 8,0); 2,4 % (w/v) Sarkosyl
Proteinase K/SDS: 2,5 mg/ml Proteinase K, 2,5 % (w/v) SDS

3.5 Proteinarbeitstechniken

3.5.1 Immunoblot Analyse

Ca. 10^6 Zellen pro Ansatz wurden in 400 μ l TBST-Puffer bei 4°C lysiert. Die unlösliche Fraktion wurde durch Zentrifugation (10 min., 15000 Rpm, 4°C) abgetrennt. Um besonders unlösliche Protein-Aggregate zu lysieren (z.B. bei Δ C-LMP1) wurden die Zellen anstelle von TBST in STMG-Puffer lysiert und für 5s sonifiziert. Zur Denaturierung der Proteine wurden die Lysate mit SDS-Probenpuffer versetzt und für 5 min. bei 95°C erhitzt. Anschließend wurden die Proteine durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) in „mighty small“-Gelapparaturen (Hoefer) nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Als Molekulargewichtsstandard wurde der „BenchMark™ Prestained Protein Ladder“ (GibcoBRL, Lifetechnologies) verwendet. Die SDS-PAGE erfolgte bei 35 mA in 12,5 %-igen SDS-Gelen mit Sammelgel (Laemmli, 1970). Unmittelbar nach der Elektrophorese wurden die aufgetrennten Proteine mit Hilfe des „SemiPhor“-Elektroblotsystems von Hoefer auf eine Hybond-ECL Membran (Amersham) transferiert. Der Transfer erfolgte bei 80 mA innerhalb von 40 min. Nach dem Transfer der Proteine auf die Membran wurde diese für ca. 30 min. in Blocklösung geschwenkt, um unspezifische Proteinbindestellen abzusättigen. Anschließend wurde der Blot über Nacht mit dem primären Antikörper in Blocklösung bei 4°C inkubiert. Bei phosphospezifischen Antikörpern erfolgten die ersten beiden Schritte in Roti-Block (Roth). Vor Zugabe des Zweitantikörpers wurde die Membran dreimal 10 min. lang in Waschpuffer geschwenkt. Die Inkubation mit dem gegen den Primärantikörper gerichteten entsprechenden Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper in Blocklösung (Verdünnung 1:2000) erfolgte bei Raumtemperatur für 1 h. Der Immunoblot wurde wieder dreimal 10 min. lang gewaschen und anschließend mit Hilfe von verstärkter Chemilumineszenz (ECL, Amersham) nach Angaben des Herstellers entwickelt.

Sollte die Membran anschließend mit einem anderen Primärantikörper ein zweites Mal gefärbt werden, so wurden zunächst sämtliche gebundenen Antikörper wieder entfernt. Dies erfolgte durch Inkubation des Immunoblots in 40 ml Strip-Lösung für 20 min. bei 52°C. Nach dreimaligem Waschen für je 20 min. in Waschpuffer wurde die Membran erneut geblockt und mit Primärantikörper inkubiert.

TBST-Puffer:

20 mM Tris-HCl (pH 7,5); 150 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid; 0,5 mM β -Glyzerophosphat; 0,5 mM Natriumpyrophosphat; 0,5 mM Natriumorthovanadat; 0,5 mM Natriumfluorid; 0,5 mM Natriummolybdat; 1 % Triton X-100

<u>STMG-Puffer:</u>	6% SDS, 125 mM Tris-HCl (pH 7,4), 10% Mercaptoethanol, 10% Glycerol, 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid; 0,5 mM β -Glyzerophosphat; 0,5 mM Natriumpyrophosphat; 0,5 mM Natriumorthovanadat; 0,5 mM Natriumfluorid; 0,5 mM Natriummolybdat
<u>SDS-Probenpuffer (4 fach):</u>	100 mM Tris-HCl (pH 6,8); 4 % SDS; 20 % Glyzerin; 0,2 % Bromphenolblau
<u>12,5 % SDS-Gel (100 ml):</u>	40,4 ml H ₂ O; 16,5 ml 2 M Tris-HCl (pH 8,8); 825 μ l 0,5 M EDTA; 41,25 ml Acrylamid (30 %)/Bisacrylamid (0,8 %)-Lösung; 700 μ l Ammoniumpersulfat (APS)-Lösung (10 %) und 40 μ l N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)
<u>Sammelgel (10 ml):</u>	7,6 ml H ₂ O; 625 μ l 2 M Tris-HCl (pH 6,8); 100 μ l 10 % SDS; 1,5 ml Acrylamid (30 %)/Bisacrylamid (0,8 %)-Lösung; 150 μ l Ammoniumpersulfat (APS)-Lösung (10 %) und 40 μ l N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)
<u>Transferpuffer :</u>	48 mM Tris; 39 mM Glycin; 0,0375% SDS; 20% Methanol
<u>Blocklösung:</u>	20 mM Tris-HCl (pH 7,4); 150 mM NaCl; 5 % Magermilchpulver
<u>Waschlösung:</u>	20 mM Tris-HCl (pH 7,4); 150 mM NaCl; 1 % Tween-20
<u>Strip-Lösung</u>	125 mM Tris-HCl (pH 6,8); 10 % SDS; 10 mM DTT

3.5.2 Immunpräzipitation

5x10⁶ B2264-19/3-Zellen wurden vor bzw. nach 30-minütiger NGF-R:LMP1-Stimulation in 200 μ l RIPA-Puffer lysiert und Zelltrümmer durch Zentrifugation (15000 rpm, 10 min., 4°C) abgetrennt. 50 μ l Protein A-Sepharose (Roche) wurden zweimal in RIPA-Puffer gewaschen, in 15 μ l Puffer resuspendiert und mit 10 μ l α STAT1-Antikörper (p84/p91 C-136; 200 μ g/ml) für 1 h bei 4°C in einem Überkopfschüttler präinkubiert. Anschließend wurde das Zelllysate zugegeben und über Nacht bei 4°C mit der Sepharose-Antikörpermischung weiter inkubiert. Als Negativkontrollen dienten Ansätze ohne Zugabe von STAT1 Antikörper bzw. ohne Zugabe von Zelllysate. Nach der Sedimentation der Sepharosekügelchen (15300 rpm, 1 min., 4°C) folgten drei Waschschrte in je 1 ml TBST (siehe 3.5.1). Das gebundene STAT1-Protein wurde durch 5-minütige Inkubation in 40 μ l TBST/ 10 μ l SDS-Probenpuffer (siehe 3.5.1) von der Protein A-Sepharose gelöst. Vom Überstand wurden nach einem kurzen Zentrifugationsschritt (15300 rpm, 1 min., 4°C) jeweils 10 μ l durch 7,5%-ige SDS-PAGE aufgetrennt. Phosphoryliertes STAT1-Protein konnte dann im Immunoblot mit einem α Phosphotyrosin-Antikörpermischung (PY20/4G10) nachgewiesen werden.

<u>5x RIPA-Puffer:</u>	100 mM Tris-HCl (pH 7,5); 750 mM NaCl, 5% Triton X-100, 2,5% Desoxycholat, 0,5% SDS, 10 mM DTT, 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid; 0,5 mM β -Glyzerophosphat; 0,5 mM Natriumpyrophosphat; 0,5 mM Natriumorthovanadat; 0,5 mM Natriumfluorid; 0,5 mM Natriummolybdat
------------------------	--

3.6 Analyse von cDNA Microarrays

ATLAS-Filter beinhalten etwa 1200 verschiedene cDNAs von 200-500bp Größe, die an definierten Positionen auf dem Filter immobilisiert sind. Die Position und Beschreibung der cDNAs kann auf der Clontech Homepage eingesehen werden, unter <http://www.clontech.com/atlas/genelists/index.html>.

Die Herstellung radioaktiv-markierter Run-On-RNA wurde bereits unter 3.4.2 beschrieben. Die verwendeten ATLAS-Arrays (Human1.2-I/II/III und Human cancer 1.2 der Firma Clontech) wurden bei 65°C für 1 h in 10 ml Hybridisierungsmix prähybridisiert. Die gereinigten, radioaktiv markierten nukleären Transkripte wurden für 5 min. bei 95°C denaturiert und in 5ml Hybridisierungsmix bei 65°C für 36 h mit den Filtern hybridisiert. Die ATLAS-Filter wurden danach bei 45 °C zweimal mit Waschpuffer I und zweimal mit Waschpuffer II gewaschen (je 20 min.). Es schloss sich eine RNase A-Behandlung in Waschpuffer III (15 min. bei 30 °C) und eine abschließende Waschung mit Waschpuffer II bei 45 °C an. Da RNase A nur einzelsträngige RNA degradiert, waren RNA/DNA-Hybride auf dem Filter vor Abbau geschützt. Mit dieser Behandlung wurde erreicht, dass nur spezifische Hybridisierungen vor Abbau geschützt wurden und unspezifischer Hintergrund reduziert wurde.

Die quantitative Auswertung der Autoradiogramme erfolgte mit Hilfe der AtlasImage 1.5-Software von Clontech. Die durchschnittliche Intensität des Gesamthintergrunds wird von den jeweiligen Signalen subtrahiert, die dann als bereinigte Werte in die Kalkulation eingehen. Dies erlaubt einen Vergleich der Signalstärke und somit des Expressionsniveaus eines Gens auf verschiedenen Arrays. Differentielle Expressionen werden als „Difference“-Werte der jeweiligen Signalintensitäten oder als daraus kalkulierte „Ratio“-Werte (x-fache Induktion) ausgedrückt.

Hybridisierungsmix:	15 ml ExpressHyb (Clontech); 1,5 mg gescherte, denaturierte Heringssperma-DNA
Waschpuffer I:	1 % (w/v) SDS; 2xSSC
Waschpuffer II:	0,5 % (w/v) SDS; 0,1xSSC
Waschpuffer III:	2 x SSC; 1 mM EDTA

3.7 Analyse von Oligonukleotid-Arrays (Affymetrix Chips)

3.7.1 Herstellung von cDNA

Die Synthese von cDNA erfolgte mit dem „cDNA-Synthese-System“ von Roche Diagnostics nach Angaben des Herstellers. Als Ausgangsmaterial dienten 20 µg gesamtzelluläre RNA (3.4.1). Die Erststrangsynthese wurde mit oligo-dT₂₅-T7-Primer durchgeführt. Nach der Zweitstrangsynthese wurde die verbleibende RNA mit RNase I für 30 min. bei 37°C verdaut. Um für die folgenden Reaktionen störende Proteinreste zu entfernen, wurde der Reaktionsansatz mit Proteinase K für 30 min. bei 37°C inkubiert. Die doppelsträngige cDNA wurde durch Phenolextraktion gereinigt und nach Ethanol-fällung in 22 µl RNase-freiem Wasser aufgenommen.

3.7.2 Herstellung Biotin-markierter cRNA

Die Synthese von Biotin-markierter cRNA wurde mit dem „BioArray RNA Transcript Labeling Kit“ von Affymetrix nach Angaben des Herstellers durchgeführt. In die Reaktion wurde die cDNA aus dem gesamten Syntheseansatz (3.7.1) eingesetzt. Die Reinigung der synthetisierten cRNA erfolgte mit dem „RNeasyMini“ Kit (Qiagen). 20 µg cRNA wurden in Fragmentierungspuffer in einem Volumen von 40 µl für 35 min. bei 95°C inkubiert. Der Ansatz wurde bei -20°C gelagert oder sofort in die Hybridisierung eingesetzt.

5 x Fragmentierungspuffer: 200 mM Tris-Acetat (pH 8,1); 500 mM Kaliumacetat; 150 mM Magnesiumacetat

3.7.3 Hybridisierung und Waschen der Chips

15 µg fragmentierte cRNA wurde mit 162 µl Hybridisierungspuffer gemischt und mit RNase-freiem Wasser auf ein Volumen von 300 µl gebracht. Dieser Hybridisierungscocktail wurde bei -20 °C gelagert oder gleich in einen Genechip U95Av2 (Affymetrix, Santa Clara, CA) pipettiert und 16 h bei 45 °C unter Rotation inkubiert (Affymetrix Hybridization Oven 640). Kontroll-cRNA I-IV (BioB, BioC, BioD und Cre) und Kontroll-Oligonukleotide wurden von dem Genomic Center, University of Madison, Wisconsin, zur Verfügung gestellt. Die Kontroll-Oligonukleotide hybridisieren am Rande des Chip und als Kreuz in der Mitte des Chip. Diese Markierungen dienten zur Positionierung eines Gitters und Orientierung bei der Auswertung. Kontroll-cRNAs verschiedener Konzentration dienten als quantitative Kontrolle für die Hybridisierung.

Hybridisierungscocktail: 15 µg Proben-cRNA; Kontroll-cRNA I-IV (1,5; 5; 25 und 100 pM); 5 nM Kontroll-Oligonukleotide; 0,1 µg/µl sonifizierte Heringssperma-DNA; 0,5 µg/µl acetyliertes BSA; 75 mM MES Natrium-Salz und 27,5 mM MES freie Säure (2-[N-Morpholino]ethansulfonsäure).

Nach der Hybridisierung wurde der Chip in einer Waschstation (Affymetrix FluidicsStation 400) gemäß Herstellerangaben computergesteuert mit nicht stringenten und stringenten Puffern gewaschen. Zur Detektion und Verstärkung der Fluoreszenzsignale wurde der Chip mit Färbelösung 1-3 behandelt. Zwischen jeder Behandlung und abschließend wurden die Chips mit nicht-stringentem Puffer gewaschen.

Nicht-stringenter Waschpuffer: 75 mM MES Natrium-Salz; 27,5 mM MES freie Säure; 26 mM NaCl; 0,01% Tween 20

Stringenter Waschpuffer: 0,9 M NaCl; 60 mM NaH₂PO₄; 6 mM EDTA; 0,005 % Triton; 0,02 % Tween 20; 0,1 g/l Antifoam-30

Färbelösung 1: 1 mg/ml Streptavidin in 600 µl Färbepuffer

Färbelösung 2: 10 mg/ml Ziegen-IgG; 0,5 mg/ml biotinylierter αIgG in 600 µl Färbepuffer

Färbelösung 3: 1 mg/ml Streptavidin-Phycoerythrin (SAPE) in 600 µl Färbepuffer

Färbepuffer: 150 mM MES Natrium-Salz; 200 mM MES freie Säure; 1,85 M NaCl; 0,1% Tween 20; 0,01% Antifoam O-30

3.7.4 Beschreibung der Affymetrix Chips

Es wurden GeneChip® U95Av2 Arrays der Firma Affymetrix (Santa Clara, CA) verwendet. Auf diesem Chip (= 1,28 x 1,28 cm² Glasplättchen) sind Sequenzen von 12625 verschiedenen cDNAs repräsentiert. Die Sequenzen entstammen der Datenbank „GenBank“ und können unter <http://www.netaffx.com> eingesehen werden. Etwa 10⁷ Kopien eines Oligonukleotids von durchschnittlich 25 Basenpaaren Länge werden auf eine Fläche von 20 µm x 20 µm direkt auf die Chipmatrix synthetisiert. Diese Fläche wird als Probenzelle bezeichnet. Die Sequenz dieses Oligonukleotids entspricht exakt derjenigen einer cDNA und wird mit PM (PerfectMatch) bezeichnet. Direkt neben eine PM-Zelle wird ein Oligonukleotid mit einem homomeren Basenaustausch an Position 13 des Oligonukleotids aufsynthetisiert und mit MM (MisMatch) bezeichnet. Ein Probenpaar (PP) besteht aus einer PM- und einer MM-Zelle. 16 Probenpaare entsprechen 16 verschiedenen Sequenzen jeder einzelnen cDNA und werden als Probenset (PS) bezeichnet (Abb.3.1). Die Mitglieder eines Probensets sind auf dem Chip nicht direkt nebeneinander positioniert, sondern die verschiedenen Probenpaare werden über den gesamten Chip verteilt, so dass z.B. bei mechanischer Schädigung eines Teilbereichs der Hybridisierungsfläche (Kratzer o.ä.) nicht die Information eines gesamten Probensets verloren geht.

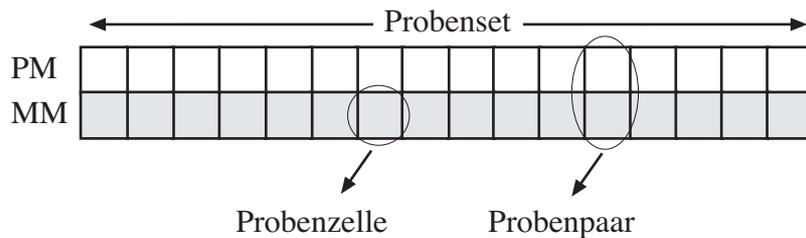


Abb.3.1: Schematische Darstellung eines Probensets des U95Av2 Genechips (Affymetrix)

Ein Proben-set setzt sich aus 16 verschiedenen Probenpaaren zusammen, die jeweils aus einer PM (PerfectMatch)-Probenzelle und einer MM (MisMatch)-Probenzelle bestehen.

3.7.5 Scannen des Chip

Das Scannen der Chips erfolgte mit einem HP GeneArray™ Scanner (Affymetrix). Die durch einen Laser erzeugte Fluoreszenz wird bei einer Auflösung von $3\mu\text{m}/\text{Pixel}$ als sogenannte .Dat Datei gespeichert. Damit werden ca. 64 Pixel/Probenzelle berechnet. Da die Intensitäten aufgrund von Randeffekten u.ä. auf der Fläche nicht gleichmäßig verteilt sind, wird eine durchschnittliche Intensität pro Probenzelle berechnet (.CEL Datei). Die .CEL Datei bildet die Grundlage der quantitativen Datenauswertung, die als „signal“- , „detection“- und „detection p-value“-Werte (3.7.6.2) in der .CHP Datei gespeichert werden.

3.7.6 Auswertung der Affymetrix Chips

Im folgenden werden die wichtigsten Schritte bei der Auswertung der Chips beschrieben. Die englischen Originalbezeichnungen und Abkürzungen wurden weitgehend beibehalten, um Ungenauigkeiten bei der Übersetzung zu vermeiden. Zusätzlich zu Microarray Suite 5.0 von Affymetrix (statistische Algorithmen unter http://www.affymetrix.com/products/statistical_algorithms_reference_guide_content.html) wurden die Programme „The Equalizer“ (Stuart et al., 2001), „Significance Analysis of Microarrays“ (SAM) (Tusher et al., 2001), „Cluster“ und „Treeview“ (Eisen et al., 1998) für die Datenanalysen eingesetzt.

3.7.6.1 Hintergrundsubtraktion

Hintergrundintensitäten entstehen durch unspezifische Bindungen des Streptavidin-Phycoerythrin-Konjugats an die Chipmatrix. Zur Subtraktion des Hintergrunds wird der Chip in 16 Sektoren unterteilt. Dem Zentrum jedes Sektors wird eine durchschnittliche Hintergrundintensität zugeordnet. Anschließend wird ein sogenannter „weighting“ Faktor bestimmt (Reziprok-Wert aus der Summe einer Konstante und dem Quadrat der Distanz einer

Probenzelle zum Zentrum des Sektors). Unter Anwendung des „weighting“ Faktors wird der Hintergrund jeder einzelnen Probenzelle berechnet und von deren Signalintensität subtrahiert.

3.7.6.2 „detection“, „detection p-value“ und „signal“

Der Parameter „detection“ drückt aus, ob ein Transkript verlässlich detektiert wird und damit als „present“ gilt oder nicht detektierbar und somit „absent“ ist. Für diese Definition wird ein „detection p-value“ berechnet, der das Signifikanzniveau der Detektion angibt. In die Berechnung des „detection p-values“ geht der sogenannte „discrimination score“ (R) ein, der ein Mass ist für die Spezifität der Hybridisierung. $R = \frac{PM - MM}{PM + MM}$, d.h. „R“ gibt das Verhältnis der spezifischen Intensität (PM-MM) zur Gesamtintensität (PM+MM) eines Probenpaars an. Die Berechnung des „detection p-values“ basiert auf der nicht-parametrischen Methode nach Wilcoxon (Wilcoxon's signed rank test: Wilcoxon, 1945). Der „discrimination score“ jeden Probenpaars wird dabei mit einem gegebenen Grenzwert τ (empfohlener Wert: 0,015) verglichen. Probenpaare, deren „discrimination score“ höher ist als τ werden als „present“ definiert. Je größer dabei die Differenz zu τ ist, desto kleiner wird der „p-value“ und somit umso wahrscheinlicher, dass das Transkript tatsächlich „present“ ist. Je höher der Grenzwert τ gesetzt wird, desto stringenter werden die Kriterien für einen „present call“. Um einen „detection call“ zu definieren wird der „detection p-value“ eines Probensets auf einer Achse mit zwei benutzerdefinierten Grenzwerten (α_1 und α_2) aufgetragen (Abb.3.2). „p-values“ $< \alpha_1$ (empfohlener Wert 0,04) definieren das Transkript als „present“, „p-values“ zwischen α_1 und α_2 (empfohlener Wert: 0,06) als „marginal“ und Transkripte mit „p-values“ $> \alpha_2$ gelten als „absent“.

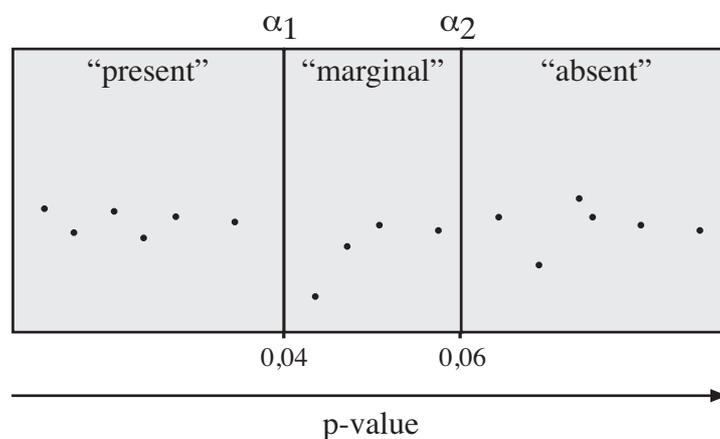


Abb.3.2: Bestimmung des „detection calls“

Die „signal“ Werte repräsentieren die relative Expressionshöhe eines Transkripts auf dem Chip. Die Berechnung beruht auf der „One-Step Tukey’s Biweight“-Schätzung (Press, 1992) (<http://mathworld.wolfram.com/TukeysBiweight.html>). Aus der MM-Intensität wird ein sogenanntes Streusignal berechnet, das von der PM-Intensität subtrahiert wird. Die log-Werte der bereinigten PM-Intensitäten werden dann entsprechend ihres Abstandes zum Median gewichtet. Der Wert eines Probenpaares erhält umso mehr Gewichtung, je näher er dem Median des gesamten Probensets ist. Damit vermeidet man die Überbewertung von „outliers“. Der Durchschnitt aus den gewichteten Intensitätswerten repräsentiert dann das metrische „signal“.

3.7.6.3 Normalisierung

Die Normalisierung der Daten erfolgte mit dem Programm „The Equalizer“ (Stuart et al., 2001), das unter <http://organogenesis.ucsd.edu/TheEqualizer.htm> oder rostuart@uscd.edu erhältlich ist. Diese „invariant set“ Normalisierung nach Stuart et al. beruht auf der Annahme, dass in jedem Datensatz ein Set von Genen existiert, deren Expressionsniveau sich unter den verschiedenen Versuchsbedingungen nicht signifikant ändert. Zunächst werden alle Fluoreszenzdaten, d.h. die „signal“-Werte nach ihrer Intensität sortiert (sogenanntes „ranking“). Anschließend werden die Gene, die in den verschiedenen Arrays ähnliche „ranks“ zeigen, als „unchanged“ definiert. Dieses Datenset bildet dann die Grundlage für eine nicht-lineare Normalisierung.

3.7.6.4 Detektion von differentiell exprimierten Genen

Nach erfolgter Normalisierung der verschiedenen Arrays wurde für die Detektion von differentiell exprimierten Genen die permutationsbasierte Methode SAM („Significance Analysis of Microarrays“) nach Tusher et al. (Tusher et al., 2001), angewandt. Das Programm ist als „add-in“ für Microsoft Excel frei erhältlich unter <http://www-stat.stanford.edu/~tibs/SAM/>. Als erster Schritt wird die relative Differenz der Expression von Genen bei verschiedenen Versuchsbedingungen unter Berücksichtigung der Variabilität in den verschiedenen Replikaten berechnet. Der Datensatz wird dann mehrfach permutiert und die relativen Differenzen auf Basis der permutierten Daten neu kalkuliert. Für die Mehrzahl der Gene sind die Werte aus original- und permutierten Datensätzen in etwa gleich. Gene, bei denen sich diese Werte um mehr als einen bestimmten Grenzwert unterscheiden, werden als differentiell exprimiert definiert. Basierend auf der Anzahl der Gene, die bei einem

bestimmten Grenzwert definiert wurde, wird eine Fehlerquote (false detection rate, FDR) errechnet.

3.7.6.5 Clustern

Dieser letzte Schritt der Datenanalyse diente zum Vergleich der Expressionsprofile einzelner Gene unter verschiedenen Versuchsbedingungen, z.B. verschiedenen Induktionszeiten. Mit dem Programm „Cluster“ wurde sogenanntes hierarchisches Clustern nach Eisen et al. (Eisen et al., 1998) durchgeführt, d.h. es wurden Gene mit ähnlichen Expressionsprofilen zusammen gruppiert. Die graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgte mit dem Programm „Treeview“ (Eisen et al., 1998). Beide Programme sind frei erhältlich unter <http://rana.lbl.gov/EisenSoftware.htm>.

3.8 Mäuse

Für die *in vivo* Untersuchung des onkogenen Potentials von Δ LMP1-LCLs im Vergleich zu LCLs, die mit Wildtyp-LMP1-EBV etabliert wurden, wurden acht Wochen alten SCID (severe combined immunodeficiency) Mäusen (Fox Chase) intraperitoneal 3×10^6 , 3×10^7 oder 1×10^8 Zellen der jeweiligen Zelllinie injiziert. Beim Auftreten klinischer Krankheitssymptome wurden die Mäuse aus dem Versuch genommen und auf pathologische Veränderungen hin untersucht.

4. Ergebnisse

4.1. Herstellung rekombinanter EBVs

Die Voraussetzung für die Manipulation von beliebigen EBV Genen wurde durch die Klonierung des gesamten EBV Genoms geschaffen (Delecluse et al., 1998). Durch den Einbau eines prokaryontischen F-Plasmids und des Chloramphenicol-Acetyltransferase Gens in das EBV Genom war es möglich, dieses sogenannte Maxi-EBV Plasmid p2089 (von p2089 abstammende Viruspartikel werden als 2089 bezeichnet) in *E.coli* zu etablieren. Zusätzlich trägt p2089 das Gen für das „green fluorescence protein“ (GFP) unter Kontrolle eines CMV Promotors und das Hygromycin-Phosphotransferase-Gen. Diese Gene erlauben eine Selektion des Maxi-EBVs in eukaryontischen Zellen, wobei die GFP vermittelte Fluoreszenz eine einfache Identifizierung von erfolgreich transfizierten bzw. infizierten Zellen ermöglicht, da die Expression von GFP den Transport des viralen Genoms in den Zellkern voraussetzt. Nach Infektion von primären, humanen B-Zellen mit Maxi-EBV konnte gezeigt werden, dass das 2089 Virus alle Eigenschaften von Wildtyp-EBV besitzt und effizient B-Zellen immortalisiert (Delecluse et al., 1998). Im Rahmen dieser Arbeit wurden elf verschiedene LMP1-Mutanten im Maxi-EBV-Kontext etabliert. Die jeweiligen Mutationen wurden zunächst durch konventionelle Klonierungstechniken in den LMP1 Genlocus eingeführt. Dies erfolgte auf der Basis des intermediären Plasmids p2167.1 (Abb.4.1A), das 9467 Nukleotide von Wildtyp-EBV mit den Koordinaten # 163,473 bis # 649 des B95.8 Genoms, enthält. Zwischen dem BALF4- und dem LMP2A-Gen wurde in p2167.1 als Selektionsmarker das Kanamycinresistenzgen inseriert. Die jeweiligen p2167.1 Derivate dienten nach Restriktionsverdau als Donor eines linearen Fragments, das das mutierte LMP1 Allel, flankiert von ca. 200 bp langen homologen EBV Sequenzen, und das Kanamycinresistenzgen trägt. Dieses DNA-Fragment wurde in *E.coli* durch homologe Rekombination in das Maxi-EBV Plasmid p2089 eingebracht (Abb.4.1).

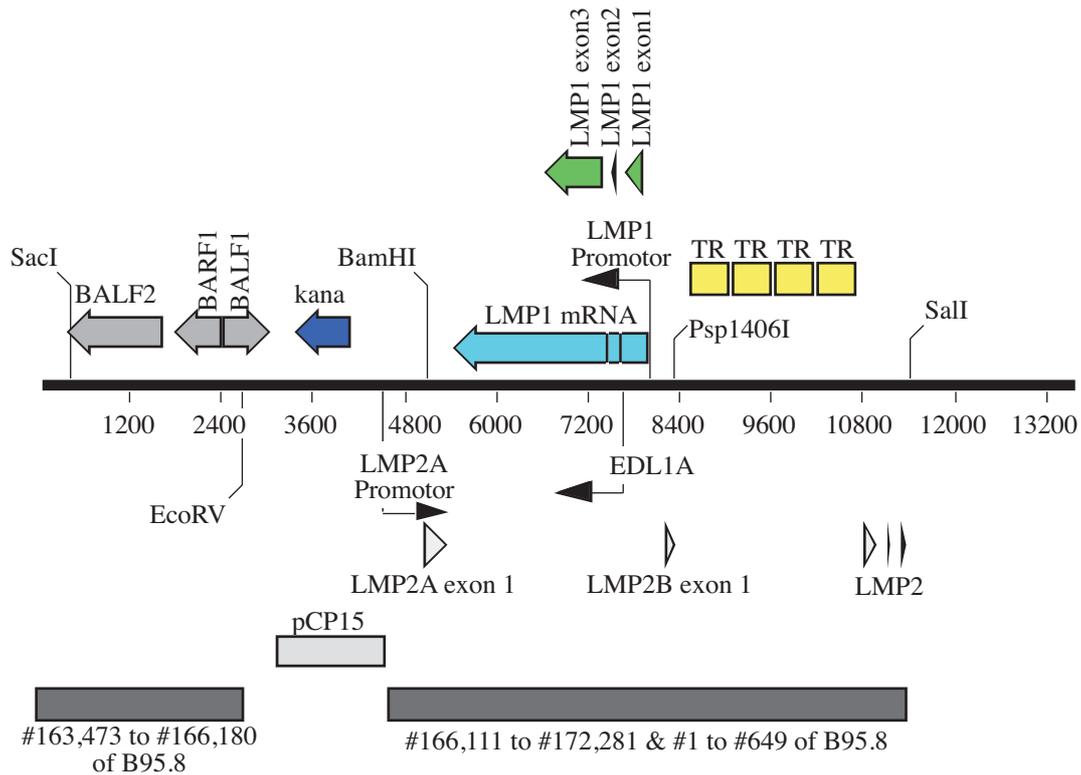


Abb.4.1A: Schematische Darstellung des intermediären Plasmids p2167.1

Dieses Plasmid trägt die B95.8 Sequenzabschnitte mit den Nukleotid-Koordinaten #163,473 bis #172,281 und #1 bis #649. An Position #166,180 (#3113 in p2167.1) wurde „downstream“ des BALF1-Gens ein 1472 bp langes Fragment aus dem Plasmid pCP15 (Cherepanov und Wackernagel, 1995) eingesetzt, das das Kanamycinresistenzgen enthält. Die dadurch unterbrochene Promotorsequenz von LMP2A wurde anschließend „downstream“ des pCP15 Fragments durch Insertion eines entsprechenden Sequenzabschnitts (#166,111-#166,180) rekonstruiert. Exon 1, 2 und 3 von LMP1 sind gezeigt. Zusätzlich dargestellt sind die Gene für BARF1 und BALF2, sowie die Exons von LMP2A bzw. B, die „terminal repeats“ (TR) und die Promotoren von LMP1, EDL1A (lytisches LMP1) und LMP2A.

4.1.1 Homologe Rekombination in *E.coli* BJ5183

Der *E.coli*-Stamm BJ5183 eignet sich aufgrund seines *recA*-positiv, *recBC*-negativen Genotyps zur homologen Rekombination eines linearen DNA-Fragments. Die relative Stabilität linearer DNA wird durch das Fehlen einer funktionellen Exonuclease V (Rec BCD) gewährleistet. Nach Transformation des jeweiligen linearen p2167.1 Derivats in den p2089/Maxi-EBV tragenden *E.coli* Stamm BJ5183 (Abb.4.1.B) wurden doppelresistente (Chloramphenicol/Kanamycin) Klone selektiert und die Plasmid DNA durch Restriktionsenzymanalysen überprüft (siehe Anhang I). Um das rekombinante Maxi-EBV genetisch zu stabilisieren, mußte die Plasmid DNA in den *recA*-negativen *E.coli*-Stamm DH10B überführt und dessen Integrität erneut überprüft werden.

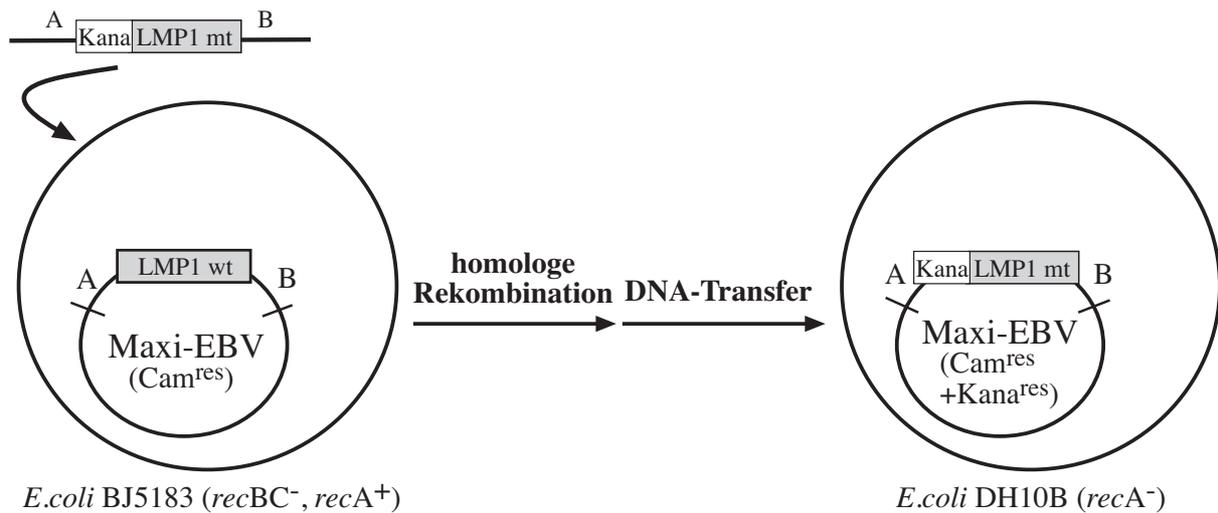


Abb.4.1B: Konstruktion von Mutationen im LMP1 Genlocus innerhalb eines Maxi-EBV-Genoms durch homologe Rekombination in *E.coli* BJ5183.

Die Abbildung zeigt schematisch das Maxi-EBV Plasmid (Wildtyp) in dem *E.coli*-Stamm BJ5183. Das lineare Fragment, das über konventionelle Klonierung hergestellt wurde, wird von zwei jeweils mindestens 200 bp langen homologen Sequenzen (A/B) flankiert und trägt neben dem mutierten LMP1-Genlocus einen Antibiotikaresistenzmarker (Kanamycin, Kana). Nach Selektion von doppelresistenten (Cam/Kana) Klonen wird die veränderte Maxi-EBV-DNA in den *recA*-negativen Stamm *E.coli* DH10B transferiert, um die DNA genetisch in einem *recA*⁻-Hintergrund zu stabilisieren.

4.1.2 Das Rekombinationssystem in *E.coli* DH10B

Als alternative Strategie wurde während dieser Arbeit ein temperatursensitives (ts) Rekombinationssystem entwickelt (B. Neuhierl, Abt. Genvektoren, GSF). Dadurch wird der zusätzliche Arbeitsschritt des DNA-Transfers in einen *recA*-negativen *E.coli*-Stamm obsolet (Abb.4.1.C). Der *E.coli*-Stamm DH10B enthält neben dem Wildtyp-Maxi-EBV das Plasmid p2650, das für die Rekombinase RecA und den ExonucleaseV-Inhibitor Red γ (Muyrers et al., 2000) kodiert. Die Replikation des ts-ori-Plasmids erfolgt bei der permissiven Temperatur von 30°C. Dieses Plasmid vermittelt zusätzlich die Resistenz gegen Ampicillin. Nach Transformation des linearen DNA Fragments und phänotypischer Expression bei 30°C, während der die homologe Rekombination stattfinden kann, wurden doppelresistente (Chloramphenicol/Kanamycin) Klone bei 42°C stabil in *E.coli* DH10B propagiert. Da bei dieser Temperatur das ts-ori Plasmid p2650 spontan verloren geht, konnte der erwartete Phänotyp (Cam^{res}, Kana^{res}, Amp^{sens}) leicht überprüft werden.

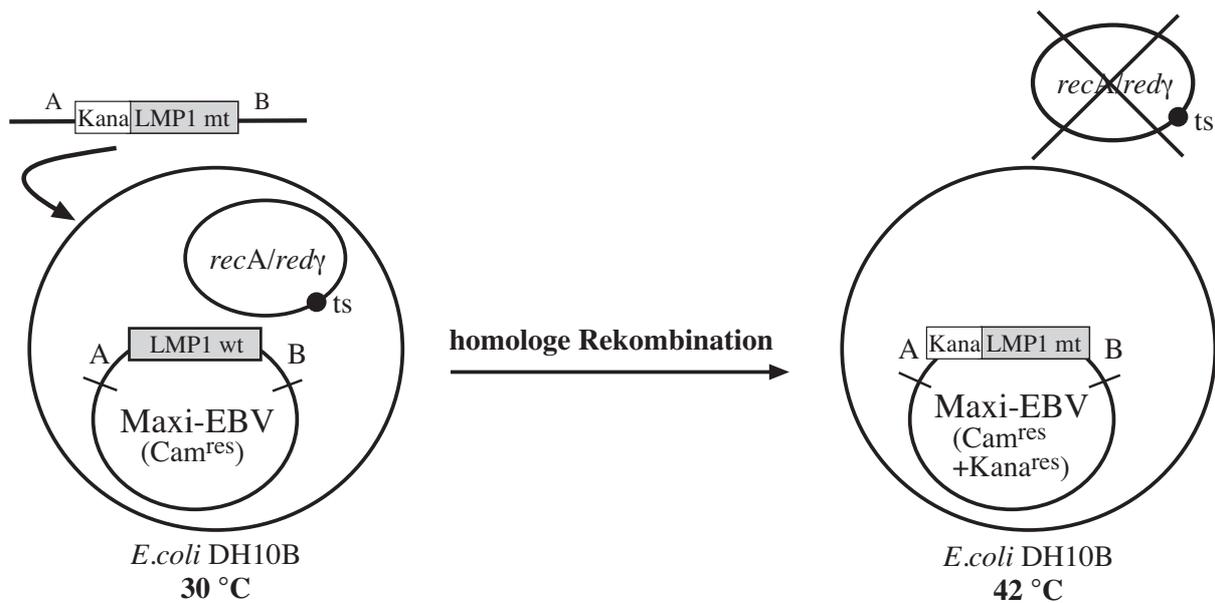


Abb.4.1C: Alternative Strategie zur Mutation des Maxi-EBV-Genoms in dem *E.coli*-Stamm DH10B.

Durch den Einsatz eines temperatursensitiven (ts) Rekombinationssystems wird der zusätzliche Arbeitsschritt des DNA-Transfers in einen *recA*-negativen Bakterienstamm wie bei 4.1.B obsolet. Eine stabile Replikation des ts-ori-Plasmids erfolgt nur bei 30°C, bei 42°C geht es spontan verloren. Nach Transformation des linearen DNA-Fragments und entsprechend langer phänotypischer Expression bei 30°C können die Klone direkt unter Doppelselektion (Cam/Kana) bei 42°C selektioniert und stabil in *E.coli* DH10B propagiert werden.

4.2 LMP1-Mutanten auf der Basis von Maxi-EBV

Nachdem die Domänenstruktur von LMP1 bereits intensiv untersucht wurde und ein Großteil der Signalmediatoren bekannt waren, die hauptsächlich mit dem C-Terminus von LMP1 interagieren, war es Ziel meiner Arbeit, den quantitativen Beitrag der verschiedenen Signalwege zum Prozess der B-Zell-Immortalisation zu klären und neue Zielgene von LMP1 zu identifizieren. Mit dem Maxi-EBV-System, das es erstmals erlaubte, Mutationen im Kontext des gesamten EBV Genoms zu untersuchen, wurden im Laufe dieser Arbeit elf verschiedene LMP1 mutierte EBVs hergestellt und für die Infektion von primären human B-Zellen eingesetzt. Alle im folgenden untersuchten LMP1-Mutanten und die jeweils betroffenen Signalwege sind in Abb.4.2 und Tab.1 dargestellt. Der kurze zytoplasmatische N-Terminus von LMP1 spielt eine Rolle bei der Interaktion des Proteins mit dem Zytoskelett, der Lokalisation von LMP1 in „lipid rafts“ und dessen Stabilität gegenüber der Degradation in Proteasomen. Diese Effekte scheinen allerdings nicht durch spezifische Interaktionen von N-terminalen Sequenzen, sondern vielmehr durch Positions- und Ladungseffekte verursacht zu sein. Der Aminosäurebereich von As 9-20 enthält Prolin-reiche Abschnitte, die Sequenzhomologien zu SH3-Erkennungs-Elementen aufweisen, die spezifische Interaktionen vermitteln könnten. In diesen Motiven wurden jeweils 3 bzw. 5 As gegen Alanin ausgetauscht (die Maxi-EBVs P9-10-15A-LMP1 und P12-15-16-19-20A-LMP1) (Abb.4.2.A). Drei

Mutationen wurden im Kontext der bereits definierten C-terminalen Aktivator-Regionen CTAR1, 2 und 3 eingeführt. Die Deletion des TRAF Bindemotivs in CTAR1 bei Δ PxQxT-LMP1 sollte zu einer verminderten Aktivierung von NF- κ B und des MAPK/ATF Signalweges führen. Die Punktmutation Y384G in CTAR2 dürfte die Bindung von TRADD und nachfolgende Induktion von NF- κ B und MAPK/ATF beeinträchtigen, sowie eine Aktivierung des JNK/AP1 Signalweges verhindern, dessen Mediatoren teilweise noch unklar sind. Eine Deletion des „33bp-repeats“ innerhalb von CTAR3 bei der Δ JAK3-LMP1 Mutante sollte die Bindung und Autophosphorylierung von JAK3 und Aktivierung von STATs verhindern. Neben diesen spezifischen Mutationen wurde eine Deletionsmutante (Δ C-LMP1) des gesamten C-Terminus konstruiert, von der erwartet wurde, dass sie im Verlust aller bisher bekannter LMP1-Signalwege resultiert (Abb.4.2C).

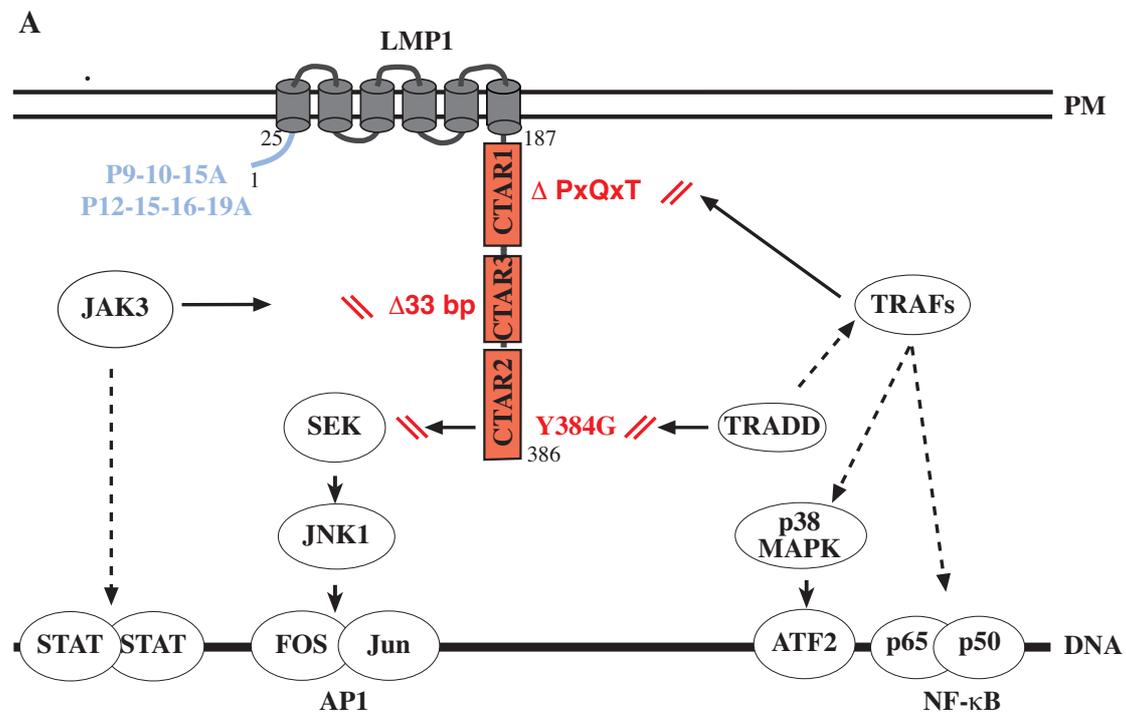
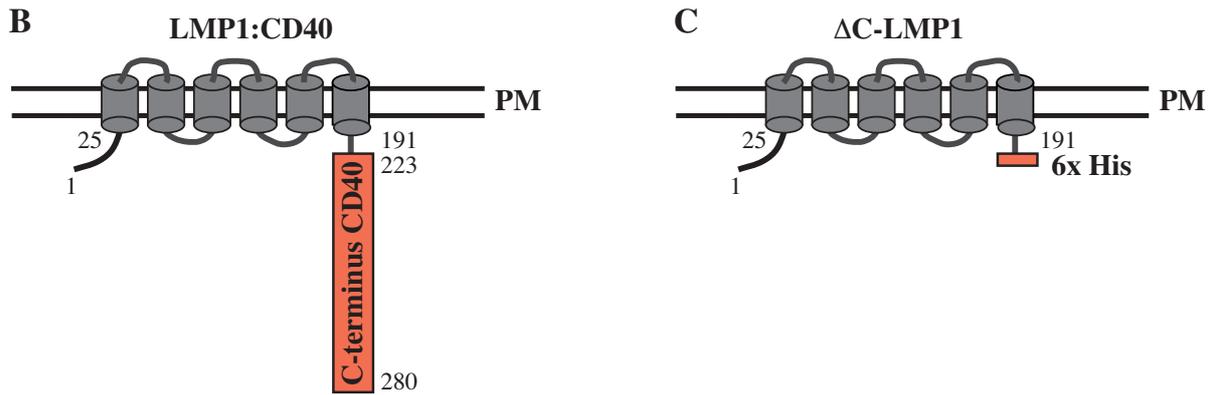


Abb.4.2 (A,B,C): Schematische Darstellung der LMP1-Mutanten und der betroffenen Signalwege.

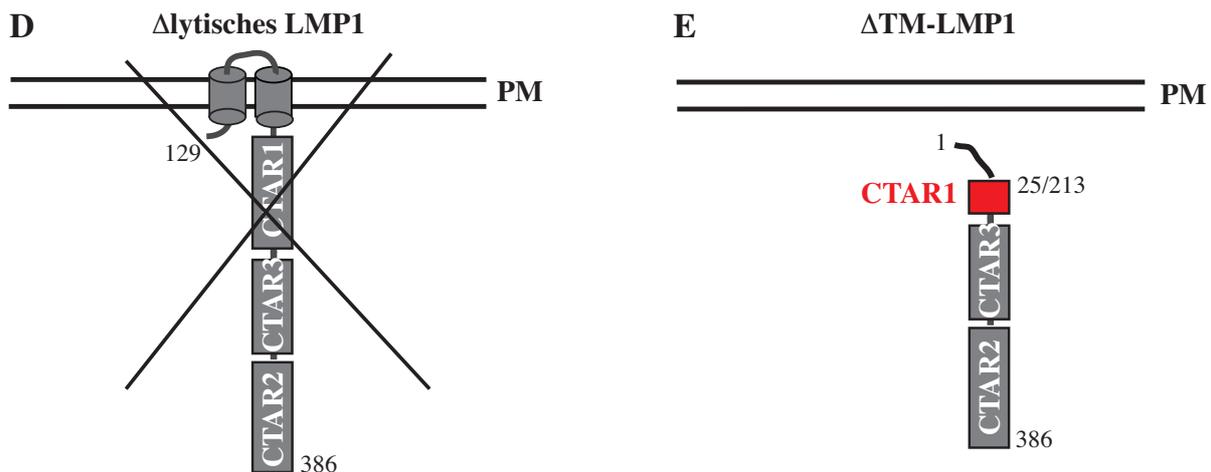
A) Dargestellt in hellblau sind die Mutanten P9-10-15A-LMP1 und P12-15-16-19-20A-LMP1, die den 25 As langen zytoplasmatischen N-Terminus von LMP1 betreffen. In diesen SH3-Erkennungs-Element ähnlichen Sequenzen wurden jeweils 3 bzw. 5 Proline gegen Alanin ausgetauscht.

Die drei in rot gezeigten C-terminalen Mutationen Δ PxQxT, Δ 33bp und Y384G betreffen jeweils eine der bereits bekannten CTARs. Bei der Mutante Δ PxQxT-LMP1 wurde das PxQxT-Motiv in CTAR1, also die Bindestelle für TRAFs, deletiert. Eine Interaktion mit TRAF2 und die Aktivierung der nachfolgenden Signalkaskade sollte dadurch nicht mehr stattfinden. Bei der Mutante Y384G-LMP1 wird durch einen singulären Aminosäure-Austausch (Y384G) die Bindung von TRADD innerhalb der CTAR2-Domäne verhindert. Als Konsequenz sollte die Aktivierung des p38 MAPK-Signalweges sowie die NF- κ B-Induktion beeinträchtigt sein und die JNK/AP1 Induktion verhindert werden. Eine Deletion des „33 bp-repeats“ innerhalb von CTAR3 bei der Δ JAK3-LMP1 Mutante dürfte in einem Verlust der JAK3 Autophosphorylierung und STAT-Aktivierung resultieren.



(B) Dargestellt ist die Mutante CD40:LMP1. Bei diesem chimären Molekül wurde die zytoplasmatische Domäne von LMP1 durch den C-Terminus von CD40 ersetzt. Die Transmembrandomäne von LMP1 vermittelt eine spontane Oligomerisierung des Proteins in der Plasmamembran und resultiert in einer konstitutiven Aktivierung des CD40-Signalweges.

(C) Die Deletion des gesamten C-terminalen Bereichs von LMP1 bei der Δ C-LMP1 Mutante führt zu einem Verlust aller bisher bekannten Signalwege des Moleküls. Zur Detektion dieser Mutante wurde ein 6xHis-tag an den C-Terminus angehängt.



(D) Das hier dargestellte Δ lytische LMP1 ist eine trunkeerte Form von LMP1 (As 129-386), die möglicherweise eine Rolle in der frühen Phase der EBV Infektion spielt und durch Entfernen des Promotors (EDL1A) deletiert wurde. Der EDL1A Promotor liegt innerhalb des ersten Introns des LMP1 Gens.

(E) Die Δ TM-LMP1 Mutante liegt als Resultat seiner fehlenden Transmembrandomäne in löslicher Form im Zytoplasma vor. Es wurde erwartet, dass dieses Protein nicht funktionell ist, da die Membranlokalisation für die Aktivität von LMP1 essentiell sein dürfte.

Nachdem LMP1 eine ganze Reihe von phänotypischen Effekten mit CD40 gemeinsam hat, interessierte uns die Frage, ob ein konstitutives CD40 Signal die LMP1 Funktionen bei der B-Zell-Immortalisation ersetzen kann. Zu diesem Zweck wurde ein Maxi-EBV etabliert, das ein LMP1:CD40 Chimär trägt (Gires et al., 1997). Dieses Molekül besteht aus dem N-terminalen und Transmembrananteil von LMP1, fusioniert mit dem zytoplasmatischen C-Terminus von

CD40 (Abb.4.2B). Die LMP1 Transmembrandomäne vermittelt die spontane Aggregation des Proteins in der Plasmamembran und sollte zu einer konstitutiven Aktivierung der CD40 Signaltransduktion führen.

Während der frühen Phase der EBV Infektion wird eine trunkierte Form von LMP1 (As 129-386) exprimiert, die auch als lytisches LMP1 bezeichnet wird (Erickson und Martin, 2000). Das Expressionsniveau des lytischen LMP1 beginnt 48 h nach Infektion abzufallen und ist nach 72 h nicht mehr detektierbar, während zu diesem Zeitpunkt das Gesamt-LMP1, auch als latentes LMP1 bezeichnet, sein volles Expressionsniveau erreicht und konstant bleibt (Erickson und Martin, 1997). Es liegen Hinweise vor, dass das lytische LMP1 bereits im Virion präsent ist und eine Rolle in der frühen Phase der EBV Infektion spielt. Zudem scheint das verkürzte Protein eine inhibitorische Wirkung auf die LMP1-vermittelte Signaltransduktion auszuüben (Erickson und Martin, 2000). Ob dies auch bei der B-Zell-Immortalisierung eine Rolle spielt, wollten wir mit Hilfe einer „knock out“ Mutation, dem Δ lytischen LMP1 untersuchen (Abb.4.2D). Zu diesem Zweck wurde der Promotor des lytischen LMP1, der im ersten Intron des LMP1 Gens lokalisiert ist, deletiert. Dabei wurde der entsprechende Sequenzabschnitt durch die cDNA von LMP1 ersetzt.

Eine sehr drastische Veränderung der LMP1 Struktur hat die Deletion der gesamten Transmembrandomäne (Δ TM-LMP1, Abb.4.2E) zur Folge, die in einer zytoplasmatischen Lokalisation des verkürzten LMP1 Proteins resultiert (Hammerschmidt et al., 1989). Dieses Δ TM-LMP1 sollte ohne Funktion sein, da die Lokalisation und Oligomerisierung des Proteins in der Plasmamembran essentiell sein dürfte für die Aktivität des Moleküls (Gires et al., 1997; Kaykas et al., 2001). Schließlich wurde noch eine Komplet-Deletion der gesamten kodierenden Region von LMP1 eingeführt, die in dem Maxi-EBV Δ LMP1 resultierte, von dem erwartet wurde, dass es kein immortalisierendes Potential aufweist.

Für die Verwirklichung des zweiten Teilprojektes, die Identifizierung von neuen LMP1 Zielgenen, wurde ein induzierbares Zellsystem entwickelt (4.6). Zu diesem Zweck wurde ein Maxi-EBV etabliert, das ein chimäres NGF-R (Nerve Growth Factor Receptor):LMP1 Oberflächenmolekül trägt (Gires et al., 1997) (Abb.4.10). Dieses Molekül besteht aus dem extrazellulären und Transmembrananteil des humanen „low affinity“ NGF-R und dem intrazellulären C-Terminus von LMP1. Aufgrund seiner fehlenden LMP1-Transmembrandomäne sollte dieses Protein in inaktiver Form vorliegen und erst nach

Quervernetzung des NGF-R-Anteils mit spezifischen Antikörpern einen funktionellen Signalkomplex bilden.

LMP1-Mutanten Maxi-EBV	mutierter Bereich	Mutation	erwarteter Phänotyp
P9-10-15A-LMP1 2276	As 9-15	P9A/P10A/P15 A	Interaktion mit Zytoskelett und Lokalisation in „lipid rafts“ beeinträchtigt, Regulation der Protein-Stabilität beeinflusst, putatives SH3-Erkennungs-Element zerstört
P12-15-16-19-20- LMP1 2263	As12-20	P12A/P15A/P16A/P19A/P20 A	s.o.
Δ PxQxT-LMP1 2262	CTAR1	Δ PxQxT (As204-208)	TRAF-Bindemotiv deletiert => verringerte NF- κ B- und MAPK/ATF-Aktivierung
Y384G-LMP1 2265	CTAR2	Aminosäureaustausch Y384G	verringerte TRADD-Bindung => verringerte Aktivierung von NF- κ B und MAPK/ATF , keine Induktion von JNK/AP1
Δ JAK3-LMP1 2319	CTAR3	Δ 33 bp repeat/ Box1: 275-280/ 302-307 (As250-307)	JAK 3 Bindemotiv deletiert => keine Autophosphorylierung von JAK3 und Aktivierung von STATs
LMP1:CD40 2433	gesamter C-Terminus	As 1- 191 LMP1 fusioniert mit As 220-277 CD40	konstitutive CD40-Aktivität
Δ C-LMP1 2614	gesamter C-Terminus	Δ As 191-386 / His-tag	keine Aktivierung von NF- κ B MAPK/ATF, JNK/AP-1, JAK3/STAT
Δ -TM 2318	Transmem- brandomäne	Δ As 26-212	keine Oligomerisierung in der Membran, keine Interaktion mit dem Zytoskelett, keine konstitutive Aktivität
Δ lytisches LMP1 2447	Intron1	Δ Promotor lytisches LMP1/ Δ lytisches LMP1 (As129-386)	Verlust der dominant negativen Aktivität des lytischen LMP1
Δ LMP1 2597	gesamtes LMP1	Δ As1-384	keine B-Zell-Immortalisation (?)
NGF-R:LMP1 2264	N-Terminus und Transmembran- domäne	As 1-283 NGF-R fusioniert mit As 191-386 LMP1	keine Oligomerisierung, keine konstitutive LMP1-Aktivität konditionales LMP1

Tab.4.1: LMP1-Mutanten.

Übersicht der LMP1-Mutanten auf der Basis von Maxi-EBV, die in meiner Arbeit hergestellt und funktionell untersucht wurden.

4.3 Herstellung von mutanten EBVs

Die Produktion von rekombinanten Viruspartikeln erfordert mehrere Prozessschritte (Abb.4.3). Diese umfassen die homologe Rekombination in *E.coli* (4.1), die stabile Selektion von Maxi-EBV in 293-Zellen, die Induktion des lytischen Zyklus in 293-Produzenten-Zelllinien und eine Bestimmung der Virustiter nach Infektion von Raji-Zellen. Bei allen etablierten EBV-Mutanten wurde jeder dieser einzelnen Schritte durch sorgfältige genetische Analysen bis hin zur genotypischen Untersuchung der immortalisierten B-Zellklone überprüft (siehe Anhang I).

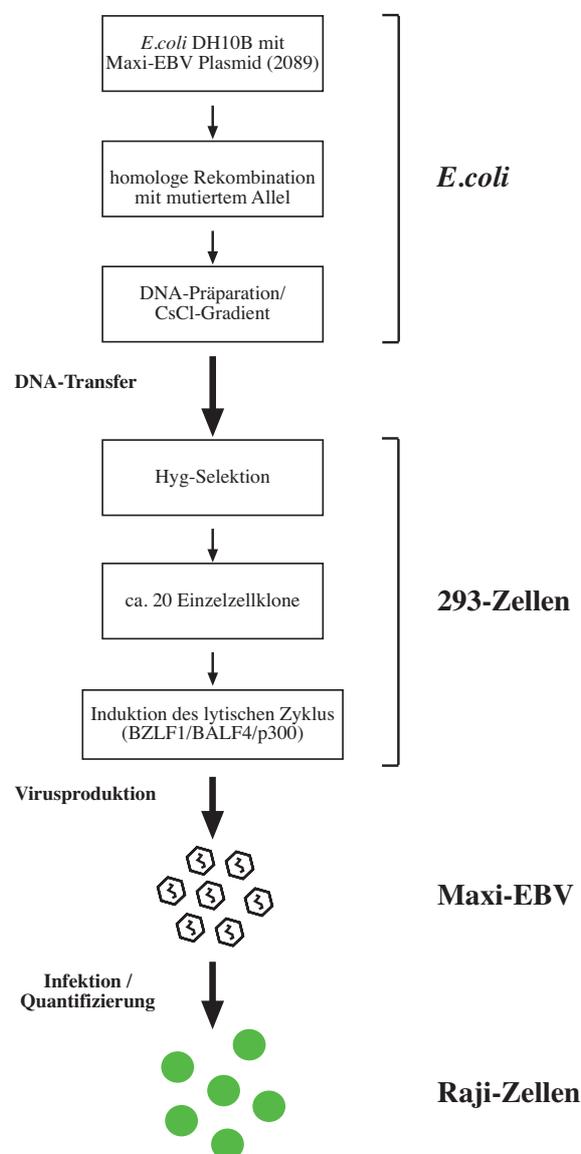


Abb.4.3 Prozessschritte zur Herstellung von rekombinanten EBVs

Dargestellt ist eine Übersicht, die die bereits in Abb.4.1 beschriebenen Schritte in *E.coli*, die nachfolgende Herstellung von rekombinanten Maxi-EBVs in 293-Zellen und den Nachweis infektiöser Partikel in Raji-Zellen beschreibt.

4.3.1 Etablierung stabiler und permissiver EBV-positiver 293-Zelllinien

Zur Generierung von Virusüberständen, die die verschiedenen EBV-Mutanten enthalten, müssen zunächst für jede Mutante mehrere stabile Zelllinien etabliert werden, die die Maxi-EBV Plasmide als extrachromosomale Kopien in latenter Form enthalten und an die Tochterzellen weitergeben. Darüber hinaus müssen diese Zelllinien den lytischen Zyklus von EBV nach Induktion des lytischen Programms unterstützen. Zu diesem Zweck wurde nach erfolgter homologer Rekombination in *E.coli* die Maxi-EBV Plasmid-DNA präpariert, über einen CsCl-Ethidiumbromid-Gradienten gereinigt und in 293 Zellen transfiziert. Nach 3-4-wöchiger Hygromycin-Selektion (100µg/ml Endkonzentration) konnten GFP positive Einzelzellklone expandiert werden. Der korrekte Genotyp der jeweiligen Maxi-EBV Plasmide wurde in diesen Zelllinien durch Analyse der gesamtzellulären DNA im Southernblot überprüft (siehe Anhang I).

4.3.2 Induktion des lytischen Zyklus und Bestimmung von Virustitern

Der Übergang von der Latenz in den lytischen Zyklus von EBV kann durch die Expression des Transaktivatorgens BZLF1 (Hammerschmidt und Sugden, 1988) eingeleitet werden. Zudem wird die Effizienz der Virusproduktion noch durch das virale Glykoprotein BALF4 (B. Neuhierl, Abt. Genvektoren, GSF) und die Histon-Acetyltransferase p300 gesteigert. Die selektierten 293-Klone wurden deshalb mit einem Cocktail aus Expressionsplasmiden transient transfiziert, die für BZLF1, BALF4 und p300 kodieren. Nach drei Tagen wurde die Induktion des lytischen Zyklus durch Immunfärbung von gp125, einem viralen Protein des VCA (Virales Capsid Antigen) Komplexes, nachgewiesen (Abb.4.4A,B). Der Kulturüberstand dieser Zellen wurde für die Infektion von Raji-Zellen, einer humanen Burkitt-Lymphom-Zelllinie, eingesetzt. Hierbei wurden jeweils 3×10^5 Raji-Zellen mit definierten Aliquots der Virusüberstände für 72 h bei 37°C inkubiert. Die GFP-Expression von infizierten Raji-Zellen konnte in einem invertierten Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden (Abb.4.4C,D). Sie erlaubt eine direkte Konzentrationsbestimmung von infektiösen Partikeln, die in der Regel 5×10^4 - 1×10^5 /ml betrug. Eine grüne Raji-Zelle wurde dabei als „Grüne Raji-Einheit“ (GRE), dem Äquivalent eines infektiösen Partikels definiert. Anhand dieser Information wurden die Virusüberstände der verschiedenen LMP1 mutierten Maxi-EBVs angeglichen und konnten daraufhin für die Infektion von primären humanen B-Zellen eingesetzt werden.

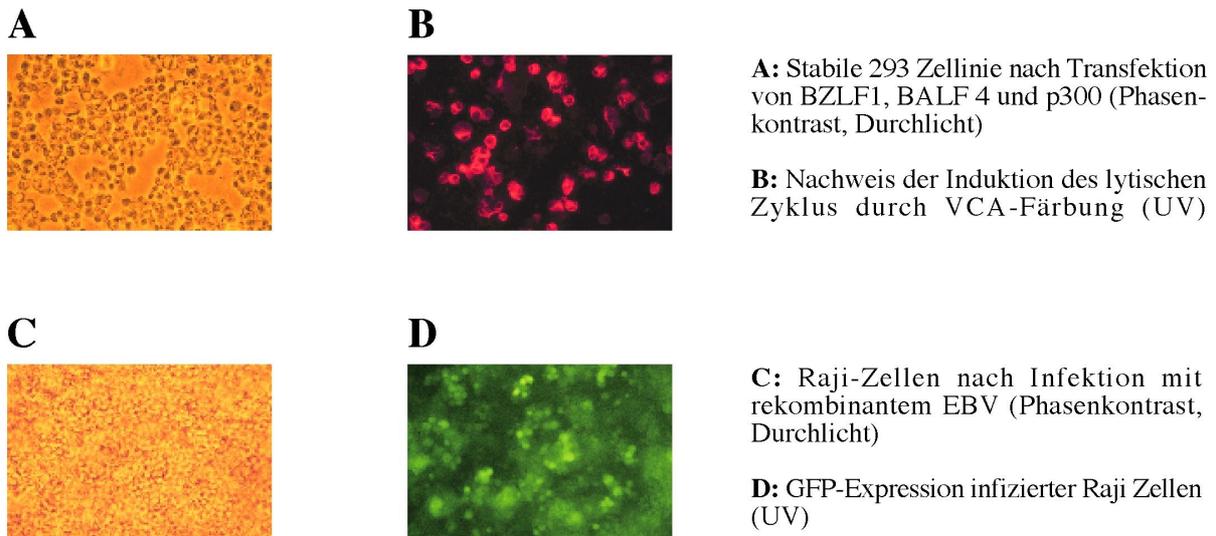


Abb.4.4: Induktion des lytischen Zyklus eines Maxi-EBV-Klons in 293-Zellen und GFP-Expression infizierter Raji-Zellen.

(A/B) In einer stabil mit Maxi-EBV transfizierten 293-Zelllinie wurde der lytische Zyklus durch Kotransfektion von Expressionsplasmiden für die Aktivatoren BZLF1, BALF4 und p300 induziert. Die Zellen wurden mit Aceton fixiert und als Nachweis der erfolgreichen Induktion des lytischen Zyklus von EBV eine Immunfärbung mit monoklonalem Antikörper gegen VCA (Virales Capsid Antigen) durchgeführt, das ein Schlüsselprotein für die lytische Phase von EBV ist. Die Detektion erfolgte mit einem Cy3-gekoppelten Sekundärantikörper in einem invertierten Fluoreszenzmikroskop. Der Kulturüberstand dieser Zellen wurde nach 3 Tagen geerntet und für die Infektion von Raji-Zellen eingesetzt. (C/D) 3×10^5 Raji-Zellen wurden 72 h lang mit 1 ml des Kulturüberstands bei 37°C inkubiert. Anhand der GFP-Expression der Raji-Zellen konnte auf eine erfolgreiche Infektion geschlossen und eine Titerquantifizierung mit Virusverdünnungen durchgeführt werden.

4.4 Infektion von primären humanen B-Zellen mit LMP1 mutierten Maxi-EBVs und Bestimmung der Immortalisationsfrequenzen

4.4.1 Infektion von humanen B-Lymphozyten mit Maxi-EBV in Flüssigkultur

Mit verschiedenen Verdünnungsstufen der angeglichenen Virusstocks von Wildtyp-2089 und Maxi-EBVs mit LMP1 mutierten Allelen wurden primäre B-Lymphozyten in 96-Loch-Platten infiziert (Einzelheiten siehe Material und Methoden). EBV infizierte B-Zellen werden routinemäßig auf letal γ -bestrahlten humanen embryonalen Fibroblasten (WI38) als „feeder layer“ gehalten. Diese standardisierte Vorgehensweise verbessert die Effizienz des klonalen Auswachsens immortalisierter B-Zellen durch bis jetzt nicht identifizierte, wahrscheinlich lösliche Faktoren (Sugden und Mark, 1977). Bereits etablierte LCLs proliferieren unbegrenzt auch in Abwesenheit von Feeder-Zellen. Nach 4-6 wöchiger Kultivierung wurde die Frequenz

bewachsener Löcher gegenüber Löchern, die keine proliferierenden B-Zellen aufwiesen, bestimmt. Es wurden nur Verdünnungsstufen in die Kalkulation einbezogen, die die statistische Voraussetzung einer „one hit“ Kinetik erfüllten (Frisan et al., 2001). Das ist der Fall bei einer 63%-igen Frequenz von positiven Ereignissen bzw. in unserem Fall bewachsenen Löchern. In die Kalkulation der jeweiligen Immortalisierungs-Effizienzen gingen die Ergebnisse von mindestens drei unabhängigen Experimenten ein. Die Auswertung erfolgte anhand der Anzahl von Viruspartikeln, die für die Etablierung eines Einzelzellklons benötigt wurde, ausgedrückt als GRE pro Klon (Tab.4.2). Alternativ wurden diese Werte als Verhältnis der Anzahl der Klone, die mit einer bestimmten Mutante immortalisiert wurden, gegenüber dem LMP1 „knock out“ Maxi-EBV Δ LMP1/2597 als x-fache Immortalisations-Effizienz dargestellt (Tab.4.2).

4.4.2 Infektion von humanen B-Lymphozyten mit Maxi-EBV in Softagar

Zusätzlich erfolgte eine Kultivierung Maxi-EBV infizierter B-Zellen in Softagar. Diese Methode bietet den Vorteil, dass die Anzahl proliferierender Einzelzellklone nach 4-6 wöchiger Kultivierung in Form von Zellkolonien sichtbar wird und sehr einfach bestimmt werden kann (Kempkes et al., 1995; Sugden und Mark, 1977). Primäre B-Zellen wurden zunächst mit verschiedenen Verdünnungsstufen der Virusstocks in kleinen Volumina über Nacht infiziert. Die Etablierung von immortalen Klonen erfolgte in 6-Loch-Platten, ebenfalls in Kokultur mit WI38 Feeder-Zellen, die letal bestrahlt und mit 0,5% agarosehaltigem Medium überschichtet wurden. Die infizierten B-Zellen wurden mit halbfester Agaroselösung gemischt (0,3% in Medium) und auf den bereits soliden „feeder layer“ ausplattiert. Nach 4-6 Wochen konnte die Anzahl der B-Zellklone bestimmt werden und einzelne Zellkolonien in Flüssigkultur weiter expandiert werden. Die Immortalisierungsfrequenzen wurde auch hier als Quotient von GRE pro Klon bestimmt und in Tab.4.2 mit aufgeführt. Prinzipiell war die Immortalisations-Effizienz bei allen eingesetzten Maxi-EBVs, sowohl 2089 (wt-LMP1), als auch den diversen LMP1 mutierten EBVs, in den Softagarversuchen um ein drei- bis fünffaches reduziert gegenüber den entsprechenden Experimenten in Flüssigkultur. Die relativen Werte der einzelnen Mutanten zu 2089 entsprachen dabei allerdings den in Flüssigkultur erhobenen Daten vollkommen. Somit scheinen die Kulturbedingungen im Softagar eine stringenter Selektion für das Auswachsen von immortalisierten Klonen zur Folge zu haben. Vermutlich spielen hierbei Faktoren wie der Konzentrationsgradient von Zytokinen oder das Fehlen des direkten Zell-Zell-Kontakts mit dem „feeder layer“ eine Rolle.

4.4.3 Immortalisations-Effizienzen von LMP1 mutierten EBVs im Vergleich zu 2089

Maxi-EBV-Konstrukte	Grüne Raji-Einheiten (GRE) / Klon	Immortalisations-Effizienz in %	Standardabweichung
wt-LMP1	4.6	100	-
P12-15-16-19-20A-LMP1	4.7	95.1	20.14
Δ JAK3-LMP1	5.0	91.07	28.62
Δ lytisches LMP1	5.8	78.68	20.68
P9-10-15A-LMP1	8.6	52.77	10.46
LMP1:CD40	9.1	49.92	2.60
Δ PxQxT-LMP1	32.9	13.92	6.85
Y384G-LMP1	47.9	9.69	4.01
Δ C-LMP1	110.8	4.12	2.22
Δ LMP1	438.0	1.24	0.37
Δ TM-LMP1	842.3	0.55	0.16

Tab.4.2: Immortalisations-Effizienz von LMP1-Mutanten.

Nach der Herstellung von LMP1-mutierten Maxi-EBVs in 293-Zellen wurden die Virustiter verschiedener Maxi-EBV-Konstrukte anhand der GFP-Expression von infizierten Raji-Zellen quantifiziert und angeglichen. Um die Virustiter auswerten und vergleichen zu können, wurde eine grüne Raji-Zelle als „Grüne Raji-Einheit“ (GRE), das Äquivalent eines infektiösen Partikels definiert. Spalte zwei zeigt eingesetzte GRE, d.h. infektiöse Partikel pro immortalisiertem B-Zellklon, ausgedrückt als „Grüne Raji-Einheiten“. Die Werte repräsentieren jeweils den Mittelwert aus mindestens drei unabhängigen Experimenten, wobei Ergebnisse aus Experimenten in Softagar mit einem Skalierungsfaktor von 3.5 in die Berechnung einbezogen wurden. Spalte drei repräsentiert die Immortalisierungs-Effizienz der jeweiligen LMP1-Mutanten im Verhältnis zu wt-LMP1, definiert als 100%. Spenderspezifische Abweichungen wurden auf einen wt-LMP1 Wert normalisiert, aufgrund dessen wurde bei wt-LMP1 keine Standardabweichung berechnet.

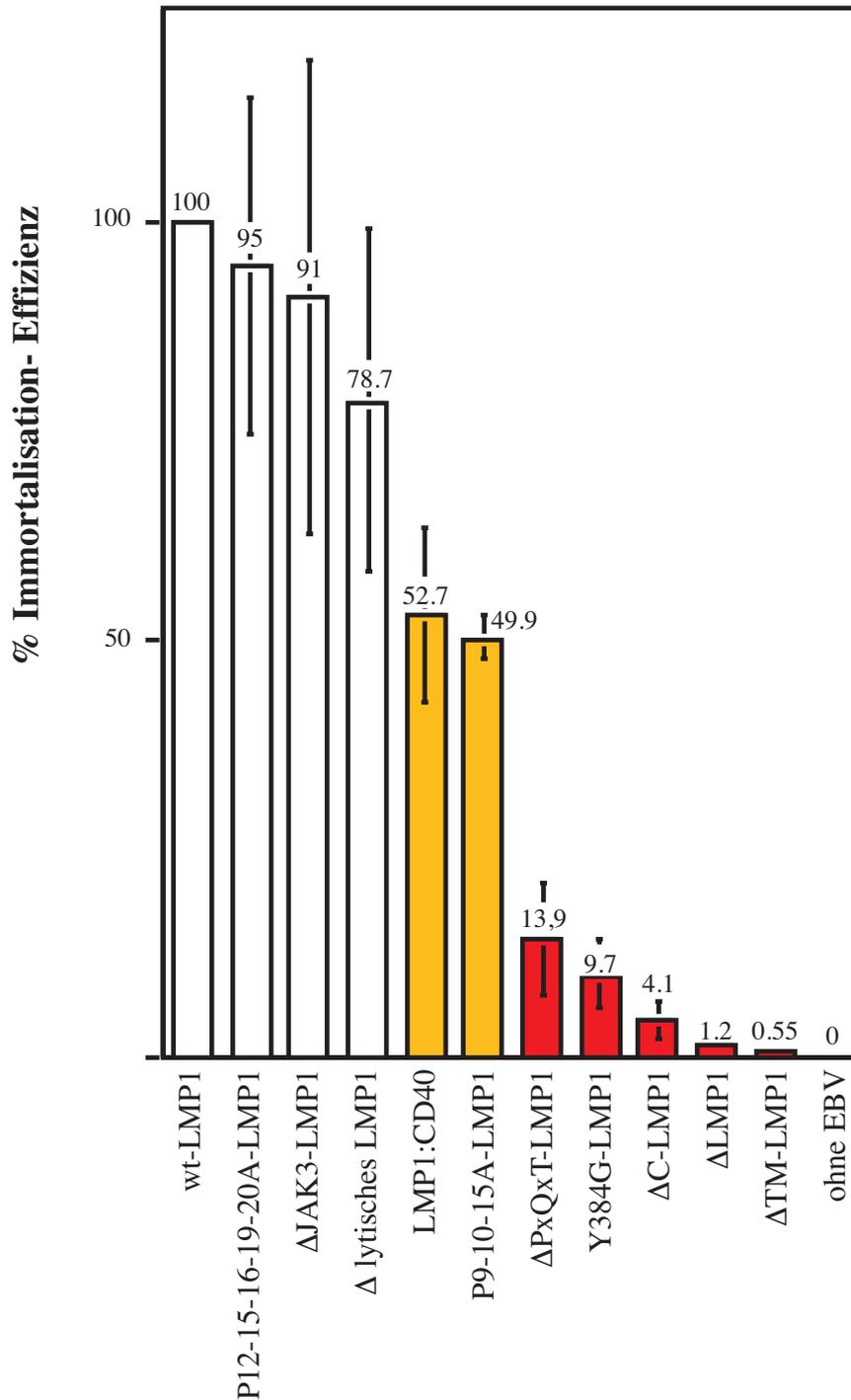


Abb.4.5: Maxi-EBV-spezifische Immortalisations-Effizienzen.

Maxi-EBV-spezifische Immortalisations-Effizienzen wurden wie in den Erläuterungen zu Tab.4.2 beschrieben, in % (y-Achse) ausgedrückt, wobei das Ergebnis von wt-LMP1 als 100% definiert wurde. Drei Gruppen lassen sich identifizieren: Die Effizienz der B-Zell-Immortalisation ist hoch und vergleichbar mit dem Maxi-EBV, das das Wildtyp-Allel trägt (weiß). Zwei Mutationen beeinträchtigen die B-Zell-Immortalisation geringfügig (gelb). Fünf der Mutanten führen zu einer schweren Beeinträchtigung der B-Zell-Immortalisierung (rot). Die Mutante ΔTM-LMP1 sticht besonders heraus, da ihre Immortalisations-Effizienz sogar noch geringer ist, als bei der vollständigen Deletion von LMP1. Die Standardabweichungen von ΔLMP1 und ΔTM-LMP1 wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht eingezeichnet und sind Tab.4.2 zu entnehmen.

Überraschenderweise war es möglich, mit allen LMP1 mutierten EBVs lymphoblastoide Zelllinien zu generieren. Das immortalisierende Potential der verschiedenen Mutanten konnte in drei Kategorien unterteilt werden (Tab.4.2, Abb.4.5). Die erste Gruppe von Mutanten zeigte eine hohe Immortalisations-Effizienz im Bereich von 2089 (wt-LMP1). Zu dieser Gruppe gehörte eine der N-terminalen Mutanten (P12-15-16-19-20A-LMP1), die Deletion des lytischen LMP1 Proteins (Δ lytisches LMP1) und das 33 bp deletierte Δ JAK3-LMP1. Die zweite Gruppe, die aus der N-terminalen Mutante P9-10-15A-LMP1 und der LMP1:CD40 Chimäre besteht, zeigte nur eine leichte Beeinträchtigung ihres immortalisierenden Potentials mit einer in etwa halbierten Effizienz im Vergleich zu 2089-Virusstocks (wt-LMP1). Eine deutliche Reduktion ihrer Immortalisations-Effizienz trat bei der dritten Gruppe von LMP1-Mutationen auf, die zu Reduktionen auf 0,45% bis 9,6% des Wildtyp-Niveaus führte. Das war der Fall bei den drei C-terminalen Mutationen Δ PxQxT-LMP1, Y384G-LMP1 und Δ C-LMP1, der Deletionsmutante der gesamten Transmembrandomäne (Δ TM-LMP1) und dem vollständigen LMP1 „knock out“ (Δ LMP1).

4.4.4 Charakterisierung von lymphoblastoiden Zelllinien mit mutiertem LMP1

Die klonale Identität etablierter LCLs und die Integrität der verschiedenen Maxi-EBV Plasmide wurde wie bereits bei allen vorhergehenden Prozessschritten durch Southernblot-Analysen überprüft (siehe Anhang). Von etwa 20 LCL Klonen jeder Mutante wurden dabei die zellulären DNAs analysiert. Zusätzlich wurden die mutierten LMP1 Genloci durch PCR amplifiziert, durch Restriktionsverdau untersucht und teilweise sequenziert (nicht gezeigte Daten). Die Expression mutierter LMP1 Proteine wurde durch Westernblots mit Hilfe verschiedener Antikörper untersucht. Mit einem Cocktail monoklonaler Antikörper, die gegen den C-Terminus von LMP1 gerichtet sind, konnten die beiden N-terminalen LMP1-Mutanten (P9-10-15A und P12-15-16-19-20A), die C-terminal mutierten Proteine Δ PxQxT-LMP1 und Y384G-LMP1, das Transmembrandomänen-deletierte LMP1 (Δ TM-LMP1), Wildtyp-EBV in LCLs mit der Δ lytischen LMP1 Mutante und die NGF-R:LMP1 Chimäre problemlos nachgewiesen werden (Abb.4.6). Alle mutanten Proteine zeigten das erwartete Laufverhalten und ein Expressionsniveau im Bereich von Wildtyp-LMP1. Als Wildtyp-Kontrolle dienten hierbei eine 2089 immortalisierte LCL bzw. die Zelllinie 721, die mit B95.8 immortalisiert

wurde. Das identische Expressionsniveau von LMP1 in diesen beiden Zelllinien bestätigt nochmals, dass das Maxi-EBV 2089 die Situation in wt-EBV adäquat widerspiegelt.

Das Δ C-LMP1 Protein, dessen kompletter C-Terminus deletiert ist, konnte nicht mit den herkömmlichen LMP1 Antikörpern, die ausschließlich gegen Epitope im C-Terminus des Moleküls gerichtet sind, detektiert werden. Da Δ C-LMP1 mit einem His-tag versehen ist (Ab.4.2C) konnte dessen Expression und Migrationsverhalten sowohl mit Hilfe eines α 6xHis-Antikörpers (Abb.4.7A), als auch mit einem Antikörper nachgewiesen werden, der gegen den N-Terminus von LMP1 gerichtet ist (Abb.4.7B). Da das Expressionsniveau von Wildtyp-LMP1 in immortalisierten B-Zellen normalerweise nicht ausreichend ist, um von dem wenig sensitiven N-terminalen Antikörper OT22CN detektiert zu werden (persönliche Mitteilung J. Middeldorp), scheint das Δ C-LMP1 in den von uns generierten LCLs deutlich überexprimiert zu sein. Dafür sprechen auch Immunfluoreszenzanalysen (Daten nicht gezeigt), die zudem massive intrazelluläre Aggregate von Δ C-LMP1 im Gegensatz zur klassischen Verteilung von Wildtyp-LMP1 sichtbar machten.

LMP1 Proteine aus LCLs, die mit Δ JAK3-LMP1 oder der LMP1:CD40 Chimäre immortalisiert wurden, konnten mit dem N-terminalen Antikörper nicht detektiert werden. Es gelang auch nicht, diese Proteine mit gegen C-terminale Epitope gerichteten monoklonalen Antikörpern nachzuweisen. In diesen Fällen sprachen die Ergebnisse der Southernblot-Analysen mit gesamtzellulärer DNA und die DNA Sequenzierung der LMP1 Genloci in den LCLs für eine korrekte Expression dieser LMP1-Mutanten (siehe Anhang I). Zudem liegt die Immortalisations-Effizienz dieser beiden LMP1-Mutanten im Bereich von Wildtyp-LMP1 bzw. ist nur geringfügig reduziert, was ebenfalls auf eine korrekte Expression der Proteine hinweist.

Wie erwartet, konnte ich in B-Zellklonen, die mit Δ LMP1-Maxi-EBVs generiert wurden, kein LMP1 Protein detektieren (Abb.4.8). Alle B-Zelllinien, die mit diesem Maxi-EBV immortalisiert wurden, waren EBV positiv in Southernblot-Analysen (siehe Anhang I) und exprimierten EBNA2. Eine Kontamination mit Wildtyp-LMP1 konnte ich definitiv ausschließen. Diese Ergebnisse zeigen, dass eine B-Zell-Immortalisation auch in Abwesenheit von LMP1 möglich ist, wenn auch die Effizienz gegenüber Wildtyp-EBV deutlich erniedrigt ist.

EBV infizierte B-Zelllinien werden wie bereits beschrieben, routinemäßig auf letal bestrahlten WI38-Zellen als „feeder layer“ etabliert. Dieses Vorgehen erhöht die Effizienz des klonalen

Auswachsen immortalisierter B-Zellen, wobei bereits etablierte LCLs auch in Abwesenheit von Feeder-Zellen unbegrenzt proliferieren. Dies traf auf sieben von elf meiner mit verschiedenen Maxi-EBV-Mutanten generierten Zelllinien zu. Im Gegensatz dazu blieben die LCLs, die mit Maxi-EBVs der Mutanten Δ C-LMP1, Δ TM-LMP1, der NGF-R:LMP1 Chimäre oder Δ LMP1 infiziert wurden, bei jeder weiteren Expansion von der Anwesenheit des „feeder layers“ abhängig. Wie schon die Experimente in halbfestem Medium nahelegten, ist der Effekt des Feeders auf einen oder mehrere lösliche Faktoren zurückzuführen. Konsequenterweise brachte auch die Kokultur in einem zweikammerigen Kulturgefäß den gewünschten Effekt (nicht gezeigte Daten).

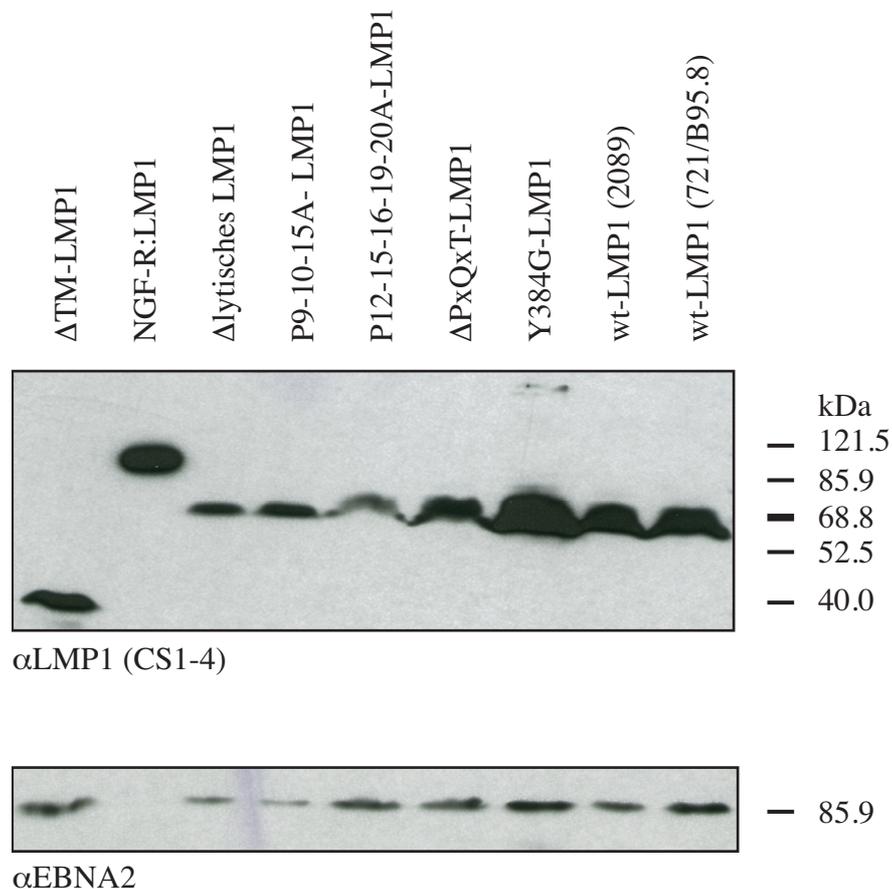


Abb.4.6: Nachweis der mutierten LMP1-Proteine in LCLs.

Um nachzuweisen, ob die verschiedenen LMP1-Mutanten in den LCLs exprimiert werden und das erwartete Migrationsverhalten zeigen, wurden in diesem Immunoblot alle mutierten LMP1-Proteine untersucht, die mit dem LMP1-Antikörper (CS1-4) über ihren C-Terminus leicht zu detektieren waren. Die Zelllinie 2089 resultiert aus einer B-Zell-Immortalisation mit dem unmodifizierten Maxi-EBV 2089. Die Zelllinie 721 wurde mit B95.8 (wt-EBV) immortalisiert. Beide Zelllinien exprimieren wt-LMP1. Der Westernblot gegen EBNA2 zeigt, dass in allen Spuren in etwa gleich viel Protein aufgetragen wurde, mit Ausnahme der NGF-R:LMP1-Probe. In diesem Fall wurde bewusst nur ca. 1/5 der Proteinmenge eingesetzt, da die signifikante Überproduktion des chimären LMP1 Proteins die Gelqualität negativ beeinträchtigt hätte.

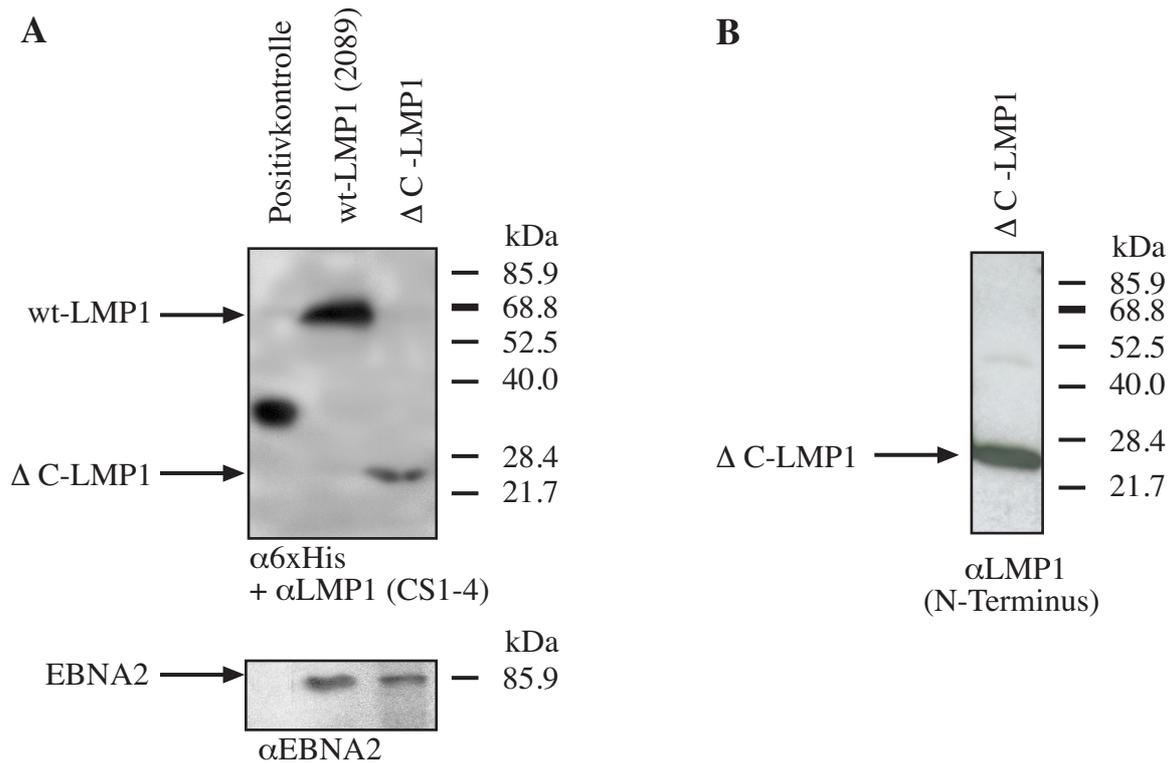


Abb.4.7 (A/B): Expression von ΔC-LMP1 in LCLs.

Die LMP1-Mutante ΔC-LMP1, dessen kompletter C-Terminus deletiert ist, konnte nicht mit dem herkömmlichen LMP1-Antikörper detektiert werden, da dieser ausschließlich Epitope im C-Terminus von LMP1 erkennt.

(A) Da ΔC-LMP1 mit einem 6xHis-tag versehen ist (siehe Abb.4.2.B), wurde die Expression und das korrekte Migrationsverhalten des mutierten Proteins mit einem α6 xHis-Antikörper nachgewiesen. Gezeigt ist eine Doppelinkubation des Immunoblots mit Antikörpern gegen 6 xHis und LMP1. Diese Antikörper-Kombination ermöglichte es, eine gleichzeitige Kontamination der ΔC-LMP1-LCL-Population mit wt-EBV-LCLs oder 2089-LCLs auszuschließen. Der αLMP1 (CS1-4)-Antikörper detektiert dagegen wie erwartet in den 2089-LCLs wt-LMP1. Als Positivkontrolle für den α6 xHis-Antikörper wurde LMP2A-6xHis aus transfizierten 293-Zellen aufgetragen. Der Immunoblot gegen EBNA2 zeigt, dass sich die eingesetzten Proteinmengen aus wt-LMP1-Lysaten und ΔC-LMP1-Lysaten entsprechen. Die 293-Positivkontrolle exprimiert wie erwartet kein EBNA2.

(B) Der dargestellte Westernblot zeigt einen zweiten Nachweis von ΔC-LMP1 aus der immortalisierten B-Zelllinie mit Hilfe des N-terminalen LMP1-Antikörpers OT22CN (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von J.Middeldorp, Virje Universität, Amsterdam). Dieser Antikörper detektiert aufgrund seiner sehr schwachen Sensitivität nur sehr hohe Konzentrationen von LMP1. Das Expressionsniveau von wt-LMP1 in 2089- oder B95.8-immortalisierten LCLs ist offensichtlich nicht ausreichend für einen Nachweis mit diesem Antikörper (auch in einer persönlichen Mitteilung von J.Middeldorp bestätigt). ΔC-LMP1 liegt vergleichsweise zu wt-LMP1 in 2089 bzw. B95.8-LCLs in sehr hoher Expression vor und läßt sich deshalb mit dem N-terminalen Antikörper detektieren.

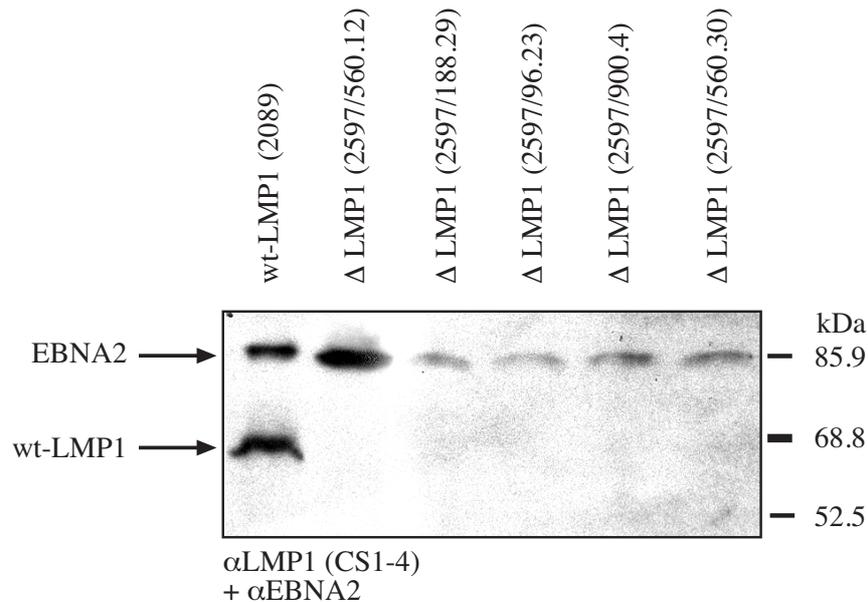


Abb.4.8: Kontrolle des korrekten Phänotyps von Δ LMP1-LCLs.

Zur Kontrolle des korrekten Δ LMP1 Phänotyps wurden ca. 20 LCLs überprüft, von denen hier 5 Zelllinien im Immunoblot exemplarisch gezeigt sind. Es sollte überprüft werden, ob tatsächlich eine B-Zell-Immortalisation ohne LMP1 stattgefunden hat und ausgeschlossen werden, dass eine Kontamination der jeweiligen Δ LMP1-LCLs mit wtLMP1-LCLs (2089- oder B95.8-immortalisiert) vorliegt. Bei gleichzeitiger Detektion von wt-LMP1 aus 2089-LCLs konnte in den Δ LMP1-Zelllinien kein LMP1 nachgewiesen werden. Der Immunoblot gegen EBNA2 zeigt, dass ausreichend Gesamtprotein eingesetzt wurde und die Zelllinien eindeutig EBV-positiv sind, d.h. eine Immortalisation ohne LMP1 stattgefunden haben muß.

4.4.5 Untersuchung des onkogenen Potentials von LCLs *in vivo*

In vitro immortalisierte humane B-Zellen verursachen maligne lymphoproliferative Erkrankungen in SCID-(severe combined immunodeficiency) Mäusen (Übersichtsartikel: Johannessen und Crawford, 1999; Rochford et al., 1997; Walter et al., 1991). Diese Tumore sind humanen Ursprungs, enthalten das EBV-Genom und exprimieren die latenten EBV-Gene. Nachdem LMP1 als einer der wichtigsten Mediatoren der Transformation von B-Zellen bekannt ist, war es überraschend, dass es in unseren *in vitro* Experimenten möglich war, LCLs zu generieren, denen das komplette LMP1 fehlte (Δ LMP1-LCLs). Um das onkogene Potential dieser Zelllinien *in vivo* zu testen, wurden Experimente in SCID Mäusen durchgeführt. Hierbei wurden Tumorentwicklung, Entstehungszeitraum und die phänotypische Charakterisierung entstehender Tumoren überwacht. Zwei Gruppen von Mäusen wurden intraperitoneal LCLs injiziert, die vom selben humanen B-Zell-Donor stammten. Einer Gruppe wurde die wt-LMP1-Zelllinie (2089), der anderen Gruppe eine Δ LMP1-LCL (2597-3) appliziert. Es wurden jeweils drei verschiedene Zellkonzentrationen zwischen 3×10^6 und 1×10^8 Zellen pro Tier eingesetzt (Tab.4.3). Mit einer Ausnahme entwickelten alle 2089-LCL

injizierten Mäuse innerhalb von 28 Tagen Tumore (Abb.4.9). Der Zeitpunkt der jeweiligen Tumorentstehung korrelierte mit der Anzahl der injizierten Zellen. Teilweise konnten bis zu 50% der Blutzellen dieser Tiere als humanen Ursprungs nachgewiesen werden und eine Rekultivierung von 2089-LCLs aus Tumormaterial war in verschiedenen Fällen möglich (Tab.4.3). Die zweite Versuchsgruppe hingegen, der die Δ LMP1-LCL (2597-3) injiziert worden war, blieb über 100 Tage vollkommen symptomlos und Tumoren waren nicht detektierbar. Dieses Ergebnis zeigt eindrucksvoll, welche wichtige Rolle LMP1 bei der *in vivo* Onkogenese von lymphoblastoiden Zelllinien spielt.

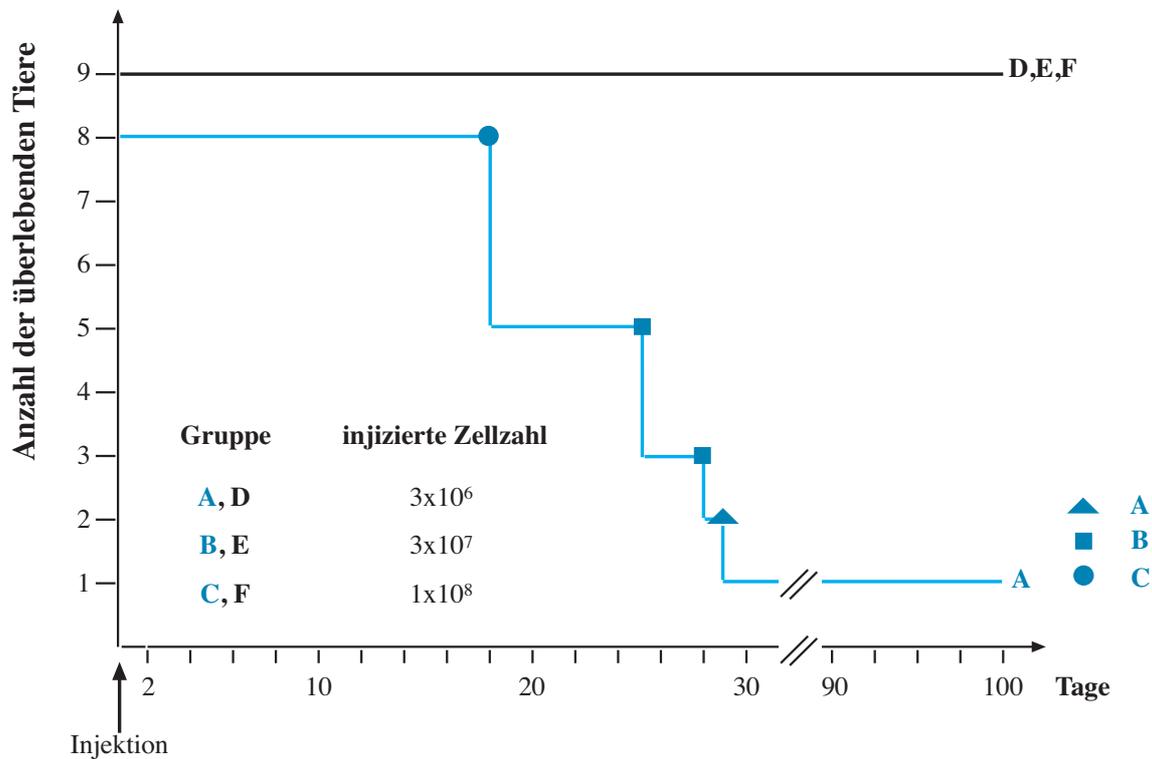


Abb.4.9: Überlebensrate von SCID-Mäusen nach Injektion von wt-LMP1-LCLs bzw. Δ LMP1-LCLs.

In vitro immortalisierte B-Zellen verursachen in SCID-Mäusen maligne lymphoproliferative Erkrankungen. Da LMP1 als einer der wichtigsten Mediatoren der B-Zelltransformation gilt, wurden zur Untersuchung des onkogenen Potentials *in vivo* Experimente an SCID-Mäusen mit zwei Zelllinien, wt-LMP1-LCLs und Δ LMP1-LCLs, durchgeführt. Die mit der wt-LMP1-Zelllinie (2089) injizierten Tiere (blau) entwickelten mit einer Ausnahme bis zum Tag 28 alle maligne Erkrankungen, die Δ LMP1 (2597-3) injizierte Versuchsgruppe (schwarz) blieb bis zum Versuchsende (Tag 100) ohne Symptome. Für jede der beiden Zelllinien wurden drei Gruppen zu je drei Versuchstieren eingesetzt, wobei die LCLs intraperitoneal injiziert wurden. Gruppe A, B und C wurden wt-LMP1-LCLs, Gruppe D, E und F Δ LMP1-LCLs appliziert. Ein Tier aus Gruppe A mußte aufgrund eines speziesspezifischen Thymoms bereits vorzeitig aus dem Versuch genommen werden. Deshalb umfasst die Gruppe A/B/C nur acht Tiere. Bei den einzelnen Tieren wurde über den Zeitpunkt des Versuchsendes, abhängig von deren Allgemeinzustand, individuell entschieden. Spontaner Exitus trat bei einem Tier der Gruppe A an Tag 29 auf, das zweite Tier blieb bis zum Versuchsabschluss (Tag 100) symptomlos. In Gruppe B mussten zwei Tiere am Tag 25 getötet werden, das dritte Tier starb am Tag 28 spontan. Die drei Tiere der Gruppe C waren am Tag 18 moribund. Alle neun Tiere der Gruppen D, E und F (injiziert mit Δ LMP1-LCLs) blieben bis zum Versuchsabschluss am Tag 100 ohne Symptome.

	Versuchsgruppen/ injizierte Zellzahlen	Tier	Versuchsende	Histologischer Befund/ Infiltrierte Organe	LCLs rekultivierbar
wt-LMP1-LCLs (2089)	A 3x10 ⁶ Zellen/Tier	1	(Tag 15)	(Thymom)	-
		2	Tag 29 (spontaner Exitus)	(bereits autolytisch)	-
		3	Tag 100	ohne Befund	-
	B 3x10 ⁷ Zellen/Tier	1	Tag 25	Leber, Milz	+
		2	Tag 25	Leber, Milz, Omentum, Blut	+
		3	Tag 28 (spontaner Exitus)	Leber, Milz, Omentum, Blut	+
	C 1x10 ⁸ Zellen/Tier	1	Tag 18	Leber, Milz, Blut	-
		2	Tag 18	Leber, Milz, Blut , pararenale Tumormasse	+
		3	Tag 18	Leber, Milz, Blut	+
ΔLMP1-LCLs (2597-3)	D 3x10 ⁶ Zellen/Tier	1	Tag 100	ohne Befund	-
		2	Tag 100	ohne Befund	-
		3	Tag 100	ohne Befund	-
	E 3x10 ⁷ Zellen/Tier	1	Tag 100	ohne Befund	-
		2	Tag 100	ohne Befund	-
		3	Tag 100	ohne Befund	-
	F 1x10 ⁸ Zellen/Tier	1	Tag 100	ohne Befund	-
		2	Tag 100	ohne Befund	-
		3	Tag 100	ohne Befund	-

Tab.4.3: In vivo Untersuchung des onkogenen Potentials von wt-LMP1-LCLs und ΔLMP1-LCLs.

Der Transfer von *in vitro* EBV-immortalisierten LCLs verursacht B-Zell-Lymphome in SCID-Mäusen (Übersichtsartikel: Johannessen und Crawford, 1999). Da es *in vitro* möglich war, auch in Abwesenheit von LMP1 B-Zellen zu immortalisieren und LCLs zu etablieren (ΔLMP1-LCLs), sollte die tumorigene Wirkung einer solchen Zelllinie *in vivo* überprüft werden. Die mit der wt-LMP1-Zelllinie (2089) injizierten Tiere entwickelten mit einer Ausnahme alle maligne Erkrankungen, die ΔLMP1 (2597-3) injizierte Versuchsgruppe blieb bis zum Versuchsende ohne Symptome. Als Versuchstiere wurden 8 Wochen alte SCID-Mäuse (Fox-Chase) verwendet. Für jede der beiden lymphoblastoiden Zelllinien (wt-LMP1 (2089) bzw. ΔLMP1 (2597-3)) wurden drei Gruppen mit jeweils drei Tieren eingesetzt. Die applizierten Zellzahlen sind in Spalte zwei dargestellt. Die LCLs wurden peritoneal injiziert. Abhängig vom Allgemeinzustand der einzelnen Tiere wurde über das Versuchsende jeweils individuell entschieden. In zwei Ausnahmefällen kam es zu spontanem Exitus (A2 und B3). Bei Tier A2 schloß die bereits sehr fortgeschrittene Autolyse weitere Untersuchungen aus. Tier A1 mußte bereits am Tag 15 aufgrund eines speziesspezifischen Thymoms aus dem Versuch genommen werden. Durch FACS-Analysen konnten bei den Tieren B2, C2 und C3 im Blut bis zu 50% der Gesamtzellen als lymphoblastoide Zellen (CD19/GFP-doppelpositive Zellen) identifiziert werden. Nicht in allen Fällen war es möglich, aus Gewebematerial LCLs zu rekultivieren, wo dies gelang, konnte deren Identität allerdings eindeutig bestätigt werden. Tier A3 und alle Tiere der Gruppe D, E und F zeigten bis zum Tag 100 keinerlei Krankheitssymptome. Damit wurde der Versuch am Tag 100 abgeschlossen.

4.6 Untersuchung von LMP1-Zielgenen in humanen B-Zellen mit Hilfe eines konditionalen LMP1-Proteins

Obwohl bereits eine ganze Reihe von LMP1 Zielgenen in Einzelberichten in den letzten 15 Jahren veröffentlicht wurden, sind längst nicht alle Zielgene von LMP1 bekannt. Auch ist das Signaltransduktions-Netzwerk, das die verschiedenen Effekte von LMP1 wie B-Zell-Immortalisation, Onkogenität und Tumorentstehung vermittelt, wahrscheinlich noch nicht vollständig aufgeklärt. In dieser Arbeit sollte deshalb eine umfassende Katalogisierung der zellulären Zielgene von LMP1 erfolgen. Da LMP1 hinsichtlich einer Reihe von Signalmediatoren Parallelen zu CD40 zeigt und auch phänotypische Effekte Homologien zu CD40 aufweisen, sollte ich vergleichende Untersuchungen zu CD40 induzierter Genexpression durchführen. Besonderer Wert wurde dabei darauf gelegt, diese Experimente in einem möglichst authentischen Zellsystem, in primären humanen B-Lymphozyten durchzuführen. Zu diesem Zweck wurde ein konditionales LMP1 Derivat hergestellt, das aus dem extrazellulären und transmembranen Anteil des humanen „low affinity“ NGF-Receptors (p75) und der intrazellulären C-terminalen Signaldomäne von LMP1 besteht (Abb.4.10) (Gires et al., 1997). Für die konstitutive Aktivität von Wildtyp-LMP1 ist die Autoaggregation des Moleküls in der Plasmamembran essentiell, die durch die Transmembrandomänen von LMP1 vermittelt wird. Da die Transmembrandomäne von LMP1 bei NGF-R:LMP1 durch die Transmembrandomäne des NGF-R ersetzt wurde, sollte das Chimär als inaktives Monomer vorliegen. Erst eine artifizielle Aggregation mit Hilfe von Antikörpern, die gegen den extrazellulären Anteil des chimären Proteins gerichtet sind, sollte LMP1-spezifische Signale in der Zelle aktivieren. Die Quervernetzung des chimären Proteins erfolgte mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers gegen den extrazellulären NGF-R Anteil und eines Sekundärantikörpers, der gegen den Primärantikörper gerichtet ist (Abb.4.10). Eine Dimerisierung von NGF-R:LMP1 durch den α NGF-R-Antikörper alleine reichte für eine Signalinduktion nicht aus (siehe Abb.4.14.B,C), die offensichtlich erst durch einen höheren Grad an Quervernetzung mit Hilfe des Sekundärantikörpers vermittelt wird. Die Induzierbarkeit des Systems konnte bereits innerhalb von Minuten nachgewiesen werden (4.6.2) (Gires et al., 1997). Dies ist für das Auffinden von direkten Zielgenen und die präzise Untersuchung von Signaltransduktionskaskaden von besonderer Bedeutung, da nur durch die Wahl sehr kleiner Zeitfenster Sekundäreffekte oder autokrine Rückkoppelungen ausgeschlossen werden können.

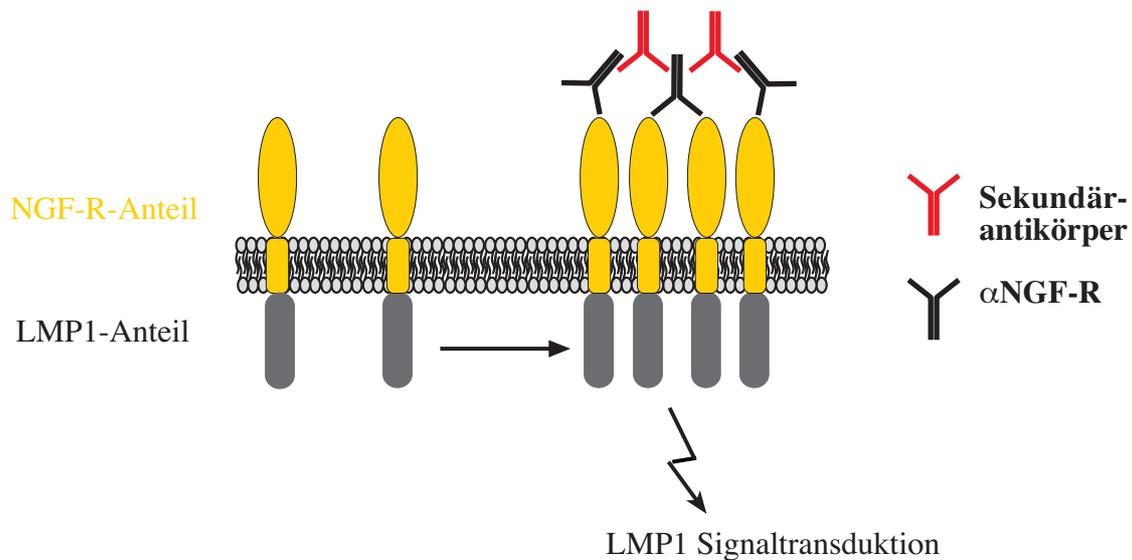


Abb.4.10: Schematische Darstellung des konditionalen NGF-R:LMP1-Chimärs.

Für die konstitutive Aktivität von wt-LMP1 ist eine Autoaggregation des Moleküls in der Plasmamembran verantwortlich, die durch die LMP1 Transmembrandomänen vermittelt wird. Die Signalaktivität von LMP1 kann durch künstliche Aggregation des hier dargestellten NGF-R:LMP1-Fusionsproteins induziert werden. Das NGF-R:LMP1-Chimär besteht aus dem extrazellulären und transmembranen Anteil des humanen, „low affinity“ NGF-Rezeptors (As 1-283) und der intrazellulären Signaldomäne von LMP1 (As 192-386). Die C-terminale Signaldomäne von LMP1 führt nach Aktivierung des Fusionsproteins zu den bekannten Signalmustern von wt-LMP1 (NF- κ B, JNK/AP1, STAT). Die Induktion von NGF-R:LMP1 erfolgt über die Quervernetzung des Moleküls durch α NGF-R-Antikörper und einen entsprechenden Sekundärantikörper (Ziege- α Maus). Eine einfache Quervernetzung unter alleinigem Einsatz des primären Antikörpers ist für eine Aktivierung von NGF-R:LMP1 nicht ausreichend. Dieses LMP1-Chimär wurde auf der Basis von Maxi-EBV kloniert und primäre B-Zellen mit den rekombinanten EBVs immortalisiert.

4.6.1 Expression des konditionalen NGF-R:LMP1 Proteins in primären B-Zellen

Wie bereits beschrieben, wurde das NGF-R:LMP1 Chimär anstelle von Wildtyp-LMP1 durch homologe Rekombination in das Maxi-EBV-Plasmid eingebracht (4.1). Nach der Produktion von rekombinanten Viren (4.3) wurden primäre B-Zellen infiziert und lymphoblastoide Zelllinien etabliert (als B2264-19 bezeichnet) (4.4). Die Integrität des Maxi-EBV Plasmids wurde ebenfalls durch Southernblot-Analysen überprüft, zudem der NGF-R:LMP1 Genlocus durch PCR amplifiziert und anhand von Restriktionsanalysen und DNA-Sequenzierung untersucht (siehe Anhang I). Die Expression und das korrekte Migrationsverhalten des chimären Proteins wurde im Westernblot mit Hilfe eines gegen C-terminale Epitope des LMP1 Proteins gerichteten Antikörpers nachgewiesen (Abb.4.11). Das Expressionsniveau von NGF-R:LMP1 schien in der lymphoblastoiden Zelllinie gegenüber Wildtyp-LMP1 um das 3-5-fache erhöht zu sein. Die korrekte Oberflächenpräsentation des chimären Proteins in LCLs wurde durch FACS Analysen überprüft. Hierbei konnten sowohl der extrazelluläre NGF-R-Anteil mit Hilfe des α NGF-R-Antikörpers, als auch der intrazelluläre LMP1 C-

Terminus mit α LMP1-Antikörper nachgewiesen werden (Abb.4.12). Auch hier zeigte sich eine etwa 3-fache Überexpression von NGF-R:LMP1 gegenüber Wildtyp-LMP1 in B95.8- und 2089-immortalisierten B-Zellen.

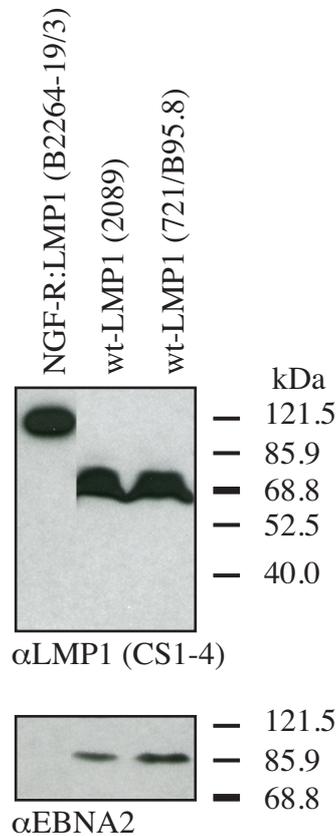


Abb.4.11: NGF-R-LMP1 Expression in B2264-19/3-LCLs (Ausschnitt aus Abb.4.6).

Zum Nachweis des erwarteten Migrationsverhaltens und zur Überprüfung des Expressionsniveaus von NGF-R:LMP1 in LCLs wurde eine Westernblot-Analyse durchgeführt. NGF-R:LMP1 und wt-LMP1 aus den jeweiligen LCLs (B2264-19/3, 2089, 721) wurden mittels α LMP1-Antikörper (CS1-4), gerichtet gegen den C-Terminus von LMP1 detektiert. Aus vorangegangenen Experimenten war bekannt, dass die Zelllinie B2264-19/3 eine sehr viel höhere Expressionsstärke des NGF-R:LMP1 Chimärs verglichen mit wt-LMP1 exprimierenden Zelllinien zeigte (siehe auch Abb.4.12). Hier wurde deshalb vom Lysat der B2264-19/3-Zelllinie nur etwa 1/5 der Proteinmenge der 2089- bzw. 721- Lysate aufgetragen, um die Gelqualität nicht durch Überladung mit NGF-R:LMP1 zu beeinträchtigen. Das eigentlich zu erwartende Signal bei dem EBNA2 Westernblot ist deshalb nicht zu sehen.

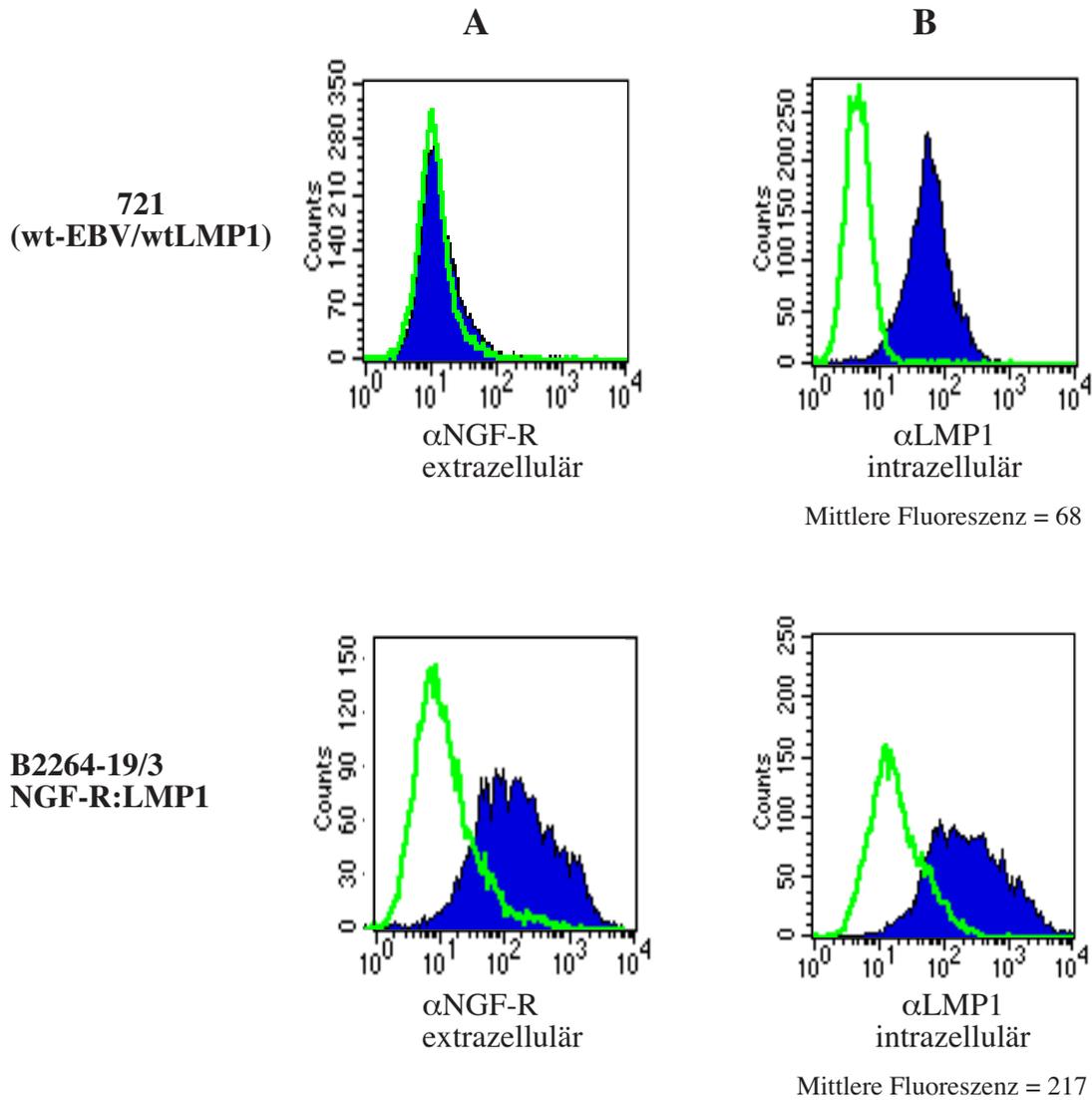


Abb.4.12: FACS-Analysen der lymphoblastoiden Zelllinien 721 (wt-LMP1) und B2264-19/3 (NGF-R:LMP1).

Um eine korrekte Oberflächenexpression des NGF-R:LMP1-Chimärs zu überprüfen und dessen Expressionsniveau zu bestimmen, wurden FACS-Analysen sowohl gegen die extrazelluläre NGF-R-Domäne als auch gegen dessen intrazellulären LMP1-C-Terminus durchgeführt. (A) extrazelluläre Detektion mit α NGF-R-Antikörper; (B) intrazelluläre Detektion des LMP1-C-Terminus mit α LMP1 (CS1-4). Auf B2264-19/3-Zellen war eine Oberflächenexpression des NGF-Rezeptors deutlich nachweisbar, 721-Zellen waren wie erwartet NGF-R-negativ. Der intrazelluläre Nachweis des C-Terminus von LMP1 zeigte in B2264-19/3 ein ca. dreifach höheres Expressionsniveau von wt-LMP1 in 721-Zellen und eine andere Intensitätsverteilung.

4.6.2 Nachweis der Induzierbarkeit des konditionalen Zellsystems

Um die Funktion des konditionalen Systems der NGF-R:LMP1 exprimierenden Zelllinie B2264-19/3 zu überprüfen, wurden verschiedene bereits bekannte Signalwege von LMP1, wie z.B. die Induktion von NF- κ B oder die Aktivierung von p38 MAPK, JNK/AP1 und JAK/STAT überprüft. Da humane B-Lymphozyten auf ihrer Oberfläche den CD40-Rezeptor konstitutiv exprimieren, konnte in den selben B2264-19/3 Zellen die CD40 vermittelte Signaltransduktion aktiviert und ebenfalls anhand von NF- κ B-Induktion und p38 MAPK-Phosphorylierung nachgewiesen werden.

Wie bereits beschrieben (4.4.4) ist die Proliferation von NGF-R:LMP1 immortalisierten Zelllinien abhängig von deren Kultivierung auf letal bestrahlten WI38 Fibroblasten als „feeder layer“. Da unklar ist, durch welche Effekte die Fibroblasten die Proliferation dieser Zelllinien unterstützen, wurden B2264-19/3 Zellen 72 h vor Induktion des NGF-R:LMP1 Proteins vom „feeder layer“ entfernt und in neue Kulturgefäße überführt. Dieses Vorgehen tolerieren die Zellen ohne erkennbare Probleme bis zu sieben Tagen, anschließend beginnen sie langsam abzusterben. B2264-19/3 Zellen wurden zunächst in Kulturmedium bei 37°C mit α NGF-R-Antikörper bzw. einem agonistischen α CD40-Antikörper (G28.5) inkubiert, die als monoklonale Antikörper aus der Maus zur Verfügung standen. Anschließend erfolgte die Quervernetzung und damit Stimulation von NGF-R:LMP1- bzw. des CD40-Rezeptors durch Zugabe des Sekundäntikörpers (α Maus-IgG). In den Kontrollansätzen wurde jeweils anstelle des spezifischen Erstantikörpers ein irrelevanter Antikörper gleichen Isotyps eingesetzt (Abb.4.13, Abb.4.14A), ansonsten in identischer Weise verfahren, bzw. lediglich mit α NGF-R-Antikörper inkubiert, der ohne Sekundäntikörper keine Induktion herbeiführt (Abb.4.14B,C).

Zum Nachweis der NF- κ B-Induktion wurden nach 30-minütiger Quervernetzung nukleäre Proteine extrahiert und Gelretentionsanalysen durchgeführt (Abb.4.13). Ein radioaktiv markiertes doppelsträngiges Oligonukleotid mit spezifischer Bindesequenz für Transkriptionsfaktoren der NF- κ B-Familie wurde als Probe verwendet und mit den Kernextrakten inkubiert. Anhand der Gelretention der Probe ließ sich die Bindung von NF- κ B-Komplexen an die DNA nachweisen. NF- κ B-Komplexe bestehen aus Homo- oder Heterodimeren, die aus unterschiedlichen Faktoren der Rel-Familie zusammengesetzt sein können. Der klassische Komplex, der die Expression von Genen mit NF- κ B-Bindesequenz im

Promotor transaktiviert, ist das Heterodimer p50/p65. Um zu untersuchen, ob dieser Faktor induziert wird, wurde zur Hälfte der Reaktionsansätze Antikörper gegen p65 zugegeben, der im positiven Fall eine weitere Gelretention (Supershift) von Protein-DNA-Komplexen bewirkt. Die Aktivierung von NF- κ B konnte bereits nach 30-minütiger Induktion sowohl von NGF-R:LMP1 (Shift und Supershift Abb.4.13A), als auch CD40 (Abb.4.13B) deutlich nachgewiesen werden. Die Induzierbarkeit von NF- κ B durch die beiden Rezeptoren scheint sich unter diesen Versuchsbedingungen in etwa zu entsprechen (Abb.4.13B).

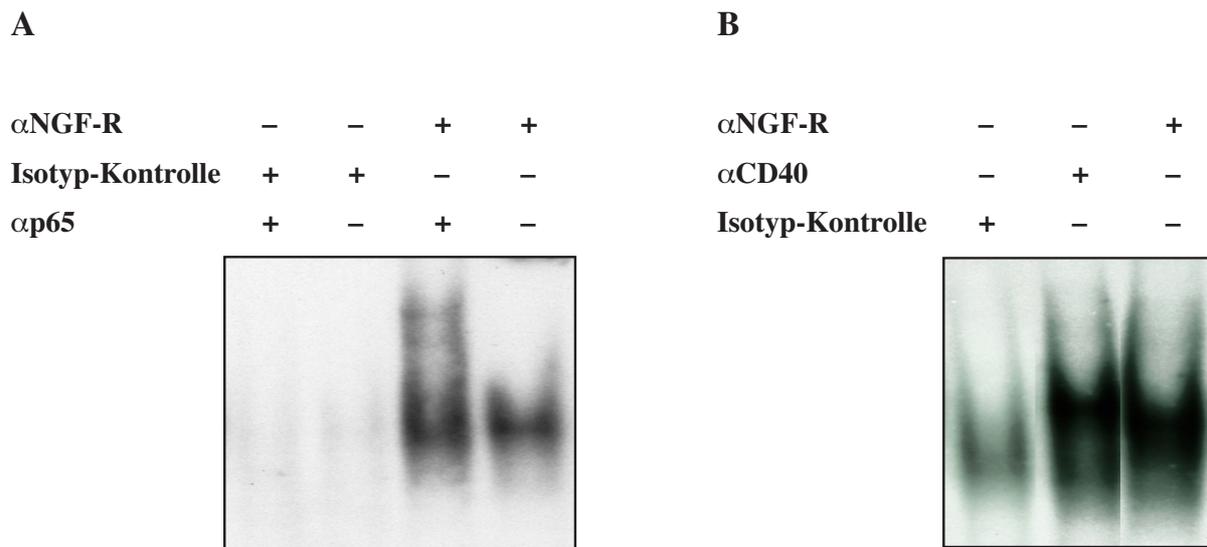


Abb.4.13: NF- κ B-Gelretentionsanalysen der NGF-R:LMP1 exprimierenden Zelllinie B2264-19/3.

Um eine korrekte Funktionalität des konditionalen Systems der NGF-R:LMP1 exprimierenden Zelllinie nachzuweisen, wurde als bereits bekannter LMP1-Signalweg die Aktivierung von NF- κ B untersucht.

(A) Eine Induktion der Zellen erfolgte drei Tage nach Feeder-Entzug durch Quervernetzung mit α NGF-R-Antikörper in Kombination mit geeignetem Sekundärantikörper. Im Kontrollansatz wurde ein nicht relevanter Erstantikörper gleichen Isotyps eingesetzt, ansonsten aber in identischer Weise verfahren. Nukleäre Proteinextrakte wurden 30 min. nach Beginn der Quervernetzung präpariert. NF- κ B -Komplexe konnten sowohl im Shift, als auch Supershift (α p65) im Vergleich zum nicht induzierten Kontrollansatz klar nachgewiesen werden.

(B) Das Oberflächenmolekül CD40, das konstitutiv auf B-Zellen exprimiert ist, zeigt eine nahe funktionelle Verwandtschaft zu LMP1 (Kilger et al., 1998) und ist ebenfalls bekannt für die Aktivierung von NF- κ B. Es konnte gezeigt werden, dass die Induzierbarkeit von NF- κ B durch NGF-R:LMP1 oder CD40 unter den Versuchsbedingungen sehr ähnlich ist. Die Aktivierung von NGF-R:LMP1 erfolgte hier wie bereits in (A) beschrieben. In einem zweiten Versuchsansatz wurde anstelle von NGF-R:LMP1 der CD40-Rezeptor induziert. Als Erstantikörper wurde der agonistische α CD40-Antikörper G28.5 (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von H. Engelmann, Institut für Immunologie der LMU München) in Kombination mit dem bereits verwendeten Sekundärantikörper eingesetzt. Nukleäre Proteinextrakte wurden wiederum nach 30-minütiger Quervernetzung präpariert. Mit dem Kontrollansatz wurde wie bereits beschrieben verfahren. In beiden induzierten Ansätzen konnte gegenüber der Kontrolle die Bildung von NF- κ B -Komplexen im Shift deutlich nachgewiesen werden.

Als weitere bekannte Signalwege von LMP1 bzw. CD40 wurden die Phosphorylierung von p38 MAPK, JNK und STAT 1 nachgewiesen (Abb.4.14). Die Familie der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen, zu denen sowohl p38, als auch JNKs gehören, spielt eine wichtige Rolle bei der Expression von Zytokinen und in der Reaktion der Zelle auf Streßfaktoren. (Eliopoulos et al., 1999; Vockerodt et al., 2001) (Freshney et al., 1994; Han et al., 1994; Raingeaud et al., 1995). Zudem wurde kürzlich die Beteiligung von p38 MAPK an zellulären Differenzierungsprozessen und der Regulation von Proliferation und Apoptose gezeigt (Übersichtsartikel: Nebreda und Porras, 2000). Die Aktivierung der p38 MAPK Signalkaskade erfolgt durch Phosphorylierung eines Thr-x-Tyr Motives (As 180-182) (Raingeaud et al., 1995) und kann mit Hilfe von phosphospezifischem α P-p38-Antikörper nachgewiesen werden. Als Substrate der aktivierten p38 MAPK sind die Proteinkinasen MAPKAPK-2/3 (Freshney et al., 1994; McLaughlin et al., 1996; Rouse et al., 1994) und Transkriptionsfaktoren wie ATF2 (Raingeaud et al., 1995), Elk-1 (Raingeaud et al., 1996), CHOP/GADD153 (Wang und Ron, 1996) und Max (Zervos et al., 1995) bekannt.

Die Induktion von JNKs erfolgt ebenfalls durch Phosphorylierung eines Thr-x-Tyr Motives (As 183-185) (Derijard et al., 1994) und resultiert in der Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren wie ATF2 (Gupta et al., 1995; Livingstone et al., 1995), Elk-1 (Cavigelli et al., 1995; Whitmarsh et al., 1995) und c-Jun (Eliopoulos und Young, 1998; Kieser et al., 1999; Kieser et al., 1997). Sowohl p38, als auch JNK spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation von AP-1, das aus Homo- und Heterodimeren der Jun, Fos und ATF Transkriptionsfaktor-Familie besteht und dessen Zusammensetzung für die Bindung an unterschiedliche DNA-Erkennungssequenzen verantwortlich ist.

Die Phosphorylierung von p38 MAPK konnte sowohl nach Induktion von NGF-R:LMP1, als auch nach Induktion des CD40-Rezeptors nachgewiesen werden, wobei die p38 MAPK-Aktivierung durch CD40 reproduzierbar schwächer ausfiel (Abb.4.14A). Eine Phosphorylierung von JNK1 und JNK2 konnte ebenfalls nach 30-minütiger NGF-R:LMP1-Stimulation mit Hilfe eines Antikörpers, der beide Proteine in ihrer phosphorylierten Form erkennt, detektiert werden (Abb.4.14B links). Da das Expressionsniveau von JNK2 im Vergleich zu JNK1 sogar geringer war (Abb.4.14B rechts), dessen Phosphorylierung jedoch um ein Vielfaches stärker, weist dieses Ergebnis darauf hin, dass JNK2 nach Aktivierung von LMP1 gegenüber JNK1 offensichtlich bevorzugt phosphoryliert wird (Abbildung 4.14B wurde freundlicherweise zur Verfügung gestellt von U. Schultheiß, Abt. Genvektoren, GSF, München).

JAKs und deren Signalmediatoren STATs spielen eine entscheidende Rolle bei der Apoptoseinhibition in B-Zellen, der Entwicklung der lymphoiden Organe, der Induktion der DNA-Synthese und der Aktivierung der Protoonkogene c-myc und c-fos (Briscoe et al., 1996). Für den CD40-Rezeptor wurde gezeigt, dass die Interaktion mit JAK3 notwendig ist für die Regulation von Oberflächenproteinen wie CD23, ICAM-1 und Lymphotoxin α (Hanissian und Geha, 1997). JAKs sind konstitutiv an ihre jeweiligen Rezeptoren gebunden und werden durch deren Aggregation in räumliche Nähe zueinander gebracht und aktiviert. Sowohl die Induktion von JAKs, als auch die nachfolgende Aktivierung von STATs erfolgt durch Phosphorylierung an Tyrosinresten. Tyrosinphosphorylierte STAT Proteine bilden dann Dimere, die in den Zellkern translozieren und die Transkription von Zielgenen induzieren. Zum Nachweis der Induktion des JAK/STAT Signaltransduktionswegs wurden B2264-19/3-Zellen nach 30-minütiger Induktion von NGF-R:LMP1 lysiert und eine Immunpräzipitation gegen STAT1 durchgeführt. Tyrosinphosphoryliertes Protein wurde anschließend im Westernblot mit dem Antikörpermix PY20/4G10 detektiert (Abb.4.14C links). Eine Phosphorylierung von STAT1 konnte 30 min. nach Induktion des NGF-R:LMP1 Chimärs sicher detektiert werden. Das Expressionsniveau von STAT1 wurde dadurch erwartungsgemäß nicht beeinflusst (Abb.4.14C rechts). Für den CD40-Rezeptor wurde die Induktion von JNKs und STATs in B2264-19/3-Zellen nicht untersucht, sie ist aber als gesichert anzunehmen (Hanissian und Geha, 1997).

Im Rahmen der phänotypischen Charakterisierung des Zellsystems konnte ich bei vier verschiedenen bereits bekannten LMP1 Signalwegen die Funktionalität des konditionalen NGF-R:LMP1 Chimärs demonstrieren. Der sehr kurze Induktionszeitraum von 30 min., während dem bereits die Aktivierung aller vier Signalwege (NF- κ B, p38 MAPK, JNK/AP1 und JAK/STAT) nachgewiesen werden konnte, schafft besonders geeignete Voraussetzungen für die Untersuchung von Signalkaskaden und die Identifizierung von direkten LMP1-Zielgenen. Die Induzierbarkeit des CD40-Rezeptors schien gegenüber dem konditionalen LMP1-System in etwa vergleichbar zu sein und somit für vergleichende Untersuchungen geeignet.

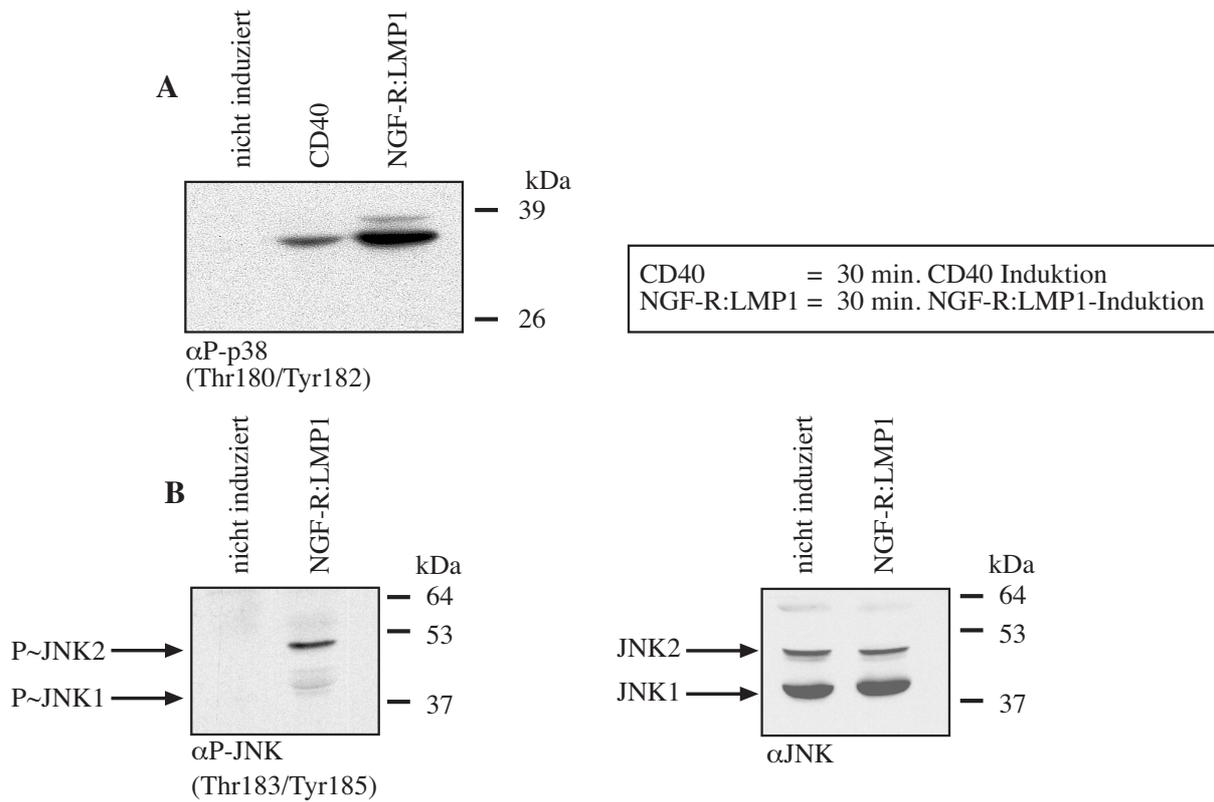
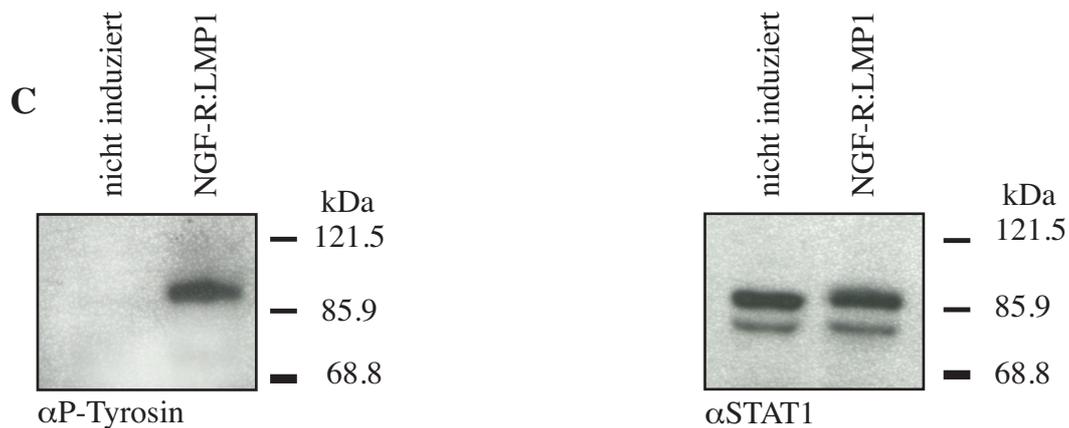


Abb.4.14 A,B,C: Analyse des Phosphorylierungsstatus ausgewählter Signalmoleküle nach NGF-R:LMP1 Induktion in der LCL B2264-19/3.

Der Nachweis einer Aktivierung bereits bekannter LMP1-Signalwege, p38 MAPK, JNK/AP1 und JAK/STAT, durch NGF-R:LMP1 diene zur weiteren Überprüfung der Funktionalität des konditionalen LMP1-Systems. Die Induktion der Zellen erfolgte in allen Fällen drei Tage nach Feeder-Entzug durch Quervernetzung mit α NGF-R- bzw. α CD40-Antikörper in Kombination mit geeignetem Sekundärantikörper für jeweils 30 min. Im Kontrollansatz in (A) wurde ein nicht relevanter Erstantikörper gleichen Isotyps eingesetzt, ansonsten aber in identischer Weise verfahren. Die Kontrollen in B und C wurden lediglich mit α NGF-R-Antikörper behandelt, die Kontrollansätze wurden mit „nicht induziert“ bezeichnet. Eine Induktion der NGF-R:LMP1-Aktivität wurde erst durch Zugabe des Sekundärantikörpers erreicht. TBST-Lysate der Zellen wurden durch 12,5% SDS-PAGE aufgetrennt. Proteinphosphorylierungen wurden mit den angegebenen phosphospezifischen Antikörpern im Immunoblot detektiert. In Klammern sind die jeweiligen Aminosäuren angegeben, deren Phosphorylierung für die Antikörpererkennung entscheidend ist.

(A) Eine Phosphorylierung von p38 konnte sowohl durch Induktion von NGF-R:LMP1, als auch durch Aktivierung von CD40 nachgewiesen werden. Die Phosphorylierung durch CD40 fiel auch in Wiederholungsexperimenten (nicht gezeigte Daten) reproduzierbar schwächer aus.

(B) Der hier verwendete α P-JNK-Antikörper erkennt sowohl JNK1 (46kDa), als auch JNK2 (55kDa) in ihrer jeweils phosphorylierten Form. Dabei wurde gezeigt, dass JNK2 innerhalb einer 30-minütigen NGF-R:LMP1 Induktion wesentlich stärker phosphoryliert wird als JNK1. Rechts: Eine Induktion des LMP1-Signals hat keine Änderung im Expressionsniveaus von JNK1 oder JNK2 zur Folge. Der verwendete α JNK-Antikörper ist für beide JNK-Homologe spezifisch. (Abb.4.14B wurde freundlicherweise von U.Schultheiß, Abt. Genvektoren, GSF, München, zur Verfügung gestellt.)



(C) NGF-R:LMP1 Induktion resultiert in der Phosphorylierung von STAT1. B2264-19/3 Zellen wurden in RIPA Puffer lysiert und eine Immunpräzipitation gegen das STAT1-Protein durchgeführt. Das Präzipitat wurde durch eine 7,5% SDS-PAGE aufgetrennt. Tyrosinphosphoryliertes Protein wurde mit dem Antikörper Mix PY20/4G10 detektiert. Rechts: NGF-R:LMP1 Induktion führt zu keiner Veränderung der STAT1-Expression. Die Doppelbande resultiert aus den zwei Spleißformen von STAT 1-Transkripten.

4.6.3 LMP1-Aktivierung induziert B-Zellproliferation

Der Phänotyp von B2264-19/3 Zellen weist darauf hin, dass die Zellen in Abwesenheit des LMP1-Signals im Zellzyklus arretieren. Darauf läßt das Verhalten dieser Zelllinie nach Entzug des „feeder layers“ schließen, woraufhin die Zellen mit einem Wachstumsstopp reagieren. Innerhalb der ersten sieben Tagen nach Feeder-Entzug vermitteln die Zellen einen vitalen Eindruck, proliferieren nicht und beginnen erst dann allmählich abzusterben. Zusätzlich gab es bereits Hinweise aus Arbeiten mit sogenannten mini-EBVs, dass ein Verlust der LMP1-Aktivität in einer Arretierung von immortalisierten B-Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus resultiert (Kilger et al., 1998). Es war allerdings offen, ob LMP1 lediglich anti-apoptotische Signale vermittelt oder eine echte proliferative Funktion erfüllt.

Die B2264-19/3- Zelllinie wurde zunächst hinsichtlich ihres Proliferationsverhaltens nach der Induktion von LMP1 untersucht. Die Zellen wurden für 72 h der Kokultur mit WI38 Fibroblasten entzogen und die LMP1-Signaltransduktion durch Quervernetzung des chimären NGF-R:LMP1 Moleküls aktiviert. Nicht induzierte Zellpopulationen wurden zur Kontrolle mit einem irrelevanten Antikörper gleichen Isotyps inkubiert. Das Proliferationsverhalten beider Fraktionen wurde über acht Tage verfolgt. Innerhalb dieser Zeit proliferierten die Zellen nach NGF-R:LMP1 Induktion mit einer Generationszeit von durchschnittlich 2,3 Tagen im Vergleich zur nicht induzierten Kontrollfraktion mit einer Generationszeit von durchschnittlich mehr als 14 Tagen (Abb.4.15 oben).

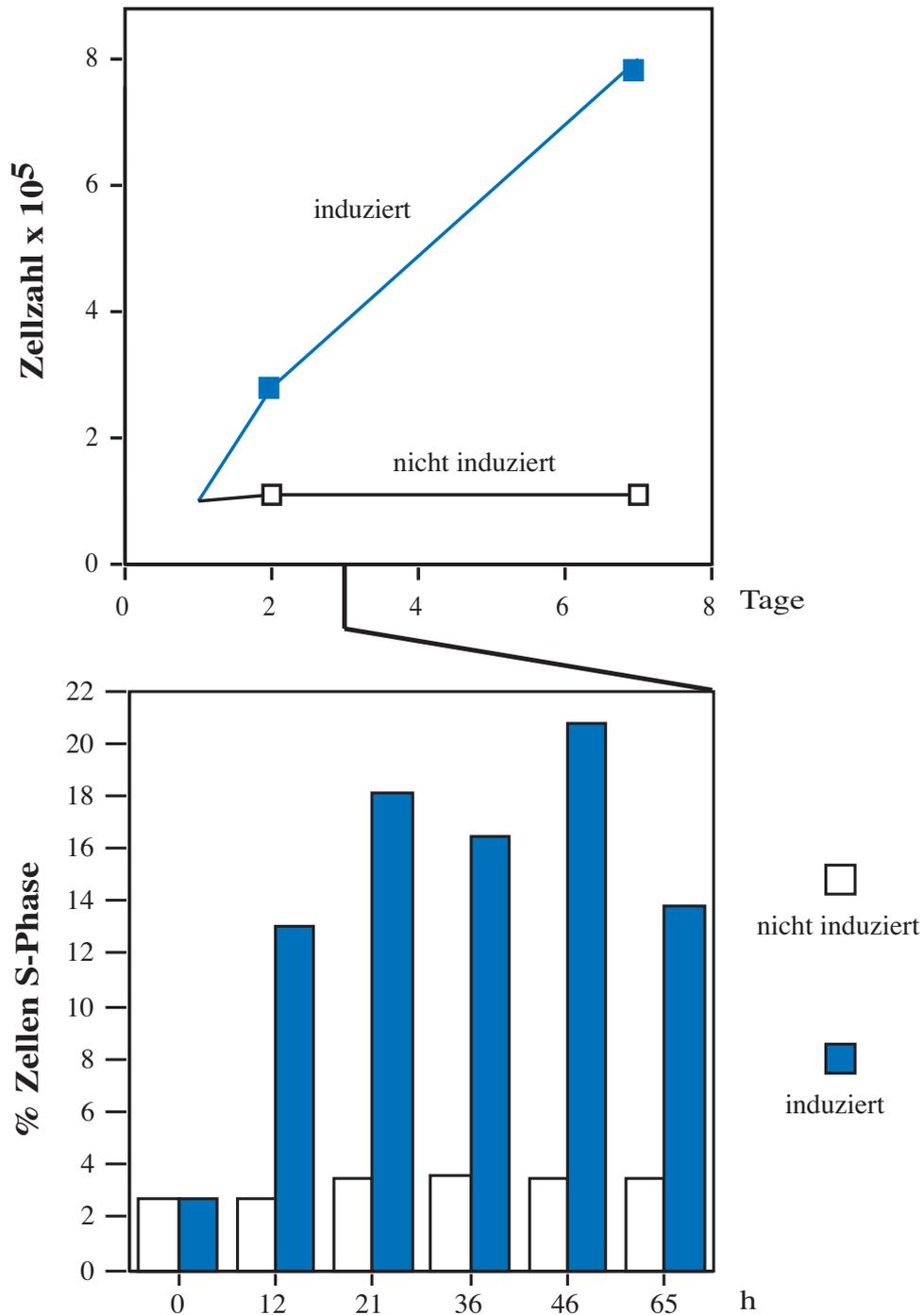


Abb.4.15: LMP1-Induktion führt zur Proliferation von LCLs und unterstützt den G1/S Übergang im Zellzyklus.

Die Generationszeit der lymphoblastoiden Zelllinie B2264-19/3 verkürzt sich nach NGF-R:LMP1-Aktivierung von 14,5 auf 2,3 Tage. Das proliferative Signal von LMP1 führt bereits nach 12 h zu einer sehr deutlichen Zunahme von Zellen in der S-Phase. B2264-19/3 LCLs wurden durch dreitägigen Feeder-Entzug im Zellzyklus arretiert. Nach Induktion des LMP1-Signals durch Quervernetzung des chimären LMP1 Moleküls wurde die Proliferation der Zellen über acht Tage hinweg verfolgt. Während der ersten 65 h nach NGF-R:LMP1-Aktivierung wurde durch Messung der Einbaurrate von Bromdeoxyuridin (BrdU) und Bestimmung des DNA-Gehalts im Durchflußzytometer der Status der Zellen im Zellzyklus ermittelt. Diese Originaldaten bilden die Grundlage für die Diagramme im unteren Teil der Abbildung.

Um zu untersuchen, wie sich die LMP1-Aktivierung auf das Zellzyklusprofil auswirkt, wurde in einem parallel durchgeführten Experiment während der ersten 64 h nach Induktion der Einbau von Bromdeoxyuridin (BrdU) und der DNA-Gehalt der Zellen im Durchflußzytometer gemessen (Abb.4.14 unten). Die Markierung bzw. Färbung mit BrdU-spezifischem, fluoreszenz-markiertem Antikörper und Propidiumiodid erlaubt eine Zuordnung der Zellen zu den Zellzyklus-Phasen. Kein Einbau von BrdU und einfacher DNA-Gehalt charakterisieren Zellen in der G1-Phase, Zellen mit doppeltem DNA-Gehalt, die kein BrdU einbauen, befinden sich in der G2- oder M-Phase und Zellen mit intermediärem DNA-Gehalt und BrdU-Einbau befinden sich in der S-Phase des Zellzyklus. Zellen mit „sub-G1“-DNA-Gehalt, d.h. ein DNA-Gehalt der kleiner als eine Genomeinheit ist, sind apoptotisch. Bereits 12 h nach LMP1-Aktivierung ließ sich eine deutliche Zunahme von Zellen in der S-Phase nachweisen, die bis zu 46 h nach Induktion noch zunahm und anschließend wieder absank. Die Zellzyklus-Verteilung der nicht induzierten Kontrolle zeigte eine Arretierung der Zellen in G1. In dieser Fraktion ließen sich gegenüber der induzierten Population durchschnittlich 20% mehr Zellen in G1 detektieren, wobei der Anteil an apoptotischen Zellen in beiden Kulturen gleich gering war (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse ließen darauf schließen, dass LMP1 ein proliferatives Signal vermittelt, das beim G1/S-Übergang eine wichtige Rolle im Zellzyklus spielt. Eine besondere Bedeutung der antiapoptotischen Funktion von LMP1 konnte hingegen in diesem Zusammenhang nicht nachgewiesen werden.

4.6.4 Analyse von LMP1- und CD40-regulierten Genen mit der Run-on-Technik

Ein Hauptteil meiner Arbeit war die umfassende Katalogisierung von LMP1-Zielgenen und der Vergleich mit CD40 induzierten Genen. Das konditionale NGF-R:LMP1-System in B2264-19/3-Zellen erfüllte dafür die nötigen Voraussetzungen. Um einen umfangreichen Überblick zu gewinnen, wurden in einem ersten Versuchsansatz cDNA-Filterarrays zum Einsatz gebracht. Diese Filter enthalten je 1176 verschiedene cDNA-Fragmente fixiert an definierten Positionen. Es kamen vier verschiedene Filtersets der ATLAS Serie von Clontech (Human1.2-I, II, III und Human cancer 1.2) zur Anwendung. Für die Markierung der RNA-Proben wurde nicht die herkömmliche Methode benutzt, bei der aus zellulären RNAs ein Pool von cDNAs hergestellt wird, die dann nach weiterer Behandlung markierte

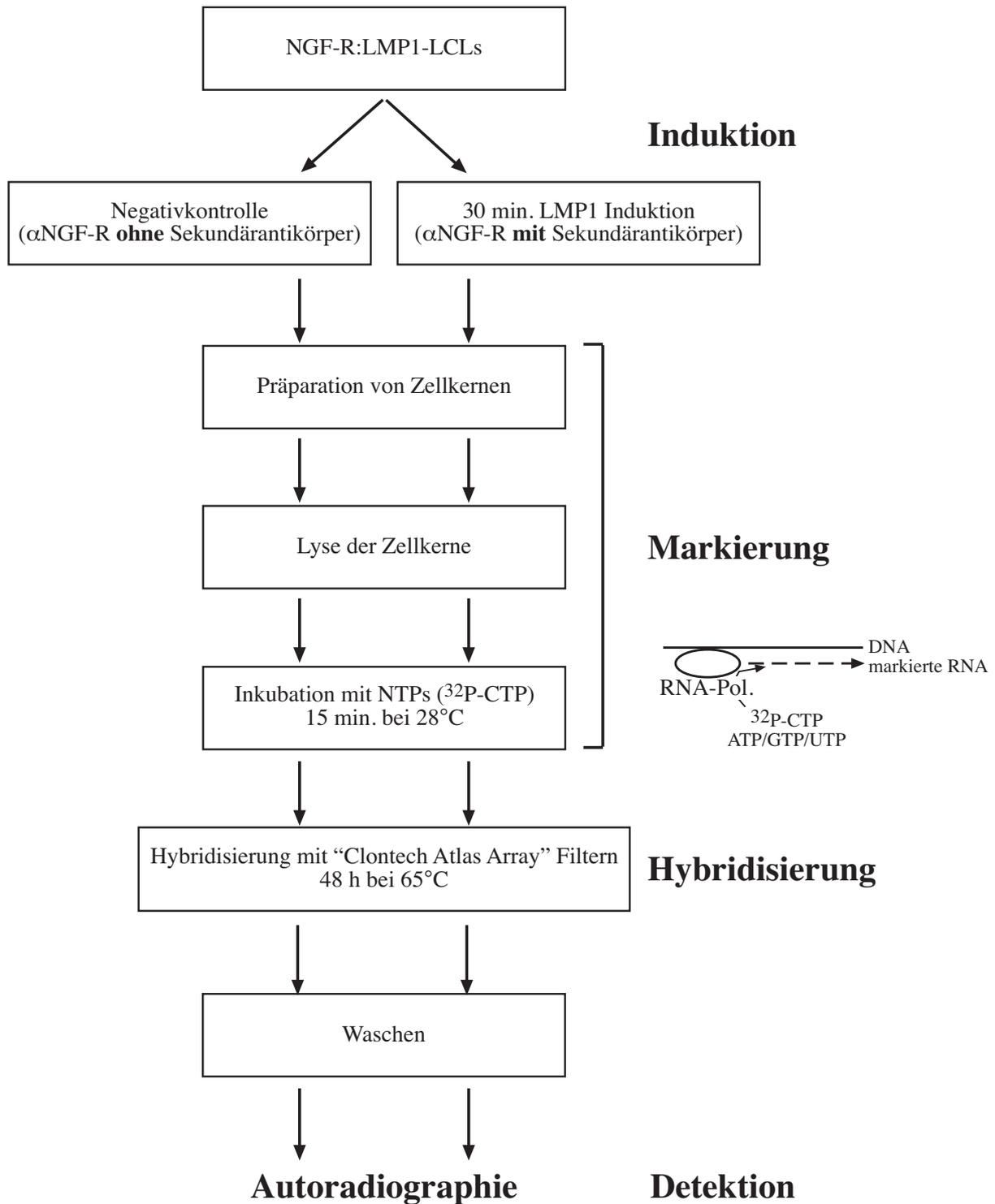


Abb.4.16: Arbeitsschritte bei der Run-on-Analyse.

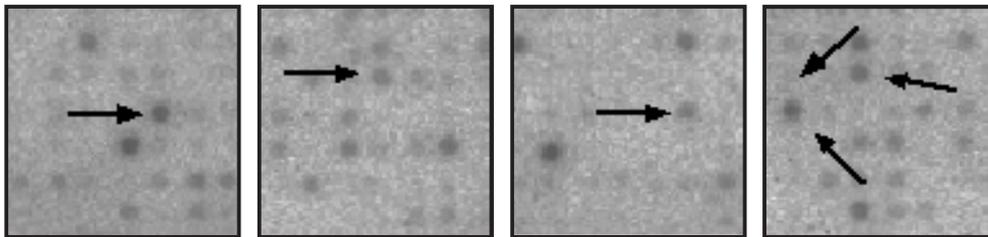
Hybridisierungsproben liefert. Dieser Ansatz vergleicht also die sogenannten „steady state“ Niveaus von Transkripten. Im Gegensatz dazu habe ich die Run-on-Technik zur Präparation von aktuell mit RNA-Polymerase II besetzten Genloci eingesetzt. Bei der Run-on-Technik (Abb.4.16) werden intakte Zellkerne isoliert, gewaschen und schockgefroren, wobei bereits initiierte RNA-Polymerase II-Komplexe zusammen mit ihren naszierenden RNAs erhalten bleiben. Werden die Kerne wieder aufgetaut und in Gegenwart von Nukleotiden inkubiert, wird die Transkription fortgesetzt. Erfolgt dies unter Zugabe von radioaktiv markiertem CTP, wird die RNA markiert, die dann isoliert und mit Filterarrays hybridisiert werden kann. Der besondere Vorteil dieser Methode liegt darin, dass nur naszierende, also gerade transkribierte mRNA markiert wird, was eine Fokussierung auf ein genau definiertes Zeitfenster und die sensitive Detektion von sehr geringen Expressionsunterschieden erlaubt. Ausserdem sind bei dieser Methode besonders kurze Halbwertszeiten von bestimmten mRNAs kein Problem.

RNA-Proben aus nicht induzierten Zellpopulationen wurden mit RNA-Proben aus LMP1 bzw. CD40 induzierten Zellpopulationen verglichen. Die Induktion der B2264-19/3-Zellen erfolgte wie bereits beschrieben durch 30-minütige Quervernetzung von NGF-R:LMP1 bzw. des CD40-Rezeptors. Anschließend wurden Zellkerne präpariert und die naszierende RNA radioaktiv markiert. Um eine Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten, wurden jeweils mindestens zwei Replikatversuche durchgeführt. Die quantitative Auswertung der Autoradiogramme erfolgte mit Hilfe der AtlasImage 1.5-Software von Clontech. Die durchschnittliche Intensität des Gesamthintergrunds wird dabei zunächst von den jeweiligen Signalen subtrahiert, die dann als korrigierte Werte in die Kalkulation eingehen. Dies erlaubt einen Vergleich der Signalstärke und somit des Expressionsniveaus eines Gens in der induzierten Probe gegenüber der nicht induzierten Kontrolle auf verschiedenen Arrays. Differentielle Expressionen werden als „Difference“-Werte der Signalintensitäten oder als daraus kalkulierte „Ratio“-Werte (x-fache Induktion) ausgedrückt. Ist bei einem Probenpaar für ein Gen bei einem Zustand kein Signal detektierbar, können die Ratio-Werte nicht berechnet werden (z.B. bei AP1) und werden als „undefined“ bezeichnet. Statt dessen werden die korrigierten „Differenz“-Werte angegeben.

Exemplarische Ausschnitte von Autoradiogrammen verschiedener AtlasArray Filtersets nach NGF-R:LMP1 Aktivierung (Abb.4.17) illustrieren z.B. die Induktion von Genen wie PAC-1, JunD, CD40L-„precursor“, JunB, c-myc oder AP1. LMP1-regulierte Gene wurden mit allen vier angegebenen Filtersets untersucht, wobei sich auf Human 1.2 III keine LMP1-regulierten Gene detektieren ließen. Bei der Analyse CD40-regulierter Gene waren aus technischen

Gründen nur zwei Filtersets (Human 1.2 und Human cancer 1.2) auswertbar, die übrigen beiden konnten trotz mehrfacher Versuche aufgrund von Qualitätsmängeln der Filter nicht erfolgreich zum Abschluß gebracht werden. Obwohl die Quervernetzung des CD40-Rezeptors in Vorversuchen eine zu NGF-R:LMP1 vergleichbare Induktion von NF- κ B und p38 MAPK vermittelte, schien das Gesamtniveau der CD40-Aktivierung in den Run-on-Analysen deutlich schwächer zu sein. Auf die Resultate aller Run-on-Experimente wird im folgenden Kapitel in Zusammenhang mit den Ergebnissen von DNA-Chip-Analysen noch näher eingegangen. Eine Liste der differentiell exprimierten Gene ist Tab.4.3 und 4.4 (siehe Anhang II) zu entnehmen.

nicht induziert



30 min. Induktion

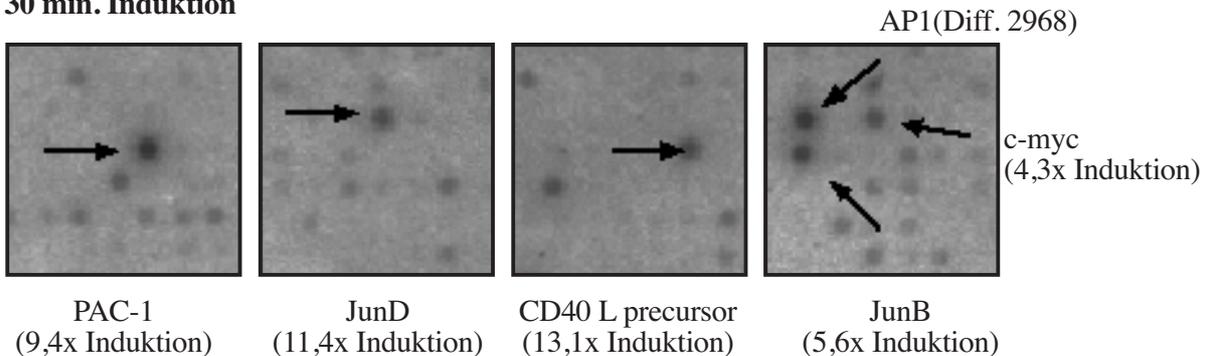


Abb.4.17: Nachweis von LMP1-regulierten Genen durch Hybridisierung mit radioaktiv markierten Run-on-RNAs auf cDNA-Filterarrays (Exemplarische Ausschnitte aus dem AtlasArray Filterset Human cancer 1.2).

In den hier gezeigten Ausschnitten der Autoradiogramme verschiedener AtlasArray Filter konnte eine deutliche Induktion der Gene PAC-1, JunD, CD40-„precursor“, JunB, c-myc und AP1 gezeigt werden. Eine Quantifizierung der jeweiligen Signalstärken wurde mit Hilfe der AtlasImage1.5-Software von Clontech vorgenommen. Die Quantifizierung erlaubt die Bestimmung der x-fachen Induktion des jeweiligen Signals. Wenn sich in der nicht induzierten Kontrolle (oben) kein Signal für das betreffende Gen detektieren läßt, müssen für die induzierte Probe (z.B. für AP1) „Difference“-Werte angegeben werden. Um eine Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten, wurden jeweils mindestens zwei Replikaversuche durchgeführt. Die Herstellung der radioaktiv markierten Run-on-RNA erfolgte aus Zellkernen nach 30-minütiger Induktion von NGF-R:LMP1 in B2264-19/3-Zellen bzw. aus einer nicht induzierten Kontrollfraktion.

4.6.5 Analyse von LMP1- und CD40-regulierten Genen mit DNA-Chip-Technologie

Eine weitere Untersuchung der differentiellen Genexpression in B2264-19/3-Zellen wurde mit Oligonukleotid-Arrays von Affymetrix durchgeführt. Leider ist bei dieser Methode eine Markierung von naszierenden Transkripten wie bei der Run-on-Technik nicht möglich, da die Affymetrix Chip-Technologie auf Biotin-markierten Nukleotiden beruht, die von der RNA-Polymerase II nicht akzeptiert werden. Nach der Präparation von Gesamt-RNA aus induzierten bzw. nicht induzierten B2264-19/3-Zellen erfolgte zunächst die Synthese von cDNA. Diese wurde in einer *in vitro* Reaktion mit biotinylierten Nukleotiden in markierte cRNA transkribiert (Abb.4.18). Die Hybridisierung erfolgte für 16 h bei 45°C unter Rotation. Nach verschiedenen Waschschritten in einer computergesteuerten Waschstation erfolgte die Färbung und Signalverstärkung mit Hilfe von Streptavidin in Kombination mit IgG, biotinyliertem α IgG-Antikörper und einem Streptavidin-Phycoerythrin-Konjugat, dessen Fluoreszenz anschließend in einem Scanner detektiert werden konnte. Für die Markierung wurde Gesamt-RNA nach 30-, 60- und 180-minütiger Induktion von NGF-R:LMP1 oder des CD40-Rezeptors und eine jeweils nicht induzierte Kontrollfraktion präpariert. Jedes Experiment wurde mit drei Replikaten durchgeführt.

Affymetrix Chips präsentieren eine umfangreiche Bibliothek an bekannten Genen sowie ESTs (expressed sequences tags). In meinem Fall wurde der Human Genome U95Av2 Chip eingesetzt, der etwa 12000 bekannte Gene repräsentiert (zur genaueren Beschreibung von Affymetrix Chips siehe 3.6.4). Gene sind nicht durch größere cDNA-Fragmente repräsentiert, sondern durch ein sogenanntes Probenet von 16 verschiedenen Oligonukleotiden mit einer Länge von 20-25 Basenpaaren. Die Oligonukleotide sind so gewählt, dass sie eine hohe Hybridisierungsspezifität für das jeweilige Gen aufweisen. Ein Probenet besteht aus 20 Probenzellen, die jeweils ca. 10^7 Kopien des betreffenden Oligonukleotids enthalten. Die Sequenz dieses Oligonukleotids entspricht exakt derjenigen der cDNA-Sequenz und wird mit PM (PerfectMatch) bezeichnet. Direkt unter einer PM-Zelle wird ein Oligonukleotid mit gleicher Sequenz, aber einem singulären Basenaustausch aufsynthetisiert und mit MM (MisMatch) bezeichnet. Die Signalintensitäten von PM- und MM-Probenzellen bilden die Grundlage für die Kalkulation, ob ein Transkript als „present“, d.h. das Signal als spezifisch und somit das Gen als exprimiert definiert werden kann (3.7.6.2). Relative Transkriptmengen werden durch sogenannte „Signal“-Werte ausgedrückt, die das gewichtete Mittel des PM-Probenets gegenüber dem MM-Probenet repräsentieren (3.7.6.2).

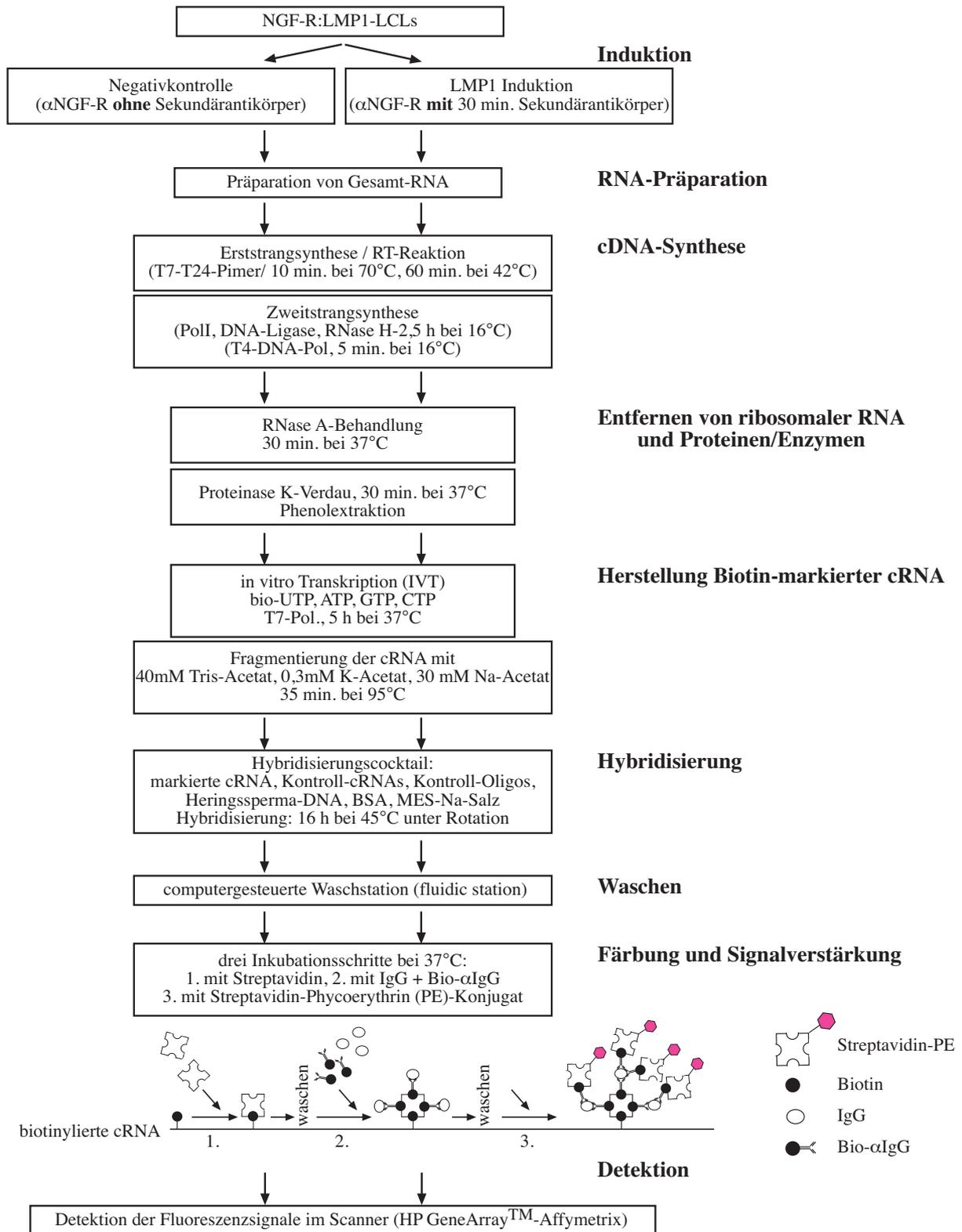


Abb.4.18: Prozessschritte für den Einsatz von Oligonukleotid-Arrays (Affymetrix Chips).

Die Analyse der Fluoreszenz-Intensitätsdaten umfaßte die folgenden drei Schritte: Einer dieser Schritte ist die Skalierung von Intensitäten verschiedener Arrays eines Experiments zur Korrektur von Unterschieden, die aus Probenmarkierung, Hybridisierungseffekten und anderen Faktoren resultieren. Dieser erste Schritt wird auch als Normalisierung bezeichnet. Die Detektion von differentiell exprimierten Genen erfolgt als zweites und falls mehr als eine Versuchsbedingung zu vergleichen ist (z.B. verschiedene Induktionszeiten oder Entwicklungsstadien), folgt ein sogenannter „Clustering“-Schritt, der Gene mit ähnlichen Expressionsmustern gruppiert.

Die Normalisierung (3.7.6.3) der Daten erfolgte mit Hilfe des Programms „The Equalizer“ (Stuart et al., 2001), das eine sogenannte „invariant set“ Normalisierung durchführt. Die „invariant set“ Normalisierung beruht auf der Annahme, dass in jedem Datensatz ein Set von Genen existiert, deren Expressionsniveau sich unter den verschiedenen Versuchsbedingungen nicht signifikant ändert. Dieses Datenset bildet dann die Grundlage für die nicht-lineare Normalisierung.

Für die Detektion von differentiell exprimierten Genen (3.7.6.4) wurde die permutationsbasierte Methode SAM („Significance Analysis of Microarrays“) (Tusher et al., 2001) angewandt. Hierbei wird zunächst die relative Differenz der Expression von Genen bei verschiedenen Versuchsbedingungen unter Berücksichtigung der Variabilität in den verschiedenen Replikaten berechnet. Anschließend wird der Datensatz mehrfach permutiert und die relativen Differenzen werden auf Basis der permutierten Daten neu kalkuliert. Für die Mehrzahl der Gene sind die Werte aus original und permutierten Datensätzen in etwa gleich. Gene, bei denen sich diese Werte um mehr als einen bestimmten Grenzwert unterscheiden, werden als differentiell exprimiert definiert. Basierend auf der Anzahl der Gene, die bei einem bestimmten Grenzwert definiert wurde, wird eine Fehlerquote (false detection rate, FDR) errechnet.

Als abschließender Schritt wurden Gene mit ähnlichen Expressionsprofilen zusammen gruppiert, d.h. eine hierarchische Cluster-Analyse (Eisen et al., 1998) durchgeführt und mit Hilfe von „Treeview“ (Eisen et al., 1998) graphisch dargestellt (3.7.6.5), (Abb.4.19).

Insgesamt konnten 144 LMP1-regulierte Gene aus verschiedenen Funktionsgruppen (Regulatoren von Transkription, Zellzyklus und Apoptose, Signalmediatoren, Oberflächenmoleküle, Rezeptoren etc., Tab.4.4A in Anhang II) nachgewiesen werden. Als bereits bekannte LMP1 Zielgene und somit zusätzliche Kontrolle wurden AP1, A20, Mcl-1,

Bfl-1 und LFA-3 als induziert bestätigt. 117 Gene wurden mit Hilfe von Affymetrix Chips als differentiell exprimiert definiert (91 Gene induziert, 26 Gene reprimiert; Abb.4.19A und Tab.4.4A in Anhang II). Bei 19 dieser Gene konnte eine Induktion auch mit der Run-on-Technik gezeigt werden. Zusätzlich wurden weitere 27 LMP1-regulierte Gene ausschließlich in Run-on-Experimenten detektiert. Von diesen zeigte sich bei 18 Genen mit der Affymetrix-Technologie kein bzw. ein nicht reproduzierbarer Expressionsunterschied, die übrigen neun Gene waren auf den Chips nicht repräsentiert (siehe Tab.4.4.A in Anhang II). Die Regulation verschiedener Oberflächenproteine wie CD83, CD69, CD44 oder CD40 konnte zusätzlich auch in FACS-Analysen bestätigt werden (nicht gezeigte Daten). In die Gruppe der sogenannten „immediate early“ Gene ließen sich 18 Gene einordnen (Abb.4.19A), da sie bereits nach 30 min. Induktion einen deutlichen Anstieg ihres Expressionsniveaus zeigten, das teilweise bereits nach 60 min., in allen Fällen aber nach 180 min. wieder abnahm. In dieser Gruppe finden sich Transkriptionsfaktoren wie NUP475, JunD, ETR101, Zytokine (LD78), Signalmediatoren (PAC-1), aber z.B. auch das Oberflächenmolekül CD69. Eine Reihe von Genen wie z.B. A20, GADD34, BTG-2 oder CD83 reagiert nach ca. 60 min. NGF-R:LMP1 Induktion mit einem Anstieg des Expressionsniveaus. Bei dem Großteil der definierten LMP1-Zielgene wurde eine Erhöhung ihres mRNA-Niveaus erst nach 180 min. Induktion detektiert. Ausgeprägte Repression von Genen zeigte sich fast ausschließlich erst nach 180 min., z.B. bei CD27, dem Interferon induzierbaren Protein 9-27 oder dem Wiskott-Aldrich-Syndrom Protein WASP. Besonders interessante Expressionsprofile wurden z.B. bei IκB epsilon, INSIG1 (Insulin induziertes Protein1) oder EB11 (G-Protein gekoppeltes Rezeptorprotein) beobachtet, die nach 30-minütiger LMP1-Induktion deutlich reprimiert waren, anschließend aber wieder anstiegen und nach 180 min. ein überdurchschnittliches Expressionsniveau zeigten.

Es wurden insgesamt nur 28 CD40-regulierte Gene nachgewiesen (Tab.4.4.B in Anhang II). Dies dürfte wie bereits erwähnt auf einem weniger effizienten Induktionssystem beruhen, denn bereits bei den Run-on-Experimenten bestand ein Detektionsproblem. Generell scheint es nicht sehr wahrscheinlich, dass CD40 nur 1/5 so viele Zielgene wie LMP1 oder diese in so viel schwächerem Ausmaß reguliert. 26 der differentiell exprimierten Gene wurden hierbei in Affymetrix-Experimenten nachgewiesen. 24 Gene wurden als induziert definiert, davon 16 Gene in der Kategorie „immediate early“, die Expression der übrigen acht Gene zeigte sich erst nach 180 min. erhöht (Abb.4.19B). Nur zwei Gene wurden reprimiert, Glycophorin C und ein inhibitorisches „Helix-Loop-Helix“-Protein (AL021154). In Run-on-Experimenten ließen sich sieben der SAM-Kandidatengene bestätigen und zwei zusätzliche Gene detektieren

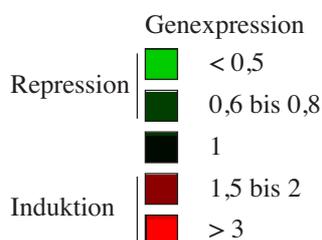
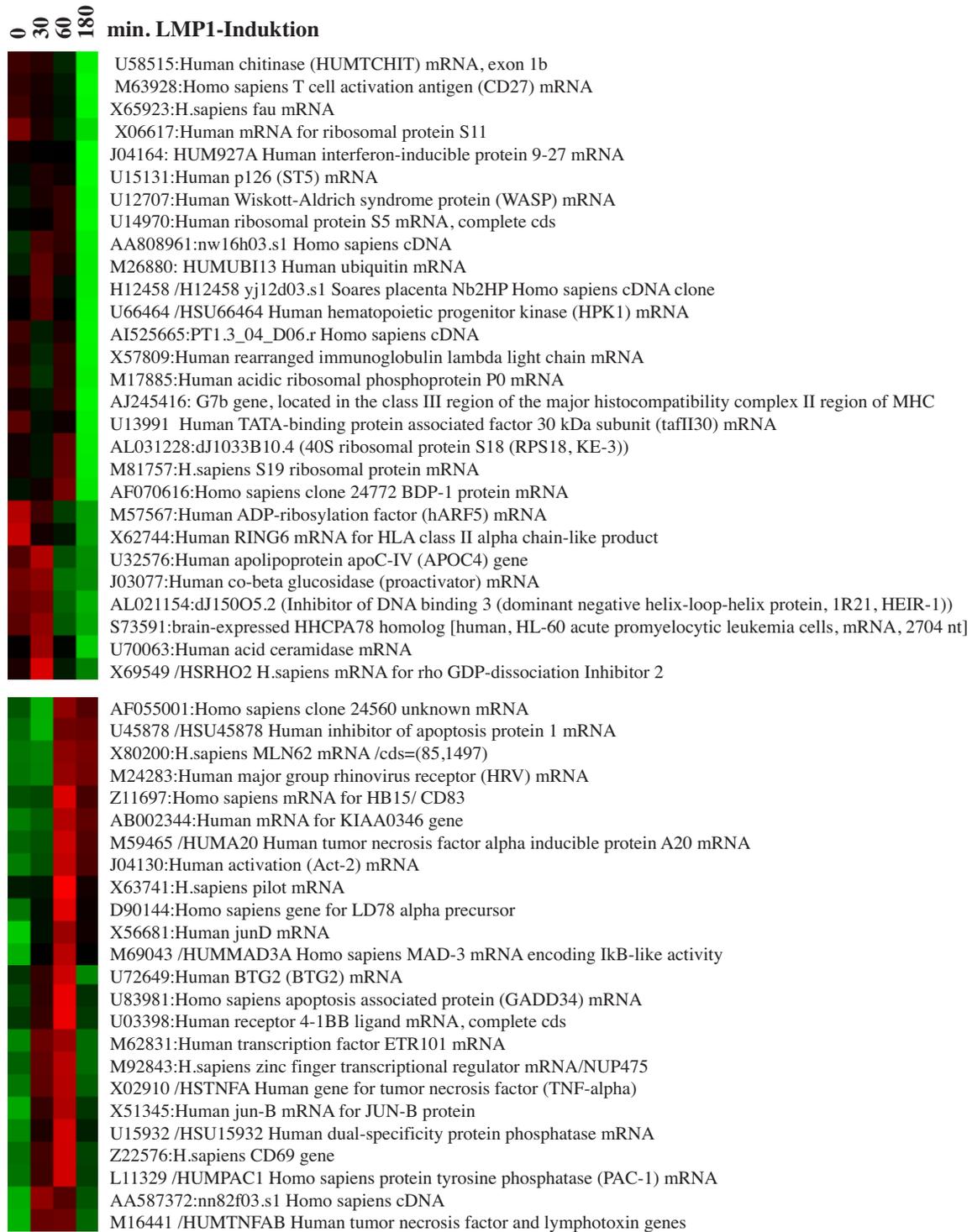
(Tab.4.4.B in Anhang II). 88% der nachgewiesenen CD40-Zielgene waren auch Bestandteil der Liste LMP1-regulierter Gene. Dieses Ergebnis bestätigt nochmals eindrucksvoll die nahe funktionelle Verwandtschaft der beiden Rezeptoren.

Wie bereits erwähnt, ist die Proliferation der B2264-19/3-Zelllinie, die das konditionale NGF-R:LMP1 Protein trägt, abhängig von dessen künstlicher Quervernetzung oder der Kokultur mit WI38 Fibroblasten als Feeder-Zellen. Um einen Eindruck zu gewinnen, über welche Zielgene die Feeder-Zellen diesen Effekt vermitteln könnten und ob dabei LMP1-ähnliche Signalkaskaden eine Rolle spielen, wurden die Zellen für 72 h aus der Kokultur entnommen und anschließend wieder für 3 h auf den „feeder layer“ zurückgesetzt. Eine Phosphorylierung von p38 oder Induktion von NF- κ B konnte hierbei durch Western-Blot bzw. Gelretardations-Experimente nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Dies weist darauf hin, dass weder die p38 MAPK- noch die NF- κ B-Signaltransduktion eine Rolle bei der Feeder-abhängigen Proliferation von B2264-19/3-Zellen spielen dürfte. Für die Untersuchung differentiell exprimierter Gene wurde nach 3 h Feeder-Induktion Gesamt-RNA aus B2264-19/3-Zellen präpariert und die Biotin-markierte cRNA, wie bereits beschrieben, auf Affymetrix Chips hybridisiert. Das Experiment wurde in drei Replikaten durchgeführt und mit Hilfe von SAM ausgewertet. Es konnten 650 differentiell exprimierte Gene nachgewiesen werden, von denen zehn bereits als LMP1- bzw. vier als CD40-Zielgene definiert worden waren (Tab.4.5). Die Frage, ob diese zehn Gene, die sowohl durch LMP1-, als auch durch Feeder reguliert wurden, oder besonders die drei Genprodukte, die von LMP1, CD40 und Feeder-Zellen induziert wurden, eine Rolle als Hauptakteure bei der Induktion der Proliferation in B2264-19/3-Zellen spielen, bleibt noch zu klären.

Abkürzung-Genname	Affymetrix bzw. Clontech Annotation	LMP1-regulierte Gene	CD40-regulierte Gene	Feeder-regulierte Gene
		(10 von 144)	(4 von 28)	(11 von 650)
	Transkriptionsfaktoren			
NUP475	M92843:NUP475, H.sapiens zinc finger transcriptional regulator mRNA	i	i	i
Spi-B	X66079:H.sapiens Spi-B mRNA	i	-	i
NF-kappaB-DNA-Bindedomäne	M58603 /Human NF-kappa-B-DNA binding subunit mRNA	i	i	i
HEIR-1	AL021154:dJ150O5.2 (Inhibitor of DNA binding 3 (dominant negative helix-loop-helix protein, 1R21, HEIR-1)	i	(r)	i
	Signaltransduktion			
rho-GDP-Dissoziations-Inhibitor	X69549 /H.sapiens mRNA for rho GDP-dissociation Inhibitor 2	i	-	i
	Oberflächenproteine/Rezeptoren			
CDw40	X60592:Human CDw40 mRNA for nerve growth factor receptor-related B-lymphocyte activation molecule	i	i	i
	Metabolismus/Strukturproteine			
Ceramidase	U70063:Human acid ceramidase mRNA, complete cds	i-r	-	i
P0	M17885:Human acidic ribosomal phosphoprotein P0 mRNA	r	-	r
Glycophorin C	X12496:Human mRNA for erythrocyte membrane sialoglycoprotein beta (glycophorin C)	-	r	r
	unbekannte Sequenzen			
	H12458 /yj12d03.s1 Soares placenta Nb2HP Homo sapiens cDNA clone	i	-	i
	AA587372:nn82f03.s1 Homo sapiens cDNA	i	-	i

Tab.4.5: Gemeinsame Zielgene von LMP1, CD40 und dem „feeder layer“

Tabellarisch dargestellt sind gemeinsame Zielgene von LMP1 bzw. CD40 und dem „feeder layer“ in B2264-19/3-Zellen. Mit Affymetrix und Run-on-Analysen wurden 144 LMP1-regulierte (TAB.4.4A in Anhang II), 28 CD40-regulierte (Tab.4.4B in Anhang II) und 650 Feeder-regulierte Gene in B2264-19/3-Zellen bestimmt. Die letztgenannten Daten mit „feeder layer“ stammen ausschließlich aus Experimenten mit Affymetrix Chips. Von diesen 650 nach Feeder-Induktion differentiell exprimierten Genen waren zehn bereits als Zielgene von LMP1 und vier als Zielgene von CD40 definiert worden. Drei Gene werden durch LMP1, CD40 und den „feeder layer“ induziert (blau). „i“ steht für induzierte, „r“ für reprimierte Gene.



0 30 60 180 min. LMP1-Induktion

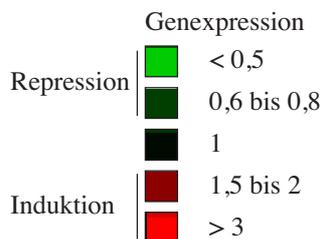
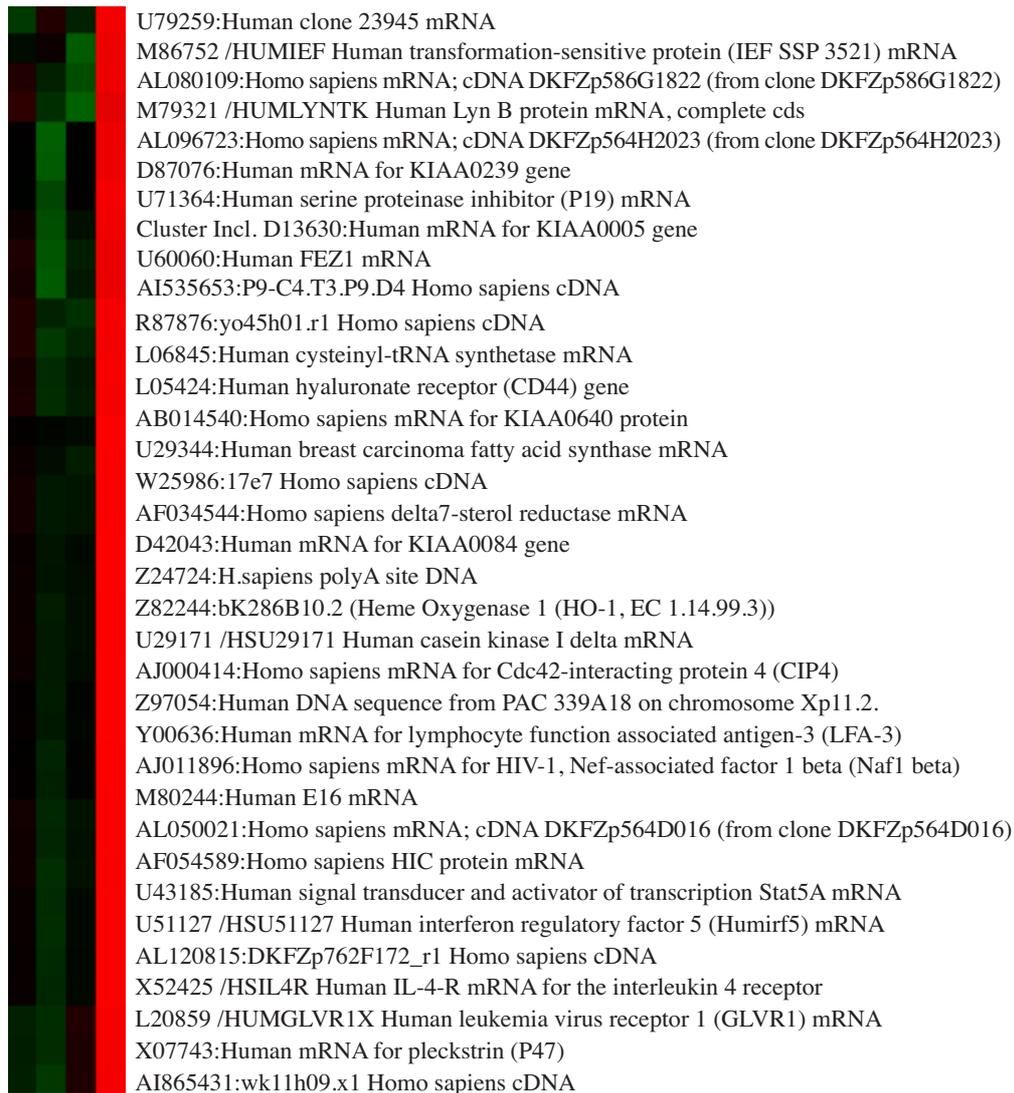




Abb.4.19A: Cluster-Analyse des Expressionsprofils LMP1-regulierter Gene

Dargestellt ist die Induktion oder Repression LMP1-regulierter Gene, die mit dem Affymetrix-System detektiert wurden. Die vier Versuchsbedingungen, keine Induktion („0“), 30, 60 und 180 min. NGF-R:LMP1 Induktion sind in vier Spalten repräsentiert. Gene mit ähnlichem Expressionsmuster wurden in Gruppen zusammengestellt. Schwarz entspricht dem durchschnittlichen Expressionsniveau, grün bedeutet unterdurchschnittliche Expression, rot bedeutet überdurchschnittliche Expression eines Gens. 91 Gene zeigten sich als induziert, 26 Gene als reprimiert. 18 Gene lassen sich als „immediate early“-reguliert kategorisieren, deren Expressionsniveau bereits nach 30 min. erhöht ist und spätestens nach 180 min. wieder abnimmt. Ein Großteil der induzierten bzw. reprimierten Gene reagierte erst nach 180-minütiger NGF-R:LMP1 Aktivierung mit einer signifikanten Veränderung ihrer mRNA.

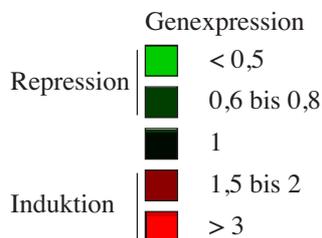
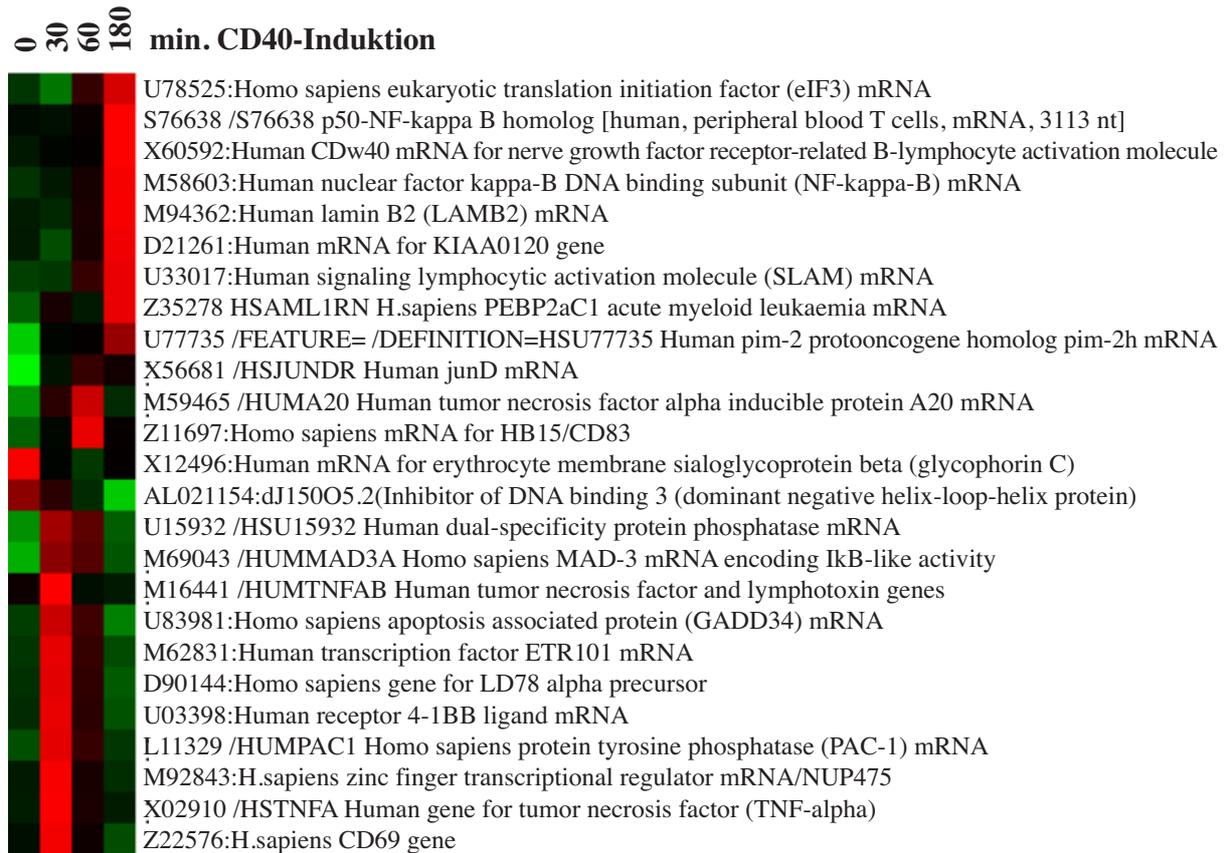


Abb.4.19B: Cluster-Analyse des Expressionsprofils CD40-regulierter Gene

Dargestellt ist die Entwicklung CD40-regulierter Gene detektiert mit dem Affymetrix-System. Die vier Versuchsbedingungen, keine Induktion („0“), 30, 60 und 180 min. CD40-Induktion sind repräsentiert als vier Spalten. Gene mit ähnlichem Expressionsmuster wurden in Gruppen zusammengestellt. Schwarz entspricht dem durchschnittlichen Expressionsniveau, grün bedeutet unterdurchschnittliche Expression, rot bedeutet überdurchschnittliche Expression eines Gens. 24 Gene wurden als induziert nachgewiesen, davon 16 Gene in der Kategorie mit „immediate early“-Regulation. Die übrigen Gene zeigten erst nach 180 min. eine erhöhte mRNA-Abundanz. Reprimiert gefunden wurden nur zwei Gene.

5. Diskussion

5.1 Die Funktion von LMP1 bei der Initiation und Aufrechterhaltung des immortalen Phänotyps in EBV infizierten humanen B-Zellen

LMP1 wurde bisher als absolut essentiell für die Transformation von humanen B-Lymphozyten *in vitro* beschrieben (Kaye et al., 1993). Im Gegensatz dazu stehen unsere Experimente, die zeigen, dass LMP1 zwar kritisch, aber nicht zwingend notwendig für den Prozess der B-Zell-Immortalisation ist. In meiner Arbeit habe ich eine Reihe von LMP1-Mutanten auf der Basis des Maxi-EBV-Systems etabliert. Mit Hilfe dieses Systems war es möglich, Virusstocks mit Konzentrationen von 5×10^4 - 1×10^5 infektiösen Partikeln/ml zu generieren. Elf verschiedene LMP1-Mutanten wurden in *E.coli* konstruiert und sorgfältig während der einzelnen Schritte der Virusproduktion überprüft. Dieser Ansatz machte es zum ersten Mal möglich, den Beitrag verschiedener LMP1-Domänen zur Immortalisierung von B-Zellen quantitativ zu bestimmen. Überraschenderweise gelang es, mit allen LMP1 mutierten EBVs proliferierende B-Zell-Klone zu etablieren, sogar mit EBVs, denen das gesamte LMP1 Gen fehlte.

EBV infizierte B-Zellen wurden routinemäßig auf bestrahlten, humanen embryonalen Fibroblasten als "feeder layer" kultiviert. Diese standardisierte Vorgehensweise verbessert die Effizienz des klonalen Auswachsens immortalisierter B-Zellen durch bis jetzt nicht identifizierte lösliche Faktoren (Sugden und Mark, 1977). Die Mehrzahl der LCLs, die mit verschiedenen Maxi-EBV-Mutanten erhalten wurden, war nach der Etablierungsphase auch in Abwesenheit von Feeder-Zellen zu unbegrenzter Proliferation in der Lage. Dies traf im Gegensatz zu bisherigen Publikationen (Izumi et al., 1997; Kaye et al., 1999; Kaye et al., 1995) auch auf LCLs zu, die mit Y384G-LMP1 etabliert worden waren. Eine Ausnahme stellten LCLs dar, die ΔC -LMP1, ΔTM -LMP1, $\Delta LMP1$ und die NGF:R-LMP1 Chimäre exprimierten. Diese Zelllinien waren für eine fortgesetzte Proliferation *in vitro* zwingend abhängig von der Anwesenheit des „feeder layers“. Wie schon die Experimente in halbfestem Medium nahelegten, ist der Effekt der Feeder-Zellen hauptsächlich auf lösliche Faktoren zurückzuführen, die direkte oder indirekte parakrine Effekte von LMP1 komplementieren können wie z.B. IL-6, IL-8 oder IL-10 (Eliopoulos et al., 1999; Eliopoulos et al., 1997; Nakagomi et al., 1994) (nicht gezeigte Daten). Konsequenterweise brachte auch die Kokultur in einem zweikammerigen Kulturgefäß den gewünschten Effekt. Möglicherweise simulieren

Feeder-Zellen eine *in vitro* Situation, die an die Wirkung von Stromazellen in „germinal centers“ von Lymphknoten bei der Initiation von Burkitt-Lymphomen erinnert.

Die Eigenschaften von einigen der EBV-Mutanten in dieser Arbeit stehen in deutlichem Widerspruch zu ähnlichen Mutanten, die in Elliot Kieffs Gruppe etabliert wurden (Higuchi et al., 2002; Izumi et al., 1994; Izumi et al., 1997; Kaye et al., 1993; Kaye et al., 1999; Kaye et al., 1995). Dabei könnte vor allem ein technischer Aspekt eine Rolle spielen, da bei funktionell entscheidend beeinträchtigten Mutanten hohe Konzentrationen infektiöser Partikel kritisch zu sein scheinen. Die Voraussetzung dafür wurde durch das Maxi-EBV-System geschaffen, das uns in die Lage versetzte, genetisch eindeutige Virusstocks zu generieren, die nicht durch unerwünschte rekombinante oder Wildtyp-EBVs belastet sind. Darüber hinaus lassen sich die Viruspartikelkonzentrationen sehr einfach und sicher mittels GFP Fluoreszenz quantifizieren. Nachdem die Effizienz der B-Zell-Immortalisation besonders mit den Maxi-EBV-Mutanten ΔC -LMP1, ΔTM -LMP1, $\Delta LMP1$ entscheidend verringert war, wurden bis zu hundert Mal mehr infektiöse Partikel für die Etablierung eines proliferierenden Einzelzellklons benötigt im Vergleich zu Wildtyp-EBV (Abb.4.5). Diese Bedingungen konnten wahrscheinlich in früheren Arbeiten nicht erfüllt werden. Dabei ist es wichtig anzumerken, dass auch diese LCLs, obwohl sie mit bis zu einhundert Mal mehr infektiösen Einheiten etabliert wurden, keine höhere Kopienzahl an EBV-DNA aufwiesen (siehe Southernblot-Analysen im Anhang) oder höhere Expressionsniveaus viraler Proteine wie z.B. EBNA2 (Abb.4.6-8) zeigten. Somit scheint es, dass LMP1-Mutationen die klonale Transformierbarkeit primärer B-Zellen durch EBV beeinträchtigen. Für die Etablierung eines wirklich immortalen Phänotyps sind weitere zelluläre Voraussetzungen entscheidend, die nur von wenigen Zellen einer B-Zellpopulation erfüllt werden (Tahara et al., 1997). Das bedeutet, dass auch bei lymphoblastoiden Zelllinien, die mit Wildtyp-EBV etabliert wurden, durchschnittlich nur jede vierte die kritische Schwelle von 90-150 Zellteilungen übersteht, wobei eine hohe Telomeraseaktivität als wichtiger Faktor angesehen wird (Counter et al., 1994; Tahara et al., 1997).

Zahlreiche Publikationen befassen sich mit Mutationen innerhalb des zytoplasmatischen N-Terminus von LMP1. Diese nehmen nicht nur Einfluß auf die Halbwertszeit des Proteins, sondern beeinflussen unter anderem auch die NF- κ B-Aktivierung und Membranlokalisation von LMP1 (Aviel et al., 2000; Coffin et al., 2001; Huen et al., 1995; Mitchell und Sugden, 1995; Moorthy und Thorley-Lawson, 1993b). N-terminale Deletionen der zytoplasmatischen und ersten Transmembrandomäne resultieren in einem Verlust der Transformation (Baichwal

und Sugden, 1989; Hammerschmidt et al., 1989; Kaye et al., 1993) und vermitteln sogar zytostatische Effekte (Kaykas und Sugden, 2000). Es wird angenommen, dass diese Effekte nicht durch spezifische Interaktionen des N-Terminus bedingt sind, sondern vor allem durch Positionseffekte, da der N-Terminus auch durch eine heterologe Sequenz ähnlicher Ladung funktionell ersetzt werden kann (Coffin et al., 2001). Unsere Untersuchungen zeigten, dass spezifische Mutationen in diesem Teil von LMP1, die die putative SH3-Domäne alterieren, keine (P12-15-16-19-20A-LMP1) bzw. nur marginale (P9-10-15A-LMP1) Auswirkungen auf die EBV vermittelte B-Zell-Immortalisation haben.

Das sogenannte lytische LMP1 (Hudson et al., 1985), das aus den beiden letzten Transmembrandomänen und dem zytoplasmatischen C-Terminus besteht, hat kein transformierendes Potential (Liebowitz et al., 1987; Liebowitz et al., 1992; Mann et al., 1985). Es wurde gezeigt, dass dieses verkürzte Protein die Signalkapazität des latenten LMP1 Moleküls reduziert, vermutlich aufgrund von Konkurrenz um Signalmediatoren (Erickson und Martin, 2000). Es gibt Hinweise darauf, dass das lytische LMP1 bereits im Viruspartikel präsent ist und eine Rolle bei der frühen Phase der EBV-Infektion spielt (Erickson und Martin, 1997). In unseren Experimenten mit der EBV-Mutante, bei der der Promotor der lytischen LMP1-Variante deletiert worden war, konnte ich keinen Effekt auf die Effizienz der B-Zell-Immortalisation beobachten. Theoretisch kann nicht ausgeschlossen werden, dass das lytische LMP1 von einem zusätzlichen unbekanntem Promoter exprimiert wird oder eine bisher unentdeckte „splicing“-Variante existiert. Dies sollte sich durch RT-PCR Experimente klären lassen.

Verschiedene Arbeiten befassen sich mit der Rolle des C-Terminus von LMP1 bei der Signaltransduktion und B-Zell-Immortalisation. Die ersten 45 Aminosäuren des C-Terminus (As187-231), auch als CTAR1 bezeichnet, tragen das TRAF-Konsensusmotiv PxQxT. Diese Region ist verantwortlich für ca. 25% der LMP1 vermittelten NF- κ B Aktivierung (Devergne et al., 1996; Huen et al., 1995; Kaye et al., 1996; Mitchell und Sugden, 1995) und wurde bei der Untersuchung von C-terminalen Deletionsmutanten als essentiell und ausreichend für den Prozess der B-Zell-Immortalisation gefunden (Kaye et al., 1999; Kaye et al., 1995). Eine Deletion des CTAR1 Motivs im Kontext des gesamten LMP1-Moleküls resultierte hier in einem kompletten Verlust des transformierenden Potentials (Izumi et al., 1997), wobei möglicherweise auch dieses Resultat den technischen Einschränkungen von sehr niedrigen Virustitern unterliegt. Die spezifische Mutation des PxQxT-Motivs in meiner Arbeit dagegen führte zu einer Reduktion der Immortalisations-Effizienz auf 10% des Wildtyp-Niveaus.

LCLs, die mit Δ PxQxT-LMP1 EBVs generiert wurden, konnten auch in Abwesenheit von Feeder-Zellen über mehrere Monate problemlos kultiviert werden, auch dies steht im Widerspruch zu bisher publizierten Daten (Izumi und Kieff, 1997)

Die putative JAK3 Bindedomäne in CTAR3 (Gires et al., 1999) scheint keine Rolle bei der Generierung von proliferierenden B-Zellklonen zu spielen (Izumi et al., 1999), was auch unsere Experimente mit der Deletionsmutante Δ JAK3-LMP1 bestätigten. Allerdings gibt es Hinweise darauf, dass die putative JAK3-Interaktionsdomäne in CTAR3 von LMP1 unvollständig ist und zusätzlich weitere, nicht in direkter Folge angeordnete Elemente eine Rolle bei der Aktivierung von JAK3 spielen (Brennan et al., 2001; Higuchi et al., 2002). Wenn das der Fall ist, würde die Δ 33 bp-Deletion in Δ JAK3-LMP1 nicht zu einem vollkommenen Verlust der JAK/STAT-Signaltransduktion führen und somit wäre auch kein Effekt auf die Immortalisations-Effizienz zu erwarten. Andererseits wurde gezeigt, dass JAK3 bei der CD40/IL-4 vermittelten B-Zellproliferation, dem Immunglobulin-„class switch“ und der Regulation von Oberflächenproteinen wie CD23, ICAM-1 oder Lymphotoxin α keine erkennbare Rolle spielt (Jabara et al., 1998). Aufgrund der nahen funktionellen Verwandtschaft der beiden Rezeptoren ist es deshalb nicht überraschend, dass JAK3 auch bei der LMP1-vermittelten B-Zell-Immortalisation keine entscheidende Rolle zu spielen scheint. Diese Frage sollte sich teilweise beantworten lassen, indem das Niveau der JAK/STAT-Induktion in LCLs, die mit Δ JAK3-LMP1 EBVs etabliert wurden, überprüft wird.

Innerhalb des zytoplasmatischen C-Terminus von LMP1 wird die Region von As 374-384 für ca. 75% der LMP1 induzierten NF- κ B Aktivierung verantwortlich gemacht (Floettmann und Rowe, 1997; Huen et al., 1995). Punktmutationen von As 379-383 (P379G, V380G, Q381G, S383G, Y384G) resultierten in einem kompletten Verlust der CTAR2 vermittelten NF- κ B Aktivität (Floettmann und Rowe, 1997). Diese Region interagiert mit TRADD, das zusammen mit TRAF2 die Induktion von NF- κ B und der p38 MAPK Signalkaskade vermittelt (Eliopoulos et al., 1999; Izumi und Kieff, 1997; Kieser et al., 1999; Schultheiss et al., 2001). Der JNK1/AP1-Signalweg wird ebenfalls durch diese Region induziert, wobei hier die Signalmediatoren weniger klar definiert sind (Eliopoulos und Young, 1998; Kieser et al., 1999; Kieser et al., 1997). In dieser Arbeit reduzierte eine einzige Punktmutation des Y384G-LMP1 Maxi-EBV dessen Immortalisations-Effizienz auf 7,5% des Wildtyp-Niveaus. Wie schon erwähnt, konnten bereits etablierte LCLs im Gegensatz zur Aussage bisheriger Publikationen (Izumi et al., 1997; Kaye et al., 1999; Kaye et al., 1995) über mehrere Monate problemlos kultiviert werden. Auch Zelllinien, die aus Y384G-LMP1 Virusstocks von

Verdünnungsstufen stammten, die den Voraussetzungen einer „one hit“-Kinetik entsprachen und somit Einzelzellklone waren, konnten nach der üblichen sechswöchigen Etablierungsphase ohne „feeder layer“ dauerhaft expandiert werden.

Hinsichtlich seiner phänotypischen Effekte bei der Zelldifferenzierung, Proliferation und Expression von Oberflächenmolekülen scheint LMP1 einen aktivierten CD40-Rezeptor zu imitieren (Kilger et al., 1998; Uchida et al., 1999; Zimmer-Strobl et al., 1996). Zudem sind eine ganze Reihe von Signalmediatoren wie z.B. NF- κ B, AP1, JNK, p38 MAPK oder STATs bekannt, die sowohl von LMP1, als auch von aktiviertem CD40-Rezeptor induziert werden. Im Gegensatz zu LMP1 wird der CD40-Rezeptor erst durch Bindung seines trimeren Liganden CD154 induziert, der hauptsächlich auf aktivierten CD4⁺ T-Zellen exprimiert wird (Chan et al., 2000; van Kooten und Banchereau, 2000). Es wurde gezeigt, dass aktiviertes CD40 *in vitro* die dauerhafte Proliferation von primären B-Zellen unter Beibehaltung ihres Phänotyps nur unter Zugabe von IL-4 induzieren kann (Crawford und Catovsky, 1993; Planken et al., 1996; Rousset et al., 1995; Spriggs et al., 1992). Das LMP1:CD40 Chimär (Gires et al., 1997), das aus dem N-terminalen und Transmembrananteil von LMP1 und dem zytoplasmatischen C-Terminus von CD40 besteht, sollte die Frage beantworten, ob ein konstitutives CD40-Signal im Kontext von EBV in der Lage ist, die Funktion von LMP1 bei der B-Zell-Immortalisierung zu ersetzen. Die konstitutive CD40-Signaltransduktion wird durch die spontane Aggregation des LMP1-Transmembrananteils vermittelt. Meine Untersuchungen zeigten, dass LMP1:CD40 Maxi-EBVs primäre B-Zellen mit sehr hoher Effizienz immortalisieren, die gegenüber Wildtyp Maxi-EBVs nur geringfügig beeinträchtigt ist. Die etablierten B-Zellklone proliferierten unbegrenzt und zeigten im Laufe weiterer Expansionen keinerlei Probleme. Dieses Ergebnis bestätigt die nahe funktionelle Verwandtschaft von LMP1 und CD40 und zeigt erstmals, dass ein konstitutives CD40 Signal im Kontext von EBV auch ohne Zugabe von IL-4 in der Lage ist, dauerhafte Proliferation von primären B-Zellen *in vitro* zu induzieren.

Nach Deletion des kompletten C-Terminus von LMP1 konnte mit Δ C-LMP1 EBVs noch eine Immortalisationsfrequenz von 2,4% erzielt werden. Die hierbei etablierten Zelllinien waren für eine fortgesetzte Proliferation von der Kokultur mit Feeder-Zellen abhängig. Im Gegensatz zu allen anderen LMP1-Mutanten wurde bei diesen LCLs eine massive Überexpression von Δ C-LMP1 festgestellt (Abb.4.7). Zudem zeigten Immunfluoreszenzanalysen (nicht gezeigte Daten) die Bildung von zytoplasmatischen Aggregaten im Kontrast zur klassischen Verteilung von Wildtyp-LMP1. Der sehr drastische

strukturelle Eingriff bei dieser Mutante resultierte vermutlich in einer starken Veränderung der Nettoladung des Proteins. Demnach ist es sehr wahrscheinlich, dass daraus entstehende Probleme mit dem intrazellulärem Proteintransport und der Insertion in die Plasmamembran zu einer Akkumulation von Δ C-LMP1 im Zytoplasma oder anderen Zellkompartimenten führten.

Das Δ TM-LMP1 Maxi-EBV zeigte eine äußerst geringe Immortalisations-Effizienz von nur 0,45% im Vergleich zu Wildtyp-LMP1 in 2089. Diese niedrige Frequenz lag konsistent sogar noch unter dem transformierenden Potential des vollständigen LMP1-„knock out“ in Δ LMP1 Maxi-EBVs, was eine dominant negative Funktion dieser Mutante vermuten lässt.

Es war sehr überraschend, dass es gelang, proliferierende B-Zellklone auch mit EBVs zu etablieren, denen das gesamte LMP1-Protein fehlte, obwohl die Immortalisations-Effizienz unter 1% lag. Für eine dauerhafte Proliferation von Δ LMP1-LCLs *in vitro* war allerdings die Kokultur mit Feeder-Zellen unabdingbar. Das onkogene Potential einer Δ LMP1-Zelllinie im Vergleich zu einer LCL, die aus demselben Spender stammte und mit Wildtyp-Maxi-EBV etabliert worden war, wurde in einem SCID-Maus Modell untersucht (Übersichtsartikel: Johannessen und Crawford, 1999; Rowe et al., 1991; Walter et al., 1991). Unsere Resultate zeigten in Übereinstimmung mit Daten, die in transgenen Mäusen erhoben wurden (Kulwichit et al., 1998; Uchida et al., 1999; Wilson et al., 1990), dass LMP1 nicht nur die Effizienz der B-Zell-Immortalisation *in vitro* verbessert, sondern für die Onkogenität von EBV *in vivo* absolut essentiell ist.

5.2 Das konditionale Zellsystem

Ein zweiter Teil meiner Arbeit war die umfassende Katalogisierung von LMP1-Zielgenen und der Vergleich mit CD40 regulierten Genen. Obwohl bereits eine ganze Reihe von LMP1-Zielgenen in Einzelpublikationen beschrieben wurde, ist die Liste der bekannten Gene längst nicht vollständig. Auch das Signaltransduktions-Netzwerk, das die verschiedenen Effekte von LMP1 vermittelt, weist noch Lücken auf. Da LMP1 und CD40 eine Reihe von Parallelen hinsichtlich ihrer Signalmediatoren und phänotypischer Effekte zeigen, sollte eine nähere Untersuchung der Zielgene beider Rezeptoren weitere Homologien und Unterschiede von LMP1 und CD40 aufklären.

Es gelang mir, ein konditionales Zellsystem in primären humanen B-Zellen zu etablieren. Basierend auf dem Maxi-EBV System, das den Kontext des gesamten EBV-Genoms in die

Untersuchungen einbrachte, konnte ich eine lymphoblastoide Zelllinie (B2264-19/3) generieren, die anstelle von Wildtyp-LMP1 ein konditionales LMP1 Gen exprimiert. Das konditionale LMP1 besteht aus dem extrazellulären und Transmembrananteil des humanen „low affinity“ NGF-Rezeptors (p75^{NTR}/p75-Neurotrophinrezeptor) und der intrazellulären, C-terminalen Signaldomäne von LMP1 (Gires et al., 1997) (Abb.4.10). Da die Transmembrandomäne des chimären Proteins aus dem NGF-R Anteil die sechs Transmembrandomänen von LMP1 ersetzt, wurde erwartet, dass die LMP1 typische Autoaggregation und damit die konstitutive Aktivität von LMP1 aufgehoben ist. Erst eine artifizielle Aggregation mit Hilfe von Antikörpern, die gegen den extrazellulären NGF-R Anteil des chimären Proteins gerichtet sind, sollte LMP1-spezifische Signale in der Zelle aktivieren (Abb.4.10).

Der humane NGF-R p75 gehört zur Familie der NT (neurotrophic factor)-Rezeptoren, die Wachstum, Überleben und Differenzierung von Neuronen unterstützen. p75^{NTR} bindet NGF, BDNF (brain derived neurotrophic factor), NT (Neurotrophin)-3,-4 und -5 mit geringer Affinität und zeigt strukturelle Homologien zu einer Reihe von leukozytären Oberflächenproteinen wie TNF-R und CD40 (Raffioni et al., 1993). Auf primären und EBV infizierten B-Zellen wurde p75^{NTR} nicht nachgewiesen (D'Onofrio et al., 2000; Schenone et al., 1996), was auch bei den von mir generierten LCLs bestätigt werden konnte (nicht gezeigte Daten). Während p75^{NTR} sowohl in neuronalen, als auch nicht neuronalen Geweben gefunden wurde, scheinen die „high affinity“-Rezeptoren der NTR-Familie selektiv in den responsiven Geweben der jeweiligen Neurotrophine exprimiert zu werden (Barbacid, 1993). Diese Gruppe besteht aus Transmembran-Tyrosin-Kinasen (Trk), die mit hoher Affinität NGF (TrkA), BDNF und NT-4/5 (TrkB) und NT-3 (TrkB) binden (Barbacid, 1993; Meakin und Shooter, 1992). Die Aktivierung von Trks resultiert in einer Induktion der PI3-Kinase, Ras, Raf und MAPK Signaltransduktion (Baxter et al., 1995; Greene und Kaplan, 1995; Kaplan und Stephens, 1994). In EBV-transformierten B-Zellen wurde keine Expression von TrkA und TrkC nachgewiesen, jedoch konnte TrkB-Expression in verschiedenen B-Zelllinien gezeigt werden (D'Onofrio et al., 2000; Schenone et al., 1996). Es gibt Hinweise darauf, dass p75^{NTR} mit TrkA interagiert und die NGF-induzierten Funktionen von TrkA verstärkt (Barker und Shooter, 1994; Chao und Hempstead, 1995; Hempstead et al., 1991).

Eine Expression von TrkA oder TrkB konnte ich in der Zelllinie B2264-19/3 in FACS-Analysen und Westernblots nicht nachweisen (nicht gezeigte Daten). Es ist deshalb auch nicht zu erwarten, dass eine Induktion des NGF-R:LMP1-Moleküls durch einen spezifischen

Antikörper gegen den extrazellulären Anteil des NGF-Rezeptors/p75^{NTR} in einer gleichzeitigen Aktivierung dieser Transmembran-Tyrosinkinase, besonders von TrkA, resultiert. Es ist deshalb äusserst unwahrscheinlich, dass die Liste von LMP1-Zielgenen, die mit dem konditionalen NGF-R:LMP1 System identifiziert wurde, auch TrkA oder B regulierte Gene enthält.

Das konditionale System erwies sich für die angestrebten Experimente als sehr geeignet. Nachdem für die Untersuchung von Signaltransduktionskaskaden und das Auffinden von direkten Zielgenen kleine Zeitfenster entscheidend sind, um Sekundäreffekte oder autokrine Rückkopplungen ausschließen zu können, war die schnelle Induzierbarkeit des Systems von besonderem Wert. Bereits innerhalb von Minuten nach einer Quervernetzung von NGF-R:LMP1 auf der Oberfläche von B2264-19/3-Zellen konnte die Aktivierung von bekannten LMP1 Signalwegen nachgewiesen werden (4.6.2). Die Induktion von NF- κ B wurde bereits nach 30-minütiger NGF-R:LMP1 Aktivierung in Gelretardationsexperimenten gezeigt (Abb.4.13). Als weitere bekannte Signalwege von LMP1 wurden innerhalb eines Induktionszeitraums von 30 min. die Phosphorylierungen von p38 MAPK, JNK1, JNK2 und STAT1 (Abb.4.14 A, B, C) nachgewiesen. Die Interaktion von LMP1 mit JAK3, das in aktiviertem Zustand die Phosphorylierung von STATs induziert, wird kontrovers diskutiert. Es liegen Hinweise vor, die darauf schließen lassen, dass die putative JAK3-Bindedomäne in CTAR3 (Gires et al., 1999) nicht vollständig definiert wurde und weitere nicht-konsequente Elemente im C-Terminus von LMP1 eine Rolle spielen (Brennan et al., 2001; Higuchi et al., 2002). Die Resultate meiner Arbeit bestätigen die Ergebnisse von Gires et al. (1999) insofern, dass eine Interaktion des C-Terminus von LMP1 mit JAK3 in B-Zellen tatsächlich stattfindet, da nach 30-minütiger Induktion von NGF-R:LMP1 in B2264-19/3-Zellen eine klare Phosphorylierung von STAT1 nachgewiesen werden konnte (Abb.4.14C). Zudem wurde unter den LMP1-regulierten Genen u.a. SpiB (Tab.4.4.A in Anhang II), ein bekanntes Zielgen der JAK/STAT-Signalkaskade, als induziert identifiziert.

Offensichtlich benötigt LMP1 für eine effiziente Signaltransduktion einen höheren Grad an Quervernetzung. Nachdem das NGF-R:LMP1-Protein in B2264-19/3-Zellen mit einem spezifischen Antikörper dimerisiert wurde, der gegen den extrazellulären NGF-R-Anteil des Moleküls gerichtet ist, konnte keine Aktivierung der bekannten Signalwege (NF- κ B, p38 MAPK, JNK/AP1 und JAK/STAT) nachgewiesen werden (Kontrollen in Abb.4.14B, C und nicht gezeigte Daten). Erst die weitere Quervernetzung mit einem Sekundärantikörper, der gegen den α NGF-R-Antikörper gerichtet ist, resultierte in einer Induktion aller vier

Signalkaskaden. Der Befund legt nahe, dass LMP1 Signalkomplexe bildet, die aus einer größeren Zahl an LMP1-Molekülen bestehen. Sehr wahrscheinlich kommt es dabei zu einer Kolokalisation mit oder Translokation in „Rafts“, die als „hot spots“ signaltransduzierender Moleküle bekannt sind (Higuchi et al., 2001; Kaykas et al., 2001).

Da humane B-Zellen die wichtigsten Zielzellen von EBV sind, war es von Vorteil, das konditionale LMP1 System in primären B-Zellen zu etablieren, was den Ergebnissen eine besondere Relevanz verlieh. Gleichzeitig waren damit auch die Voraussetzungen für vergleichende Untersuchungen von LMP1- und CD40-Zielgenen geschaffen, da primäre B-Zellen den CD40-Rezeptor konstitutiv exprimieren. Damit konnten beide Rezeptoren in der selben Zelllinie untersucht werden und damit zellspezifische Unterschiede ausgeschlossen werden.

Die Induktion des CD40-Rezeptors in B2264-19/3-Zellen erfolgte entsprechend der Vorgehensweise bei NGF-R:LMP1 mit einem agonistischen Antikörper gegen CD40 unter zusätzlicher Quervernetzung durch einen Sekundärantikörper. Die dadurch induzierte CD40-Aktivierung wurde durch NF- κ B Gelretentionsanalysen nachgewiesen. Die Induzierbarkeit der NF- κ B-Signaltransduktion durch CD40 schien dem Niveau der NGF-R:LMP1 vermittelten Induktion in etwa zu entsprechen. Die Phosphorylierung von p38 MAPK nach CD40-Aktivierung fiel dagegen reproduzierbar schwächer aus. Die Ergebnisse der ATLAS Array und Affymetrix Chip Experimente lassen vermuten, dass das CD40-Induktionssystem die Genexpression in B2264-19/3-Zellen möglicherweise nicht mit derselben Effizienz wie NGF-R:LMP1 reguliert. Es ist nicht auszuschließen, dass dies teilweise auf einer geringeren Effizienz des Induktionssystems beruht. Die Ursachen dafür könnten einerseits auf einer geringeren Oberflächenexpression von CD40 gegenüber NGF-R:LMP1 in B2264-19/3-Zellen beruhen oder einer weniger effizienten Induktion des CD40-Rezeptors durch das verwendete Antikörpersystem. *In vivo* erfolgt die Aktivierung von CD40 durch die Bindung des zellständigen trimeren Liganden CD154. Möglicherweise ist diese Stöchiometrie für eine Effizienz des Systems besonders entscheidend und wird durch eine Quervernetzung mit Antikörpern nicht gewährleistet.

5.3 LMP1 Aktivierung induziert B-Zellproliferation

Die Zelllinie B2264-19/3 ist für eine fortgesetzte Proliferation völlig von der Kokultur mit WI38 Fibroblasten als „feeder layer“ abhängig, die anscheinend in der Lage ist, LMP1 durch

direkte oder indirekte parakrine Effekte zu komplementieren. Zellen, denen der „feeder layer“ entzogen wurde, reagierten mit einem Wachstumsstopp, vermittelten aber während der ersten sieben Tage einen vitalen Eindruck und starben erst dann allmählich. Diese Beobachtung bestätigt frühere Arbeiten aus unserem Labor mit sogenannten mini-EBVs, die zeigten, dass ein Verlust der LMP1-Aktivität in einer Arretierung von immortalisierten B-Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus resultiert (Kilger et al., 1998). Auf die Induktion von NGF-R:LMP1 reagierten arretierte B2264-19/3-Zellen mit sofortiger Proliferation (Abb.4.15). Das proliferative LMP1-Signal scheint dabei deutlich potenter zu sein als die Effekte, die von Feeder-Zellen induziert wurden (nicht gezeigte Daten). Bei Untersuchungen des Zellzyklusprofils während der ersten 65 h nach NGF-R:LMP1 Induktion zeigte sich bereits nach 12 h eine massive Zunahme von Zellen in der S-Phase (Abb.4.14). Der Anteil an S-Phase Zellen stieg noch bis zu 46 h nach Induktion an und sank dann langsam wieder ab. Die nicht-induzierte Kontrollpopulation enthielt nur einen sehr geringen Anteil S-Phase-Zellen, dagegen 20% mehr Zellen in G1 als die induzierte Population. Der Anteil apoptotischer Zellen war in beiden Kulturen gleich gering. Diese Ergebnisse bestätigen nochmals, dass ein Fehlen von LMP1-Signalen zu einer Arretierung immortalisierter B-Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus führt. LMP1 scheint ein echtes proliferatives Signal zu vermitteln. Die anti-apoptotischen Effekte von LMP1 dürften in diesem Zusammenhang keine oder nur eine untergeordnete Rolle spielen.

Für weitere Untersuchungen des LMP1-abhängigen Proliferationsverhaltens von B2264-19/3-Zellen wäre es in anschließenden Experimenten möglich, verschiedene kommerziell erhältliche Inhibitoren, die z.B. die NF- κ B- oder MAPK-Signaltransduktion unterbinden, einzusetzen. Solche mehr oder weniger spezifischen Inhibitoren sollten es erlauben, den Anteil der bekannten Signalkaskaden an LMP1-vermittelter Proliferation von B-Zellen zu untersuchen.

5.4 Zielgene von LMP1 und CD40

Die Untersuchung von LMP1- und CD40-Zielgenen erfolgte in B2264-19/3-Zellen mit zwei verschiedenen Methoden, mit der Run-on-Technik auf cDNA Filterarrays und mit Oligonukleotid-Arrays von Affymetrix. Der Vorteil der Run-on-Technik besteht darin, dass nur naszierende, d.h. gerade transkribierte RNAs markiert werden, was eine klare Beschränkung auf ein genau definiertes Zeitfenster zur Folge hat und die sensitive Detektion von sehr geringen Expressionsunterschieden ermöglicht. Ausserdem sind bei dieser Methode

mRNAs mit besonders kurzen Halbwertszeiten kein Problem. Die Oligonukleotid-Arrays von Affymetrix vergleichen die „steady state“ Niveaus von Transkripten und bieten den Vorteil, dass eine sehr grosse Anzahl von Genen auf einem einzigen Chip untersucht werden kann und die Datenanalyse weniger fehleranfällig ist.

Run-on-Experimente wurden ausschließlich nach 30-minütiger Induktion von NGF:R-LMP1 bzw. des CD40-Rezeptors durchgeführt, bei den Analysen mit Affymetrix Chips wurden drei verschiedene Induktionszeiten, 30, 60 und 180 min. untersucht. Insgesamt konnten 144 LMP1 regulierte Gene identifiziert werden (Tab.4.4.A in Anhang II). Einige davon waren bereits als LMP1-Zielgene bekannt wie z.B. AP1, A20, Mcl-1, Bfl-1 oder LFA3 und stellten somit eine zusätzliche Bestätigung für die Aussagekraft des Systems dar. Eine ganze Reihe von Genen konnte sowohl mit der Run-on-Technik als auch auf Affymetrix Chips nachgewiesen werden, was die Zuverlässigkeit beider Methoden bestätigte. Die identifizierten Zielgene von LMP1 stammten aus verschiedenen funktionellen Gruppen. Es wurden z.B. 23 verschiedene Transkriptionsfaktoren bzw. deren Untereinheiten identifiziert, sowie zahlreiche Signalmediatoren, Oberflächenproteine und metabolisch aktive Gene. Eine ganze Reihe von Genen konnte als „immediate early“-responsiv definiert werden, der Großteil der Gene zeigte allerdings erst nach 180-minütiger Induktion Regulationseffekte (Abb.4.19A).

Dagegen konnte ich nur 28 CD40 regulierte Gene identifizieren (Tab.4.4.B in Anhang II). Auch unter diesen waren bereits bekannte CD40-Zielgene wie TNF α , CD83 oder CD40. Auffälligerweise waren 25 der CD40-Zielgene auch Bestandteil der Liste LMP1-regulierter Gene, was die nahe Verwandtschaft der beiden Rezeptoren eindrucksvoll belegt. Besonders viele Übereinstimmungen fanden sich in der Gruppe der Transkriptionsfaktoren und „immediate early“-regulierten Gene (Abb.4.19B). Ob die deutlich geringere Anzahl der identifizierten CD40-Zielgene gegenüber LMP1-regulierten Genen die Realität widerspiegelt oder eine Konsequenz des Induktionssystems darstellt, bleibt zu klären. Für die Vermittlung CD40-induzierter Proliferation von primären B-Zellen *in vitro* ist die Anwesenheit des Zytokins IL-4 absolut essentiell, was ein Hinweis darauf sein könnte, dass der CD40-Rezeptor im Vergleich zu LMP1 tatsächlich geringere Effekte in B-Zellen hervorruft. Andererseits scheint ein CD40 Signal in B-Zellen, die mit LMP1:CD40 Maxi-EBVs infiziert wurden, absolut ausreichend zu sein für eine dauerhafte Proliferation dieser LCLs in Kultur. Das bedeutet, dass CD40 im Kontext von EBV auch unabhängig von IL-4 Proliferation induzieren und aufrechterhalten kann.

Als dritte Versuchsgruppe wurden mit der Affymetrix-Technologie in B2264-19/3-Zellen Gene identifiziert, die vom „feeder layer“ reguliert werden. Dabei sollte ein Eindruck gewonnen werden, ob bei der Feeder-Zell-vermittelten Proliferation von B2264-19/3-Zellen ähnliche Signalkaskaden wie bei LMP1 oder CD40 eine Rolle spielen könnten. Eine Induktion von NF- κ B oder p38 MAPK durch den „feeder layer“ konnte nicht nachgewiesen werden, was bedeutet, dass diese beiden LMP1-typischen Signalwege bei der Feeder-abhängigen Proliferation keine Rolle spielen dürften. Erstaunlicherweise wurden in diesen Experimenten 650 Gene als differentiell exprimiert identifiziert, was darauf hinweisen könnte, dass der Feeder-Effekt auf dem Zusammenspiel von vielen verschiedenen Faktoren beruhen könnte. Von diesen 650 Genen waren bereits zehn auch als LMP1-Zielgene und vier als CD40-reguliert nachgewiesen worden (Tab.4.5). CD40 selbst und zwei Transkriptionsfaktoren (NUP475 und eine NF- κ B-Untereinheit) wurden von LMP1, CD40 und den Feeder-Zellen induziert. Ob diesen Gene eine Rolle als Hauptakteure bei der Induktion der Proliferation in B2264-19/3-Zellen zukommt, bleibt noch zu klären, erscheint aber eher unwahrscheinlich.

Die Aufbereitung von komplexen Datensätzen aus Oligonukleotid-Arrays wird z.Z. besonders diskutiert. Zur Analyse werden verschiedene Verfahren eingesetzt und ein allgemein gültiger Standard ist (noch) nicht etabliert. Im allgemeinen umfasst die Analyse von Fluoreszenz-Intensitätsdaten aus Microarray-Experimenten drei Schritte: Die Normalisierung, bei der die Intensitäten verschiedener Arrays skaliert werden, die Detektion differentiell exprimierter Gene und (falls mehr als eine Versuchsbedingung zu vergleichen ist) ein „Clustering“-Schritt, der Gene mit ähnlichen Expressionsmustern zu Gruppen zusammenfasst.

Die Normalisierung der Daten erfolgte mit Hilfe des Programms „The Equalizer“ (Stuart et al., 2001), das eine sogenannte „invariant set“ Normalisierung durchführt. Diese Methode umgeht zwei signifikante Nachteile herkömmlicher globaler Normalisierungsverfahren wie z.B. von Affymetrix angewandt. Globale Skalierungen beruhen auf der Annahme, dass der gesamte mRNA-Gehalt der Zelltypen, die verglichen werden, gleich ist, was besonders in verschiedenen Differenzierungs- und Zellzyklusstadien nicht der Fall sein muß. Dieses Problem versucht man zu umgehen, indem identische Mengen von cRNA auf die Chips geladen werden. Trotzdem wurde gezeigt, dass die Verteilung des durchschnittlichen Expressionsniveaus auf einem Chip signifikanten Variationen unterliegt (Hill et al., 2001). Außerdem sind globale Normalisierungsmethoden linear und nicht in der Lage, Datensätze mit nicht-linearem Charakter einzubeziehen. Die „invariant set“ Normalisierung nach Stuart

et al. beruht auf der Annahme, dass in jedem Datensatz ein Set von Genen existiert, deren Expressionsniveau sich unter den verschiedenen Versuchsbedingungen nicht signifikant ändert. Um diesen Datensatz zu bestimmen, werden zunächst alle Fluoreszenzdaten, d.h. die „Signal“-Werte, nach ihrer Intensität sortiert (sogenanntes „ranking“). Anschließend werden die Gene, die in den verschiedenen Arrays ähnliche „ranks“ zeigen, als „unchanged“ definiert. Dieses Datenset bildet dann die Grundlage für die nicht-lineare Normalisierung.

Für die Detektion differentiell exprimierter Gene wurde die permutationsbasierte Methode SAM (Significance Analysis of Microarrays) nach Tusher et al. angewandt. Die Vorteile dieser Methode sind vielfältig. Sie setzt keine Normalverteilung der Daten voraus, was nicht unbedingt immer der Fall ist, wie die Analyse verschiedener Datensets bereits gezeigt hat (Long et al., 2001) und benötigt nicht die sehr hohe Anzahl an Replikaten wie andere nicht-parametrische Tests (z.B. der „Mann-Whitney“-Test). Der Hauptvorteil der permutationsbasierten Methode nach Tusher et al. liegt in der Bewältigung der Problematik von „multi-class“-Experimenten, die mehr als zwei Versuchsbedingungen enthalten. Normalerweise werden in diesem Fall paarweise Vergleiche aller möglichen Kombinationen erstellt, die in einer Liste von Genen resultieren, die mindestens einmal differentiell exprimiert waren. Dies führt zu einer Erhöhung des sogenannten Typ I-Fehlers (die Nullhypothese: ‚das Gen ist nicht differentiell exprimiert‘ ist richtig, wird aber abgelehnt, d.h. das Gen fälschlicherweise als differentiell exprimiert eingeordnet (Zar, 1999). Fünf paarweise Vergleiche z.B. auf einem 95% „confidence“-Niveau resultieren nämlich in einem Gesamt-„confidence“-Niveau von nur noch 77%. Hierbei können sogenannte ANOVA-Algorithmen Abhilfe schaffen, die Varianzen innerhalb einer experimentellen Bedingung mit Varianzen zwischen verschiedenen Versuchsansätzen vergleichen. Das Problem aller Multivariat-Analysen dieser Art besteht bei herkömmlichen ANOVA-Tests allerdings nach wie vor, nämlich die hohe sogenannte „family-wise error rate“, die immer dann auftritt, wenn die Anzahl der Hypothesen (in diesem Fall die über 12000 untersuchten Gene) die Anzahl der Parameter (in diesem Fall die vier Zeitpunkte) deutlich übersteigt. Eine herkömmliche ANOVA-Analyse würde nur die Wahrscheinlichkeit angeben, mit der ein einziges Gen aus z.B. 1000 detektierten Genen falsch positiv ist, was bei der hohen Anzahl an Hypothesen einer hohen Fehlerrate unterliegt. Die permutationsbasierte Methode liefert hierbei die wesentlich genauere Berechnung der „false discovery rate“ (FDR) innerhalb der bereits als signifikant definierten Gene.

Die Anwendung der beiden statistischen Methoden „invariant set“ Normalisierung und SAM resultiert in sehr stringenten Auswahlkriterien. In einem Vergleich verschiedener Kombinationen statistischer Analysemethoden von Microarray-Daten wurde gezeigt, dass die Anzahl von Genen, die als differentiell exprimiert detektiert wird, in Abhängigkeit von der Methode mindestens um einen Faktor drei variiert (Hoffmann et al., 2002). Bei diesen Untersuchungen erwies sich die von uns angewandte Kombination als eine der stringentesten Methoden. Das bedeutet, dass damit identifizierte Gene als Teilmenge der Resultate weniger stringenterer Verfahren auftauchen, wie z.B. bei der Globalen Skalierung in Kombination mit parametrischen und nicht-parametrischen ANOVA-Tests (F-Test oder Kruskal-Wallis-Test). Somit werden bei unserem Analyseverfahren wahrscheinlich eine Reihe von Genen fälschlicherweise als nicht differentiell exprimiert kategorisiert, andererseits sind die damit identifizierten Zielgene dafür umso vertrauenswürdiger.

Nachdem bisher lediglich ein hierarchisches „Clustering“ nach Eisen et al. (Eisen et al., 1998) von Genen mit ähnlichen Expressionsprofilen durchgeführt wurde (Abb.4.19), sollte es im weiteren möglich sein, eine funktionelle Analyse des Datensets durchzuführen. Diese würde z.B. in dem Erstellen von Signalkaskaden resultieren, die mit dem Repertoire an detektierten Genen theoretisch möglich wären. Darüber hinaus ist das System so attraktiv, dass es sich anbietet, die Liste LMP1 induzierter Gene mit einem neuen Set von Affymetrix Chips (HG-U133A/B) zu vervollständigen, das über 39.000 Transkripte repräsentiert und damit wahrscheinlich alle menschlichen Gene umfaßt.

6. Zusammenfassung

Epstein-Barr Virus (EBV) infiziert ruhende primäre humane B-Zellen und induziert deren unbegrenzte Proliferation. Dieser Prozess der B-Zell-Immortalisation ist ein Modellsystem, das die pathogenetischen Mechanismen bei der Tumorentstehung widerspiegelt. *In vitro* gilt das virale latente Membranprotein 1 (LMP1) für die Immortalisation von B-Zellen als essentiell. LMP1 ist ein integrales Membranprotein, das als konstitutiv aktivierter Pseudorezeptor verschiedene Signalwege in der B-Zelle induziert und dabei analoge Funktionen zum zellulären CD40-Rezeptor wahrnimmt.

Das Genom des EBV ist in dem Maxi-EBV-System einer genetischen Manipulation zugänglich. Zuerst habe ich verschiedene Mutanten des LMP1 Gens im Kontext des EBV-Genoms etabliert und auf ihren Phänotyp untersucht. Überraschenderweise war es möglich, mit allen LMP1 mutierten EBVs proliferierende B-Zellklone zu generieren, dies gelang sogar mit einer „knock out“ Mutante des kompletten LMP1 Gens. Die zehn verschiedenen LMP1-Mutanten unterschieden sich gravierend in ihrer Effizienz, B-Zellen zu immortalisieren. So wurden bis zu 100 mal mehr Virionen benötigt, um z.B. mit der LMP1-„knock out“-Mutante proliferierende B-Zellklone zu etablieren. Eine solche B-Zelllinie wies in einem *in vivo* Experiment mit SCID-Mäusen im Gegensatz zu B-Zelllinien mit Wildtypvirus kein onkogenes Potential auf. Im Widerspruch zu den bisherigen Veröffentlichungen einer anderen Gruppe zeigen meine Ergebnisse, dass LMP1 für den Prozess der B-Zell-Immortalisation *in vitro* zwar kritisch, aber nicht zwingend notwendig ist. Für die Onkogenität von EBV *in vivo* ist LMP1 dagegen absolut essentiell.

Die Zielgene des LMP1, die die verschiedenen Effekte wie B-Zell-Immortalisation, Onkogenität und Tumorentstehung vermitteln, sind nicht vollständig bekannt. Ein zweites Ziel dieser Arbeit war deshalb die umfassende Katalogisierung dieser Zielgene. Da LMP1 und der CD40-Rezeptor analoge Funktionen und gemeinsame Signalmediatoren und -wege aufweisen, sollten vergleichende Untersuchungen von LMP1- und CD40-regulierten Genen durchgeführt werden. Zu diesem Zweck wurde ein konditionales LMP1-System in humanen B-Zellen etabliert, das es erlaubt, LMP1-Signaltransduktion innerhalb eines sehr kurzen, definierten Zeitraums zu induzieren und differentiell exprimierte Gene zu identifizieren. Da der CD40-Rezeptor auf humanen B-Zellen konstitutiv exprimiert ist und durch Interaktion mit seinem Liganden aktiviert werden kann, konnte die Analyse CD40-regulierter Zielgene im selben Zellsystem erfolgen. Unter Anwendung von ATLAS Array-Filtern und Affymetrix

Chips wurden 144 LMP1- und 28 CD40-regulierte Gene identifiziert. Schließlich konnte in Zellzyklusanalysen gezeigt werden, dass LMP1-Signale in humanen B-Zellen echte proliferative Effekte vermitteln und nicht nur anti-apoptotische Funktionen erfüllen.

7. Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AP-1	Aktivierungsprotein-1
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATF-2	aktivierter Transkriptionsfaktor 2
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin („ <u>b</u> ovine <u>s</u> erum <u>a</u> lbumin“)
ca.	zirka
CD	Zell-Differenzierungsmarker („ <u>c</u> ell <u>d</u> ifferentiation marker“)
Ci	Curie
CMV	Cytomegalovirus
CTAR	Carboxyterminale Aktivierungsregion
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dpm	radioaktive Zerfälle (disintegrations) pro Minute
DTT	Dithiothreitol
EBNA	Epstein-Barr Virus nukleäres Antigen
EBNA-LP	Epstein-Barr Virus nukleäres Antigen Leader-Protein
EBV	Epstein-Barr Virus
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor („ <u>e</u> pidermal <u>g</u> rowth <u>f</u> actor“)
FKS	Fötales Kälberserum
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethan-sulfonsäure
ICAM-1	Interzelluläres Adhäsionsmolekül 1 („ <u>i</u> nter <u>c</u> ellular <u>a</u> dhesion <u>m</u> olecule 1“)
IκB	Inhibitor von NF-κB
IKK	IκB Kinase
IL	Interleukin

JAK3	Janus-Kinase 3
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
kb	Kilobasenpaar(e)
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	Luria-Bertani
LCL	lymphoblastoide Zelllinie („lymphoblastoid cell line“)
LMP	Latentes Membranprotein
mA	Milliampere
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
min.	Minute
mRNA	Boten-RNA („messenger RNA“)
NGF-R	Nervenwachstumsfaktor-Rezeptor („nerve growth factor receptor“)
NIK	NF- κ B induzierende Kinase
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion („polymerase chain reaction“)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RIP	Rezeptor-interagierendes Protein
SDS	Natriumdodecylsulfat
STAT	Signaltransduktions-aktivierter Transkriptionsfaktor
SV40	Simian Virus 40
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
TNF-R	Tumornekrose Faktor-Rezeptor
TRADD	TNF-R-assoziertes Death Domain Protein
TRAF	TNF-R-assoziierter Faktor
Tris	Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan
rpm	Umdrehungen (rounds) pro Minute
UV	Ultraviolett
ZU	Ultrazentrifuge
V	Volt
Vol.	Volumen
z.B.	zum Beispiel
z.Z.	zur Zeit

8.Literatur

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.

Aiyar, A., Tyree, C., and Sugden, B. (1998). The plasmid replicon of EBV consists of multiple cis-acting elements that facilitate DNA synthesis by the cell and a viral maintenance element. *EMBO J* 17, 6394-6403.

Allday, M. J., Crawford, D. H., and Thomas, J. A. (1993). Epstein-Barr virus (EBV) nuclear antigen 6 induces expression of the EBV latent membrane protein and an activated phenotype in Raji cells. *J Gen Virol* 74, 361-369.

Arpin, C., Dechanet, J., Van Kooten, C., Merville, P., Grouard, G., Briere, F., Banchereau, J., and Liu, Y. J. (1995). Generation of memory B cells and plasma cells in vitro. *Science* 268, 720-722.

Aviel, S., Winberg, G., Massucci, M., and Ciechanover, A. (2000). Degradation of the Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 (LMP1) by the ubiquitin-proteasome pathway. Targeting via ubiquitination of the N-terminal residue. *J Biol Chem* 275, 23491-23499.

Baer, R., Bankier, A. T., Biggin, M. D., Deininger, P. L., Farrell, P. J., Gibson, T. J., Hatfull, G., Hudson, G. S., Satchwell, S. C., Seguin, C., *et al.* (1984). DNA sequence and expression of the B95-8 Epstein-Barr virus genome. *Nature (London)* 310, 207-211.

Baichwal, V. R., and Sugden, B. (1988). Transformation of Balb 3T3 cells by the BNLF-1 gene of Epstein-Barr virus. *Oncogene* 2, 461-467.

Baichwal, V. R., and Sugden, B. (1989). The multiple membrane-spanning segments of the BNLF-1 oncogene from Epstein-Barr virus are required for transformation. *Oncogene* 4, 67-74.

Barbacid, M. (1993). Nerve growth factor: a tale of two receptors. *Oncogene* 8, 2033-2042.

Barker, P. A., and Shooter, E. M. (1994). Disruption of NGF binding to the low affinity neurotrophin receptor p75LNTR reduces NGF binding to TrkA on PC12 cells. *Neuron* 13, 203-215.

Baxter, R. M., Cohen, P., Obermeier, A., Ullrich, A., Downes, C. P., and Doza, Y. N. (1995). Phosphotyrosine residues in the nerve-growth-factor receptor (Trk-A). Their role in the activation of inositolphospholipid metabolism and protein kinase cascades in phaeochromocytoma (PC12) cells. *Eur J Biochem* 234, 84-91.

Bloss, T., Kaykas, A., and Sugden, B. (1999). Dissociation of patching by latent membrane protein-1 of Epstein-Barr virus from its stimulation of NF-kappaB activity. *J Gen Virol* 80, 3227-3232.

Brennan, P., Floettmann, J. E., Mehl, A., Jones, M., and Rowe, M. (2001). Mechanism of action of a novel latent membrane protein-1 dominant negative. *J Biol Chem* 276, 1195-1203.

Briscoe, J., Kohlhuber, F., and Müller, M. (1996). JAKs and STATs branch out. *Trends in cell biology* 6, 336-340.

Brodeur, S. R., Cheng, G., Baltimore, D., and Thorley-Lawson, D. A. (1997). Localization of the major NF-kappaB-activating site and the sole TRAF3 binding site of LMP-1 defines two distinct signaling motifs. *J Biol Chem* 272, 19777-19784.

Calender, A., Billaud, M., Aubry, J. P., Banchereau, J., Vuillaume, M., and Lenoir, G. M. (1987). Epstein-Barr virus (EBV) induces expression of B-cell activation markers on in vitro infection of EBV-negative B-lymphoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 84, 8060-8064.

Cavigelli, M., Dolfi, F., Claret, F. X., and Karin, M. (1995). Induction of c-fos expression through JNK-mediated TCF/Elk-1 phosphorylation. *EMBO J* 14, 5957-5964.

Chan, F. K., Chun, H. J., Zheng, L., Siegel, R. M., Bui, K. L., and Lenardo, M. J. (2000). A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling. *Science* 288, 2351-2354.

Chao, M. V., and Hempstead, B. L. (1995). p75 and Trk: a two-receptor system. *Trends Neurosci* 18, 321-326.

Chaudhuri, B., Xu, H., Todorov, I., Dutta, A., and Yates, J. L. (2001). Human DNA replication initiation factors, ORC and MCM, associate with oriP of Epstein-Barr virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 10085-10089.

- Cherepanov, P. P., and Wackernagel, W. (1995). Gene disruption in *Escherichia coli*: TcR and KmR cassettes with the option of Flp-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant. *Gene* 158, 9-14.
- Church, G. M., and Gilbert, W. (1984). Genomic sequencing. *Proc Natl Acad Sci USA* 81, 1991-1995.
- Coffin, I. W., Erickson, K. D., Hoedt-Miller, M., and Martin, J. M. (2001). The cytoplasmic amino-terminus of the Latent Membrane Protein-1 of Epstein-Barr Virus: relationship between transmembrane orientation and effector functions of the carboxy-terminus and transmembrane domain. *Oncogene* 20, 5313-5330.
- Counter, C. M., Botelho, F. M., Wang, P., Harley, C. B., and Bacchetti, S. (1994). Stabilization of short telomeres and telomerase activity accompany immortalization of Epstein-Barr virus-transformed human B lymphocytes. *J Virol* 68, 3410-3414.
- Crawford, D. H., and Catovsky, D. (1993). In vitro activation of leukaemic B cells by interleukin-4 and antibodies to CD40. *Immunology* 80, 40-44.
- D'Onofrio, M., de Grazia, U., Morrone, S., Cuomo, L., Spinsanti, P., Frati, L., Gulino, A., and Ragona, G. (2000). Expression of neurotrophin receptors in normal and malignant B lymphocytes. *Eur Cytokine Netw* 11, 283-291.
- D'Souza, B., Rowe, M., and Walls, D. (2000). The bfl-1 gene is transcriptionally upregulated by the Epstein-Barr virus LMP1, and its expression promotes the survival of a Burkitt's lymphoma cell line. *J Virol* 74, 6652-6658.
- Delecluse, H. J., Hilsendegen, T., Pich, D., Zeidler, R., and Hammerschmidt, W. (1998). Propagation and recovery of intact, infectious Epstein-Barr virus from prokaryotic to human cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 8245-8250.
- Derijard, B., Hibi, M., Wu, I. H., Barrett, T., Su, B., Deng, T., Karin, M., and Davis, R. J. (1994). JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. *Cell* 76, 1025-1037.
- Devergne, O., Cahir McFarland, E. D., Mosialos, G., Izumi, K. M., Ware, C. F., and Kieff, E. (1998). Role of the TRAF binding site and NF-kappaB activation in Epstein-Barr virus latent membrane protein 1-induced cell gene expression. *J Virol* 72, 7900-7908.

Devergne, O., Hatzivassiliou, E., Izumi, K. M., Kaye, K. M., Kleijnen, M. F., Kieff, E., and Mosialos, G. (1996). Association of TRAF1, TRAF2, and TRAF3 with an Epstein-Barr virus LMP1 domain important for B-lymphocyte transformation: role in NF- κ B activation. *Mol Cell Biol* 16, 7098-7108.

Eisen, M. B., Spellman, P. T., Brown, P. O., and Botstein, D. (1998). Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 14863-14868.

Eliopoulos, A. G., Gallagher, N. J., Blake, S. M., Dawson, C. W., and Young, L. S. (1999). Activation of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway by Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1 coregulates interleukin-6 and interleukin-8 production. *J Biol Chem* 274, 16085-16096.

Eliopoulos, A. G., Stack, M., Dawson, C. W., Kaye, K. M., Hodgkin, L., Sihota, S., Rowe, M., and Young, L. S. (1997). Epstein-Barr virus-encoded LMP1 and CD40 mediate IL-6 production in epithelial cells via an NF-kappaB pathway involving TNF receptor-associated factors. *Oncogene* 14, 2899-2916.

Eliopoulos, A. G., and Young, L. S. (1998). Activation of the cJun N-terminal kinase (JNK) pathway by the Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1 (LMP1). *Oncogene* 16, 1731-1742.

Erickson, K. D., and Martin, J. M. (1997). Early detection of the lytic LMP-1 protein in EBV-infected B-cells suggests its presence in the virion. *Virology* 234, 1-13.

Erickson, K. D., and Martin, J. M. (2000). The late lytic LMP-1 protein of Epstein-Barr virus can negatively regulate LMP-1 signaling. *J Virol* 74, 1057-1060.

Feinberg, A. P., and Vogelstein, B. (1983). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* 132, 6-13.

Floettmann, J. E., and Rowe, M. (1997). Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 (LMP1) C-terminus activation region 2 (CTAR2) maps to the far C-terminus and requires oligomerisation for NF-kappaB activation. *Oncogene* 15, 1851-1858.

Freshney, N. W., Rawlinson, L., Guesdon, F., Jones, E., Cowley, S., Hsuan, J., and Saklatvala, J. (1994). Interleukin-1 activates a novel protein kinase cascade that results in the phosphorylation of Hsp27. *Cell* 78, 1039-1049.

Fried, M., and Crothers, D. M. (1981). Equilibria and kinetics of lac repressor-operator interactions by polyacrylamide gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res* 9, 6505-6525.

Frisan, T., Levitsky, V., and Masucci, M. (2001). Limiting dilution assay. *Methods Mol Biol* 174, 213-216.

Gires, O., Kohlhuber, F., Kilger, E., Baumann, M., Kieser, A., Kaiser, C., Zeidler, R., Scheffer, B., Ueffing, M., and Hammerschmidt, W. (1999). Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus interacts with JAK3 and activates STAT proteins. *EMBO J* 18, 3064-3073.

Gires, O., Zimmer-Strobl, U., Gonnella, R., Ueffing, M., Marschall, G., Zeidler, R., Pich, D., and Hammerschmidt, W. (1997). Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus mimics a constitutively active receptor molecule. *EMBO J* 16, 6131-6140.

Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C., and Nairn, R. (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 36, 59-74.

Greene, L. A., and Kaplan, D. R. (1995). Early events in neurotrophin signalling via Trk and p75 receptors. *Curr Opin Neurobiol* 5, 579-587.

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 USA* 91, 7568-7572.

Gupta, S., Campbell, D., Derijard, B., and Davis, R. J. (1995). Transcription factor ATF2 regulation by the JNK signal transduction pathway. *Science* 267, 389-393.

Hammerschmidt, W., and Sugden, B. (1988). Identification and characterization of *oriLyt*, a lytic origin of DNA replication of Epstein-Barr virus. *Cell* 55, 427-433.

Hammerschmidt, W., Sugden, B., and Baichwal, V. R. (1989). The transforming domain alone of the latent membrane protein of Epstein-Barr virus is toxic to cells when expressed at high levels. *J Virol* 63, 2469-2475.

Han, J., Lee, J. D., Bibbs, L., and Ulevitch, R. J. (1994). A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science* 265, 808-811.

Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166, 557-580.

- Hanahan, D. (1985). Techniques for transformation of *E.coli*. In DNA cloning. A practical approach, D. e. In Glover, ed. (Oxford), pp. 109-135.
- Hanissian, S. H., and Geha, R. S. (1997). Jak3 is associated with CD40 and is critical for CD40 induction of gene expression in B cells. *Immunity* 6, 379-387.
- Hempstead, B. L., Martin-Zanca, D., Kaplan, D. R., Parada, L. F., and Chao, M. V. (1991). High-affinity NGF binding requires coexpression of the trk proto- oncogene and the low-affinity NGF receptor. *Nature (London)* 350, 678-683.
- Henderson, S., Rowe, M., Gregory, C., Croom-Carter, D., Wang, F., Longnecker, R., Kieff, E., and Rickinson, A. (1991). Induction of bcl-2 expression by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 protects infected B cells from programmed cell death. *Cell* 65, 1107-1115.
- Henkel, T., Ling, P. D., Hayward, S. D., and Peterson, M. G. (1994). Mediation of Epstein-Barr virus EBNA2 transactivation by recombination signal-binding protein J kappa. *Science* 265, 92-95.
- Higuchi, M., Izumi, K. M., and Kieff, E. (2001). Epstein-Barr virus latent-infection membrane proteins are palmitoylated and raft-associated: protein 1 binds to the cytoskeleton through TNF receptor cytoplasmic factors. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 4675-4680.
- Higuchi, M., Kieff, E., and Izumi, K. M. (2002). The Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 putative Janus kinase 3 (JAK3) binding domain does not mediate JAK3 association or activation in B-lymphoma or lymphoblastoid cell lines. *J Virol* 76, 455-459.
- Hill, A. A., Brown, E. L., Whitley, M. Z., Tucker-Kellogg, G., Hunter, C. P., and Slonim, D. K. (2001). Evaluation of normalization procedures for oligonucleotide array data based on spiked cRNA controls. *Genome Biol* 2.
- Hoffmann, R., Seidl, T., and M., D. (2002). Profound Effect of Normalization on Detection of Differentially Expressed Genes in Oligonucleotide Microarray Data Analysis. *Genome Biol* *submitted*.
- Hostager, B. S., Catlett, I. M., and Bishop, G. A. (2000). Recruitment of CD40 and tumor necrosis factor receptor-associated factors 2 and 3 to membrane microdomains during CD40 signaling. *J Biol Chem* 275, 15392-15398.

Hudson, G. S., Farrell, P. J., and Barrell, B. G. (1985). Two related but differentially expressed potential membrane proteins encoded by the EcoRI Dhet region of Epstein-Barr virus B95-8. *J Virol* 53, 528-535.

Huen, D. S., Henderson, S. A., Croom-Carter, D., and Rowe, M. (1995). The Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 (LMP1) mediates activation of NF- κ B and cell surface phenotype via two effector regions in its carboxy-terminal cytoplasmic domain. *Oncogene* 10, 549-560.

Ishida, T. K., Tojo, T., Aoki, T., Kobayashi, N., Ohishi, T., Watanabe, T., Yamamoto, T., and Inoue, J. (1996). TRAF5, a novel tumor necrosis factor receptor-associated factor family protein, mediates CD40 signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 9437-9442.

Izumi, K. M., Kaye, K. M., and Kieff, E. D. (1994). Epstein-Barr virus recombinant molecular genetic analysis of the LMP1 amino-terminal cytoplasmic domain reveals a probable structural role, with no component essential for primary B-lymphocyte growth transformation. *J Virol* 68, 4369-4376.

Izumi, K. M., Kaye, K. M., and Kieff, E. D. (1997). The Epstein-Barr virus LMP1 amino acid sequence that engages tumor necrosis factor receptor associated factors is critical for primary B lymphocyte growth transformation. *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 1447-1452.

Izumi, K. M., and Kieff, E. D. (1997). The Epstein-Barr virus oncogene product latent membrane protein 1 engages the tumor necrosis factor receptor-associated death domain protein to mediate B lymphocyte growth transformation and activate NF- κ B. *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 12592-12597.

Izumi, K. M., McFarland, E. C., Riley, E. A., Rizzo, D., Chen, Y., and Kieff, E. (1999). The residues between the two transformation effector sites of Epstein-Barr Virus latent membrane protein 1 are not critical for B-lymphocyte growth transformation. *J Virol* 73, 9908-9916.

Jabara, H. H., Buckley, R. H., Roberts, J. L., Lefranc, G., Loiselet, J., Khalil, G., and Geha, R. S. (1998). Role of JAK3 in CD40-mediated signaling. *Blood* 92, 2435-2440.

Janz, A., Oezel, M., Kurzeder, C., Mautner, J., Pich, D., Kost, M., Hammerschmidt, W., and Delecluse, H. J. (2000). Infectious Epstein-Barr virus lacking major glycoprotein BLLF1 (gp350/220) demonstrates the existence of additional viral ligands. *J Virol* 74, 10142-10152.

Jayachandra, S., Low, K. G., Thlick, A. E., Yu, J., Ling, P. D., Chang, Y., and Moore, P. S. (1999). Three unrelated viral transforming proteins (vIRF, EBNA2, and E1A) induce the MYC oncogene through the interferon-responsive PRF element by using different transcription coadaptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 11566-11571.

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.

Johannessen, I., and Crawford, D. H. (1999). In vivo models for Epstein-Barr virus (EBV)-associated B cell lymphoproliferative disease (BLPD). *Rev Med Virol* 9, 263-277.

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.

Jones, N. C. (1990). Transformation by the human adenoviruses. *Semin Cancer Biol* 1, 425-435.

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.

Kaplan, D. R., and Stephens, R. M. (1994). Neurotrophin signal transduction by the Trk receptor. *J Neurobiol* 25, 1404-1417.

Kaye, K. M., Devergne, O., Harada, J. N., Izumi, K. M., Yalamanchili, R., Kieff, E., and Mosialos, G. (1996). Tumor necrosis factor receptor associated factor 2 is a mediator of NF-kappa B activation by latent infection membrane protein 1, the Epstein-Barr virus transforming protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 11085-11090.

Kaye, K. M., Izumi, K. M., and Kieff, E. (1993). Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 is essential for B-lymphocyte growth transformation. *Proc Natl Acad Sci USA* *90*, 9150-9154.

Kaye, K. M., Izumi, K. M., Li, H., Johannsen, E., Davidson, D., Longnecker, R., and Kieff, E. (1999). An Epstein-Barr virus that expresses only the first 231 LMP1 amino acids efficiently initiates primary B-lymphocyte growth transformation. *J Virol* *73*, 10525-10530.

Kaye, K. M., Izumi, K. M., Mosialos, G., and Kieff, E. (1995). The Epstein-Barr virus LMP1 cytoplasmic carboxy terminus is essential for B-lymphocyte transformation; fibroblast cocultivation complements a critical function within the terminal 155 residues. *J Virol* *69*, 675-683.

Kaykas, A., and Sugden, B. (2000). The amino-terminus and membrane-spanning domains of LMP-1 inhibit cell proliferation. *Oncogene* *19*, 1400-1410.

Kaykas, A., Worringer, K., and Sugden, B. (2001). CD40 and LMP-1 both signal from lipid rafts but LMP-1 assembles a distinct, more efficient signaling complex. *EMBO J* *20*, 2641-2654.

Kempkes, B., Pich, D., Zeidler, R., Sugden, B., and Hammerschmidt, W. (1995). immortalization of human B lymphocytes by a plasmid containing 71 kilobase pairs of Epstein-Barr virus DNA. *J Virol* *69*, 231-238.

Kieff, E., and Rickinson, A. B. (2001). Epstein-Barr virus and its replication. In *Field's Virology*, D. M. Knipe, P. M. Howley, D. E. Griffin, M. A. Martin, R. A. Lamb, B. Roizman, and S. E. Straus, eds. (Philadelphia, Lippincott - Williams & Wilkins), pp. 2511-2573.

Kieser, A., Kaiser, C., and Hammerschmidt, W. (1999). LMP1 signal transduction differs substantially from TNF receptor 1 signaling in the molecular functions of TRADD and TRAF2. *EMBO J* *18*, 2511-2521.

Kieser, A., Kilger, E., Gires, O., Ueffing, M., Kolch, W., and Hammerschmidt, W. (1997). Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 triggers AP-1 activity via the c-Jun N-terminal kinase cascade. *EMBO J* *16*, 6478-6485.

- Kilger, E., Kieser, A., Baumann, M., and Hammerschmidt, W. (1998). Epstein-Barr virus-mediated B-cell proliferation is dependent upon latent membrane protein 1, which simulates an activated CD40 receptor. *EMBO J* 17, 1700-1709.
- Kindler, V., and Zubler, R. H. (1997). Memory, but not naive, peripheral blood B lymphocytes differentiate into Ig-secreting cells after CD40 ligation and costimulation with IL-4 and the differentiation factors IL-2, IL-10, and IL-3. *J Immunol* 159, 2085-2090.
- Knutson, J. C. (1990). The level of c-fgr RNA is increased by EBNA-2, an Epstein-Barr virus gene required for B-cell immortalization. *J Virol* 64, 2530-2536.
- Kulwichit, W., Edwards, R. H., Davenport, E. M., Baskar, J. F., Godfrey, V., and Raab-Traub, N. (1998). Expression of the Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 induces B cell lymphoma in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 11963-11968.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)* 227, 680-685.
- Laherty, C. D., Hu, H. M., Opiari, A. W., Wang, F., and Dixit, V. M. (1992). The Epstein-Barr virus LMP1 gene product induces A20 zinc finger protein expression by activating nuclear factor kappa B. *J Biol Chem* 267, 24157-24160.
- Laux, G., Dugrillon, F., Eckert, C., Adam, B., Zimmer-Strobl, U., and Bornkamm, G. W. (1994). Identification and characterization of an Epstein-Barr virus nuclear antigen 2-responsive cis element in the bidirectional promoter region of latent membrane protein and terminal protein 2 genes. *J Virol* 68, 6947-6958.
- Levitskaya, J., Coram, M., Levitsky, V., Imreh, S., Steigerwald-Mullen, P. M., Klein, G., Kurilla, M. G., and Masucci, M. G. (1995). Inhibition of antigen processing by the internal repeat region of the Epstein-Barr virus nuclear antigen-1. *Nature (London)* 375, 685-688.
- 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 USA* 94, 12616-12621.
- Liebowitz, D., Kopan, R., Fuchs, E., Sample, J., and Kieff, E. (1987). An Epstein-Barr virus transforming protein associates with vimentin in lymphocytes. *Mol Cell Biol* 7, 2299-2308.

Liebowitz, D., Mannick, J., Takada, K., and Kieff, E. (1992). Phenotypes of Epstein-Barr virus LMP1 deletion mutants indicate transmembrane and amino-terminal cytoplasmic domains necessary for effects in B-lymphoma cells. *J Virol* *66*, 4612-4616.

Livingstone, C., Patel, G., and Jones, N. (1995). ATF-2 contains a phosphorylation-dependent transcriptional activation domain. *EMBO J* *14*, 1785-1797.

Long, A. D., Mangalam, H. J., Chan, B. Y., Toller, L., Hatfield, G. W., and Baldi, P. (2001). Improved statistical inference from DNA microarray data using analysis of variance and a Bayesian statistical framework. Analysis of global gene expression in *Escherichia coli* K12. *J Biol Chem* *276*, 19937-19944.

MacLennan, I. C. (1994). Germinal centers. *Annu Rev Immunol* *12*, 117-139.

Mann, K. P., Staunton, D., and Thorley-Lawson, D. A. (1985). Epstein-Barr virus-encoded protein found in plasma membranes of transformed cells. *J Virol* *55*, 710-720.

McLaughlin, M. M., Kumar, S., McDonnell, P. C., Van Horn, S., Lee, J. C., Livi, G. P., and Young, P. R. (1996). Identification of mitogen-activated protein (MAP) kinase-activated protein kinase-3, a novel substrate of CSBP p38 MAP kinase. *J Biol Chem* *271*, 8488-8492.

Meakin, S. O., and Shooter, E. M. (1992). The nerve growth factor family of receptors. *Trends Neurosci* *15*, 323-331.

Miller, G., Shope, T., Lisco, H., Stitt, D., and Lipman, M. (1972). Epstein-Barr virus: transformation, cytopathic changes, and viral antigens in squirrel monkey and marmoset leukocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* *69*, 383-387.

Miller, W. E., Mosialos, G., Kieff, E., and Raab-Traub, N. (1997). Epstein-Barr virus LMP1 induction of the epidermal growth factor receptor is mediated through a TRAF signaling pathway distinct from NF- κ B activation. *J Virol* *71*, 586-594.

Mitchell, T., and Sugden, B. (1995). Stimulation of NF- κ B-mediated transcription by mutant derivatives of the latent membrane protein of Epstein-Barr virus. *J Virol* *69*, 2968-2976.

Moorthy, R. K., and Thorley-Lawson, D. A. (1993a). All three domains of the Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein LMP-1 are required for transformation of rat-1 fibroblasts. *J Virol* 67, 1638-1646.

Moorthy, R. K., and Thorley-Lawson, D. A. (1993b). Biochemical, genetic, and functional analyses of the phosphorylation sites on the Epstein-Barr virus-encoded oncogenic latent membrane protein LMP-1. *J Virol* 67, 2637-2645.

Moran, E. (1993). Interaction of adenoviral proteins with pRB and p53. *Faseb J* 7, 880-885.

Mosialos, G., Birkenbach, M., Yalamanchili, R., VanArsdale, T., Ware, C., and Kieff, E. (1995). The Epstein-Barr virus transforming protein LMP1 engages signaling proteins for the tumor necrosis factor receptor family. *Cell* 80, 389-399.

Muyrers, J. P., Zhang, Y., Benes, V., Testa, G., Ansorge, W., and Stewart, A. F. (2000). Point mutation of bacterial artificial chromosomes by ET recombination. *EMBO Rep* 1, 239-243.

Nakagomi, H., Dolcetti, R., Bejarano, M. T., Pisa, P., Kiessling, R., and Masucci, M. G. (1994). The Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 (LMP1) induces interleukin-10 production in Burkitt lymphoma lines. *Int J Cancer* 57, 240-244.

Nebreda, A. R., and Porras, A. (2000). p38 MAP kinases: beyond the stress response. *Trends Biochem Sci* 25, 257-260.

Parker, G. A., Crook, T., Bain, M., Sara, E. A., Farrell, P. J., and Allday, M. J. (1996). Epstein-Barr virus nuclear antigen (EBNA)3C is an immortalizing oncoprotein with similar properties to adenovirus E1A and papillomavirus E7. *Oncogene* 13, 2541-2549.

Planken, E. V., Dijkstra, N. H., Bakkus, M., Willemze, R., and Kluin-Nelemans, J. C. (1996). Proliferation of precursor B-lineage acute lymphoblastic leukaemia by activating the CD40 antigen. *Br J Haematol* 95, 319-326.

Press, F., Teukolsky, Vetterling (1992). *Numerical Recipes in FORTRAN: The Art of Scientific Computing*, 2nd edn (Cambridge, Cambridge University Press).

Pullen, S. S., Dang, T. T., Crute, J. J., and Kehry, M. R. (1999). CD40 signaling through tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs). Binding site specificity and activation of downstream pathways by distinct TRAFs. *J Biol Chem* 274, 14246-14254.

- Pulvertaft (1964). Cytology of Burkitt's tumour (African lymphoma). *Lancet i*, 238-240.
- Raffioni, S., Bradshaw, R. A., and Buxser, S. E. (1993). The receptors for nerve growth factor and other neurotrophins. *Annu Rev Biochem* 62, 823-850.
- Raingeaud, J., Gupta, S., Rogers, J. S., Dickens, M., Han, J. H., Ulevitch, R. J., and Davis, R. J. (1995). Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen- activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. *J Biol Chem* 270, 7420-7426.
- Raingeaud, J., Whitmarsh, A. J., Barrett, T., Derijard, B., and Davis, R. J. (1996). MKK3- and MKK6-regulated gene expression is mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *Mol Cell Biol* 16, 1247-1255.
- Robertson, E. S., Grossman, S., Johannsen, E., Miller, C., Lin, J., Tomkinson, B., and Kieff, E. (1995). Epstein-Barr virus nuclear protein 3C modulates transcription through interaction with the sequence-specific DNA-binding protein J kappa. *J Virol* 69, 3108-3116.
- Rochford, R., Miller, C. L., Cannon, M. J., Izumi, K. M., Kieff, E., and Longnecker, R. (1997). In vivo growth of Epstein-Barr virus transformed B cells with mutations in latent membrane protein 2 (LMP2). *Arch Virol* 142, 707-720.
- Rothe, M., Sarma, V., Dixit, V. M., and Goeddel, D. V. (1995). TRAF2-mediated activation of NF-kappa B by TNF receptor 2 and CD40. *Science* 269, 1424-1427.
- Rouse, J., Cohen, P., Trigon, S., Morange, M., Alonso-Llamazares, A., Zamanillo, D., Hunt, T., and Nebreda, A. R. (1994). A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins. *Cell* 78, 1027-1037.
- Rousset, F., Peyrol, S., Garcia, E., Vezzio, N., Andujar, M., Grimaud, J. A., and Banchereau, J. (1995). Long-term cultured CD40-activated B lymphocytes differentiate into plasma cells in response to IL-10 but not IL-4. *Int Immunol* 7, 1243-1253.
- Rowe, M., Khanna, R., Jacob, C. A., Argaet, V., Kelly, A., Powis, S., Belich, M., Croom-Carter, D., Lee, S., Burrows, S. R., and et al. (1995). Restoration of endogenous antigen processing in Burkitt's lymphoma cells by Epstein-Barr virus latent membrane protein-1:

coordinate up- regulation of peptide transporters and HLA-class I antigen expression. *Eur J Immunol* 25, 1374-1384.

Rowe, M., Young, L. S., Crocker, J., Stokes, H., Henderson, S., and Rickinson, A. B. (1991). Epstein-Barr virus (EBV)-associated lymphoproliferative disease in the SCID mouse model: implications for the pathogenesis of EBV-positive lymphomas in man. *J Exp Med* 173, 147-158.

Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning. A laboratory manual* (Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Schenone, A., Gill, J. S., Zacharias, D. A., and Windebank, A. J. (1996). Expression of high- and low-affinity neurotrophin receptors on human transformed B lymphocytes. *J Neuroimmunol* 64, 141-149.

Schepers, A., Ritzi, M., Bousset, K., Kremmer, E., Yates, J. L., Harwood, J., Diffley, J. F., and Hammerschmidt, W. (2001). Human origin recognition complex binds to the region of the latent origin of DNA replication of Epstein-Barr virus. *EMBO J* 20, 4588-4602.

Schönbeck, and Libby (2001). The CD40/CD154 receptor/ligand dyad. *CMLS CellMilLifeSci* 58.

Schultheiss, U., Puschner, S., Kremmer, E., Mak, T. W., Engelmann, H., Hammerschmidt, W., and Kieser, A. (2001). TRAF6 is a critical mediator of signal transduction by the viral oncogene latent membrane protein 1. *EMBO J* 20, 5678-5691.

Sheng, Y., Mancino, V., and Birren, B. (1995). Transformation of *Escherichia coli* with large DNA molecules by electroporation. *Nucleic Acids Res* 23, 1990-1996.

Silins, S. L., and Sculley, T. B. (1994). Modulation of vimentin, the CD40 activation antigen and Burkitt's lymphoma antigen (CD77) by the Epstein-Barr virus nuclear antigen EBNA- 4. *Virology* 202, 16-24.

Southern, E. M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 98, 503-517.

Spriggs, M. K., Armitage, R. J., Strockbine, L., Clifford, K. N., Macduff, B. M., Sato, T. A., Maliszewski, C. R., and Fanslow, W. C. (1992). Recombinant human CD40 ligand stimulates B cell proliferation and immunoglobulin E secretion. *J Exp Med* 176, 1543-1550.

Stuart, R. O., Bush, K. T., and Nigam, S. K. (2001). Changes in global gene expression patterns during development and maturation of the rat kidney. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 5649-5654.

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

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.

Tahara, H., Tokutake, Y., Maeda, S., Kataoka, H., Watanabe, T., Satoh, M., Matsumoto, T., Sugawara, M., Ide, T., Goto, M., *et al.* (1997). Abnormal telomere dynamics of B-lymphoblastoid cell strains from Werner's syndrome patients transformed by Epstein-Barr virus. *Oncogene* 15, 1911-1920.

Takeshita, H., Yoshizaki, T., Miller, W. E., Sato, H., Furukawa, M., Pagano, J. S., and Raab-Traub, N. (1999). Matrix metalloproteinase 9 expression is induced by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 C-terminal activation regions 1 and 2. *J Virol* 73, 5548-5555.

Thorley-Lawson, D. A., and Mann, K. P. (1985). Early events in Epstein-Barr virus infection provide a model for B cell activation. *J Exp Med* 162, 45-59.

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

Tusher, V. G., Tibshirani, R., and Chu, G. (2001). Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 5116-5121.

Uchida, J., Yasui, T., Takaoka-Shichijo, Y., Muraoka, M., Kulwichit, W., Raab-Traub, N., and Kikutani, H. (1999). Mimicry of CD40 Signals by Epstein-Barr Virus LMP1 in B Lymphocyte Responses. *Science* 286, 300-303.

- van Kooten, C., and Banchereau, J. (2000). CD40-CD40 ligand. *J Leukoc Biol* 67, 2-17.
- Vidalain, P. O., Azocar, O., Servet-Delprat, C., Rabourdin-Combe, C., Gerlier, D., and Manie, S. (2000). CD40 signaling in human dendritic cells is initiated within membrane rafts. *EMBO J* 19, 3304-3313.
- Vockerodt, M., Haier, B., Buttgereit, P., Tesch, H., and Kube, D. (2001). The Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 induces interleukin-10 in Burkitt's lymphoma cells but not in Hodgkin's cells involving the p38/SAPK2 pathway. *Virology* 280, 183-198.
- Walter, J., Wolf, J., Pawlita, M., Schirmacher, V., Moldenhauer, G., and Moller, P. (1991). Invasive, metastatic growth of lymphoblastoid B cells in immunodeficient SCID mice. *Verh Dtsch Ges Pathol* 75, 224-228.
- Waltzer, L., Logeat, F., Brou, C., Israel, A., Sergeant, A., and Manet, E. (1994). The human J kappa recombination signal sequence binding protein (RBP-J kappa) targets the Epstein-Barr virus EBNA2 protein to its DNA responsive elements. *EMBO J* 13, 5633-5638.
- Wang, D., Liebowitz, D., and Kieff, E. (1985). An EBV membrane protein expressed in immortalized lymphocytes transforms established rodent cells. *Cell* 43, 831-840.
- Wang, D., Liebowitz, D., Wang, F., Gregory, C., Rickinson, A., Larson, R., Springer, T., and Kieff, E. (1988). Epstein-Barr virus latent infection membrane protein alters the human B-lymphocyte phenotype: deletion of the amino terminus abolishes activity. *J Virol* 62, 4173-4184.
- Wang, F., Gregory, C., Sample, C., Rowe, M., Liebowitz, D., Murray, R., Rickinson, A., and Kieff, E. (1990). Epstein-Barr virus latent membrane protein (LMP1) and nuclear proteins 2 and 3C are effectors of phenotypic changes in B lymphocytes: EBNA-2 and LMP1 cooperatively induce CD23. *J Virol* 64, 2309-2318.
- Wang, X. Z., and Ron, D. (1996). Stress-induced phosphorylation and activation of the transcription factor CHOP (GADD153) by p38 MAP Kinase. *Science* 272, 1347-1349.
- Whitmarsh, A. J., Shore, P., Sharrocks, A. D., and Davis, R. J. (1995). Integration of MAP kinase signal transduction pathways at the serum response element. *Science* 269, 403-407.
- Wilcoxon, F. (1945). Individual comparisons by ranking methods. *Biometrics* 1, 80-83.

Wilson, J. B., Weinberg, W., Johnson, R., Yuspa, S., and Levine, A. J. (1990). Expression of the BNLF-1 oncogene of Epstein-Barr virus in the skin of transgenic mice induces hyperplasia and aberrant expression of keratin 6. *Cell* 61, 1315-1327.

Yates, J. L., Warren, N., and Sugden, B. (1985). Stable replication of plasmids derived from Epstein-Barr virus in various mammalian cells. *Nature (London)* 313, 812-815.

Yoshizaki, T., Sato, H., Furukawa, M., and Pagano, J. S. (1998). The expression of matrix metalloproteinase 9 is enhanced by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 3621-3626.

Young, L. S., Dawson, C. W., and Eliopoulos, A. G. (2000). The expression and function of Epstein-Barr virus encoded latent genes. *Mol Pathol* 53, 238-247.

Zan, H., Cerutti, A., Dramitinos, P., Schaffer, A., and Casali, P. (1998). CD40 engagement triggers switching to IgA1 and IgA2 in human B cells through induction of endogenous TGF-beta: evidence for TGF-beta but not IL-10-dependent direct S mu-->S alpha and sequential S mu-->S gamma, S gamma-->S alpha DNA recombination. *J Immunol* 161, 5217-5225.

Zar, J. H. (1999). *Biostatistical Analysis*, 4 edn (New Jersey, Upper saddle River).

Zervos, A. S., Faccio, L., Gatto, J. P., Kyriakis, J. M., and Brent, R. (1995). Mxi2, a mitogen-activated protein kinase that recognizes and phosphorylates Max protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 10531-10534.

Zimber-Strobl, U., Kempkes, B., Marschall, G., Zeidler, R., Van Kooten, C., Banchereau, J., Bornkamm, G. W., and Hammerschmidt, W. (1996). Epstein-Barr virus latent membrane protein (LMP1) is not sufficient to maintain proliferation of B cells but both it and activated CD40 can prolong their survival. *EMBO J* 15, 7070-7078.

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.

**Funktionelle und genetische Analyse des Latenten
Membranproteins 1 des Epstein-Barr Virus**

Anhang I

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

von

Ulrike Dirmeier

München, April 2002

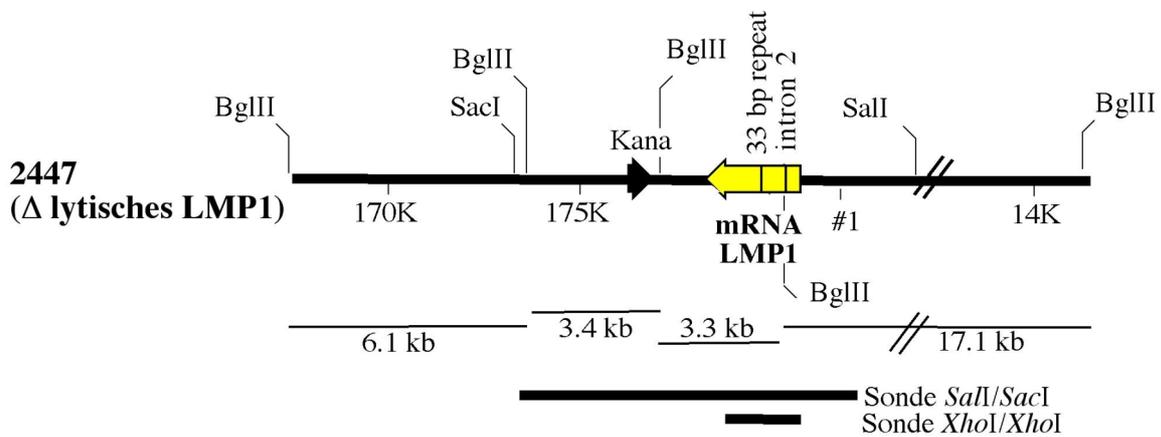
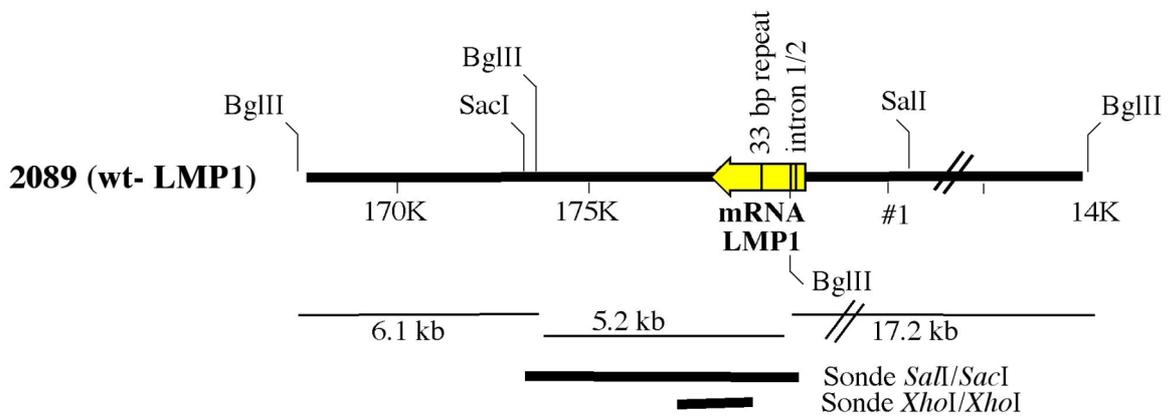
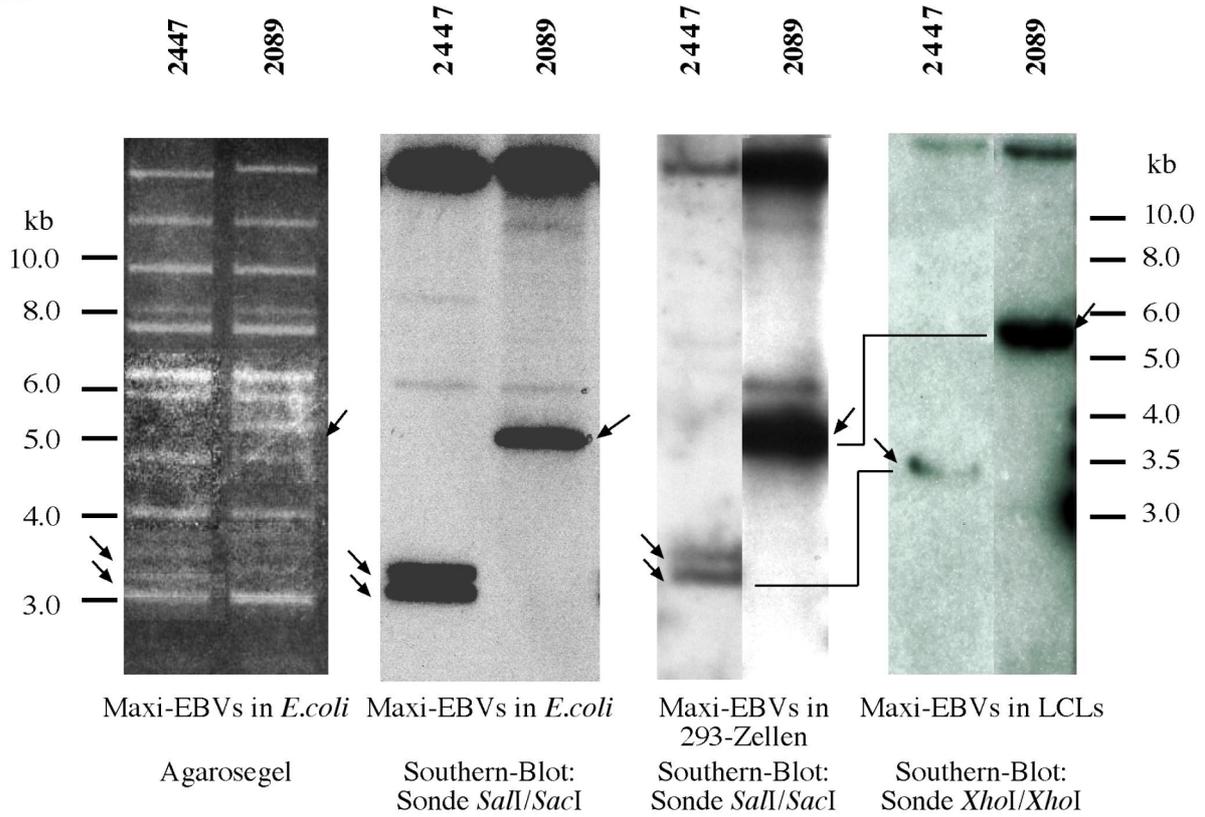
Anhang I

Abb.A-L: Überprüfung und Identitätskontrolle von elf LMP1-Mutanten im Maxi-EBV Kontext.

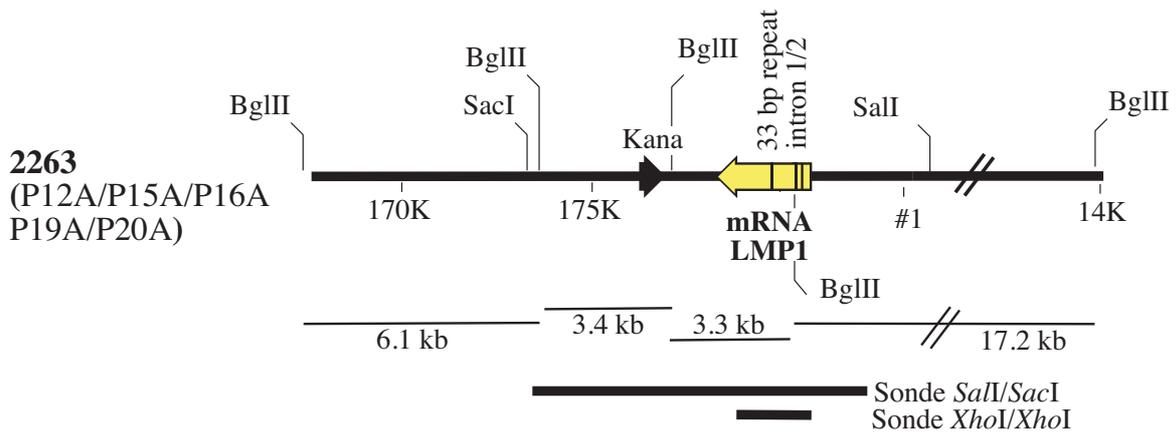
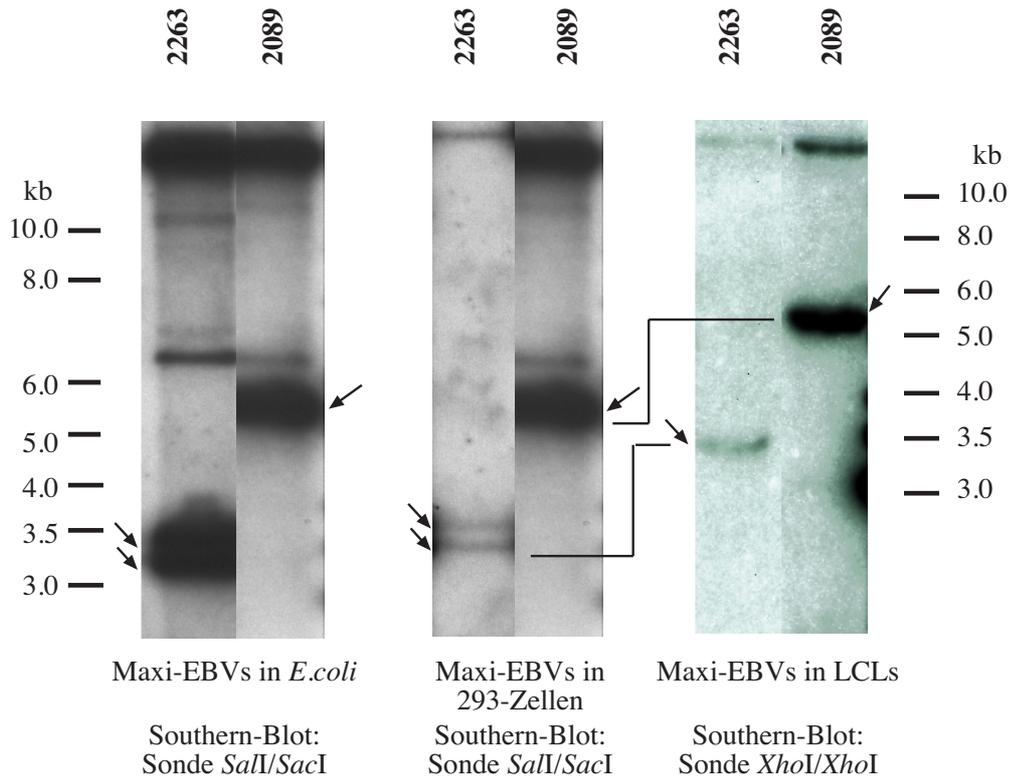
Dargestellt sind verschiedene Prozeßschritte zur Herstellung von Maxi-EBV. Diese umfassen die homologe Rekombination in *E.coli*, die stabile Selektion der Maxi-EBV-Mutanten in HEK 293-Zellen und die Immortalisation von B-Zelllinien mit Maxi-EBV (LCLs). Alle Prozeßschritte wurden bei der Herstellung von jeder der insgesamt elf Maxi-EBV-Mutanten zur Qualitäts- und Identitätskontrolle verfolgt. Die Überprüfung erfolgte anhand von Restriktionsfragment-Mustern des Maxi-EBV Plasmids (exemplarisch in A gezeigt) und Southernblots des LMP1-Genlocus. Dies wurde mit Plasmidpräparationen aus *E.coli* und gesamtzellulärer DNA aus 293-Zellen bzw. LCLs durchgeführt. Der Genotyp der LCLs, die durch Infektion mit rekombinanten EBVs generiert wurden, wurde stichprobenartig bei jeweils ca. 20 Klonen überprüft (hier je ein Beispiel gezeigt). Zusätzlich wurde exemplarisch der mutierte LMP1-Genlocus mittels PCR aus den LCLs amplifiziert und durch Restriktionsanalyse und Sequenzierung verifiziert (Agarosegele nur bei 2597/ Δ LMP1 gezeigt). Zur besseren Übersichtlichkeit werden jeweils nur Ausschnitte der Southernblots gezeigt, was bedeutet, daß die wt-Maxi-EBV-Spur (2089) direkt neben die jeweilige Mutante gestellt wurde. Da aus Platzgründen oft nur eine wt-Kontrolle für verschiedene Mutanten und Prozeßstadien auf einem Gel aufgetragen wurde, findet sich dieselbe 2089-Spur in mehreren Ausschnitten wieder (z.B. bei LCLs in A, B, C und D).

Alle Restriktionen erfolgten mit dem Enzym *Bgl*III. Für die Verdau wurden 1 μ g CsCl-gereinigter Plasmid-DNA aus *E.coli* bzw. 10 μ g gesamtzelluläre DNA aus 293-Zellen und LCLs eingesetzt. Die auftretenden Restriktions-Banden wurden mit dem Bandenmuster, das nach Verdau von Wildtyp-DNA (2089) entsteht, verglichen. Unterschiedliche Banden sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Zusätzlich wurde die DNA auf eine Nylonmembran transferiert und mit radioaktiv markierten Sonden hybridisiert. Die auftretenden Fragmente im Ethidiumbromid gefärbten Agarosegel bzw. Autoradiogramm des Southernblots sind jeweils in einer Schemazeichnung dargestellt. In allen untersuchten Prozeßstadien und allen überprüften LCLs konnten die klonalen Identitäten bestätigt werden. Für zuverlässige Aussagen hinsichtlich Immortalisationsfrequenz und Phänotyp der verschiedenen LCLs war es besonders wichtig, eine Kontamination mit wt-EBV ausschließen zu können. Dies war in allen untersuchten Fällen möglich.

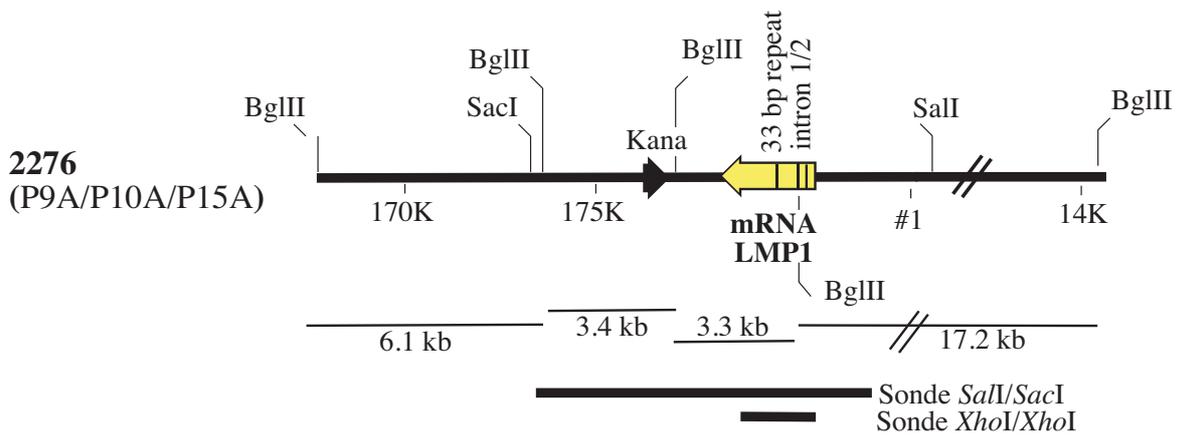
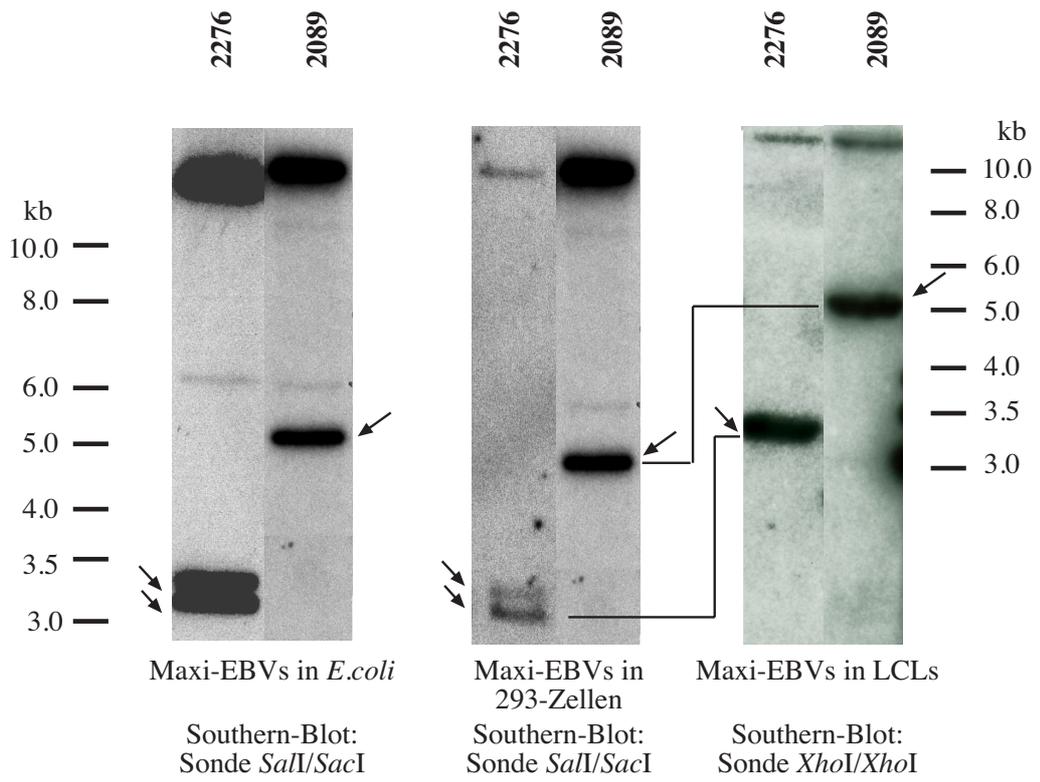
A



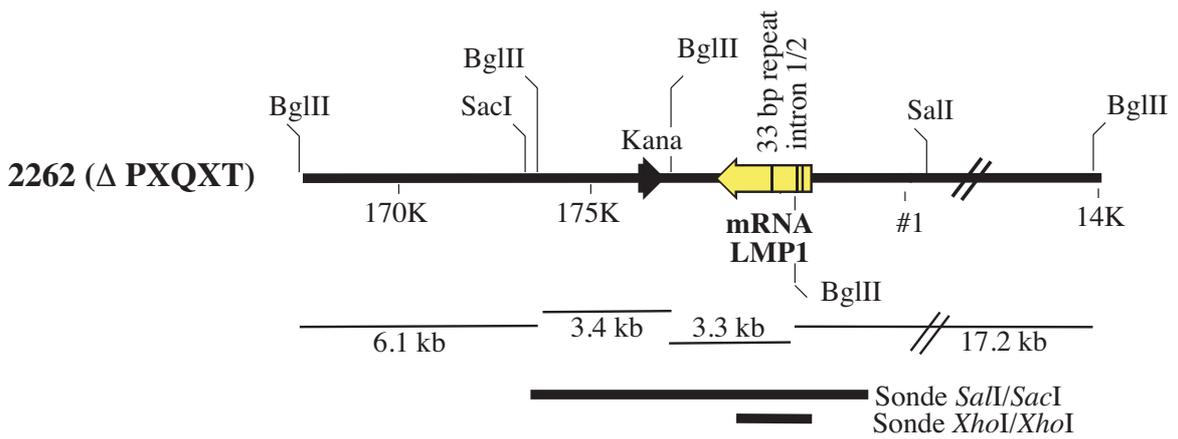
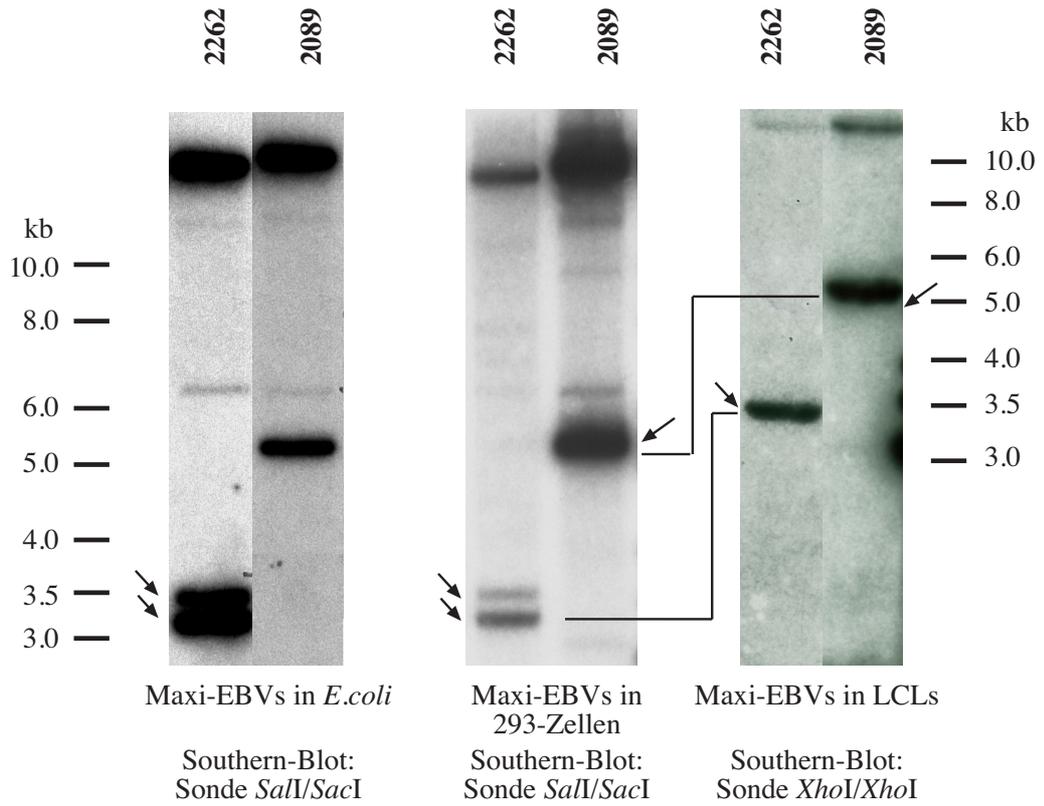
B



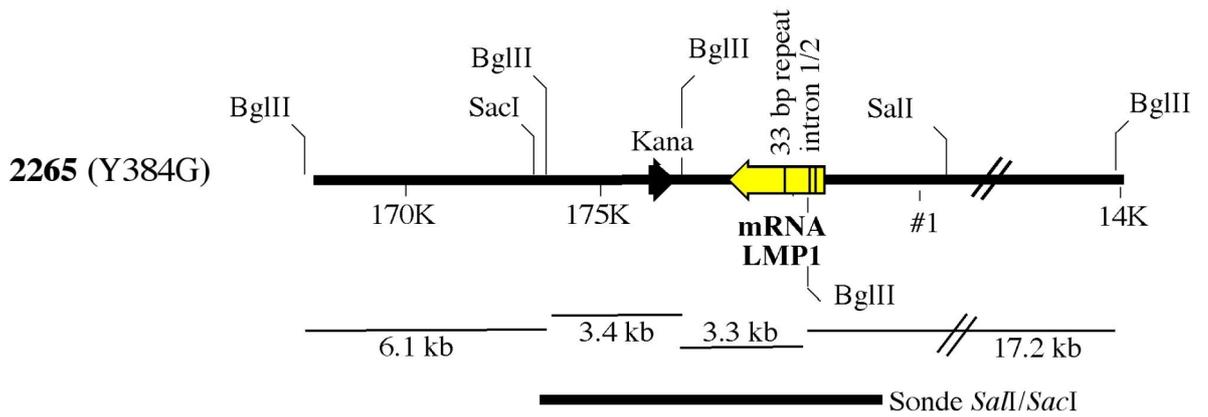
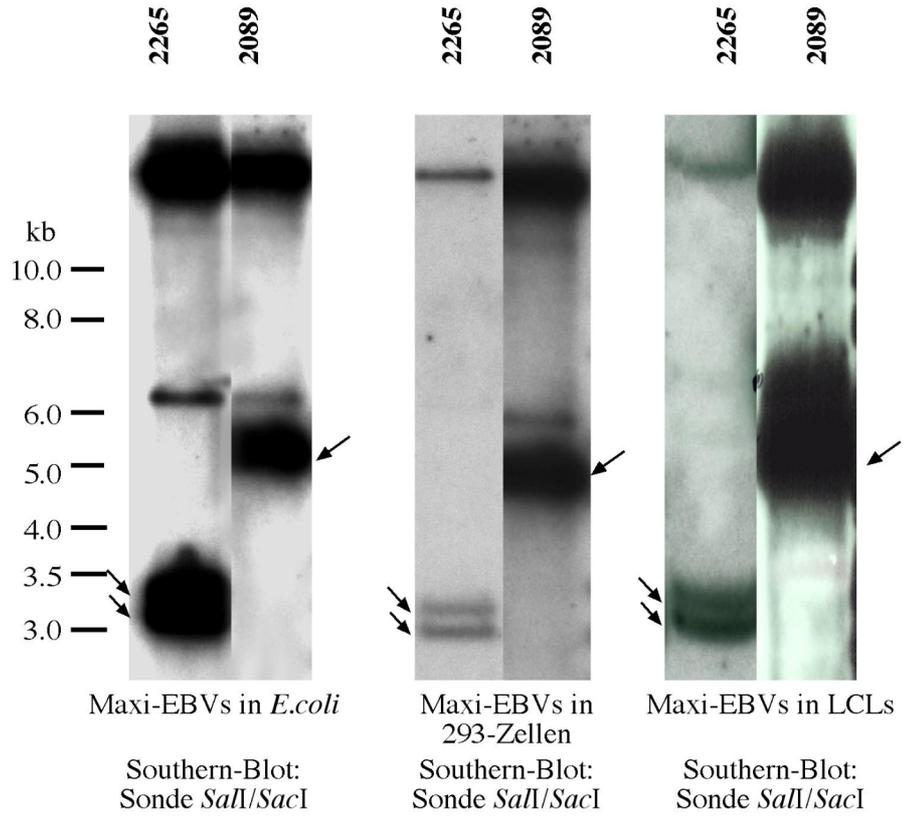
C



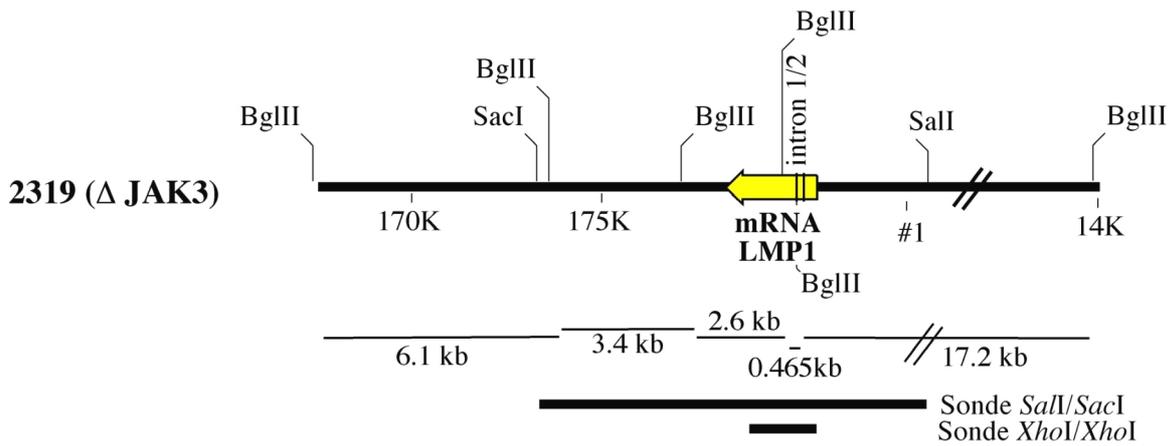
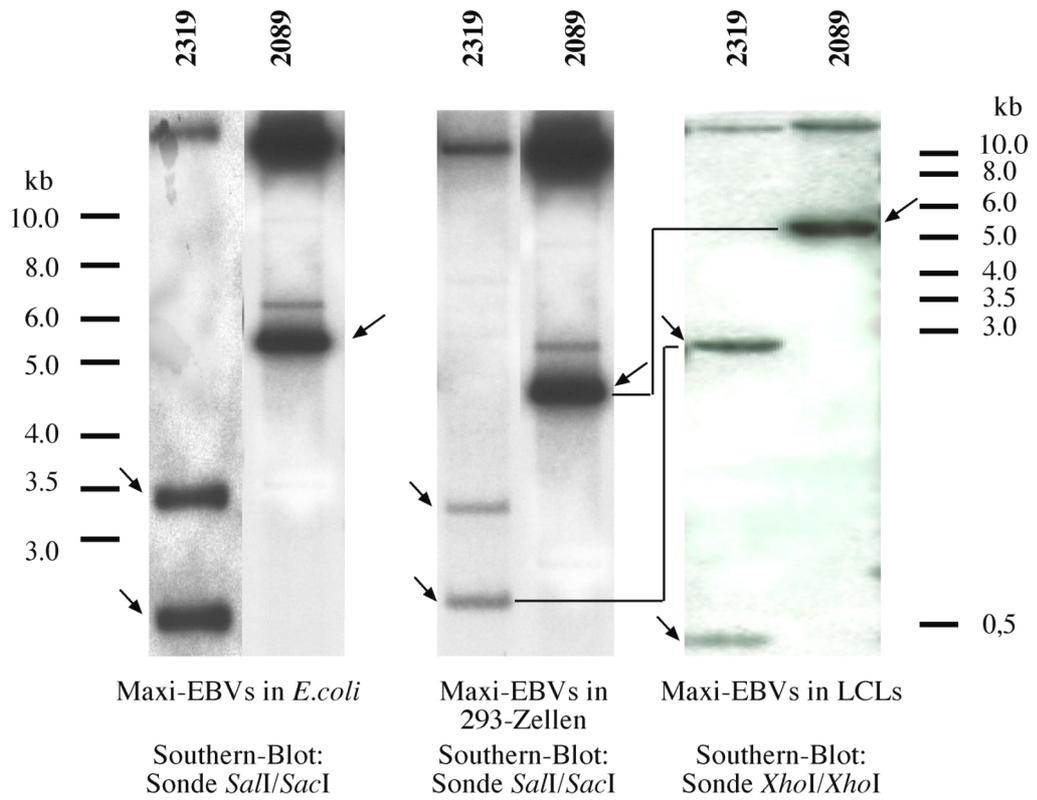
D



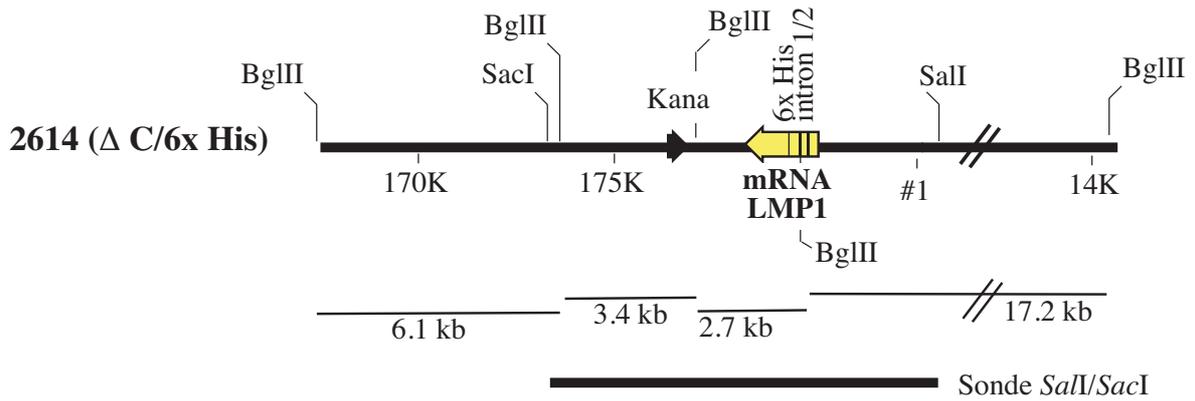
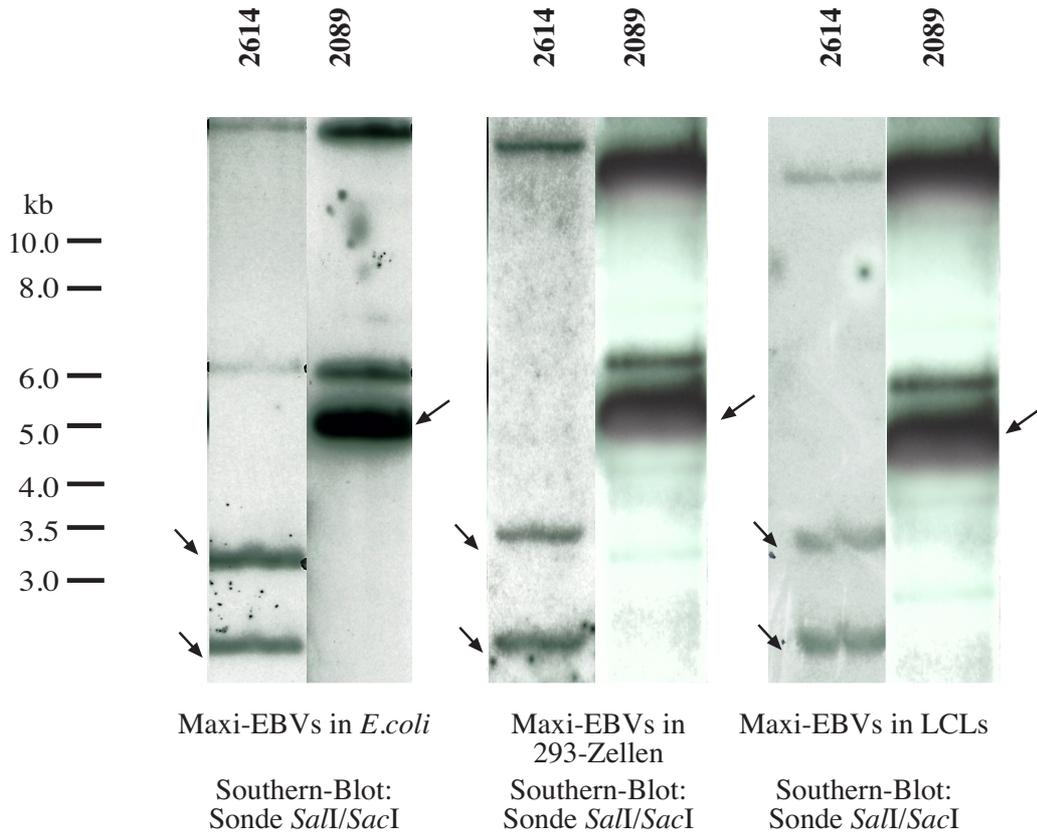
E



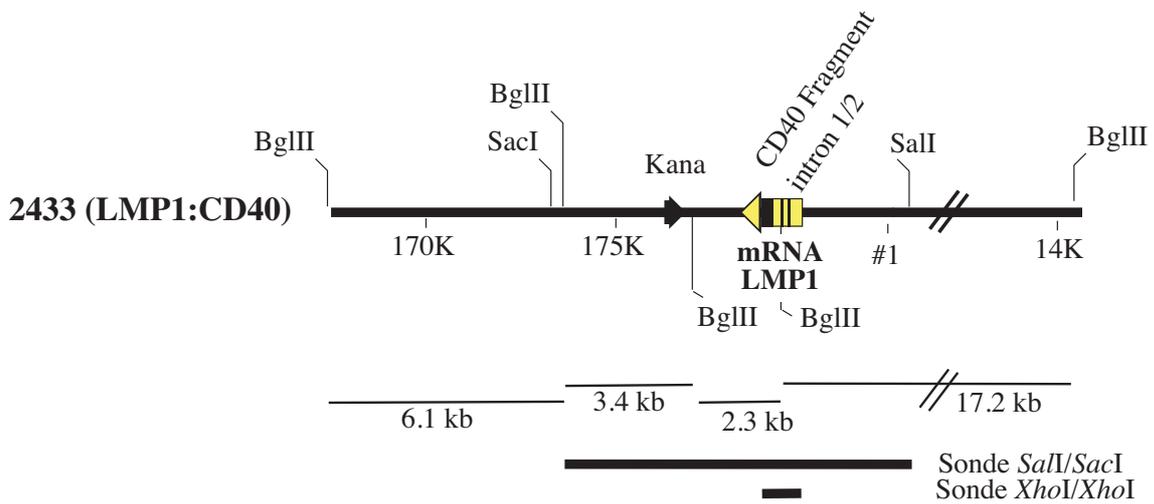
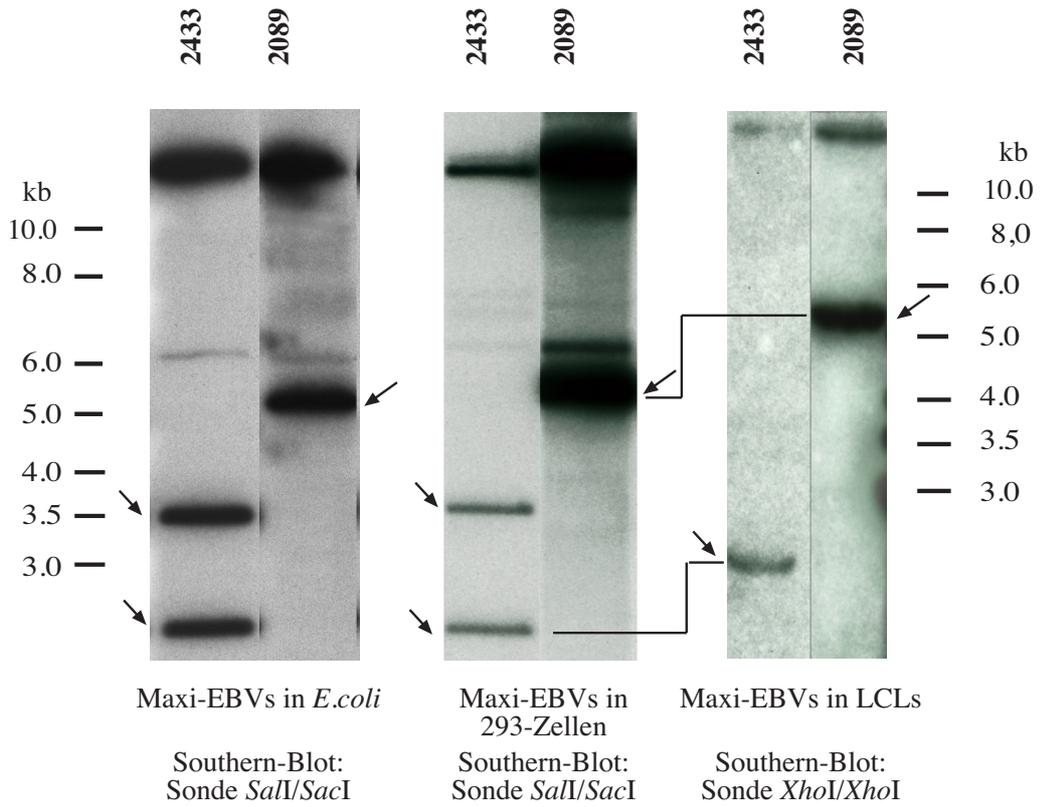
F



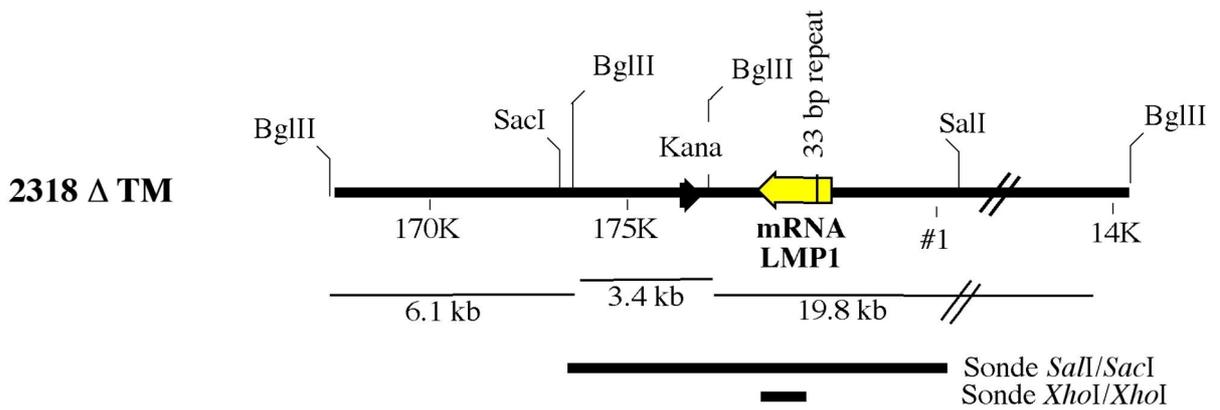
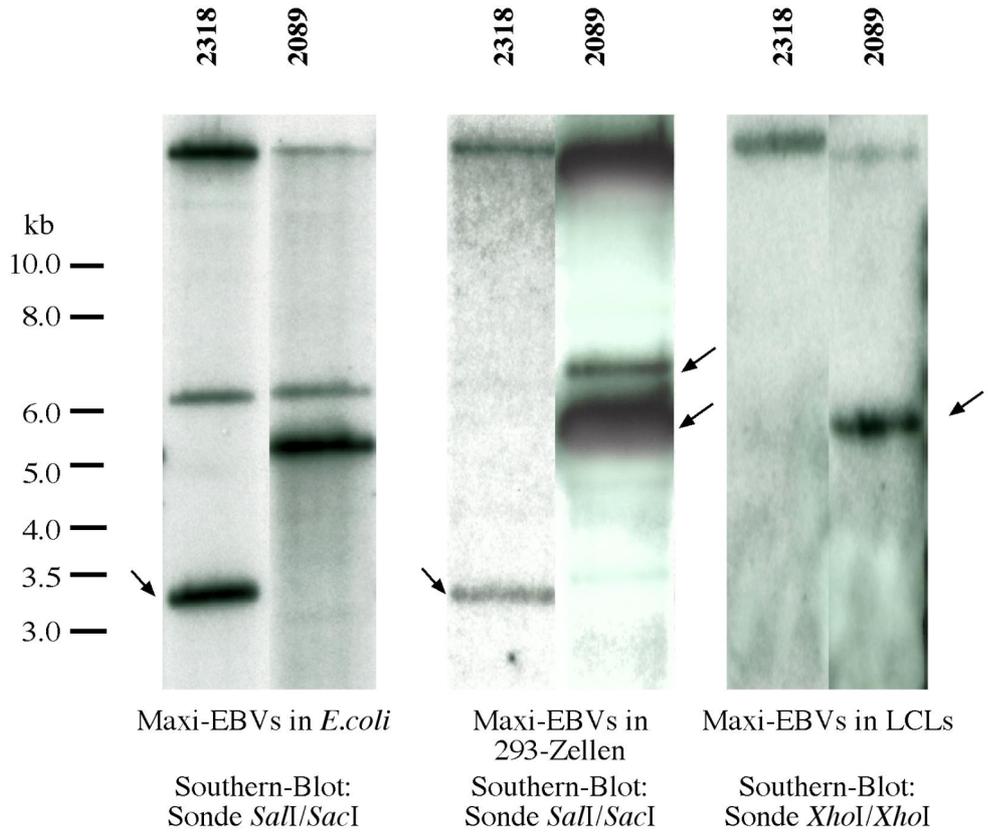
G



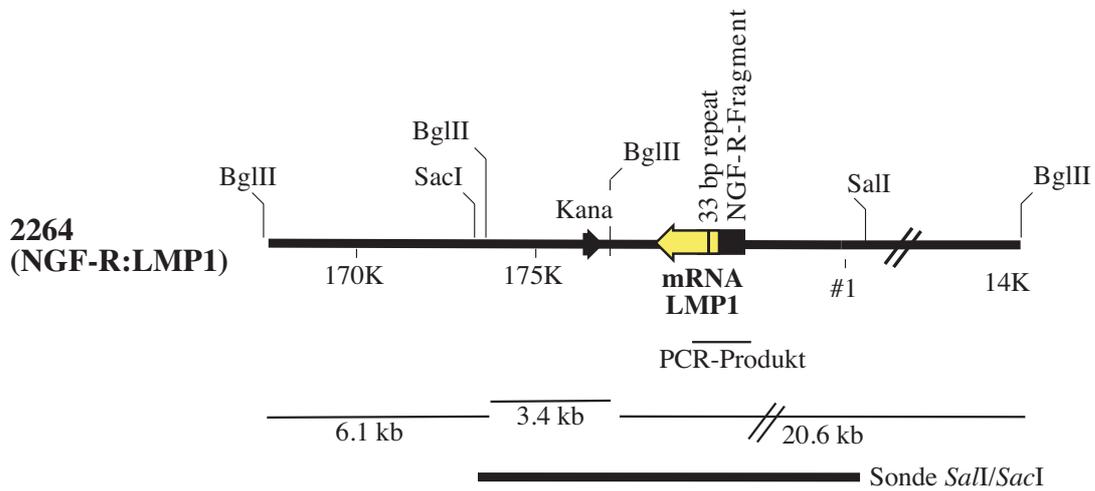
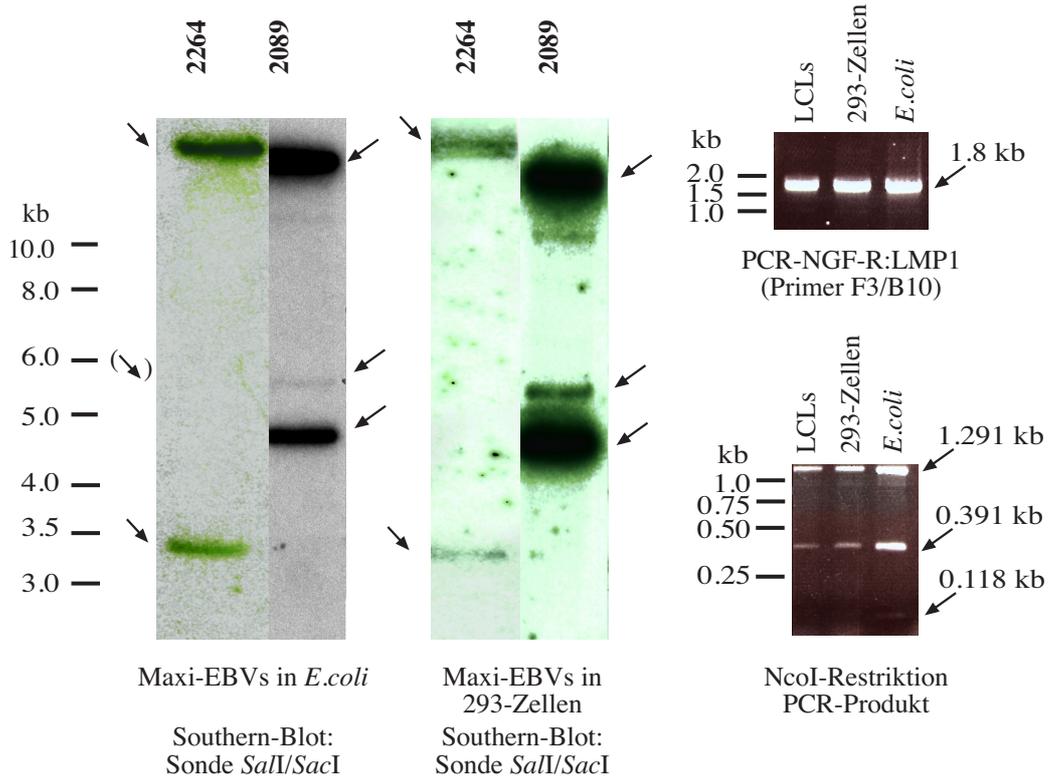
H



I



L



**Funktionelle und genetische Analyse des Latenten
Membranproteins 1 des Epstein-Barr Virus**

Anhang II

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

Ulrike Dirmeier

München, April 2002

Abkürzung- Genname	Affymetrix bzw. Clontech Annotation	differenziell exprimiert in Affymetrix-Exp. 1- 15	differenziell exprimiert. in Run- on-Exp. (1,2,4,5,6,7,8)	bestätigt durch FACS-Analyse	induziert ("i")/ reprimiert ("r")
	Transkriptionsfaktoren/-regulatoren				
Spi-B	X66079:H.sapiens Spi-B mRNA	√	1,2,4		i
NUP475	M92843:NUP475, H.sapiens zinc finger transcriptional regulator mRNA	√	5,6		i
ETR101	M62831:Human transcription factor ETR101 mRNA	√	5,6		i
ETR103	AT225:transcription factor ETR103	n.d.	4		i
NF-kappaB-Homolog	S76638 /p50-NF-kappa B homolog [human, peripheral blood T cells, mRNA, 3113 nt]	√			i
NF-kappaB-DNA-Bindedomäne	M58603 /Human NF-kappa-B-DNA binding subunit mRNA	√			i
NF-kappaB p100	nuclear factor NF-kappa-B p100 subunit; nuclear factor NF-kappa-B p52 subunit; H2TF1; oncogene Iy1-10	-	1,2,4,8		i
RelB	M83221/I-rel (RELB)	√			i
IkappaBepsilon	U91616:Human I kappa B epsilon (IkBe) mRNA	unklar	1,2,4		r-i
JunD	X56681 / Human junD mRNA	√	1,2,4		i
JunB	Cluster Incl. X51345:Human jun-B mRNA for JUN-B protein	√	1,2,4		i
API/c-Jun	J04111/c-jun proto-oncogene; transcription factor AP-1	n.d.	1,2,4		i
MAD-3	M69043:Homo sapiens MAD-3 mRNA encoding Ikb-like activity	√	1,2,4		i
TafII30	U13991 /Human TATA-binding protein associated factor 30 kDa subunit (tafII30) mRNA	√			r
c-myc	V00568 / Human mRNA encoding the c-myc oncogene	unklar	1,2,4		i
CPBP	U44975/DNA-binding protein CPBP	-	4		i
PEBP-2a	Z35278 /H.sapiens PEBP2aC1 acute myeloid leukaemia mRNA	√			i
80K-L	D10522:Homo sapiens mRNA for 80K-L protein, substrate of protein kinase C	√			i
Pilot	X63741:H.sapiens pilot mRNA	√			i
pp32	U73477:Human acidic nuclear phosphoprotein pp32 mRNA, inhibitor of HAT	√			i
B-ATF	AF016898:Homo sapiens B-ATF gene	√	7,8		i
KROX20	J04076/EARLY GROWTH RESPONSE PROTEIN 2 (EGR-2/KROX20)	n.d.	7,8		i
IRF-7	U73036/interferon regulatory factor 7 (IRF-7)	-	7,8		i
HEIR-1	AL021154:dJ150O5.2 (Inhibitor of DNA binding 3 (dominant negative helix-loop-helix protein, 1R21, HEIR-1))	√			i-r

Abkürzung- Genname	Affymetrix bzw. Clontech Annotation	differenziell exprimiert in Affymetrix-Exp. 1- 15	differenziell exprimiert. in Run- on-Exp. (1,2,4,5,6,7,8)	bestätigt durch FACS-Analyse	induziert ("i")/ reprimiert ("r")
	Signaltransduktion				
PAC-1	L11329 /HUMPAC1 Homo sapiens protein tyrosine phosphatase (PAC-1) mRNA	√	1,2,4,5,6		i
RhoG-GTPase	X61587:H.sapiens rhoG mRNA for GTPase	√	1,2,4		i
rho-GDP- Dissoziations- Inhibitor	X69549 /H.sapiens mRNA for rho GDP-dissociation Inhibitor 2	√			i-r
p62	U46751:Human phosphotyrosine independent ligand p62 for the Lck SH2 domain mRNA	√			i
STAT5A	U43185 /Human signal transducer and activator of transcription Stat5A	√			i
dual-specificity protein phosphatase	U15932 / Human dual-specificity protein phosphatase mRNA	√			i
HVH3	U16996/dual-specificity protein phosphatase 5; HVH3	√	7,8		i
lynB	M79321 /Human Lyn B protein mRNA	√			i
FAK	U33284/focal adhesion kinase 2 (FADK2; FAK2); CAKbeta	unklar	1,2,4		i
PI3K-p110 Untereinheit	X83368/PI3K catalytic subunit gamma isoform (PIK3CG); PI3 kinase P110 subunit	n.d.	7,8		i
Pleckstrin	X07743:Human mRNA for pleckstrin (P47)	√			i
MLN62	X80200:H.sapiens MLN62 mRNA	√			i
FEZ1	U60060:Human FEZ1 mRNA, fasciculation and elongation protein zeta-1, a PKCzeta interacting protein	√			i
IEF SSP	M86752 /Human transformation-sensitive protein (IEF SSP 3521) mRNA, stress inducible protein	√			i
GNAT2	Z18859/GUANINE NUCLEOTIDE-BINDING PROTEIN, TRANSDUCIN ALPHA-2 CHAIN(GNAT2)	n.d.	7,8		i
WASP	U12707:Human Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP) mRNA	√			r
HPK1	U66464 /Human hämatopoietic progenitor kinase (HPK1) mRNA, activates the JNK/SAPK kinase cascade	√			r
	Regulation von Apoptose/ Zellzyklusregulation				
A20	M59465 /HUMA20 Human TNF-alpha inducible protein A20 mRNA	√	7,8		i
Mcl-1	L08246:Human myeloid cell differentiation protein (MCL1) mRNA	unklar	1,2,4		i
Bfl-1/Bcl2A1	U27467 /Human Bcl-2 related (Bfl-1) mRNA	√	1,2,4		i

Abkürzung- Genname	Affymetrix bzw. Clontech Annotation	differenziell exprimiert in Affymetrix-Exp. 1-15	differenziell exprimiert. in Run- on-Exp. (1,2,4,5,6,7,8)	bestätigt durch FACS-Analyse	induziert ("i")/ reprimiert ("r")
clarp	AF005775 / Homo sapiens caspase-like apoptosis regulatory protein 2 (clarp) mRNA	√			i
Apoptoseinhibitor-Protein 1	U45878 /Human inhibitor of apoptosis protein 1 mRNA	√			i
GADD34	U83981:Homo sapiens apoptosis associated protein (GADD34) mRNA	√			i
GADD45	AF078077:Homo sapiens growth arrest and DNA-damage-inducible protein GADD45beta mRNA	√			i
p95/(NBS1)	AF058696:Homo sapiens cell cycle regulatory protein p95 (NBS1) mRNA	√			i
CIP4	AJ000414:Homo sapiens mRNA for Cdc42-interacting protein 4 (CIP4)	√			i
BTG2	U72649:Human BTG2 (BTG2) mRNA	√	4		i
BTG1	X61123:B-cell translocation gene 1 protein (BTG1)	-	7,8		i
	Zytokine				
LD78	D90144:Homo sapiens gene for LD78 alpha precursor	√	6,5		i
Act-2	J04130:Human activation (Act-2) mRNA	√			i
	EBV-induzierte Gene				
EBV induziertes Protein	U19261 /Homo sapiens Epstein-Barr virus-induced protein mRNA	√	7,8		i
	Oberflächenmoleküle/ Rezeptoren				
CD83	Z11697:Homo sapiens mRNA for HB15/CD83	√	7,8	√	i
CD69	Z22576:H.sapiens CD69 gene	√	7,8	√	i
CD44	L05424:Human hyaluronate receptor (CD44) gene	√		√	i
CDw40	X60592:Human CDw40 mRNA for nerve growth factor receptor-related B-lymphocyte activation molecule	√	1,2,4,5,6	√	i
CD27	M63928:Homo sapiens T cell activation antigen (CD27) mRNA	√			r
CD97	Cluster Incl. X94630:H.sapiens CD97	√			i
SLAM	U33017/signaling lymphocytic activation molecule	unklar	1,2,4		i
4-1BB	U03398:Human receptor 4-1BB ligand mRNA	√			i
TNF-beta	D12614:Human mRNA for lymphotoxin (TNF-beta)	√			i
TNFAB	M16441 /HUMTNFAB Human tumor necrosis factor and lymphotoxin genes	√			r-i

Abkürzung- Genname	Affymetrix bzw. Clontech Annotation	differenziell exprimiert in Affymetrix-Exp. 1-15	differenziell exprimiert. in Run- on-Exp. (1,2,4,5,6,7,8)	bestätigt durch FACS-Analyse	induziert ("i")/ reprimiert ("r")
LFA-3	Y00636:Human mRNA for lymphocyte function associated antigen-3 (LFA-3)	√			i
EBI1	L31584 /Human G protein-coupled receptor (EBI 1) gene exon 3	√			i
EBI 2	L08177/EBV-induced G-protein-coupled receptor 2 (EBI2)	√	7,8		i
IL-4-R	X52425 /Human IL-4-R mRNA for the interleukin 4 receptor	√			i
RDC1-Homolog	M64749/G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR RDC1 HOMOLOG	n.d.	7,8		i
HRV	M24283:Human major group rhinovirus receptor (HRV) mRNA	√			i
GLVR1	L20859 /Human leukemia virus receptor 1 (GLVR1) mRNA	√			i
TNF-R	M32315 / Human tumor necrosis factor receptor mRNA, complete cds	√			r-i
RING6	X62744:Human RING6 mRNA for HLA class II alpha chain-like product	√			r
	Metabolismus, Strukturproteine				
BCA-FS-synthase	Cluster Incl. U29344:Human breast carcinoma fatty acid synthase mRNA	√			i
Methylen-Tetrahydrofolat-DH-cyclooxyg.	X16396:Human mRNA for NAD-dependent methylene tetrahydrofolate dehydrogenase cyclohydrolase (EC 1.5.1.15)	√			i
ubiquitin	M26880 /Human ubiquitin mRNA,	√			r
Fau	X65923:H.sapiens fau, ubiquitin like S30-fusion protein	√			r
hARF5	M57567:Human ADP-ribosylation factor (hARF5) mRNA	√			r
delta7-Sterol-Reduktase	AF034544:Homo sapiens delta7-sterol reductase mRNA	√			i
Casein Kinase	U29171 / Human casein kinase I delta mRNA	√			i
Glucosidase	J03077:Human co-beta glucosidase (proactivator) mRNA	√			i-r
Ceramidase	U70063:Human acid ceramidase mRNA, complete cds	√			i-r
Lysosomale Alpha-Mannosidase	U60266/LYSOSOMAL ALPHA-MANNOSIDASE	n.d.	7,8		i
Häm-Oxygenase	Z82244:bK286B10.2 (Heme Oxygenase 1 (HO-1, EC 1.14.99.3))	√			i
Cysteinyl-t-RNA-Synthase	L06845:Human cysteinyl-tRNA synthetase mRNA	√			i
Glycyl-t-RNA-Synthase	U09510:Human glycyl-tRNA synthetase mRNA	√			i
DP3	M2341/junction plakoglobin (JUP); desmoplakin III (DP3)	-	1,2,4		i

Abkürzung-Genname	Affymetrix bzw. Clontech Annotation	differenziell exprimiert in Affymetrix-Exp. 1-15	differenziell exprimiert. in Run-on-Exp. (1,2,4,5,6,7,8)	bestätigt durch FACS-Analyse	induziert ("i")/reprimiert ("r")
HSN	U03057:Human actin bundling protein (HSN) mRNA	√			i
LCP-1	M22300/L-plastin; lymphocyte cytosolic protein 1 (LCP-1); LC64P	-	7,8		i
ACTB	X00351/zytoplasmic beta-actin (ACTB)	n.d.	7,8		i
E16	M80244:Human E16 mRNA	√			i
CoA-Synthase	X66435/zytoplasmic hydroxymethylglutaryl-CoA synthase	n.d.	7,8		i
Ferritin-schwere Kette	M97164/ferritin heavy chain (FTH1); FTHL6	n.d.	7,8		i
ribosomales Protein S5	U14970:Human ribosomal protein S5 mRNA	√			r
ribosomales Protein S9	U14971/40S ribosomal protein S9	n.d.	7,8		i
ribosomales Protein S11	X06617:Human mRNA for ribosomal protein S11	√			r
ribosomales Protein S18	AL031228:40S ribosomal protein S18	√			r
S19 ribosomales Protein	M81757:H.sapiens S19 ribosomal protein mRNA	√			r
P0	M17885:Human acidic ribosomal phosphoprotein P0 mRNA	√			r
APOC4	U32576:Human apolipoprotein apoC-IV (APOC4) gene	√			r
	Andere				
HIV-1	AJ011896:Homo sapiens mRNA for HIV-1, Nef-associated factor 1 beta (Naf1 beta)	√			i
Antiplasmin	D00174/alpha-2-antiplasmin	n.d.	7,8		i
PolyA site DNA	Z24724:H.sapiens polyA site DNA	√			i
P19	U71364:Human serine proteinase inhibitor (P19) mRNA	√			i
EF1	M27364/elongation factor 1 alpha (EF1 alpha)	-	7,8		i
EF2	X51466/elongation factor 2 (EF2)	-	1,2,4		i
ELL	U16282/ELL protein, RNA polyII elongation factor	n.d.	7,8		i
natriuretisches Vorläuferpeptid	M25296/ natriuretic peptide precursor B	-	7,8		i
(Sequenz aus Chromosom Xp11.2: Seggregation, DNA-Bindeprotein)	Z97054:Human DNA sequence from PAC 339A18 on chromosome Xp11.2. Contains KIAA0178 gene, similar to mitosis-specific chromosome segregation protein SMC1 of S.cerevisiae, DNA binding protein similar to URE-B1, ESTs and STS	√			i
HIC	AF054589:Homo sapiens HIC protein mRNA	√			i

Abkürzung- Genname	Affymetrix bzw. Clontech Annotation	differenziell exprimiert in Affymetrix-Exp. 1-15	differenziell exprimiert. in Run- on-Exp. (1,2,4,5,6,7,8)	bestätigt durch FACS-Analyse	induziert ("i")/ reprimiert ("r")
Protein 9-27	J04164 /Human interferon-inducible protein 9-27 mRNA	√			r
90kDa HSP	M16660:Human 90-kDa heat-shock protein gene	√			r-i
INSIG1	U96876:Homo sapiens insulin induced protein 1 (INSIG1) gene, growth and metabolic control	√			r-i
hSIAH2	U76248:Human hSIAH2 mRNA, development	√			r-i
IgL-leichte Kette	X57809:Human rearranged immunoglobulin lambda light chain mRNA	√			r
p126	U15131:Human p126 (ST5) mRNA	√			r
Chtinase	U58515:Human chitinase (HUMTCHIT) mRNA,	√			r
	Sequenzen unbekannter Funktion				
	D42043:Human mRNA for KIAA0084 gene	√			i
	AI865431:wk11h09.x1 Homo sapiens cDNA,	√			i
	AI525665:PT1.3_04_D06.r Homo sapiens cDNA	√			r
	AB002344:Human mRNA for KIAA0346 gene	√			i
	D87071:Human mRNA for KIAA0233 gene	√			i
	AL120815:DKFZp762F172_r1 Homo sapiens cDNA	√			i
	AF055001:Homo sapiens clone 24560 unknown mRNA	√			i
	W25986:17e7 Homo sapiens cDNA	√			i
	AL096723:Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp564H2023	√			i
	R87876:yo45h01.r1 Homo sapiens cDNA	√			i
	AB028969:Homo sapiens mRNA for KIAA1046 protein	√			i
	AB014540:Homo sapiens mRNA for KIAA0640 protein	√			i
	X81625:H.sapiens mRNA for C11 protein	√			i
	AI017574:ou23f10.x1 Homo sapiens cDNA	√			i
	D87076:Human mRNA for KIAA0239 gene,	√			i
	AA808961:nw16h03.s1 Homo sapiens cDNA	√			r
	AI535656	√			i

Abkürzung-Genname	Affymetrix bzw. Clontech Annotation	differenziell exprimiert in Affymetrix-Exp. 1-15	differenziell exprimiert in Run-on-Exp. (1,2,4,5,6,7,8)	bestätigt durch FACS-Analyse	induziert ("i")/reprimiert ("r")
	S73591:brain-expressed HHCPA78 homolog, human HL-60 acute promyelocytic leukemia cells	√			i
	H12458 /yj12d03.s1 Soares placenta Nb2HP Homo sapiens cDNA clone	√			i
	Cluster Incl. D13630:Human mRNA for KIAA0005 gene	√			i
	AL050021:Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp564D016	√			i
	AL080109:Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp586G1822	√			i
BDP-1	AF070616:Homo sapiens clone 24772 BDP-1 protein mRNA	√			i
	U79259:Human clone 23945 mRNA	√			i
	AA587372:nn82f03.s1 Homo sapiens cDNA	√			i-r
G7b	AJ245416:Homo sapiens mRNA for G7b protein (G7b gene, located in the class III region of the major histocompatibility complex	√			r

Tab.4.4A: LMP1-regulierte Gene

Tabellarisch dargestellt sind 144 LMP1-regulierte Gene in neun funktionellen Gruppen. Diese wurden mit Hilfe der Affymetrix-Technologie und SAM (Significance Analysis of Microarrays) bzw. durch Run-on-Analysen und Clontech AtlasImage1.5-Software bestimmt. Die 117 SAM-definierten Gene wurden in Spalte drei mit √ gekennzeichnet. 27 weitere Gene, die ausschließlich in Run-on Experimenten nachgewiesen wurden, sind in dieser Spalte mit n.d. (in Affymetrix-Analysen nicht differenziell) bzw. „unklar“ bezeichnet (nur in einzelnen Replikaten der Affymetrix-Experimente differenziell exprimiert, entsprechen aber nicht den stringenten Kriterien von SAM). Die mit „-“ bezeichneten neun Gene sind auf dem „Human Genome U95Av2“-Chip nicht repräsentiert. Spalte vier beinhaltet alle 46 Gene, die durch Run-on-Analysen definiert wurden. Dabei wurden die Arrays (1,2,4,5,6,7,8), auf denen das jeweilige Gen detektiert wurde, aufgeführt. 1, 2 und 4 stehen für die drei Replikativversuche durchgeführt mit Filterset „Human cancer 1.2“; 5 und 6 für „Human 1.2I“; 7 und 8 für „Human 1.2II“. In Experiment 9 und 10 mit „Human 1.2III“ wurden keine differenziell exprimierten Gene detektiert. 19 LMP1-regulierte Gene konnten mit beiden Methoden nachgewiesen werden. In Spalte sechs ist aufgeführt, welche Gene LMP1-induziert („i“, 112 Gene) bzw. -reprimiert sind („r“, 21 Gene). Die Bezeichnungen „r-i“ (6 Gene) bzw. „i-r“ (5 Gene) repräsentieren die Entwicklung eines Gens nach LMP1-Induktion über den untersuchten Zeitraum (30 bis 180 min.) (siehe auch Abb.4.19A). Spalte fünf kennzeichnet Gene, deren differentielle Expression auch auf Proteinebene mittels FACS-Analysen bestätigt werden konnte. Bereits bekannte Zielgene von LMP1 sind in Spalte eins fettgedruckt. In rot dargestellt sind gemeinsame Zielgene von LMP1 und CD40. Grau unterlegt sind Gene, die sowohl durch LMP1, als auch durch den „feeder layer“ reguliert wurden.

Abkürzung- Genname	Affymetrix bzw. Clontech Annotation	differenziell exprimiert in Affymetrix-Exp. 1-15	differenziell exprimiert. in Run-on-Exp. (1,2,3)	bestätigt durch FACS-Analyse	induziert ("i")/ reprimiert ("r")
	Transkriptionsfaktoren/-regulatoren				
ETR101	M62831:Human transcription factor ETR101 mRNA	√			i
MAD3	M69043 /Homo sapiens MAD-3 mRNA encoding IκB-like activity	√	1		i
NfκappaB-Homolog	S76638/ p50-NF-κappa B homolog [human, peripheral blood T cells, mRNA, 3113 nt]	√			i
NF-κappaB-DNA-Bindedomäne	M58603:Human nuclear factor kappa-B DNA binding subunit (NF-κappa-B) mRNA	√			i
NUP475	M92843:H.sapiens zinc finger transcriptional regulator mRNA	√	2,3		i
junD	X56681 /Human junD mRNA	√	1		i
c-myc	V00568: Human mRNA encoding the c-myc oncogene	n.d.	1		i
AP1/c-Jun	J04111/c-jun proto-oncogene; transcription factor AP-1	n.d.	1		i
PEBP-2a	Z35278 /H.sapiens PEBP2aC1 acute myeloid leukaemia mRNA	√			i
HEIR-1	AL021154:dJ150O5.2 (Inhibitor of DNA binding 3 (dominant negative helix-loop-helix protein, 1R21, HEIR-1))	√			r
	Signaltransduktion				
PAC-1	L11329 /Homo sapiens protein tyrosine phosphatase (PAC-1) mRNA	√	1		i
dualspecificity protein phosphatase	U15932 /Human dual-specificity protein phosphatase mRNA	√			i
pim-2	U77735 /Human pim-2 protooncogene homolog pim-2h mRNA	√			i
	Regulation von Apoptose/Zellzykluskontrolle				
A20	M59465 /Human tumor necrosis factor alpha inducible protein A20 mRNA	√			i
GADD34	U83981:Homo sapiens apoptosis associated protein (GADD34) mRNA	√			i
	Zytokine				
LD78	D90144:Homo sapiens gene for LD78 alpha precursor	√			i
	Oberflächenmoleküle/Rezeptoren/Liganden				
CD83	Cluster Incl. Z11697:Human sapiens mRNA for HB15/CD83	√		√	i
CD69	Z22576:H.sapiens CD69 gene	√		√	i

Tab.4.4.B

Abkürzung- Genname	Affymetrix bzw. Clontech Annotation	differenziell exprimiert in Affymetrix-Exp. 1-15	differenziell exprimiert. in Run-on-Exp. (1,2,3)	bestätigt durch FACS-Analyse	induziert ("i")/ reprimiert ("r")
TNFalpha	X02910 /Human gene for tumor necrosis factor (TNF-alpha)	√	2,3		i
TNFAB	M16441 /Human tumor necrosis factor and lymphotoxin genes	√			i
CDw40	X60592:Human CDw40 mRNA for nerve growth factor receptor-related B-lymphocyte activation molecule	√	1		i
4-1BB ligand	Cluster Incl. U03398:Human receptor 4-1BB ligand mRN	√			i
TNFAB	M16441 /Human tumor necrosis factor and lymphotoxin genes	√			i
SLAM	U33017:Human signaling lymphocytic activation molecule (SLAM) mRNA	√	1		i
	Metabolismus, Strukturproteine				
Lamin B2	M94362:Human lamin B2 (LAMB2) mRNA	√			i
Glycophorin C	X12496:Human mRNA for erythrocyte membrane sialoglycoprotein beta (glycophorin C)	√			r
	Andere/ Sequenzen unbekannter Funktion				
eIF3	U78525:Homo sapiens eukaryotic translation initiation factor (eIF3)	√			i
	D21261:Human mRNA for KIAA0120 gene	√			i

Tab.4.4B: CD40-regulierte Gene

Tabellarisch dargestellt sind 28 CD40-regulierte Gene in sieben funktionellen Gruppen. Diese wurden mit Hilfe der Affymetrix-Technologie und SAM (Significance Analysis of Microarrays) bzw. durch Run-on-Analysen und Clontech AtlasImage1.5-Software bestimmt. Die 26 SAM-definierten Gene wurden in Spalte drei mit √ gekennzeichnet. Zwei weitere Gene, die ausschließlich in Run-on-Experimenten nachgewiesen wurden, sind in dieser Spalte mit n.d. (in Affymetrix-Analysen nicht differenziell) bezeichnet. Spalte vier beinhaltet alle neun Gene, die durch Run-on-Analysen definiert wurden. Dabei wurden die Arrays (1,2,3) aufgeführt, auf denen das jeweilige Gen detektiert wurde. 1 steht für Filterset „Human cancer 1.2“; 2 und 3 für „Human 1.2I“. Die Run-on-Experimente mit den Arrays „Human 1.2II und III“ lieferten keine weiteren differenziell exprimierten Gene. Sieben Gene konnten in Run-on-Experimenten und mit Affymetrix Chips nachgewiesen werden. In Spalte sechs ist aufgeführt, welche Gene CD40-induziert („i“, 26 Gene) bzw. -reprimiert sind („r“, zwei Gene). Die Entwicklung eines Gens nach CD40-Induktion über den untersuchten Zeitraum (30 bis 180 min.) kann Abb.4.19B entnommen werden. Spalte fünf kennzeichnet Gene, deren differentielle Expression auch auf Proteinebene mit FACS-Analysen bestätigt werden konnte. Bereits bekannte Zielgene von CD40 sind in Spalte eins fettgedruckt. In rot dargestellt sind gemeinsame Zielgene von CD40 und LMP1. Grau unterlegt sind Gene, die sowohl durch CD40, als auch durch den „feeder layer“ reguliert wurden.

Danksagung

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

Herrn Prof. Dr. Wolfgang Hammerschmidt für die hervorragende Betreuung, den wissenschaftlichen Rat und seine ständige Diskussionsbereitschaft, für die Unterstützung in Computerfragen und in Form von Cookies und nicht zuletzt für die superschnelle Korrektur,

Herrn Prof. Dr. Dirk Eick dafür, dass er mich höchstpersönlich in die Run-on-Technik eingewiesen hat und die Aufgaben und Pflichten des offiziellen Betreuers der Arbeit übernommen hat,

Dr. Reinhard Hoffmann für den ausgiebigen Beistand bei der Auswertung von Chipdaten und allen sonstigen statistischen Problemen, vor allem für die viele Geduld und Isabell Schlosser für Protokolle und praktische Tipps bei den Affymetrix-Experimenten,

Dr. Olivier Gires für die vielen Stunden, die er mit mir vor dem FACS verbracht hat, bis ich es endlich mal alleine hingekriegt habe, außerdem allen anderen aus der Arbeitsgruppe Gires/Zeidler, für die Versorgung mit Adenoiden, Dr. Elisabeth Kremmer für die Antikörper und Hybridomzellen und Dr. Gilbert Reisbach, dass er mir die Mäuseversuche erspart hat,

Dr. (!) Ute Schultheiß für den praktischen und moralischen Beistand bei allen Westernblot-Fragen, und Dr. Arnd Kieser fürs Korrekturlesen, Dr. Bernhard Neuhierl für die vielen praktischen und theoretischen Ratschläge, die wir in der „königstigerlosen bay“ sicher in Zukunft sehr vermissen werden,

den Mitgliedern der Arbeitsgruppe Genvektoren für die gute Zusammenarbeit, praktische Unterstützung und wissenschaftliche Diskussion und allen Kolleginnen und Kollegen des Instituts, die zum guten Arbeitsklima beigetragen haben,

speziellen Dank natürlich an meine Doktorandenkollegen (und die, die die zwei Buchstaben mittlerweile schon haben) Ute, Annette, Eva, Eva, Madelaine, Sibille, Thomas, Frank und natürlich meinen geplagten Schreibtischnachbarn Markus für die Hilfsbereitschaft, gemeinsames Jammern und natürlich auch viel Spaß !!

dem Michi fürs Korrekturlesen und die moralische Unterstützung.

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name: Ulrike Dirmeier
Geburtsdatum: 01.03.1970
Geburtsort: München
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

Ausbildung

1976-1980 Grundschule, München
1980-1989 Theresien-Gymnasium, München
Juni 1989 Abitur

1989-1993 Fachakademie für Musik: Richard-Strauss-Konservatorium,
München
Juli 1992 Staatliche Musikreifeprüfung
Juli 1993 Staatliche Musiklehrerprüfung

1992-1998 Studium der Biologie, Ludwig-Maximilians-Universität
München
November 1994 Vordiplom
April 1997-Februar 1998 Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Karl
Forchhammer, Institut für Mikrobiologie, Ludwig-Maximilians-
Universität München
Februar 1998 Abschluss des Studiums der Biologie (Diplom)

Juli 1998- Februar 1999 wissenschaftliche Hilfskraft Boehringer Mannheim GmbH,
Penzberg

März 1999- April 2002:
Promotion in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Wolfgang Hammerschmidt an der GSF,
Abteilung Genvektoren, München