

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

Transkriptionsregulation durch das EBV-nukleäre Antigen 2 - Abhängigkeit von DNA-Adaptoren und die Funktion der N-terminalen Domäne

Sybille Thumann
München, März 2016



Erstgutachter: Prof. Bettina Kempkes

Zweitgutachter: Prof. Angelika Böttger

Tag der Abgabe: 16.3.2016

Tag der mündl. Prüfung: 26.7.2016

**„Der einzige Mist, auf dem nichts
wächst, ist der Pessimist.“**

Theodor Heuss

Teile der vorliegenden Dissertation wurden veröffentlicht in:

Friberg A., Thumann S., Hennig J., Zou P, Nössner E., Ling P.D., Sattler M., Kempkes B. (2015). „The EBNA-2 N-Terminal Transactivation Domain Folds into a Dimeric Structure Required for Target Gene Activation”. PLoS Pathog **11**(5): e1004910.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	xiii
-----------------------------	-------------

I. Einleitung.....	1
---------------------------	----------

1. Das Epstein-Barr Virus.....	1
1.1. Burkitt-Lymphom und Epstein-Barr-Virus	1
1.2. Virusinfektionen gehören zu den Hauptrisikofaktoren für Krebserkrankungen.....	1
1.3. Das γ -Herpesvirus EBV: taxonomische Einteilung, Aufbau und Übertragungsweg.....	2
1.4. Der Lebenszyklus des EBV und assoziierte Krankheiten.....	2
1.5. Proteine und Transkripte in der Latenzphase	6
2. Transkriptionsregulation durch EBNA2.....	7
2.1. Funktionell charakterisierte Regionen von EBNA2.....	7
2.2. CBF1-vermittelte Transkriptionsregulation	8
2.3. Genomweite Bindestellen von EBNA2 und CBF1	9
2.4. EBNA2-regulierte Transkripte	10
2.5. Zielsetzung des ersten Teils meiner Arbeit.....	11
3. Funktionell charakterisierte Regionen von EBNA2 und EBNA2-Interaktionspartnern.....	12
3.1. Zwei Domänen sind an der Transaktivierungsfunktion des EBNA2 beteiligt.....	12
3.2. Zelluläre Interaktionspartner von EBNA2 geben Einblicke in die vielfältigen Funktionen des viralen Faktors	13
3.3. Zielsetzung des 2. Teils meiner Arbeit.....	14

II. Material	16
---------------------------	-----------

1. Bakterienstämme	16
2. Zelllinien	16
3. Oligonukleotide/Primer.....	17
3.1. Oligonukleotide, die für Klonierungen und Sequenzierungen verwendet wurden.....	17
3.2. Oligonukleotide zur Amplifikation genomischer Bereiche nach Chromatinimmunpräzipitationen	17
3.3. Oligonukleotide zum Nachweis von EBNA2-Zielgenen mit cDNA als <i>template</i>	18
3.4. Oligonukleotide zum Nachweis von microRNAs	20
4. Plasmide	21
5. Antikörper.....	23
5.1. Antikörper für Western Blot	23
5.2. Antikörper für Immunpräzipitation.....	23
6. Material für Bakterienstämme.....	24
7. Material für Zellkultur	24

8. DNA- und Proteinstandards	24
9. Enzyme und Reagenziensysteme	25
10. Chemikalien und Reagenzien	25
11. Verbrauchsmaterial	26
12. Laborausstattung.....	27
13. Datenbanken, Internet-Programme und Computer-Software	28
III. Methoden	29
1. Arbeiten mit Bakterienkulturen	29
1.1. Kultivierung und Aufbewahrung von Bakterien	29
1.2. Transformation chemisch-kompetenter Bakterien	29
2. Arbeiten mit eukaryotischen Zellen.....	29
2.1. Kultivierung und Aufbewahrung von Zellen	29
2.2. Kultivierung von Suspensionszelllinien.....	29
2.3. Aufbewahrung von Zellen.....	30
2.4. Bestimmung der Zellzahl	30
2.5. Transiente Transfektion eukaryotischer Suspensionszellen durch Elektroporation	30
2.6. Promotor-Reportergenstudien.....	31
3. DNA - Arbeitstechniken	31
3.1. Schnelle Plasmidisolierung.....	31
3.2. Präparative Plasmidisolierung.....	31
3.3. Konzentrationsbestimmungen der DNA mit dem Qubit® Fluorometer oder dem Eppendorf Photometer.....	32
3.4. Polymerasekettenreaktion (PCR).....	32
3.5. Aufreinigung von DNA-Fragmenten.....	32
3.6. Agarosegelelektrophorese.....	33
3.7. Klonierung von Plasmidvektoren.....	33
3.8. Quantitative PCR (qPCR).....	34
4. RNA-Arbeitstechniken.....	36
4.1. Isolierung von RNA aus eukaryotischen Zellen	36
4.2. Spektrometrische Konzentrationsbestimmungen der RNA.....	37
4.3. Agarosegelelektrophorese von RNA	37
4.4. Reverse Transkription.....	37
4.5. Genomweite Genexpressionsanalysen (Affymetrix <i>GeneChip® Human Gene 2.0 ST Array</i>)	38
5. MicroRNA-Arbeitstechniken	39
5.1. Isolierung von microRNA aus eukaryotischen Zellen.....	39
5.2. Konzentrationsbestimmung der microRNA mit dem Qubit® Fluorometer	39

5.3.	Oligonukleotid-Design für die microRNA-Detektion.....	39
5.4.	Reverse Transkription der microRNAs	39
5.5.	Quantifizierung der microRNAs.....	40
6.	Proteinbiochemische Methoden.....	41
6.1.	Herstellung und Konzentrationsbestimmung von Zelllysaten	41
6.2.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	42
6.3.	Western Blot	42
6.4.	Quantifizierung von Western Blot-Signalen.....	43
6.5.	Immunpräzipitation.....	43
6.6.	Immunpräzipitation für die massenspektrometrische Analyse	44
6.7.	Kovalente Kopplung von Antikörpern an Protein A/G Sepharose- <i>beads</i>	44
6.8.	Massenspektrometrische Analyse der Immunpräzipitate (<i>LC-MS/MS</i>).....	45
7.	Chromatinimmunpräzipitation (ChIP).....	46
7.1.	Präparation von fragmentiertem Chromatin	46
7.2.	Immunpräzipitation der Protein-DNA-Komplexe und DNA-Extraktion.....	47
7.3.	Quantifizierung von DNA nach Chromatinimmunpräzipitation	48
8.	Kernspinresonanzspektroskopie oder NMR-Spektroskopie (von <i>nuclear magnetic resonance</i>)..	48
8.1.	Expression und Aufreinigung der END-Domäne für die NMR-Spektroskopie	48
8.2.	NMR-Spektroskopie	49
IV.	Ergebnisse Teil 1.....	51
1.	Genomweite, vergleichende Genexpressionsanalyse CBF1-positiver und CBF1-negativer Zellen vor und nach EBNA2-Expression.....	52
1.1.	Molekulare Eigenschaften von DG75 Burkitt-Lymphomzellen und der Einfluss von EBNA2	52
1.2.	Modifizierte Burkitt-Lymphomzelllinien als Modellsysteme	52
1.3.	Genexpressionsanalyse mit dem <i>GeneChip® Human Gene 2.0 ST Array</i>	53
1.4.	RNA-Präparationen und Arrayhybridisierungen.....	54
1.5.	Möglichkeiten der Zielgenanalysen	54
1.6.	Darstellung von 950 mindestens 2-fach EBNA2-regulierter Transkripte der 4 untersuchten Zelllinien.....	56
1.7.	Die Östrogenbehandlung von DG75-Zellen führt zu keinen signifikanten Veränderungen der Genexpressionsprofile.....	57
1.8.	EBNA2-Zielgenregulation in DG75-B-Zellen.....	58
1.9.	EBNA2-Zielgenregulation in DG75-B-Zellen, die kein CBF1-Protein exprimieren	61
1.10.	Die Expressionsdaten der SM296 ^{CBF1 neg.} -Zellen konnten anhand ausgewählter Zielgene bestätigt werden.....	64

1.11. Besonderheit des CCL3/CCL3L1/CCL3L3-Genortes.....	69
1.12. EBNA2-Zielgene werden in CBF1-positiven Zellen stärker aktiviert	70
1.13. CBF1-reprimierte Zielgene	71
1.14. Es werden andere Gene durch EBNA2 aktiviert als durch CBF1 reprimiert	75
1.15. EBNA2-regulierte microRNAs und lincRNAs	75
2. Rekrutierung von CBF1 und EBNA2 an Chromatin	80
2.1. Kriterien für die Auswahl der EBNA2-Bindestellen.....	80
2.2. In CBF1-negativen Zellen ist die Interaktion von EBNA2 mit Chromatin schwächer.....	82
3. Zusammenfassung.....	86
V. Ergebnisse - Teil 2.....	87
1. Mutationsanalysen basierend auf NMR-Struktur-Daten der N-terminalen Domäne	87
1.1. Die END-Domäne faltet sich und dimerisiert in Lösung	87
1.2. Design verschiedener END-Domänen-Mutanten: Grenzflächen- und Oberflächenmutanten	92
1.3. Die Mutation von hydrophoben Aminosäuren zerstört die Interaktion der EBNA2-Monomere	92
1.4. Histidin 15, Leucin 16, Isoleucin 50 und die α -Helix 1 sind wichtig für die Funktion von EBNA2.....	95
1.5. Zusammenfassung: Die END-Domäne - eine neuartige Dimerisierungs- und Transaktivierungsdomäne	101
2. Zwei neue Interaktionspartner von EBNA2: PLK1 und PAXIP1	102
2.1. Die Suche nach END-spezifischen Interaktionspartnern	102
2.2. Massenspektrometrische Analyse von EBNA2-Wildtyp, -H15A und - $\Delta\alpha 1$ Immunpräzipitaten	103
2.3. 4 potentielle END-Domänen-Interaktionspartner	108
2.4. EBNA2 und PAXIP/PTIP.....	111
2.5. PLK1 ist stark exprimiert in DG75-B-Zellen und interagiert mit EBNA2.....	113
2.6. Zusammenfassung: potentielle END-Domänen Interaktions-partner	114
VI. Diskussion.....	116
1. CBF1-abhängige und CBF1-unabhängige Transkriptions-regulation durch EBNA2.....	116
1.1. Gibt es weitere DNA-Adapterproteine im EBNA2-Komplex?.....	117
1.2. Gibt es CBF1-unabhängig EBNA2-regulierte Zielgene?	117
1.3. Übersicht zur EBNA2-Zielgenregulation in CBF1-pos. und CBF1-neg. Zellen.....	118
2. CBF1-reprimierte versus CBF1/EBNA2-aktivierte Transkription	119
2.1. CBF1-reprimierte Transkripte.....	119
2.2. CBF1-reprimierte und CBF1/EBNA2-aktivierte Zielgene im Vergleich	121
3. Funktion von EBNA2-regulierten microRNAs.....	122

3.1.	MiR-21	122
3.2.	MiR-146a.....	123
3.3.	MiR-181b1.....	123
3.4.	Hat die EBNA2-Regulation des <i>MIR17HG</i> einen Einfluss auf DG75-B-Zellen?	124
3.5.	Welche Zielgene werden möglicherweise durch EBNA2-induzierte microRNAs reprimiert?	125
4.	Funktion von EBNA2-regulierten lincRNAs.....	126
5.	Die Funktion der END-Domäne (EBNA2 N-terminale Dimerisierungsdomäne).....	127
5.1.	Die END-Domäne zeigt ein neues Faltungsmodell	127
5.2.	Die Faltung der END-Domäne ist stark konserviert	127
5.3.	Funktion der Dimerisierung der END-Domäne	127
5.4.	Die END-Domäne - eine Transaktivierungsdomäne (TAD)	129
5.5.	Die END-Domäne - eine ungewöhnliche Transaktivierungsdomäne.....	129
5.6.	Die Bedeutung der Erkenntnisse der Mutationsstudien für Therapieansätze.....	130
6.	Die Ergebnisse der <i>label-free LC-MS/MS</i> -Versuche.....	130
6.1.	Zwei neue EBNA2-Interaktionspartner	130
6.2.	END-Domänen Interaktionspartner.....	135
VII.	Anhang.....	137
1.	Abkürzungsverzeichnis.....	137
2.	Tabellen	140
3.	Inhalte des CD-Rom Anhangs.....	160
VIII.	Literatur	161
IX.	Eidesstattliche Erklärung.....	180
X.	Danksagung	181
XI.	Lebenslauf.....	183

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Konservierte Regionen des EBNA2-Proteins.....	8
Abbildung 2: Modell der Zielgenaktivierung durch EBNA2.....	9
Abbildung 3: Schematische Darstellung des Ablaufs der microRNA Quantifizierung.....	41
Abbildung 4: Entstehungsweg der Zelllinien für die Expressionsstudien dieser Arbeit.	53
Abbildung 5: 28 Möglichkeiten 4 Zelllinien in je 2 Zuständen miteinander zu vergleichen.	55
Abbildung 6: Zusammenstellung der Expressionsdaten der 950 EBNA2-regulierten Transkripte aller untersuchten Zelllinien.....	57
Abbildung 7: Bekannte östrogenresponsive Gene werden nicht durch Östrogen induziert.	58
Abbildung 8: Aus der Literatur bekannte EBNA2-Zielgene.	59
Abbildung 9: Differentielle Genexpressionsprofile von SM295-Zellen vor und nach EBNA2-Induktion.	62
Abbildung 10: Differentielle Genexpressionsprofile von SM296 ^{CBF1 neg.} -Zellen vor und nach Aktivierung von EBNA2.....	64
Abbildung 11: In SM295-Zellen stärker EBNA2-regulierte Gene - Vergleich der Ergebnisse der Expressionsanalysen mittels qPCR mit den Expressionswerten der <i>GeneChip 2.0 ST Arrays</i>	67
Abbildung 12: In SM296CBF1 neg. stärker EBNA2-regulierte Gene - Vergleich der Ergebnisse der Expressionsanalysen mittels qPCR mit den Expressionswerten der <i>GeneChip 2.0 ST Arrays</i>	69
Abbildung 13: Expressionswerte aus den Daten des <i>GeneChip® 2.0 ST Arrays</i> für <i>CCL3</i>	69
Abbildung 14: In SM296 ^{CBF1 neg.} EBNA2-regulierte Gene sind größtenteils auch in SM295 durch EBNA2 reguliert.	71
Abbildung 15: Regulation durch CBF1 - Differentielle Genexpressionsprofile von DG75- im Vergleich zu SM224.9 ^{CBF1 neg.} -Zellen.	73
Abbildung 16: CBF1-regulierte Transkripte.	74
Abbildung 17: EBNA2-Regulation von microRNAs in SM295- und SM296 ^{CBF1 neg.} -Zellen.....	78
Abbildung 18: Verifizierung der EBNA2-Regulation von microRNAs mittels qPCR.....	79
Abbildung 19: Bindet EBNA2 auch in CBF1-negativen Zellen an Chromatin?.....	83
Abbildung 20: EBNA2-Chromatin Interaktion im Bereich des auch CBF1-unabhängig EBNA2-regulierten Genes <i>CD69</i>	84
Abbildung 21: EBNA2-Chromatin Interaktion im Bereich des CBF1-unabhängig EBNA2-regulierten Genes <i>RGS1</i>	85
Abbildung 22: Strukturvorhersagen mit dem Programm PSIPRED.	88
Abbildung 23: Die Struktur der END-Domäne.	90
Abbildung 24: Hydrophobe Aminosäuren der END-Domäne sind spezieübergreifend stark konserviert.	91
Abbildung 25: Der Einfluss der Grenzflächen- und Oberflächenmutationen auf die EBNA2-Dimerisierung.....	94
Abbildung 26: Der C-Promoter (Cp) wird in Eli-BL durch transient exprimiertes EBNA2 nicht beeinflusst.	96
Abbildung 27: Für die Funktion von EBNA2 spielen Histidin 15, die Helix $\alpha 1$ und die EBNA2-Dimerisierung eine wichtige Rolle.	98
Abbildung 28: Einfluss der END-Domänen Mutationen auf die Expression von endogenem LMP1.	99
Abbildung 29: Bestätigung der Bedeutung von Histidin 15 und der Helix $\alpha 1$ für die Transaktivierung mit Gal4-Fusionsproteinen in Promotor-Reportergenstudien.	101

Abbildung 30: Qualitätskontrolle der Immunpräzipitationsproben für die massenspektrometrischen Analysen.....	104
Abbildung 31: PAXIP1 interagiert mit EBNA2.....	111
Abbildung 32: Im EBNA2- $\Delta\alpha 1$ -Immunpräzipitat kann nur 33,3% an PAXIP1-Anreicherung im Vergleich zum EBNA2-wt-Immunpräzipitat nachgewiesen werden.....	112
Abbildung 33: PLK1 interagiert mit EBNA2-wt und -N-terminalen Mutanten.	114
Abbildung 34: Modell zur Zielgenregulation durch EBNA2.....	119
Abbildung 35: Schematische Darstellung der Sekundärstruktur der N-terminalen Domäne von EBNA2.	127
Abbildung 36: Proteinsequenz des EBNA2.....	134

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Expressionsprogramme in der Latenz nach Amoroso et al. und Longnecker et al. (Amoroso, Fitzsimmons et al. 2011, Longnecker, Kieff et al. 2013).....	4
Tabelle 2: Lymphome und EBV-Assoziation (Gandhi, Tellam et al. 2004, Castillo, Beltran et al. 2011, Ok, Li et al. 2015).....	5
Tabelle 3: Übersicht Zelllinien und Expressionssysteme.....	30
Tabelle 4: PCR-Programm der Taq-Polymerase.....	32
Tabelle 5: Das qPCR-Programm	36
Tabelle 6: qPCR-Programm für die Quantifizierung von microRNA-cDNA.....	40
Tabelle 7: Übersicht EBNA2-Mutanten: Dimerisierung und Aktivierung von Zielgenen.....	102
Tabelle 8: Ergebnisse der <i>label-free LC-MS/MS</i> -Analyse: Gezeigt sind alle Proteine, die im EBNA2-wt-Immunpräzipitat im Vergleich zum Kontroll-Immunpräzipitat mind. 1,5-fach angereichert sind ($p\text{-Wert} \leq 0,05$).....	106
Tabelle 9: Potentielle END-Domänen Interaktionspartner: Signifikant geringere Anreicherung im EBNA2-H15A Immunpräzipitat ($p\text{-Wert} \leq 0,05$)	109
Tabelle 10: Potentielle END-Domänen Interaktionspartner: Signifikant geringere Anreicherung im EBNA2- $\Delta\alpha 1$ Immunpräzipitat ($p\text{-Wert} \leq 0,05$)	110
Tabelle 11: potentielle microRNA-vermittelte EBNA2-reprimierte Zielgene	126
Tabelle 12: 99 mindestens 4-fach signifikant EBNA2-regulierte Zielgene	140
Tabelle 13: 132 mindestens 2-fach signifikant EBNA2-regulierte Zielgene in CBF1-neg. Zellen	143
Tabelle 14: 21 mindestens 4-fach signifikant EBNA2-regulierte Zielgene in CBF1-neg. Zellen	147
Tabelle 15: Zielgene, die in SM295 und in SM296 ^{CBF1-neg.} oder nur in der CBF1-neg. Zelllinie SM296 ^{CBF1 neg.} durch EBNA2 aktiviert werden.	148
Tabelle 16: Zielgene, die in SM295 und in SM296 ^{CBF1-neg.} oder nur in der CBF1-neg. Zelllinie SM296 ^{CBF1 neg.} durch EBNA2 reprimiert werden.	149
Tabelle 17: mindestens 4-fach signifikant CBF1-regulierte Zielgene in DG75-Zellen.....	150
Tabelle 18: mindestens 2-fach signifikant CBF1-reprimierte Transkripte in DG75-Zellen.....	152
Tabelle 19: mindestens 1,5-fach signifikant EBNA2-regulierte microRNAs.....	154
Tabelle 20: Ergebnisse der <i>label-free LC-MS/MS</i> -Analyse - EBNA2-H15A IP:.....	156
Tabelle 21: Ergebnisse der <i>label-free LC-MS/MS</i> -Analyse - EBNA2- $\Delta\alpha 1$ -IP:.....	158
Tabelle 22: Expressionsdaten der 24 <i>GeneChip® Human Gene 2.0 ST Arrays</i>	160
Tabelle 23: Daten zu Abbildung 6A	160
Tabelle 24: Daten zu den Transkripten, die in SM295 Zellen mind. 2-fach reguliert sind.....	160
Tabelle 25: Daten zu den Transkripten die in DG75 mind. 2-fach durch CBF1 reguliert sind.	160
Tabelle 26: Daten zu den Transkripten, die in SM295 mind. 2-fach durch CBF1 reguliert sind.	160
Tabelle 27: Daten zu den massenspektrometrischen Analysen	160

Zusammenfassung

Das Epstein-Barr-Virus (EBV) ist ein humanes Herpesvirus. Etwa 95 % der Weltbevölkerung sind im Erwachsenenalter latent mit EBV infiziert. Das Virus kann B-Lymphozyten infizieren und *in vitro* zu stark proliferierenden Zellen transformieren. Diese Beobachtung führte zu der Klassifizierung des „Tumovirus“ EBV. Das Virus wird mit der Entstehung vieler Lymphome assoziiert.

Das zentrale Protein dieser Promotionsarbeit ist das Epstein-Barr-Virus nukleäre Antigen 2 (EBNA2), ein essentielles Protein für die Transformationsfähigkeit des EBV. Dieses Protein wird während der Latenzphase des Virus in humanen B-Zellen exprimiert. EBNA2 nimmt durch seine Funktion als Transkriptionsfaktor starken Einfluss auf das Expressionsprofil einer Zelle.

Die Ergebnisse des ersten Teils dieser Arbeit zeigen den Einfluss des EBNA2 auf das Expressionsprofil humaner B-Zellen. Ein wichtiger Faktor bei der Transkriptionsregulation durch EBNA2 ist das zelluläre Protein CBF1, das als DNA-bindendes Protein EBNA2 an die DNA rekrutieren kann. CBF1 ist bisher der einzige unumstrittene „DNA-Adapter“ für EBNA2 in humanen B-Zellen. Ein Hinweis darauf, dass noch weitere DNA-Bindeproteine im EBNA2-Transkriptionskomplex vorhanden sein müssen, liefern die Ergebnisse der genomweiten Expressionsstudien dieser Arbeit. Es konnte erstmalig gezeigt und bestätigt werden, dass in CBF1-negativen Zellen die Transkription zellulärer Gene durch EBNA2 signifikant aktiviert oder reprimiert werden kann. Zusätzlich konnten anhand einer genomweiten vergleichenden Expressionsanalyse von CBF1-negativen mit CBF1-positiven B-Zellen auch CBF1-reprimierte Gene identifiziert werden.

Der zweite Teil dieser Arbeit befasst sich mit einer Domäne des EBNA2-Proteins. In Kollaboration mit der AG Sattler (Helmholtz Zentrum München) konnte erstmals die NMR-Struktur dieser Domäne gelöst werden, die daraufhin EBNA2-N-terminale Dimerisierungs-Domäne (**END**-Domäne) genannt wurde. Die END-Domäne ist essentiell für die Funktion des EBNA2. Sie ist nur als Dimer stabil und weist eine bisher einzigartige Struktur auf. Mutationsstudien haben gezeigt, dass der Austausch einer Aminosäure (Histidin 15) oder die Deletion einer kurzen alpha-Helix zum Funktionsverlust des EBNA2 als Transkriptionsfaktor führen. Möglicherweise wird in diesen Bereichen die Interaktion mit anderen, für die Transkriptionsaktivierung von EBNA2-Zielgenen wichtigen, regulatorischen Faktoren vermittelt. Zur Identifikation dieser Faktoren wurden vergleichende massenspektrometrische Analysen nach Immunpräzipitation mit EBNA2-wt oder END-Domänen-Mutanten durchgeführt.

In der Folge konnten zwei interessante, bisher noch nicht beschriebene EBNA2-Interaktionspartner in weiteren Koimmunpräzipitationsversuchen bestätigt werden: EBNA2 interagiert in humanen B-Zellen direkt oder indirekt mit dem *pax transactivation-domain interacting protein* (PAXIP1) und der *polo-like Kinase 1* (PLK1).

I. Einleitung

1. Das Epstein-Barr Virus

1.1. Burkitt-Lymphom und Epstein-Barr-Virus

Das Epstein-Barr-Virus (EBV) wurde vor 50 Jahren als erstes „Tumovirus“ entdeckt (Epstein, Achong et al. 1964). Epstein und Kollegen fanden das Virus in Zellkulturen, die ausgehend von Burkitt-Lymphomen äquatorialafrikanischer Kinder etabliert wurden. Diese endemische Form des Burkitt-Lymphoms, die sich hauptsächlich im Kiefer und Abdomen der Patienten manifestierte und in Äquatorialafrika stark verbreitet war, wurde 1958 von dem irischen Chirurg Denis Burkitt erstmals genauer beschrieben (Burkitt 1958). Unter anderem beobachtete Burkitt, dass dieses Lymphom nur in der tropischen, feuchten Klimazone auftrat und die gleiche Verbreitung wie die chronische Form der Malaria aufwies (Burkitt 1962, Burkitt 1962). Dieses gleichzeitige Auftreten von Malaria und dem Lymphom legte die Vermutung nahe, dass ein von Moskitos übertragener Erreger für den Tumor verantwortlich sein müsste, was sich nicht bewahrheitete, aber zur Entdeckung des EBV führte.

Erst einige Jahre später wurde ein wichtiger Faktor entdeckt, der zur Pathogenese des Burkitt-Lymphoms entscheidend beiträgt: die Translokation des *MYC*-Genes zum Genort der schweren oder der leichten Kette des Immunglobulins M (*IgM*) auf Chromosom 14 (t(14:8)). Diese Translokationen führen zur konstitutiven Expression von *MYC* (Manolov and Manolova 1972, Klein 1983). Das *MYC*-Protein aktiviert eine Vielzahl an Genen, die an Zellproliferation und Zellzyklusregulation beteiligt sind.

Eine weitere Entdeckung festigte die Assoziation des EBV mit Tumoren: 2 Arbeitsgruppen fanden unabhängig voneinander, dass EBV primäre B-Zellen *in vitro* zu kontinuierlich proliferierenden, latent infizierten Lymphoblasten (LCL) transformieren kann (Henle, Diehl et al. 1967, Pope, Horne et al. 1968).

Die Ergebnisse dieser Doktorarbeit stammen aus Versuchen mit EBV-negativen (DG75) und EBV-positiven (Eli-BL) Burkitt-Lymphom B-Zelllinien. Im Mittelpunkt steht das Epstein-Barr Virus nukleäre Antigen 2 (EBNA2). In unterschiedlichen experimentellen Ansätzen wurden nach transienter Expression des EBNA2 im zellulären Hintergrund dieser beiden Burkitt-Lymphom-Zelllinien neue Einblicke in die Funktion des EBNA2-Proteins gewonnen.

1.2. Virusinfektionen gehören zu den Hauptrisikofaktoren für Krebserkrankungen

Das Epstein-Barr-Virus ist nur eines unter mehreren Tumoviren. Die *International Agency for research on cancer* klassifizierte 11 biologische Agenzien als humane Karzinogene. Dies sind EBV, Hepatitis B und Hepatitis C Virus (HBV und HCV), humanes Herpesvirus 8 (oder KSHV für *kaposi sarcoma herpes virus*), humanes Immundefizienzvirus (HIV), humanes Papillomvirus (HPV), humanes T-Zell-lymotropisches Virus (HTLV), ein Bakterium und 3 Saugwürmerarten

(Bouvard, Baan et al. 2009). Die genannten Viren können Auslöser einer großen Bandbreite an Tumoren sein, von Burkitt-Lymphom, Hodgkin-Lymphom oder Nasopharynx-Karzinom (EBV, HIV), über Leberzellkarzinom (HBV und HCV) bis hin zu Gebärmutterhalskrebs oder T-Zell-Leukämie (HPV und HTLV), um nur einige Beispiele zu nennen (Oh and Weiderpass 2014).

1.3. Das γ -Herpesvirus EBV: taxonomische Einteilung, Aufbau und Übertragungsweg

EBV oder Humanes Herpesvirus 4 (HHV4) wurde ursprünglich wegen seiner biologischen Eigenschaften in die Unterfamilie der γ -Herpesviren eingeordnet. Diese biologischen Eigenschaften sind unter anderen die Tumorassoziation des Virus, das eingeschränkte Wirtsspektrum, der Erhalt des Episoms bei der Zellteilung und die Fähigkeit nach einer Infektion teilungsfähige, latent infizierte Lymphozyten-Kulturen zu etablieren. Nach neueren Klassifizierungsstrategien wird EBV immer noch den γ -Herpesviren zugeordnet, die Einteilung wird aber anhand von Sequenzhomologien vorgenommen. Zu den γ -Herpesviren werden heute Lymphokryptoviren (EBV und andere Affen-Herpesviren), Rhadinoviren (z.B. KSHV und Herpesvirus saimiri), Macaviren und Percaviren gezählt (Longnecker, Kieff et al. 2013).

Im Elektronenmikroskop kann man behüllte Epstein-Barr-Virionen erkennen. Epstein-Barr Virionen besitzen eine einfache Membranhülle mit Glykoproteinen an der Oberfläche (Young and Rickinson 2004). Auf diese Membranhülle folgt das Tegument und im Inneren das aus Proteinen aufgebaute Kapsid, das die lineare, doppelsträngige Virus-DNA von ca. 172 kb enthält (Longnecker, Kieff et al. 2013).

Die Übertragung des EBV erfolgt über eine Tröpfcheninfektion, in den meisten Fällen ist dies der Speichel. Die Erstinfektion findet am häufigsten zwischen dem 2. und 4. Lebensjahr oder im Jugendalter statt (Longnecker, Kieff et al. 2013). In der frühen Kindheit verläuft die Erstinfektion meist symptomlos, bei späteren Infektionen entwickelt ca. die Hälfte der Jugendlichen eine infektiöse Mononukleose (Pfeiffersches Drüsenfieber). Aufgrund des Übertragungsweges über den Speichel wird Pfeiffersches Drüsenfieber auch „Kissing Disease“ genannt. Im Erwachsenenalter sind über 90 % der Weltbevölkerung EBV-positiv, da das Virus eine latente Phase in B-Gedächtniszellen entwickelt, die lebenslang aufrechterhalten wird (Thorley-Lawson 2001).

1.4. Der Lebenszyklus des EBV und assoziierte Krankheiten

Viele Menschen kennen die typischen Merkmale der Herpesviren: Wenn man sie einmal hat, bekommt man sie nicht mehr los und von Zeit zu Zeit brechen sie aus. Bekannt ist das besonders von Herpes-Simplex-Viren und den Lippenbläschen, die man bei deren Reaktivierung, z.B. in stressigen Lebenslagen, bekommt. Auch EBV hat, wie bereits erwähnt, eine latente und eine lytische Phase. Die lytische Phase dient der Verbreitung des Virus, die latente Phase ist die persistierende Phase, bei der das Virus die meiste Zeit unbemerkt vom Immunsystem im Wirt überdauert, im Fall des EBV aber auch erhebliche Probleme verursachen kann.

Für die symptomlose Ausbildung der latenten Infektion bei Kleinkindern wird vermutet, dass die Epstein-Barr-Virionen zunächst über den Speichel in Epithelzellen im Rachenraum eindringen. Von dort aus wandern sie zu naiven B-Zellen, z.B. in den Mandeln und befallen diese. Nach der Infektion wird zunächst das gesamte Latenzprogramm exprimiert, also 6 EBV nukleäre Antigene (EBNALP, EBNA1, -2 -3A, -3B, -3C) 3 Membranproteine (LMP1, LMP2A und LMP2B), microRNAs des BART-Clusters (*BamHIA rightward transcripts*) und die BHRF1 microRNAs (Amoroso, Fitzsimmons et al. 2011) sowie 2 kurze, nicht polyadenylierten Transkripte, EBER 1 und EBER 2 (*EBV encoded RNAs*) (Longnecker, Kieff et al. 2013). Durch dieses, als *growth program* oder Latenz III bezeichnete Transkriptionsprogramm (siehe auch **Tabelle 1**), wird die Proliferation der naiven B-Zellen angeregt. Die meisten dieser infizierten, proliferierenden B-Zellen werden durch zytotoxische T-Zellen erkannt und eliminiert. Einige entkommen dieser Immunantwort und bilden, der B-Zellbiologie folgend, Keimzentren indem sie sich zu Zentroblasten und Zentrozyten entwickeln. In EBV-infizierten B-Zellen kommt das Überlebenssignal in den Keimzentren nicht von T-Helferzellen und Dendritischen Zellen, sondern von den viralen latenten Membranproteinen LMP1 und LMP2A (Thorley-Lawson 2001). Mithilfe dieses Überlebenssignals entwickeln sich die EBV-infizierten B-Zellen in Keimzentren zu B-Gedächtniszellen und bilden das Latenzreservoir des Virus im peripheren Blut.

Während der einzelnen Phasen, die EBV-infizierte B-Zellen auf dem Weg bis zu den B-Gedächtniszellen durchlaufen, werden unterschiedliche Kombinationen von latenten Proteinen exprimiert. Wie bereits erwähnt, wird direkt nach der Infektion das komplette Latenzprogramm exprimiert (Latenz III). Im Keimzentrum wird nur noch LMP1, LMP2A und EBNA1 exprimiert (Latenz II). In den B-Gedächtniszellen wird kurzzeitig, wenn sie sich teilen, EBNA1 exprimiert (Latenz 0; **Tabelle 1**) (Kuppers 2003, Hochberg, Middeldorp et al. 2004). Die unterschiedlichen viralen Transkriptionsprogramme findet man auch in Zelllinien, die ausgehend von Tumoren etabliert wurden. Eine Übersicht häufiger Lymphome und die von diesen exprimierte Transkriptionsprogramme zeigt **Tabelle 2**.

B-Gedächtniszellen können spontan lytisch reaktiviert werden und neue Viruspartikel bilden. Diese spontane lytische Reaktivierung des EBV geschieht sporadisch und ist in gesunden, latent infizierten Individuen unterschiedlich stark ausgeprägt (Yao, Rickinson et al. 1985). Die sporadische Neubildung von Viruspartikeln trägt zur Aufrechterhaltung der Latenz des Virus bei und dient der Verbreitung des Virus.

Eine EBV-Infektion im Jugend- oder Erwachsenenalter manifestiert sich bei ca. der Hälfte der Patienten als Pfeiffersches Drüsenfieber. Die Symptome dieser Krankheit sind häufig Halsschmerzen, Fieber und stark geschwollene Lymphknoten, hervorgerufen durch eine massive zytotoxische T-Zellantwort von CD8⁺-T-Zellen gegen Proteine der lytischen und latenten Phase. Warum diese Reaktion bei der Erstinfektion von Kleinkindern nur sehr selten hervorgerufen wird, ist noch unbekannt (Hislop, Taylor et al. 2007).

Weitere Erkrankungen, die mit EBV in Verbindung gebracht werden sind T- und NK-Zelllymphome und einige Tumoren epithelialen Ursprungs, die Magen- und Nasen-Rachen-Karzinome. Bis zu 10 % der untersuchten Adenokarzinome im Magen sind EBV-positiv, bei den Karzinomen des Nasen-Rachen-Raumes (Nasopharynxkarzinome) sind es für manche Formen sogar über 95 % (Maeda, Akahane et al. 2009).

Tabelle 1: Expressionsprogramme in der Latenz nach Amoroso et al. und Longnecker et al. (Amoroso, Fitzsimmons et al. 2011, Longnecker, Kieff et al. 2013)

Latenz-programm	BARTs	BHRF1	EBERs	EBNA1	EBNA2	EBNA3	EBNA-LP	LMP1	LMP2
0	?	?	+	- ^a	-	-	-	-	-
I	+	-	+	+	-	-	-	-	-
II	+	-	+	+	-	-	-	+	+
III	+	+	+	+	+	+	+	+	+

^a EBNA1 wird nur in einem kurzen Zeitfenster exprimiert, wenn sich die Zelle teilt

1.4.1. PTLD und DLBCL

Posttransplant lymphoproliferative disorder (PTLD) und *diffuse large B-cell lymphoma* (DLBCL) sind Erkrankungen, die stark mit einer EBV-Infektion assoziiert sind. Interessanterweise wird in EBV-positiven PTLD- und DLBCL-Zellen das Latenzprogramm III exprimiert und somit spielt bei diesen Erkrankungen EBNA2 wahrscheinlich eine wichtige Rolle.

1.4.1.1. PTLD

Posttransplant-Lymphome sind lymphoproliferative Erkrankungen verschiedenster Ausprägung. Das Spektrum reicht von benignen lymphoproliferativen Erkrankungen bis zu malignen Lymphomen. Auch DLBCL ist eine Ausprägungsform der posttransplant-Lymphome. Die Ätiologie des posttransplant-Lymphomes ist bis auf eine starke Assoziation mit einer EBV-Infektion noch kaum bekannt. Ein entscheidender Risikofaktor für die Entstehung von PTLD ist die Behandlung der Patienten mit Immunsuppressiva nach einer Transplantation. 2-10 % der Patienten entwickeln in Folge einer Organtransplantation oder einer hämatopoietischen Stammzelltransplantation eine Form der posttransplant-Lymphome. 60 - 80 % der Fälle sind mit EBV-assoziiert. Bei den EBV-negativen Fällen vermutet man, dass andere Virusinfektionen, wie z.B. humanes Herpesvirus 8 (HHV8) oder Cytomegalovirus bei der Lymphomentstehung mitwirken (Morscio, Dierickx et al. 2013).

Der pathogene und onkogene Einfluss des EBV wird durch die Latenzproteine und -transkripte vermittelt. EBV-positive PTLD-Zellen exprimieren das *growth program* (oder Latenz III, siehe **Tabelle 1**). Bei immunsupprimierten Patienten fehlen zytotoxische T-Lymphozyten, welche EBV-infizierte Lymphoblasten erkennen und eliminieren können. Die Expression des *growth programs* dieser Zellen kann zur Entstehung von posttransplant Lymphomen führen (Morscio, Dierickx et al. 2013).

1.4.1.2. DLBCL

Das diffuse, großzellige B-Zelllymphom (DLBCL) gehört zu den häufigsten malignen hämatopoietischen Erkrankungen (Smith, Howell et al. 2011). Eine Art des DLBCL ist das EBV-positive DLBCL, das gehäuft bei älteren Personen auftritt. Die Definition der WHO (*World Health Organization*) für diese Art von Lymphomen wurde 2008 festgelegt als ein EBV-positives, monoklonales, großzelliges B-Zelllymphom, das bei immunkompetenten Patienten über 50 Jahre auftritt (*WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*). Es gibt zwei Subtypen des DLBCL, das „aktivierte B-Zellen-DLBCL“ (ABC-Subtyp) und das „Keimzentrum-DLBCL“ (GCB-Subtyp). In DLBCL-Proben findet man vorwiegend die Expression des EBV-*growth programs* (Latenz III) und einen stark aktivierten NFκB-Signalweg. Das DLBCL besitzt viele Gemeinsamkeiten mit PTLD. Tatsächlich ist das geschwächte Immunsystem der Patienten im fortgeschrittenen Alter (Immunseneszenz) vermutlich eine Ursache für die Entstehung des DLBCL (Ok, Papathomas et al. 2013).

Tabelle 2: Lymphome und EBV-Assoziation (Gandhi, Tellam et al. 2004, Castillo, Beltran et al. 2011, Ok, Li et al. 2015)

Lymphom	Unterteilung/Beschreibung/Vorkommen	EBV-Assoziation (%)	Latenz-Programm ^b
Burkitt-Lymphom	endemisch	98	I
	sporadisch	15 - 20	
Hodgkin-Lymphom	Nordamerika, Brasilien, Taiwan, Arabische Emirate, Westeuropa	30 - 50	II
	Entwicklungsländer	>90	
Post-Transplant-Lymphom	1 Jahr nach Transplantation	73 - 100	III
	5 Jahre nach Transplantation	34 - 80	
AIDS-assoziierte-Lymphome	DLBCL ^a	80	II oder III
	Hodgkin-Lymphom	>95	II
	ZNS-Lymphom	100	III
	Burkitt-Lymphom	30 - 40	I
	Primäres Effusionslymphom	70-100	II
DLBCL ^a	Asien und Lateinamerika	9 - 15	II oder III
	westliche Welt	<5	
	im Alter	100	
NK/T-Zell-Lymphome		100	II
lymphomatoide Granulomatose		100	II oder III

^a DLBCL = *diffuse large b cell lymphoma*;

^b siehe **Tabelle 1**

1.5. Proteine und Transkripte in der Latenzphase

Nach einer EBV-Infektion wird *in vitro* und *in vivo* zunächst das volle Transkriptionsprogramm der Latenzphase exprimiert (Latenz III), das die kontinuierliche Proliferation der Zellen steuert. *In vitro* bleibt dieses Expressionsprogramm in den infizierten B-Zellen (LCLs = *Lymphoblastoid cell line*) erhalten, *in vivo* wird es im gesunden Wirt allmählich abgeschaltet, damit das Virus nicht mehr vom Immunsystem erkannt werden kann. Wie unter **1.4** bereits kurz beschrieben durchwandern EBV-infizierte Zellen im Wirt verschiedene Latenzphasen. In **Tabelle 1** sind diese Latenzphasen und die dabei exprimierten Proteine und Transkripte zusammengefasst.

LCLs dienen als Modellsystem für den Transformationsprozess primärer B-Zellen. Auch in manchen Gewebeproben verschiedener Tumoren findet man alle Proteine und Transkripte der Latenz III (**Tabelle 2**). Die folgenden Absätze geben einen kurzen Überblick über die wichtigsten Funktionen der Proteine und Transkripte der Latenzphase.

EBNA1 wird in allen Latenzphasen exprimiert, da es essentiell für die Erhaltung des EBV-Episoms bei der Zellteilung ist. Es bindet an den *origin of replication* (oriP) und ist maßgeblich an der Replikation und Segregation des Virusgenoms beteiligt (Saha and Robertson 2011).

EBNA2 ist der zentrale Transaktivator der Latenz III. Da es keine eigene DNA-Bindedomäne besitzt, muss es über andere Proteine, z.B. CBF1, an die DNA rekrutiert werden. Da EBNA2 auch das zentrale Protein dieser Doktorarbeit ist, wird es im nächsten Kapitel ausführlicher vorgestellt.

Die **EBNA3**-Proteine werden als Transkriptionsrepressoren beschrieben. Da sie auch mit CBF1 interagieren fungieren sie z.T. als Gegenspieler zu EBNA2. Des Weiteren spielen die EBNA3-Proteine eine wichtige Rolle bei der Immortalisierung von B-Zellen, da sie bei der Regulation des Zellzyklus beteiligt sind und die Expression von Tumorsuppressoren durch epigenetische Modifikationen verhindern können (Kempkes and Robertson 2015).

EBNA-LP oder **EBNA5** gilt als Koaktivator für EBNA2 bei der Transaktivierung viraler und zellulärer Zielgene. Zusätzlich ist es am Übergang von G0 nach G1 nach der Infektion durch Interaktion mit Tumorsuppressoren und Proteinkinasen involviert (Kempkes and Ling 2015).

LMP1, ein Transmembranprotein, wird als funktionelles Homolog des zellulären Oberflächenrezeptors CD40 gesehen und verstärkt das Zellwachstum durch Aktivierung u.a. des NFκB-Signalweges. Zudem hat LMP1 antiapoptotische Funktionen über die Transaktivierung von BCL-2 und A20. Die **LMP2**-Proteine sind auch Transmembranproteine. Sie sind beteiligt an der Blockierung des B-Zellrezeptor (BCR)-Signalweges und an der Aufrechterhaltung der Latenzphase (Saha and Robertson 2011).

Die nicht polyadenylierten **EBER** Transkripte sind an der Regulation der Wirtsimmunantwort beteiligt, z.B. durch Induktion von Zytokinen (Saha and Robertson 2011).

Zielsequenzen der **BARTs** (*BamHIA rightward transcripts*) findet man hauptsächlich im 3'UTR (*untranslated region*) von zellulären Genen. Die BARTs tragen dazu bei, dass das Virus in der Latenzphase persistieren kann. Viele BARTs sind an der Regulation zellulärer Gene des p53-Signalweges, der B-Zellaktivierung und der Apoptose beteiligt (Skalsky, Corcoran et al. 2012).

2. Transkriptionsregulation durch EBNA2

2.1. Funktionell charakterisierte Regionen von EBNA2

Der EBNA2-ORF (*open reading frame*) des Typ 1 EBV-Stammes B95-8 kodiert für 487 Aminosäuren (AS). Das Migrationsverhalten in der SDS-PAGE zeigt es ein Molekulargewicht von 84 kDa (Grasser, Haiss et al. 1991). An chemischen Modifikationen weist EBNA2 hauptsächlich Phosphorylierungen auf, die Zellzyklus-abhängig variieren (Yue, Davenport et al. 2004). Außerdem sind einige Bereiche des Proteins innerhalb der Lymphokryptoviren stark konserviert. Aligniert man die Sequenzen der Typ 1 und Typ 2 EBV-Stämme zusammen mit den Pavian- und Makaken-Lymphokryptoviren, so erkennt man 9 besonders gut konservierte Bereiche, sogenannte „*conserved regions*“ (CRs). In **Abbildung 1** sind die Positionen dieser konservierten Bereiche über das gesamte EBNA2-Protein gezeigt (Peng, Gordadze et al. 2000).

EBNA2 besitzt wichtige funktionelle Domänen eines Transkriptionsfaktors. Über Promotor-Reporterstudien mit Gal4-DNA-Bindedomäne-Fusionsproteinen und Mutationsanalysen konnten zwei Transaktivierungsdomänen identifiziert werden, eine N-terminale im Bereich der CR1 und CR2 und eine C-terminale um die CR8 (Cohen and Kieff 1991, Cohen, Wang et al. 1991). Die N-terminale Aktivierungsdomäne scheint eine besondere Funktion bei der Aktivierung des *LMP1*-Promotors inne zu haben (Gordadze, Onunwor et al. 2004). Des Weiteren gibt es zwei Kernlokalisierungssignale, eines in der CR9-Region und eines vor der C-terminalen Transaktivierungsdomäne. Der Bereich, der mit dem DNA-bindenden Protein CBF1 interagieren kann, beinhaltet die konservierten Regionen CR5 und CR6 (Cohen, Wang et al. 1991, Ling, Rawlins et al. 1993, Grossman, Johannsen et al. 1994, Henkel, Ling et al. 1994, Zimmer-Strobl, Strobl et al. 1994). CR1 und CR2 sind zusätzlich zu ihrer Transaktivierungsfunktion, zusammen mit einer CR3 und CR4 umfassenden Domäne, an der Ausbildung von Homodimeren oder Oligomeren beteiligt (Tsui and Schubach 1994, Yalamanchili, Harada et al. 1996, Harada, Yalamanchili et al. 2001).

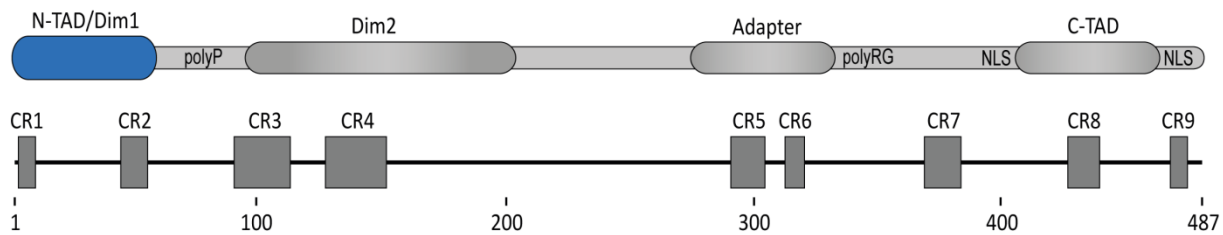


Abbildung 1: Konservierte Regionen des EBNA2-Proteins.

Dargestellt sind die Positionen der konservierten Regionen 1 bis 9 des EBNA2-Proteins (CR1-9) und eine Übersicht der funktionellen Domänen. N-TAD/Dim1 = N-terminale Transaktivierungs- und Dimerisierungsdomäne 1; polyP = Prolinreiche Region; Dim2 = Dimerisierungsdomäne 2; Adapter = Bereich, der mit CBF1 interagiert; polyRG = Arginin- und Glyzinreiche Region; NLS = Kernlokalisierungssignal; C-TAD = C-terminale Transaktivierungsdomäne.

2.2. CBF1-vermittelte Transkriptionsregulation

CBF1 (*C-promoter binding factor*) ist spezieübergreifend stark konserviert und wird in *Drosophila melanogaster* mit Su(H) bezeichnet, in *Caenorhabditis elegans* mit Lag1 und in Mäusen mit RBPJ (*recombination binding protein-J*). Als Vermittler der Interaktion von EBNA2 mit der DNA ist CBF1 mehrfach beschrieben worden (Grossman, Johannsen et al. 1994, Henkel, Ling et al. 1994, Waltzer, Logeat et al. 1994, Zimmer-Strobl, Strobl et al. 1994). Auch eine direkte Interaktion von EBNA2 mit CBF1 konnte eindeutig nachgewiesen werden (Hsieh and Hayward 1995).

Die Analyse der EBNA2-Transaktivierung einzelner viraler und zellulärer Zielgene zeigte, dass eine intakte CBF1-Bindestelle in den untersuchten Promotoren ein essentielles, funktionelles Element ist (Zimmer-Strobl, Suentzenich et al. 1991, Ling, Rawlins et al. 1993, Zimmer-Strobl, Kremmer et al. 1993, Grossman, Johannsen et al. 1994, Henkel, Ling et al. 1994, Laux, Dugrillon et al. 1994, Waltzer, Logeat et al. 1994, Zimmer-Strobl, Strobl et al. 1994). Oligonukleotid-Anreicherungsversuche (Blackwell and Weintraub 1990), EMSAs (*electrophoretic mobility shift assays*) und Strukturanalysen des CBF1-Proteins gebunden an den *Hes1*-Promotor, führten zu dem Ergebnis, dass CBF1 bevorzugt an die Sequenz G/CTGG/AGAA bindet (Tun, Hamaguchi et al. 1994, Kovall and Hendrickson 2004).

CBF1 wurde ursprünglich über eine 10-Nukleotid-Bindesequenz des adenoviralen Promotors pIX aufgereinigt und anhand Infektions- und Transfektionsversuchen und *in vitro* Transkriptionsversuchen als Repressor beschrieben (Dou, Zeng et al. 1994). Durch die Assoziation mit einem Korepressor-Komplex, der aus verschiedenen Kombinationen der Proteine SMRT, NCoR, HDAC1/2, Sin3A, SAP30, CIR, SKIP und CtIP/ CtBP bestehen kann, ist DNA-gebundenes CBF1 in der Lage, die Transkription zu reprimieren (Lai 2002, Oswald, Winkler et al. 2005).

Die repressorische Domäne des CBF1 umfasst Exon 6 bis Exon 9 (AS 179 bis 361). Es konnte gezeigt werden, dass EBNA2 auch in dieser Region mit CBF1 interagiert (Hsieh and Hayward

1995). Die Interaktion von EBNA2 mit CBF1 verhindert demnach eine Interaktion der Korepressoren mit CBF1. Im ursprünglichen Modell der EBNA2-Zielgenaktivierung ist CBF1 zunächst zusammen mit Korepressoren statisch an seine Zielsequenz gebunden. Sobald EBNA2 in der Zelle exprimiert wird, werden die Korepressoren verdrängt und die Transkription kann aktiviert werden (**Abbildung 2**).

Eine entscheidende Rolle spielt CBF1 beim Notch-Signalweg, da es auch das DNA-Adapterprotein des intrazellulären Fragmentes von Notch (Notch-IC) ist. Nach Aktivierung des Notch-Rezeptors wird das intrazelluläre Fragment abgespalten, durch Interaktion mit CBF1 an die DNA rekrutiert und ist dort an der Transkriptionsregulation einer großen Anzahl von Zielgenen beteiligt. Einige wenige Notch-IC-regulierte Gene findet man bei den EBNA2-Zielgenen wieder (Zimmer-Strobl and Strobl 2001). Für einige Notch-IC-Zielgene konnte zudem gezeigt werden, dass sie durch CBF1 reprimiert werden können (Borggreve and Oswald 2009).

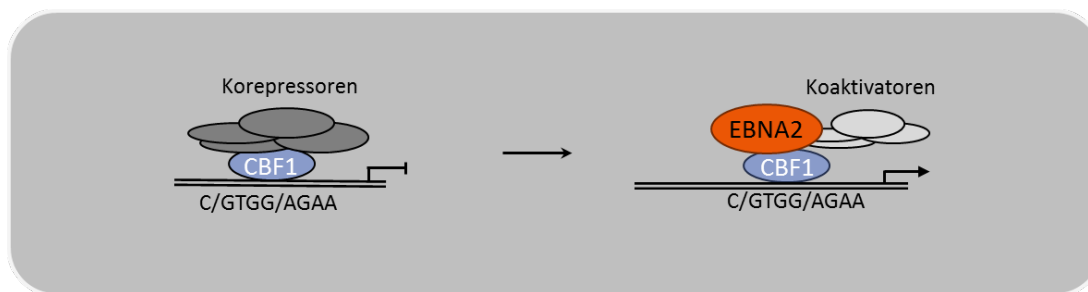


Abbildung 2: Modell der Zielgenaktivierung durch EBNA2.

CBF1 kann in der Zelle Korepressoren rekrutieren und die Transkription von Zielgenen reprimieren. Sobald EBNA2 in der Zelle exprimiert wird, kann EBNA2 mit dem Korepressor-Komplex in Konkurrenz treten und zusammen mit anderen Transkriptionsfaktoren aktivierend wirken (Hsieh and Hayward 1995).

2.3. Genomweite Bindestellen von EBNA2 und CBF1

Mittlerweile weiß man aus Chromatinimmunpräzitationsversuchen mit anschließender Sequenzierung der präzipitierten DNA (ChIP-seq), dass die meisten EBNA2-Bindestellen im Genom auch eine CBF1-Bindestelle aufweisen. Eine ChIP-seq Studie von Zhao und Kollegen zeigte, dass in einem 100 bp Fenster um EBNA2 -Bindestellen neben CBF1 gehäuft auch PU.1 und weitere Transkriptionsfaktoren wie EBF und RelA (Untereinheit von NFκB) an Chromatin binden. Die EBNA2-Bindestellen, die in dieser Studie gefunden wurden überlappen in LCLs zu 72 % mit CBF1-Bindestellen, zu 54 % mit EBF-Bindestellen, zu 31 % mit RelA-Bindestellen und zu 17 % mit PU.1-Bindestellen (Zhao, Zou et al. 2011). Außerdem wurde in dieser Studie gezeigt, dass nur 14 % aller gefundenen EBNA2-Bindestellen in einem Bereich von +/- 2 kb eines Transkriptionsstarts liegen. Der Großteil der EBNA2-Bindestellen liegt in sog. *enhancer*-Bereichen. *Enhancer* sind Abschnitte im Genom, die sich durch Anhäufung der Histonmodifikation H3K4me1 und H3K27ac auszeichnen (Heintzman, Hon et al. 2009, Creighton, Cheng et al. 2010). Am *enhancer* gebundene, regulatorische Faktoren können in cis oder trans zu Promotoren rekrutiert werden. Diese Interaktion von *enhancer*-Bereichen

mit Promotoren führt zur Bildung von Chromatinschleifen. Zhao und Kollegen führten ein 3C (*chromatin conformation capture*)-Experiment mit anschließender Sequenzierung in LCLs durch. Mit Hilfe dieses Datensatzes analysierten sie die genomweiten Kontaktstellen der Promotoren von 81 EBNA2-regulierten Genen. Pro EBNA2-reguliertem Gen konnten sie durchschnittlich 3,3 unterschiedliche „long-range“-Interaktionen (90 % der Interaktionsstellen waren mehr als 150 kb voneinander entfernt) nachweisen (Zhao, Zou et al. 2011).

2.4. EBNA2-regulierte Transkripte

2.4.1. Der Einfluss von EBNA2 auf die Expression proteinkodierender Transkripte

Bei EBNA2-Zielgenanalysen muss man beachten, dass EBNA2 unter anderem die Transkription des viralen *LMP1* und des zellulären *MYC* aktiviert (Abbot, Rowe et al. 1990, Fahraeus, Jansson et al. 1990, Ghosh and Kieff 1990, Wang, Tsang et al. 1990, Kaiser, Laux et al. 1999). *LMP1* kann den NFκB-Signalweg aktivieren und beeinflusst dadurch das Expressionsprofil einer Zelle (Ersing, Bernhardt et al. 2013). *MYC* ist ein Transkriptionsfaktor, der in den meisten Tumoren überexprimiert ist und an der Transkriptionsregulation vieler Gene beteiligt ist (Wolf, Lin et al. 2014). Durch die Aktivierung insbesondere von *LMP1* und *MYC*, aber auch anderer EBNA2-Zielgene, die sekundär die Transkription beeinflussen können, ist es sehr schwer direkte EBNA2-Zielgene zu identifizieren.

EBNA2-Zielgenstudien wurden bereits in EBV-negativen und in EBV-positiven Zelllinien durchgeführt. Um den Einfluss von EBNA2 auf die zelluläre Expression zu untersuchen, wurden EBNA2-induzierbare Systeme in EBV-negativen B-Zelllinien etabliert. Beispiele identifizierter und bestätigter EBNA2-Zielgene, deren Expression ohne den Einfluss weiterer viraler Proteine EBNA2-reguliert ist, sind *CD23*, *CD21*, *CCR7*, *Hes-1*, *bfl-1*, *FcRh5*, *ABHD6*, *CCL3*, *CCL4*, *CDK5R1*, *DNASE1L3*, *MFN1*, *RAPGEF2*, *RHOH*, *SAMSN1* und *SLAMF1* (Wang, Gregory et al. 1987, Calender, Cordier et al. 1990, Cordier, Calender et al. 1990, Burgstahler, Kempkes et al. 1995, Sakai, Taniguchi et al. 1998, Maier, Staffler et al. 2006, Mohan, Dement-Brown et al. 2006).

Eine Möglichkeit, direkte EBNA2-Zielgene zu identifizieren, ist über die Verwendung eines östrogeninduzierbaren EBNA2 gegeben. Durch die Fusion des ORF (*open reading frame*) der Hormonbindedomäne des Östrogenrezeptors mit dem ORF des EBNA2 konnte das Fusionsprotein ER/EBNA2 generiert werden. Dieses Fusionsprotein kann durch Zugabe von Östrogen zum Kulturmedium aktiviert werden. Der Vorteil dieses induzierbaren Systems liegt darin, dass keine Proteinneusynthese für die Aktivität von EBNA2 notwendig ist (Kempkes, Spitkovsky et al. 1995). Es wurden unterschiedliche Zelllinien, die dieses induzierbare ER/EBNA2 stabil exprimieren, für Zielgenstudien verwendet. Die Analyse der Expression dieser Zellen vor und nach EBNA2-Induktion und unter Zugabe eines Proteinsyntheseinhibitors ermöglichte die Unterscheidung von direkten und indirekten Zielgenen auf RNA-Niveau. Dieses System wurde in mehreren Studien verwendet und *c-MYC* und *LMP1* als direkte EBNA2-Zielgene bestätigt. Unter den direkten Zielgenen wurde in diesen Studien auch *FcRH5*, *AML-2*

und die p55 α Untereinheit der *PIK3R1* gefunden. Indirekt durch EBNA2 aktiviert sind z.B. Zellzyklus einleitende Faktoren wie Cyclin D2 und CDK4 (Kaiser, Laux et al. 1999, Spender, Cornish et al. 2001, Spender, Cornish et al. 2002, Mohan, Dement-Brown et al. 2006, Spender, Lucchesi et al. 2006).

2.4.2. EBNA2-regulierte nicht-kodierende Transkripte

2.4.2.1. EBNA2-regulierte microRNAs

Bis zur Fertigstellung dieser Arbeit war zum Thema „EBNA2-regulierte microRNAs“ nur eine Publikation veröffentlicht. In dieser Studie wird unter anderem das microRNA-Expressionslevel von EBNA2 transfizierten *diffuse large b cell lymphoma* (DLBCL)-Zellen mit nicht transfizierten DLBCL-Zellen verglichen. Ein Ergebnis dieser Studie ist, dass miR-21 durch EBNA2 aktiviert und miR-146a durch EBNA2 reprimiert wird. Die Ergebnisse wurden anhand Northern Blots in mehreren Zelllinien bestätigt (Rosato, Anastasiadou et al. 2012).

Zwei genomweite microRNA-Expressionsstudien in LCLs geben Aufschluss über die microRNA-Expressionsprofile in EBV-infizierten Zellen (Riley, Rabinowitz et al. 2012, Skalsky, Corcoran et al. 2012). Diese Datensätze sind wertvoll für Abgleiche mit EBNA2-regulierten microRNAs. In den eben erwähnten Studien wurden außerdem die *targets*, also die Zielsequenzen zellulärer und viraler microRNAs in LCLs ermittelt und genomweit die Zielgene der microRNAs beschrieben.

2.4.2.2. EBNA2-regulierte lincRNAs (*long non-coding RNAs*)

In einer Studie von 2007 wurde in einem SHORT (*Subtractive hybridization of ncRNA transcripts*)-Experiment versucht, spezifisch durch EBV-regulierte, nichtkodierende RNAs (ncRNA) zu identifizieren. Es wurden 2 Gruppen an ncRNAs (*non-coding RNAs*) aus EBV-infizierten Zellen untersucht, zum einen ncRNAs zwischen 20 und 70 Nukleotiden Länge (kleine Fraktion) und zum anderen ncRNAs zwischen 70 und 500 Nukleotiden Länge (große Fraktion). In der kleinen Fraktion wurden einige bekannte und später bestätigte virale und zelluläre microRNAs identifiziert. In der großen Fraktion wurden eine SRP RNA (SRP von *signal recognition particle*), 3 vRNAs (v von *vault*), 2 EBERs und 3 bis heute nicht annotierte RNAs gefunden (Mrazek, Kreutmayer et al. 2007). Dies sind die einzigen Daten, die bis Anfang 2016 zu potentiellen EBNA2-regulierten lincRNAs publiziert waren.

2.5. Zielsetzung des ersten Teils meiner Arbeit

Eine sehr breit angelegte Expressionsstudie mit CBF1-positiven und CBF1-negativen Zelllinien sollte zur Aufklärung der Funktion des EBNA2-Adapters CBF1 beitragen.

Es wurden die Expressionsprofile EBV-negativer DG75 Burkitt-Lymphomzellen analysiert und ein System verwendet, bei dem EBNA2 östrogenabhängig aktiv oder inaktiv in den Zellen vorliegt. Mit diesem System ist es möglich in EBV-negativen Zellen gezielt die Auswirkungen

des viralen Transkriptionsfaktors EBNA2 auf die zelluläre Genexpression und auf die Expression von nichtkodierenden RNAs zu untersuchen.

Ein wesentliches Ziel dieser Arbeit war die Beantwortung der Frage, ob es CBF1-unabhängig EBNA2-regulierte, zelluläre Transkripte gibt. Um dieses Ziel zu erreichen, sollten die Expressionsprofile CBF1-negativer Zellen vor und nach Aktivierung von EBNA2 verglichen werden.

Die Expressionsprofile wurden zudem von CBF1-positiven und CBF1-negativen Zellen ohne EBNA2-Expression erstellt. Durch den Vergleich der Expressionsprofile dieser Zellen ergab sich erstmalig die Möglichkeit den Einfluss von CBF1, unabhängig von EBNA2, genomweit zu untersuchen. CBF1 wird als Repressor beschrieben und es sollten Gene identifiziert werden, die in CBF1-positiven Zellen reprimiert sind.

Ein allgemein anerkanntes Modell beschreibt, dass CBF1 in Interaktion mit einem Korepressor-Komplex Zielgene reprimiert, doch sobald EBNA2 in der Zelle vorhanden ist, der Korepressor Komplex verdrängt wird und diese Zielgene aktiviert werden. Die neu identifizierten CBF1-reprimierten Zielgene können durch den Vergleich mit EBNA2-aktivierten Zielgenen neue Erkenntnisse zur Wirkungsweise des EBNA2 geben.

Außerdem war ein Ziel dieser Arbeit, die mehrfache Kritik an dem in der AG Kempkes verwendeten, östrogenabhängigen System aus der Welt zu schaffen. Vergleichende Analysen der Expressionsprofile in Anwesenheit und in Abwesenheit von Östrogen sollen Aufschluss darüber geben, ob Östrogen in den DG75 B-Zellen einen signifikanten Einfluss auf die Genexpression hat.

3. Funktionell charakterisierte Regionen von EBNA2 und EBNA2-Interaktionspartnern

3.1. Zwei Domänen sind an der Transaktivierungsfunktion des EBNA2 beteiligt

3.1.1. Die C-terminale Transaktivierungsdomäne

Die C-terminale Transaktivierungsdomäne (C-TAD, **Abbildung 1**) wurde erstmalig 1991 anhand Promotor-Reportergenstudien mit Fusionsproteinen der Gal4-DNA-Bindedomäne (Gal4-DBD) und EBNA2-Fragmenten beschrieben (Cohen and Kieff 1991). Diese Domäne weist Sequenz- und Strukturhomologien zur Aktivierungsdomäne des Herpes-Simplex-Virus (VP16) auf. Die C-TAD kann in funktionellen Studien durch die VP16-TAD ersetzt werden (Cohen 1992).

Die C-TAD wirkt als Aktivierungsdomäne indem es mit basalen Transkriptionsfaktoren, wie TFIIB, -D und -H interagiert. Dies ist in Kapitel **3.2.1** näher erläutert.

3.1.2. Die N-terminale Transaktivierungs- und Dimerisierungsdomäne

In der Literatur wird der EBNA2-N-Terminus erstmals 1991 als wichtige Domäne für die Transaktivierungseffizienz des Proteins beschrieben (Cohen, Wang et al. 1991). 2004 wird die N-terminale Domäne des EBNA2 als essentiell bei der Aktivierung des viralen LMP1-Promotors und für die Aufrechterhaltung der Proliferation von LCLs dargestellt (Gordadze, Onunwor et al. 2004). Kurz darauf konnte die Transaktivierungsfunktion der N-terminalen Domäne als Fusionsprotein mit der Gal4-DBD in Promotor-Reportergenstudien bestätigt werden. Die Effekte waren in dieser Studie allerdings erst nach Kotransfektion mit EBNA-LP überzeugend (Peng, Zhao et al. 2004).

Zusätzlich zu der Transaktivierungsfunktion wurde 2001 entdeckt, dass der N-Terminus des EBNA2 vermutlich auch an der Dimerisierung des Proteins beteiligt ist (Harada, Yalamanchili et al. 2001). Bei der Dimerisierung des EBNA2-Proteins sind nach ersten Ergebnissen von Harada et al. 2 Domänen des N-Terminus involviert, die erste umfasst die AS 1-58 und die zweite die AS 97-122.

3.2. Zelluläre Interaktionspartner von EBNA2 geben Einblicke in die vielfältigen Funktionen des viralen Faktors

3.2.1. EBNA2-Interaktionspartner, die an der Transkriptionsregulation beteiligt sind

Die meisten Proteine, die mit EBNA2 interagieren, stehen im Zusammenhang mit der Transaktivatorfunktion des EBNA2. Für die Rekrutierung des EBNA2 an bestimmten Bereiche des Genoms ist hauptsächlich das DNA-bindende Protein CBF1 verantwortlich. Wie bereits erwähnt, interagiert es mit EBNA2 im Bereich der CR6. Eine Stabilisierung der CBF1-EBNA2 Interaktion wird durch SKIP und NPM1 vermittelt. SKIP kontaktiert EBNA2 im Bereich der CR5, die NPM1-EBNA2 Interaktion konnte auf die Aminosäuren 300-360, welche die CR6 einschließen, eingegrenzt werden (Zhou, Fujimuro et al. 2000, Liu, Chen et al. 2012). Ein weiteres DNA-bindendes Protein, das bei der Transkriptionsregulation durch EBNA2 eine Rolle spielt, ist PU.1 (Yue, Davenport et al. 2004).

Ein wichtiger Bereich für die Transkriptionsregulation ist die Transaktivierungsdomäne im Bereich der CR8 (C-TAD). Hier können mehrere Kontakte zur basalen Transkriptionsmaschinerie ausgebildet werden, nämlich mit den Faktoren TFIIB, der TFIID Untereinheit TAF_{II}28 (humanes Homolog zu TAF40 in Drosophila), den TFIID Untereinheiten p62 (auch: TFB1) und p80 (auch: ERCC2) und mit TFIIIE über p100. 2014 wurde die Interaktion zwischen der EBNA2-C-TAD und p62 in Strukturuntersuchungen bestätigt (Tong, Drapkin et al. 1995, Tong, Drapkin et al. 1995, Tong, Wang et al. 1995, Chabot, Raiola et al. 2014). Neben diesen Interaktionen mit der Transkriptionsmaschinerie spielt EBNA2 auch eine Rolle bei der Vorbereitung und Modifizierung des Chromatins für die Transkription. EBNA2 rekrutiert die Histonacetyltransferasen (HATs) CBP/p300 und P/CAF, welche die Lysin-Reste der Histone acetylieren können und somit die Chromatinstruktur auflockern (Wang, Grossman et al.

2000). Des Weiteren interagiert EBNA2 mit einem Faktor des SWI/SNF Chromatin-Remodeling-Komplexes, dem hSNF5/Ini1. Durch den SWI/SNF Komplex können Nucleosomen auf der DNA ATP-abhängig verschoben oder entfernt werden und somit der Zugang für Transkriptionsfaktoren frei gemacht werden. hSNF5/Ini1 interagiert im Bereich zwischen CR4 und CR5 und über phosphorylierte Aminosäuren am C-Terminus mit EBNA2 (Wu, Kalpana et al. 1996, Wu, Krumm et al. 2000, Kwiatkowski, Chen et al. 2004).

EBNA2 wird hauptsächlich mit Transkriptionsaktivierung in Verbindung gebracht. Auch die bisher in diesem Kapitel beschriebenen Interaktionspartner stehen mit Transaktivierung in Verbindung. 2002 wurde der potentielle Tumorsuppressor BS69 als EBNA2-Interaktionsprotein identifiziert. BS69 interagiert mit EBNA2 im Bereich der CR7 und CR8. Es konnte gezeigt werden, dass BS69 die Zielgenaktivierung durch EBNA2 inhibiert, eine funktionelle Charakterisierung liegt zu diesen Daten aber noch nicht vor (Ansieu and Leutz 2002). Bereits 1995 konnte BS69 als Repressor der Transaktivierung des adenoviralen Proteins E1A beschrieben werden (Hateboer, Gennissen et al. 1995).

3.2.2. Weitere zelluläre Interaktionspartner

EBNA2 scheint noch bei weiteren zellulären Prozessen involviert zu sein. Die direkte Interaktion wurde z.B. für RPA70 gezeigt, ein DNA-bindendes Protein, das bei der Replikation wichtig ist (Tong, Wang et al. 1995), oder für DP103 und SMN, die für eine Funktion bei der RNA-Prozessierung sprechen (Grundhoff, Kremmer et al. 1999, Voss, Hille et al. 2001).

Über die CR4 interagiert EBNA2 mit Nur77. Ein virales Onkoprotein wie EBNA2 kann neben den proliferationsstimulierenden auch antiapoptotische Wirkung besitzen. Die Interaktion von EBNA2 mit Nur77 verhindert die Translokation von Nur77 vom Zellkern ins Zytoplasma und zu den Mitochondrien. Es wurde beschrieben, dass EBNA2 durch das Zurückhalten des Nur77 im Zellkern antiapoptotisch wirkt (Lee, Lee et al. 2002).

Zuletzt möchte ich noch FOE (oder Wapl) unter den EBNA2-Interaktionspartner erwähnen. FOE ist an der Regulation der Cohesin-DNA-Interaktion beteiligt und trägt dadurch entscheidend zum richtigen Ablauf des Zellzyklus bei (Kwiatkowski, Ragoczy et al. 2004, Kueng, Hegemann et al. 2006).

3.3. Zielsetzung des 2. Teils meiner Arbeit

EBNA2 besitzt 2 Transaktivierungsdomänen, eine C-terminale (C-TAD) und eine N-terminale (N-TAD), wobei die N-TAD gleichzeitig auch eine Rolle bei der Dimerisierung des Proteins spielt. Der zweite Ergebnisteil befasst sich mit der Charakterisierung der N-TAD, ausgehend von NMR-Strukturdaten dieser Domäne. Zusammen mit unserem Kollaborationspartner Anders Friberg (AG Sattler) wurden Mutationen generiert, die auf unterschiedliche Weise die Funktion der N-TAD beeinflussen sollten. Eine Gruppe an Mutationen sollte sich auf die Dimerisierung auswirken (Grenzflächenmutationen) und eine Gruppe an Mutationen auf die Transaktivierungseffizienz (Oberflächenmutationen). Ziele waren einerseits die Bestätigung

der Strukturdaten und andererseits die Untermauerung der Funktion der N-TAD als Dimerisierungs- **und** Transaktivierungsdomäne.

Zwei der Oberflächenmutationen wirkten sich stark auf die Transaktivierungseffizienz des EBNA2 aus. Es wurde angenommen, dass die Oberflächenmutationen die Interaktion zu weiteren transkriptionsregulatorischen Faktoren unterbinden. Aus dieser Annahme entstand ein weiteres Ziel dieser Arbeit: die Identifikation regulatorischer Faktoren, die essentiell für die Transaktivierungseffizienz sind und spezifisch mit der N-TAD interagieren. Um dieses Ziel zu erreichen wurden vergleichende massenspektrometrische Analysen mit EBNA2-Wildtyp und EBNA2-Oberflächenmutanten durchgeführt.

II. Material

1. Bakterienstämme

Bakterienstamm	Beschreibung
E. coli DH5α:	F- endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169, hsdR17(rK- mK+), λ- (Invitrogen, UK)
XL1 blue	endA1 gyrA96(nalR) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F'[::Tn10 proAB+ lacIq Δ(lacZ)M15] hsdR17(rK- mK+) (Stratagene, USA)
DH10B	F- endA1 recA1 galE15 galK16 nupG rpsL ΔlacX74 Φ80lacZΔM15 araD139 Δ(ara,leu)7697 mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) λ- (Invitrogen, UK)

2. Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung
DG75	humane EBV-negative Burkitt-Lymphomzelllinie (Ben-Bassat, Goldblum et al. 1977)
721	Lymphoblastoide Zelllinie (Kavathas, Bach et al. 1980)
SM224.9	Humane EBV-negative Burkitt-Lymphomzelllinie DG75 mit vollständiger Deletion von CBF1 (Maier, Santak et al. 2005)
SM295 D6	DG75, stabil transfiziert mit dem ER/EBNA2 Vektor (Kempkes, Pawlita et al. 1995)
SM296 D3	SM224.9, stabil transfiziert mit dem ER/EBNA2 Vektor (Kempkes, Pawlita et al. 1995)
Eli-BL	Burkitt-Lymphomzelllinie mit Latenz I Expressionsstatus (Rooney, Rowe et al. 1985)
BJAB K3	Burkitt-Lymphomzelllinie, stabil transfiziert mit dem ER/EBNA2 Vektor (Menezes, Leibold et al. 1975, Kempkes, Pawlita et al. 1995)

3. Oligonukleotide/Primer

3.1. Oligonukleotide, die für Klonierungen und Sequenzierungen verwendet wurden

Verwendung	Bezeichnung	Sequenz [5'-3']
Klonierung EBNA2-Mutanten, Primer mit EcoRI-Erkennungsstelle	ST215	GCGCGAATTCATGCCTACATTCTATCT TGC
Klonierung EBNA2 Mutanten, <i>reverse</i> Primer	ST217	GAATTCGGATCCGGTACCTC
Sequenzierung des Vektors RSP357 (kodiert für F199)	ST317_R	GAGTCAGTGAGCGAGGAAGC
Sequenzierungen der Gal4/EBNA2-Fusionen im pSG5-Vektor	ST728	TGGCTGGCGTGGAAATATTC

3.2. Oligonukleotide zur Amplifikation genomischer Bereiche nach Chromatinimmunpräzipitationen

Zielbereich	Bezeichnung	Sequenz [5'-3']	Amplifikatlänge [bp]
CCL3 TSS	ST151_F	GCATGACAGCATCACTACGC	120
	ST151_R	GCATGATTCTGAGCAGGTGA	
RPL30, Intron 3-4	ST122_F	CTGGTCTGACGCTCCTGACT	120
	ST122_R	CAGTGCCCAGAATTCCAGAT	
CD23-Promotor	ST156_F	TGTGATCGGCCATAGTGGTA	101
	ST156_R	TTAAGCAGCAAGTCCCACA	
CD69_P-1338-1	ST602_F	GCTAGGAGGCTGCTTGTTTC	164
	ST602_R	TCTTCTCTGCTTGTTGGAAATGT	
CD69_P-6476-1	ST603_F	CCGCCTACTTGCTTGACTAC	155

	ST603_R	AATCCCACTTTCTCCTGCT	
CD69_P-2501-1	ST604_F	TGTAGAATCCAGGGTGAGACG	162
	ST604_R	TAGGTCGGAAGTCTGTGGTC	
RGS1_P-8583-1	ST605_F	CGTCACAGCACACCAAGAAA	178
	ST605_R	CTTTGGAGTGGAGATGGCTG	
RGS1_P-1717-2	ST607_F	CACTTGGAAGAACTGCTGACA	162
	ST607_R	TCTTGCATGAACCCCTTAGAG	
RGS1_P-553-1	ST608_F	AAGGCAGGAAGGAGCAGATG	161
	ST608_R	AGACCCATTAGAAGCCACCT	
ADAM-enhancer	MH2675fw	CTTCATGGCTACAGACTCTTGG	93
	MH2675rev	CCTATGTCTCGCTTCCTGCT	

3.3. Oligonukleotide zum Nachweis von EBNA2-Zielgenen mit cDNA als *template*

Zielgen	Bezeichnung	Sequenz [5'-3']	Amplifikatlänge [bp]
<i>ACTB</i>	ST249_F	GGCATCCTCACCTGAAGTA	203
	ST249_R	GGGGTGTTGAAGGTCTCAAA	
<i>EBNA2</i> (in Ag155)	ST447_F	TTTGCAAAAAGCTGGATCG	122
	ST455_R	GAGAGTGACGGGTTTCCAAG	
<i>CD69</i>	ST546_F	AACACGTCATGAAGGGTCCT	152
	ST546_R	GGCTGTCTGATGGCATTGAG	
<i>GPR183</i>	ST547_F	ACTACACAGAGACCCGAACG	192
	ST547_R	CCACGAGCCCAATGATGAAG	
<i>IKZF2</i>	ST548_F	TGAAATGTGACGTCTGTGGC	172
	ST548_R	TTGAACGGCTTCTCTCCAGA	

<i>KLRC3</i>	ST549_F	TCTGGCCAGCATTTTACCTTC	150
	ST549_R	CCACGTACATGTAGCATTGCA	
<i>PCDH9</i>	ST658_F	TGGGAAAGGGGAAAGGTTGA	201
	ST658_R	TCAGAGCAGCCAACAGGTAA	
<i>RGS1</i>	ST551_F	TGCAATGGTCTCAATCTCTGG	154
	ST551_R	CAGGGCAAAAGATCAGACTCTG	
<i>LRN3</i>	ST587_F	GAGGTGAAGCATTCCACAGA	229
	ST587_R	CCCATGCTTCTTCAGTATTTGC	
<i>SERPINI1</i>	ST588_F	AGACGAAAGCAGGAACGAGA	297
	ST588_R	GCCCCAAGTTCCATCATTCC	
<i>RUNX2</i>	ST659_F	CTGTGGTACTGTCATGGCG	183
	ST659_R	AGGTAGCTACTTGGGGAGGA	
<i>GLRA3</i>	ST590_F	GTCTACACCAACACCATGCG	237
	ST590_R	GGTGACATTGGAGCACTTCG	
<i>GPR174</i>	ST591_F	TGTACCCCTTTCGCTTCCAT	223
	ST591_R	ACAAACCCAATCAACTCGCC	
<i>ZNF608</i>	ST592_F	TTCAGGGCTCATGGGAAACT	281
	ST592_R	GCACTCTGGCTCTGTCACT	
<i>EBNA2</i> (Brooks, Yao et al. 1992, Yoshioka, Ishiguro et al. 2001)	MH276fw	GCTGCTACGCATTAGAGACC	339
	MH276rev	TCCTGGTAGGGATTGAGGG	
<i>LMP1</i> (nach Maja Santak)	MH335fw	GGTGTTTCATCACTGTGTCGTTGTC	
	MH335rev	GCTACTGTTTTGGCTGTACATCGT	
<i>LMP2A</i>	MH282fw	ATGACTCATCTCAACACATA	280
	MH282rev	CATGTTAGGCAAATTGCAAA	

(Brooks, Yao et al. 1992, Yoshioka, Ishiguro et al. 2001)			
<i>Cp</i> (Schlager, Speck et al. 1996)	MH273fw C1	AGATCAGATGGCATAGAGAC	212 und 312 (<i>W-repeats</i>)
	MH273 rev	GACCGGTGCCTTCTTAGGAG	
<i>CCL3</i>	Gs25a.1 for	ATGCAGGTCTCCACTGCTG	249
	Gs25a.1 rev	TTTCTGGACCCACTCCTCAC	
<i>CD23</i>	ST240_F	CTGGGACACCACACAGAGTC	237
	ST240_R	GACACCTGCAACTCCATCCT	

3.4. Oligonukleotide zum Nachweis von microRNAs

microRNA	Verwendung	Bezeichnung	Sequenz [5'-3']	Amplifikationslänge [bp]
hsa-mir-21	Erstrang-Oligonukleotid für cDNA Synthese	ST571	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCC GAGGTATTCGCACCAGAGCCA AC tcaaca	
hsa-mir-181b1	Erstrang-Oligonukleotid für cDNA Synthese	ST573	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCC GAGGTATTCGCACCAGAGCCA AC acccac	
hsa-mir-146a	Erstrang-Oligonukleotid für cDNA Synthese	ST575	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCC GAGGTATTCGCACCAGAGCCA AC aaccaca	
hsa-mir-21	qPCR	ST572	GGCGTAGCTTATCAGACTGA	60
		miRNA universal	GGCGTAGCTTATCAGACTGA	
hsa-mir-181b1	qPCR	ST574	GGCGAACATTTCATTGCTGTCG	61
		miRNA universal	GGCGTAGCTTATCAGACTGA	
	qPCR	ST576	GGCGTGAGAACTGAATTCCA	60

hsa-mir-146a		miRNA universal	GGCGTAGCTTATCAGACTGA	
--------------	--	--------------------	----------------------	--

4. Plasmide

Klonierungsstrategien:

ST371-ST378: ORF der END-Domäne wurde über PCR aus einem Expressionsplasmid von Peijian (AG Sattler) amplifiziert und EcoRI/AleI Schnittstellen angehängt. Klonierung über pUC19-*shuttle* und Schnittstellen EcoRI/AleI; Transfer des Fragmentes von Ag155 zu zu pUC19 und zurück über Schnittstellen EcoRI/BamHI (siehe ST211).

ST694 und CKR231.1-CKR231.3: Gal4DBD + *linker* (GGTGGTTCTGGTGGTGGTCTGGT) flankiert von 2 EcoRI-Erkennungsstellen bei GeneArt (Regensburg) bestellt. Über EcoRI Gal4DBD + *linker* vor EBNA2 in Ag155 kloniert.

Bezeichnung	Beschreibung	Herkunft
Ag155	Expressionsplasmid, EBNA2 mit C-terminalem HA-tag; Vektor: pSG5	Paul D. Ling Labor
Ag190	Expressionsplasmid, EBNA2 mit C-terminalem HA-tag und Deletion AS 3-30; Vektor: pSG5	Paul D. Ling Labor
Ag191	Expressionsplasmid, EBNA2 mit C-terminalem HA-tag und Deletion AS 3-52; Vektor: pSG5	Paul D. Ling Labor
pST371	Expressionsplasmid, EBNA2 mit C-terminalem HA-tag und Punktmutation L16A; Vektor: pSG5	diese Arbeit
pST372	Expressionsplasmid, EBNA2 mit C-terminalem HA-tag und Punktmutation L16D; Vektor: pSG5	diese Arbeit
pST373	Expressionsplasmid, EBNA2 mit C-terminalem HA-tag und Punktmutation I50A; Vektor: pSG5	diese Arbeit
pST374	Expressionsplasmid, EBNA2 mit C-terminalem HA-tag und Punktmutation I50D; Vektor: pSG5	diese Arbeit
pST375	Expressionsplasmid, EBNA2 mit C-terminalem HA-tag und Punktmutation Y5A; Vektor: pSG5	diese Arbeit

pST376	Expressionsplasmid, EBNA2 mit C-terminalem HA-tag und Punktmutation H15A; Vektor: pSG5	diese Arbeit
pST377	Expressionsplasmid, EBNA2 mit C-terminalem HA-tag und Deletion AS35-39; Vektor: pSG5	diese Arbeit
pST378	Expressionsplasmid, EBNA2 mit C-terminalem HA-tag und Punktmutation F51A; Vektor: pSG5	diese Arbeit
RSP357	Expressionsplasmid, EBNA2 AS 1-199 mit C-terminalem FLAG-tag	Paul Ling Labor
pHACS1	von pcDNA3 abstammendes Plasmid mit HA-tag	
pN3Flag	von pEGFP-N3 abstammendes Plasmid mit FLAG-tag und Ampizillin Resistenz	
pSG5	eukaryotisches Expressionsplasmid mit SV40 Promoter	
pST694	Expressionsplasmid, Gal4DBD- <i>linker</i> -EBNA2, Ausgangsvektor Ag155	diese Arbeit
CKR231.1	Expressionsplasmid, Gal4DBD- <i>linker</i> -EBNA2 mit H15A Mutation, Ausgangsvektor Ag155	diese Arbeit
CKR231.2	Expressionsplasmid, Gal4DBD- <i>linker</i> -EBNA2 mit Δ 35-39 Mutation, Ausgangsvektor Ag155	diese Arbeit
CKR231.3	Expressionsplasmid, Gal4DBD- <i>linker</i> -EBNA2 mit F51 A Mutation, Ausgangsvektor Ag155	diese Arbeit
pRL-PGK WH3695.3	Renilla-Luziferase Expressionsplasmid zur internen Kontrolle	
Ga981.6	Promotor-Reporterplasmid mit 6 doppelten CBF1-Bindestellen aus dem LMP1 Promotor und Luziferase als Reporter	
Gal4-TK-Luc	Promotor-Reporterplasmid. Herpes simplex Thymidinkinase (TK) Promotor mit mehreren Gal4 Bindestellen und Luziferase als Reporter	

5. Antikörper

5.1. Antikörper für Western Blot

Bezeichnung	Spezies	Isotyp/Klonalität	Bezugsquelle
α -EBNA2 R3-1-3	Ratte	IgG2a/monoklonal	E. Kremmer, Helmholtz Zentrum München, Deutschland
EBNA1 1H4	Ratte	IgG2a/monoklonal	E. Kremmer, Helmholtz Zentrum München, Deutschland
α -RBP-J 7A11-1-6-1	Ratte	IgG2b/monoklonal	E. Kremmer, Helmholtz Zentrum München, Deutschland
ANTI-FLAG M2	Maus	IgG1/monoklonal	Sigma-Aldrich, USA
LMP1 S12	Maus	IgG2a/monoklonal	E. Kremmer, Helmholtz Zentrum München, Deutschland
α -GAPDH 6C5	Maus	IgG1/monoklonal	Millipore, USA
PAXIP1/PTIP ab2614	Kaninchen	IgG/polyklonal	Abcam, UK
PLK1 ab17056	Maus	IgG2b/monoklonal	Abcam, UK
α -Maus-IgG-HRP	Ziege	IgG/polyklonal	Santa Cruz Biotechnology, USA
α -Ratte-IgG-HRP	Ziege	IgG/polyklonal	Santa Cruz Biotechnology, USA

5.2. Antikörper für Immunpräzipitation

Bezeichnung	Spezies	Isotyp/Klonalität	Bezugsquelle
α -HA 3F10	Ratte	IgG1/monoklonal	Roche Applied Science, USA
PAXIP1/PTIP ab70434	Kaninchen	IgG/polyklonal	Abcam, UK
PLK1 ab17056	Maus	IgG2b/monoklonal	Abcam, UK
α -GST 6G9	Ratte	IgG2a/monoklonal	E. Kremmer, Helmholtz Zentrum München, Deutschland

6. Material für Bakterienstämme

Bezeichnung	Bezugsquelle
Ampicillin	Sigma-Aldrich, USA
Kanamycin	Sigma-Aldrich, USA
LB - Medium	selbst hergestellt
LB - Agarose Platten	selbst hergestellt

7. Material für Zellkultur

Bezeichnung	Bezugsquelle
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Deutschland
Doxycyclin	Sigma-Aldrich, USA
Fötales Kälberserum	PAA Laboratories, Österreich
L-Glutamin	GIBCO, UK
OptiMEM Medium	GIBCO, UK
Penicillin/Streptomycin	GIBCO, UK
Puromycin	Merck (Calbiochem), Deutschland
RPMI 1640-Medium	GIBCO, UK
Trypsin	GIBCO, UK

8. DNA- und Proteinstandards

Bezeichnung	Bezugsquelle
1 kb DNA ladder	Invitrogen, UK
100 bp DNA ladder plus	MBI Fermentas, Deutschland
2-log Marker	New England Biolabs, USA
Prestained Protein Ladder	MBI Fermentas, Deutschland

λ DNA/ <i>Hind</i> III Fragments	GIBCO, UK
--	-----------

9. Enzyme und Reagenziensysteme

Bezeichnung	Bezugsquelle
Alkaline Phosphatase, shrimp	Roche Diagnostics GmbH, Deutschland
Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets	Roche Diagnostics, Deutschland
ECL™ Reaktionssystem	GE Healthcare (Amersham), UK
JETSTAR 2.0	Genomed, Deutschland
NucleoSpin Extract II	Macherey-Nagel, Deutschland
NucleoSpin Plasmid	Macherey-Nagel, Deutschland
Proteinase K (PCR grade)	Roche Diagnostics, Deutschland
Restriktionsenzyme und Puffer	New England Biolabs, USA; MBI Fermentas, Deutschland
T4 DNA Ligase	New England Biolabs, USA

10. Chemikalien und Reagenzien

Bezeichnung	Bezugsquelle
Acrylamid 30%	Roth, Deutschland
Agarose	Invitrogen, UK
APS	MP Biomedicals, Deutschland
BSA (<i>bovine serum albumin</i>)	MP Biomedicals, Deutschland
Chloroform	Merck, Deutschland
dNTPs	Roche Diagnostics GmbH, Deutschland
Ethidiumbromid	Merck, Deutschland
Formaldehyd, 37%	Merck, Deutschland
Formamid, deionisiert	Roth, Deutschland

Galacton-Plus	Applied Biosystems, Deutschland
Isoamylalkohol	Roth, Deutschland
Luciferin	Roche Diagnostics GmbH, Deutschland
Milchpulver	AppliChem, Deutschland
MS2 RNA	Roche Diagnostics, Deutschland
Polyethylenimin	Sigma-Aldrich, USA
Protein G Sepharose	GE Healthcare, UK
Restore Western Blot Stripping Buffer	Thermo Fisher Scientific, USA
TEMED	GE Healthcare, UK
Triton X-100	Sigma-Aldrich, USA
Trypanblau	Sigma-Aldrich, Deutschland
Tween-20 (Polyoxyethylenesorbitanmonol-aureat)	AppliChem, Darmstadt

11. Verbrauchsmaterial

Bezeichnung	Bezugsquelle
ART Aerosol Resistant Tips	Molecular BioProducts, USA
Elektroporationsküvette, Gene Pulser 0,4 cm	Bio-Rad Laboratories, USA
FACS-Röhrchen	BD Biosciences, USA
Gel-Blotting-Papier 3MM	Schleicher & Schüll, Deutschland
Hyperfilm ECL TM	Amersham Bioscience, Schweden
Immobilion PVDF Membran	Millipore, USA
Membranfilter	Schleicher & Schuell, Deutschland
Minisart Einwegspritzenfilter, steril 0,2/ 0,4/ 0,8/ 1,2 µm	Sartorius, Deutschland

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

12. Laborausstattung

Bezeichnung	Bezugsquelle
3.2RS Varifuge	Heraeus Instruments, Deutschland
6K10 Zentrifuge	SIGMA Centrifuges GmbH, Deutschland
Bakterien-Inkubator	Heraeus Instruments, Deutschland
Bakterienschüttler	New Brunswick Scientific, USA
CP1000 Entwicklermaschine	AGFA, Köln
Elektroporationsgerät Gene Pulser II	Biorad, Deutschland
FACS Calibur	BD Biosciences, USA
Filmkassetten	FujiFilm, Kleve
Geldokumentationssystem	Ltf Labortechnik, Deutschland
Gelelektrophoresekammer (DNA)	PeqLab, Deutschland
Gelelektrophoresekammer (Protein)	Amersham Bioscience, Schweden
GeneAmp PCR System 9600	PerkinElmer, USA
LightCycler	Roche Diagnostics GmbH, Deutschland
Neubauer Zählkammer	Menzel-Gläser, Deutschland
Orion Microplate Luminometer	Berthold Detection Systems, USA
RC5C Zentrifuge	DuPont, USA
Rotanta 460 R Zentrifuge	Hettich, Deutschland
Schüttel-Inkubator	New Brunswick Scientific, USA
Sonifier II W-250 D	Branson Ultrasonics Corporation, USA
Spannungsquellen	Biorad, USA
Spektralphotometer Gene Ray (Protein)	Biometra GmbH, Deutschland

Spektralphotometer Ultrospec 1100 pro (DNA, RNA)	GE Healthcare (Amersham), UK
Sterilbank	Heraeus Instruments, Deutschland
Thermomixer 5436	Eppendorf, Deutschland
UV-Transiluminator	PeqLab, Deutschland
Zell-Inkubator	Heraeus Instruments, Deutschland
Zentrifuge 5415	Eppendorf, Deutschland
Zentrifuge 5417 R	Eppendorf, Deutschland

13. Datenbanken, Internet-Programme und Computer-Software

Bezeichnung	Bezugsquelle
Bioedit	Ibis Biosciences, USA
CellQuestPro	BD Biosciences, USA
Clone Manager 9	Scientific & Educational Software, USA
EndNote 5	Thomson Reuters, New York (USA)
Ensembl Genome Browser	http://www.ensembl.org
LightCycler 480 Software, Version 1.5	Roche Diagnostics GmbH, Deutschland
NCBI Homepage	http://www.ncbi.nlm.nih.gov
Primer3	http://frodo.wi.mit.edu
GraphPad Prism 5	GraphPad Software, USA
Simplicity 4.02 (Luminometer)	Berthold Detection Systems, USA
UCSC Genome Browser	UCSC Genome Bioinformatics Group, USA

III. Methoden

1. Arbeiten mit Bakterienkulturen

1.1. Kultivierung und Aufbewahrung von Bakterien

Verschiedene *E. coli* Stämme wurden für die Amplifizierung von Plasmiden verwendet. Zum Kultivieren wurden die Bakterien über Nacht auf *Lysogeny Broth* (LB)-Agar-Platten oder in flüssigem LB-Medium bei 37°C inkubiert. Plasmidpräparationen neu klonierter Konstrukte wurden aus Bakterienkulturen, die von einer einzelnen Kolonie stammten, durchgeführt. Die Selektion von transformierten Bakterien erfolgte durch Zugabe des entsprechenden Antibiotikums zum Medium. Zur Langzeitaufbewahrung wurden 900 µl Bakterienkultur mit 100 µl DMSO gemischt und bei -80°C eingefroren.

LB-Medium:	1 % Bacto-Trypton; 0,5 % Yeast Extract; 1 % NaCl (pH 7,4)
LB-Agar:	LB-Medium mit 1,5 % Bacto-Agar
Antibiotika:	50 µg/ml Ampicillin oder 50 µg/ml Kanamycin

1.2. Transformation chemisch-kompetenter Bakterien

50 µl chemisch kompetenter *E.coli*-Bakterien wurden auf Eis aufgetaut und mit 10 µl Ligationsansatz oder 50-100 ng Plasmid-DNA für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem 50 sek. Hitzeschock bei 42°C, wurden 300 µl LB-Medium (ohne Antibiotika) zu dem Transformationsansatz zugegeben und 1 h bei 37°C geschüttelt. Für die Kultivierung der transformierten Bakterien wurden sie auf Selektionsplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2. Arbeiten mit eukaryotischen Zellen

2.1. Kultivierung und Aufbewahrung von Zellen

Alle verwendeten Zelllinien wurden unter Standardbedingungen bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert. In das Kulturmedium RPMI 1640 wurden zusätzlich 10 % fötales Kälberserum (FKS), 4 mM L-Glutamin und 100 U/ml Penicillin/Streptomycin zugegeben. Im Folgenden wird dieses Medium als Vollmedium bezeichnet

2.2. Kultivierung von Suspensionszelllinien

Die Zelllinien DG75, SM224.9^{CBF1 neg.}, 721 und Eli-BL wurden in Vollmedium kultiviert. Bei den Zelllinien BJAB K3, SM295, SM296^{CBF1 neg.}, CKR128-34 und CKR178-10 mussten zum Erhalt der jeweiligen Expressionsvektoren G418 oder Puromycin zum Vollmedium zugegeben werden. Für die Induktion der EBNA2-Fusionsproteine musste zu den jeweiligen Zelllinien entweder β-Estradiol oder Doxycyclin zugegeben werden (siehe **Tabelle 3**). Die Induktion erfolgte abhängig vom Versuch für 6 bis 24 h.

Tabelle 3 Übersicht Zelllinien und Expressionssysteme

Zelllinie	Expressionsvektor	Selektion	Induktion
BJAB K3	ER/EBNA2	0,8 mg/ml G418	1 μ M β -Estradiol
SM295	ER/EBNA2	1,2 mg/ml G418	1 μ M β -Estradiol
SM296 ^{CBF1 neg.}	ER/EBNA2	1,2 mg/ml G418	1 μ M β -Estradiol
CKR128-34	EBNA2/HA	1 μ g/ml Puromycin	1 μ g/ml Doxycyclin
CKR178-10	EBNA2/HA	1 μ g/ml Puromycin	1 μ g/ml Doxycyclin

2.3. Aufbewahrung von Zellen

Um Zellen für längere Zeit aufzubewahren, wurden ca. 1×10^7 Zellen bei 300 g für 10 min abzentrifugiert, in 1,5 ml Einfriermedium resuspendiert und in 1,8 ml Einfrierrohrchen überführt. Die Röhrchen wurden in mehreren Lagen Papiertücher gewickelt, um langsames durchfrieren zu gewähren, und für mindestens 2 Tage bei -80°C eingefroren. Anschließend wurden sie in flüssigen Stickstoff überführt.

Sollten eingefrorene Zellen wieder in Kultur genommen werden, so ist es für die Zellen am besten, wenn sie möglichst schnell aufgetaut werden. Die Zellen wurden mit 20 ml vorgewärmten Medium gewaschen, um das DMSO zu entfernen und in frischem, vorgewärmtem Vollmedium aufgenommen. Erforderliche Selektionszusätze wurden dem Medium erst am nächsten Tag zugesetzt

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

2.4. Bestimmung der Zellzahl

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit einer Neubauer-Zählkammer. Hierzu wurde ein Aliquot der Zellen gut resuspendiert, 1:2 mit einer 0,4 % - igen Trypanblau-Lösung gemischt, in die Zählkammer gegeben und unter dem Mikroskop gezählt. Da nur tote Zellen den Farbstoff aufnehmen, waren diese anhand der Blaufärbung zu erkennen und wurden aus der Zählung ausgeschlossen. Die Lebendzellzahl/ml ergibt sich aus der durchschnittlichen Anzahl ungefärbter Zellen pro Großquadrat $\times 2$ (Verdünnungsfaktor der Trypanblau-Färbung) $\times 10^4$. Es wurden jeweils mindestens 4 Großquadrate pro Zelllinie gezählt.

2.5. Transiente Transfektion eukaryotischer Suspensionszellen durch Elektroporation

Einen Tag vor der Transfektion wurden die Suspensionszellen im Verhältnis 1:2 verdünnt. Pro Transfektionsansatz wurden 1×10^7 Zellen bei 300 g für 10 min abzentrifugiert, zweimal mit OptiMEM gewaschen und in 250 μ l OptiMEM aufgenommen. Die Zellsuspension wurde mit je 0,5-5 μ g pro Plasmid-DNA gemischt und in eine „GenePulser“ - Küvette (Biorad) mit einem

Elektrodenabstand von 4 mm überführt. Die Elektroporation erfolgte bei 250 V und 950 μ F für DG75-Zellen und bei 240 V und 975 μ F für Eli-BL.

2.6. Promotor-Reportergenstudien

Alle Promotor-Reportergenstudien basierten auf Reportergenkonstrukten, die für das Luziferasegen des Leuchtkäfers (*firefly*) kodieren. Um mögliche Unterschiede der Transfektionseffizienz zwischen den einzelnen Proben ausgleichen zu können, wurde zu jedem Transfektionsansatz ein Expressionsplasmid, das für das Luziferasegen der Seefeder aus der Gattung *Renilla* kodiert, transfiziert. Die verwendeten Promotor-Reportergenkonstrukte waren der Vektor Ga981.6, bei dem die CBF1-Bindesequenz des *LMP2A*-Promotors 6 Mal in Folge kloniert wurde, und ein Vektor mit einer Gal4-Bindestelle im Promotor. 5 μ g je eines dieser Promotor-Reportergenkonstrukte wurden mit 5 μ g des jeweiligen EBNA2-Expressionsplasmides und mit 0,5 μ g *Renilla*-Vektor in 5×10^6 DG75-Zellen kotransfiziert. 48 h nach Transfektion wurden die Zellen bei 300 g für 10 min abzentrifugiert, mit PBS gewaschen und in 150 μ l des *Dual-Luciferase® Reporter Assay System* (Promega) Lysepuffer aufgenommen. Die Proben wurden bei -80°C über Nacht eingefroren und der Luziferase-Assay am nächsten Tag nach Herstellerprotokoll durchgeführt.

Für die Messung der Proben im Luminometer (Orion Microplate Luminometer, Berthold Detection Systems) wurden je 15 μ l der Proteinlysate im Duplikat in einer Mikrotiterplatte vorgelegt und automatisch nach folgendem Programm pro Loch ausgelesen:

Zugabe 50 μ l *Luciferase Assay Reagent II* – 2 s Pause – 10 s erste Messung – 10 s Pause – Zugabe *Stop & Glo® Reagent* – 2 s Pause – 10 s 2. Messung.

Für die Normalisierung der Luziferase-Werte wurde der Quotient aus der mittleren Leuchtkäfer-Luziferase-Aktivität und der mittleren *Renilla*-Luziferase-Aktivität berechnet.

3. DNA - Arbeitstechniken

3.1. Schnelle Plasmidisolierung

5 ml einer Übernachtskultur von transformierten Bakterien wurden abzentrifugiert (4750 g, 10 min) und mit dem NucleoSpin Plasmid Kit (Macherey-Nagel) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Zur Überprüfung der Plasmid-DNA wurden 2 μ l DNA mit Restriktionsenzymen gespalten und elektrophoretisch aufgetrennt.

3.2. Präparative Plasmidisolierung

Die Plasmidisolierung aus einer 400 ml Bakterienkultur wurde mit dem Plasmid-Maxipräparationskit *Jetstar Genomed 2.0* nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Das DNA-Pellet wurde nach der Fällung in 300 μ l TE-Puffer aufgenommen und bei -20°C gelagert.

TE-Puffer: 10 mM Tris/HCl pH 7,5; 1 mM EDTA pH 8

3.3. Konzentrationsbestimmungen der DNA mit dem Qubit® Fluorometer oder dem Eppendorf Photometer

Es wurden zwei Methoden für DNA-Konzentrationsbestimmungen angewandt. Zur schnellen Konzentrationsbestimmung wurden 2 µl der Probe bei 260 nm im Eppendorf Photometer (Eppendorf BioPhotometer D30) gemessen. Die Qualität der DNA wurde auf Verunreinigungen durch Proteine (280 nm) und organische Verbindungen (230 nm) überprüft. Das Verhältnis der Absorption $A_{260/280}$ sollte etwa 1,8 betragen, das Verhältnis $A_{260/230}$ etwa 2.

Eine genauere Methode stellt die Messung der DNA nach Anfärben mit einem Fluoreszenzfarbstoff im Qubit (Qubit® 2.0 Fluorometer, Invitrogen) dar. Der Fluoreszenzfarbstoff markiert spezifisch nur doppelsträngige DNA. Bei erwarteten DNA-Mengen unter 100 ng/µl wurde der *Qubit® dsDNA HS assay kit* verwendet, bei erwarteten höheren DNA-Mengen der *Qubit® dsDNA BR assay kit*. Die Durchführung erfolgte gemäß dem Herstellerprotokoll.

3.4. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Zur Vervielfältigung eines bestimmten DNA-Fragmentes *in vitro* wurden Oligonukleotid-Primerpaare verwendet, die sequenzspezifisch an komplementäre denaturierte *template*-DNA hybridisieren und den zu amplifizierenden Bereich gegenläufig orientiert flankieren. Als *template* wurde sowohl genomische DNA also auch Plasmid-DNA eingesetzt. Für die Amplifikation der DNA-Fragmente wurde die Taq-DNA-Polymerase (Roche) eingesetzt. Für einen 50 µl Reaktionsansatz wurde 200 ng genomische DNA oder 100 ng Plasmid DNA, je 300 nm *forward* und *reverse* Primer, 200 µM dNTP-Mix, 1 x PCR Reaktionspuffer und 1,25 U Taq Polymerase eingesetzt. Der Ablauf des PCR Programmes ist in **Tabelle 4** dargestellt.

Tabelle 4: PCR-Programm der Taq-Polymerase

Zyklen	Programm	Temperatur [°C]	Zeit
1	Denaturierung	96	5 min
25	Denaturierung	96	30 s
	Primerhybridisierung	55 - 60	30 s
	Elongation	72	1 min/ kb
1	Elongation	72	7 min

3.5. Aufreinigung von DNA-Fragmenten

Bei der Aufreinigung von PCR-Produkten wurde die gesamte Probe mit dem *Nuclospin® Gel and PCR Clean-up kit* (Macherey und Nagel) mit dem Säulen-Bindepuffer des Kits gemischt und

nach Herstellerprotokoll aufgereinigt. Dabei wurden überschüssige Primer und Nukleotide aus der Probe entfernt. Das PCR-Produkt wurde in 30 µl Elutionspuffer des Kits eluiert.

Musste ein DNA-Fragment nach einem Restriktionsverdau bei der Klonierung von Plasmiden aufgereinigt werden, so wurde zunächst der gesamte Verdau im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, die gewünschten DNA-Fragmente aus dem Gel ausgeschnitten und nach Herstellerprotokoll des *Nuclospin® Gel and PCR Clean-up kit* (Macerey und Nagel) aufgereinigt. Die Fragmente wurden mit 50 µl Elutionspuffer des Kits eluiert.

3.6. Agarosegelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten wurde für unterschiedliche Zwecke benötigt. Zum einen zur Kontrolle von Plasmid-DNA nach Test-Restriktionsverdauen oder zur Isolation von Plasmid-Fragmenten nach einem präparativen Restriktionsverdau bei der Klonierung. Zum anderen auch zur Kontrolle der Größe von PCR-Produkten nach einer qPCR oder zur Isolation von PCR-Produkten für Klonierungszwecke. Für alle diese Anwendungen wurden die DNA-Fragmente über ein 1,5 %-iges Agarosegel aufgetrennt. Die Agarose wurde in 1 x TAE-Laufpuffer gelöst und mit 10 mg/ml Ethidiumbromid versetzt. Die DNA-Proben wurden mit 1 x DNA-Ladepuffer gemischt und mit einem geeigneten Größenstandard elektrophoretisch bei 5 - 8 V/cm aufgetrennt. Anschließend wurden die DNA - Banden im UV-Licht bei 254 nm auf einem UV-Transluminator kontrolliert.

TAE-Laufpuffer:	40 mM Tris-Acetat; 1 mM EDTA (pH 8,0)
DNA-Ladepuffer:	10 % Bromphenolblau; 30 % Glycerin

3.7. Klonierung von Plasmidvektoren

Für die Klonierung von Säugerzellexpressionsvektoren wurden die entsprechenden DNA-Fragmente entweder aus anderen Plasmiden umklontiert oder der gewünschte Bereich aus einem Plasmid via PCR mit sequenzspezifischen Primerpaaren, die am 5'-Ende mit zwei unterschiedlichen überhängenden Restriktionsschnittstellen ausgestattet waren, hergestellt. Diese Fragmente mussten verdaut (**3.7.1**), aufgereinigt (**3.5**) und mit dem ebenfalls verdauten Vektor ligiert (**3.7.2**) werden. Mit dem Ligationsansatz wurden schließlich chemisch kompetent gemachte Bakterien transformiert und auf Selektionsplatten kultiviert. Die Plasmid-DNA wurde aus Kulturen einzelner Klone präpariert und mit Hilfe eines Test-Restriktionsverdaus und zusätzlicher Sequenzierung (**3.7.3**) auf ihre Richtigkeit überprüft.

3.7.1. Restriktionsverdau

Der Verdau von DNA mit Restriktionsenzymen wurde in den Reaktionspuffern des jeweiligen Herstellers durchgeführt. Die Restriktionsenzyme (1 U/ 1 µg DNA pro h) wurden so eingesetzt, dass sie maximal einem Zehntel des Reaktionsvolumens entsprachen. Die eingesetzte DNA sollte eine Konzentration von 200 ng/µl nicht überschreiten. Die Reaktion wurde nach 1 - 3 h bei einer Temperatur von 37 bis 65°C (abhängig vom eingesetzten Enzym) bei der vom

Hersteller empfohlenen Temperatur gestoppt. Die Vollständigkeit des Verdau wurde mittels Agarosegelelektrophorese kontrolliert.

3.7.2. Ligation

Um ein DNA-Fragment (Insert) mit passenden Schnittstellen in ein Plasmid-DNA-Rückgrat (Vektor) zu klonieren wurde die T4 DNA-Ligase verwendet. 1 U ist definiert als die Menge an Enzym, die benötigt wird, um 50 % der Inserts in einem Endvolumen von 20 µl in 30 min bei 16°C zu ligieren. Für die Ligation wurden Vektor und Insert im molaren Verhältnis 1:3 eingesetzt. 50 ng Vektor, die entsprechende Menge an Insert, 1 x T4 DNA-Ligase Puffer und 1 µl T4 DNA-Ligase (400 U/µl) wurden mit H₂O auf 20 µl Endvolumen aufgefüllt. Es wurden jeweils 2 Kontrollen durchgeführt, bei denen einmal das Insert und einmal die Ligase durch Wasser ersetzt wurden. Nach einer Inkubation bei 16°C über Nacht wurden kompetente Bakterien mit den Ligationsansätzen transformiert.

3.7.3. Sequenzierung der DNA

Die Sequenzierung von bis ca. 1000 bp Abschnitten der Expressionsvektoren mit Insert wurde bei der Firma MWG, Ebersberg, durchgeführt und mit Hilfe der Software ClustalW ausgewertet. Sequenzierungsansätze aus Plasmidverdünnungen und gegebenenfalls eines Sequenzierungsprimers wurden nach Angaben der Firma MWG hergestellt.

3.8. Quantitative PCR (qPCR)

Die Quantifizierung von DNA und cDNA erfolgte mittels qPCR im LightCycler 480 II Gerät der Firma Roche Diagnostic. Die Methode basiert auf dem *SYBR-Green I*-System, bei dem ein Fluoreszenzfarbstoff zum Einsatz kommt, der nach der Einlagerung in doppelsträngige DNA blaues Licht absorbiert und grünes Licht emittiert. Das LightCycler Gerät misst das emittierte Fluoreszenzsignal nach jedem PCR-Zyklus und berechnet die Anzahl an PCR-Zyklen, die erforderlich ist, bis das Fluoreszenzsignal über dem Hintergrundniveau ist. Je mehr *template* vorhanden ist, desto früher ist dies der Fall. Die Menge an ursprünglich eingesetztem *template* ist demnach umgekehrt proportional zur Anzahl der erforderlichen PCR-Zyklen, die nach der *second derivative maximum* Methode ermittelt wird. Dabei wird das Maximum der zweiten Ableitung der während der Amplifikation aufgezeichneten Fluoreszenzkurve bestimmt und als Cp-Wert (*Crossing - point*) angegeben.

Nach der Quantifizierung der DNA oder cDNA-Proben wurde die Qualität der entstandenen PCR-Produkte durch Schmelzkurvenanalyse und Agarose-Gelelektrophorese überprüft.

3.8.1. Quantifizierung von Transkripten

Die relative Quantifizierung von Transkripten am LightCycler 480 II (Roche Diagnostics) wurde in einem Gesamtvolumen von jeweils 10 µl im 96-well Format durchgeführt. Die PCR-Ansätze setzten sich nach Angaben des Herstellers aus je 0,5 µM *forward* und *reverse* Primer, 2 µl cDNA *template* und 5 µl des *SYBR Green I Master Mix* zusammen. Je nach Abundanz des zu

quantifizierenden Transkriptes wurde die cDNA unverdünnt oder in einer angemessenen Verdünnung eingesetzt.

Bei der relativen Quantifizierung wird die Menge an PCR-Produkten der zu quantifizierenden Transkripte (zur Vereinfachung im folgenden Abschnitt als „Zielgen“ bezeichnet) in der Probe ermittelt. Um mögliche Unterschiede zwischen den eingesetzten cDNA-Proben der Transkripte auszugleichen, wurde parallel für jede Probe die Menge des PCR-Produktes einer Referenz berechnet (zur Vereinfachung im Folgenden als „Referenzgen“ bezeichnet). Bei dieser Referenz handelt es sich um typische Haushaltsgene, die unabhängig von Zelltyp und äußeren Einflüssen konstitutiv exprimiert werden. Bei den Experimenten dieser Arbeit wurde β -Aktin als Referenzgen verwendet.

Die ideale Amplifikationseffizienz entspricht einer Verdoppelung der eingesetzten cDNA pro Zyklus. Abhängig von Fragmentlänge, Sequenz und Qualität des *templates* und der Primer kann die Amplifikationseffizienz variieren. Um die Amplifikationseffizienz der verschiedenen Primerpaarkombinationen in der Berechnung der relativen Transkriptmenge zu berücksichtigen, wurde für jedes Zielgen eine Standardkurve erstellt. Hierzu wurde zunächst ein PCR-Produkt des Zielgenes unter Verwendung des Primerpaares generiert und damit eine Verdünnungsreihe mit den Stufen $2,5 \times 10^7$, $2,5 \times 10^5$, $2,5 \times 10^3$, $2,5 \times 10^1$ und $2,5 \times 10^{-1}$ Kopien/ μ l in MS2-RNA-Verdünnungslösung (Roche Diagnostics) hergestellt. Die Phagen-RNA dient zur Stabilisierung des PCR-Produktes und ermöglicht das wiederholte Einfrieren und Auftauen der Proben. Nach Amplifikation der Verdünnungen wurden die Cp-Werte graphisch gegen den dekadischen Logarithmus der relativen Konzentrationen aufgetragen und die Amplifikationseffizienz aus der Steigung der geraden ermittelt.

Die Menge des jeweiligen Ziel- oder Referenzgens kann mit folgender Formel berechnet werden:

$$N_n = N_0 \times E^{Cp}$$

N_n = Anzahl der Moleküle im PCR - Zyklus n

N_0 = Anzahl der Moleküle vor Beginn der Reaktion

E = Amplifikationseffizienz

Cp = *Crossing – point*

Für die relativen Quantifizierung wird nun das Verhältnis des Zielgens zu einem Referenzgen mit dem Verhältnis der beiden untersuchten Sequenzen in der $2,5 \times 10^3$ Kopien/ μ l Standard Probe (= Kalibrator) verglichen. Die relative Transkriptmenge, das heißt die Menge des

Zielgens nach interner Normalisierung auf die Menge des Referenzgens, wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Relative Transkriptmenge} = (M_{ZG}/M_{RG}) / (M_{ZSK}/M_{RSK}) \times MF$$

M_{ZG} = Menge des Zielgens in der Probe

M_{RG} = Menge des Referenzgens in der Probe

M_{ZSK} = Menge Zielsequenz im Kalibrator

M_{RSK} = Menge der Referenzsequenz im Kalibrator

MF = Multiplikationsfaktor, je nach Abundanz des Transkriptes $10^6 - 10^8$

Für die Quantifizierung eines Zielgenes X erfolgten PCR-Läufe mit Zielgen-X-spezifischen Primern unter Einsatz der cDNA des Zielgens-X, des Kalibrators und H₂O. Ein weiterer PCR-Lauf mit der gleichen cDNA wurde mit den Referenzgen-spezifischen Primern durchgeführt. Unter **Tabelle 5** ist das PCR-Programm dargestellt.

Tabelle 5: Das qPCR-Programm

Programm	Zyklen	Segment	Temp. [°C]	Zeit
Präinkubation	1		95	10 min
Amplifikation	45	Denaturierung	95	3 s
		Primerhybridisierung	60 - 63	10 s
		Elongation	72	20 s
Schmelzkurve	1	Denaturierung	95	5 s
		Hybridisierung	65	1 min
		Schmelzkurve	65-97 („ramp rate“ = 0,11°C/ sec)	
Kühlung	1		40	30 s

Das Fluoreszenzsignal wird in der Elongationsphase als Einzelwert aufgenommen und während der Schmelzkurve kontinuierlich. Die „ramp rate“ ist die Geschwindigkeit des Heizblocks. Während der Amplifikation heizt und kühlt er mit 20°C pro Sekunde. Für das Aufnehmen der Schmelzkurve ist der Temperaturanstieg auf 0,11°C pro Sekunde eingestellt.

4. RNA-Arbeitstechniken

4.1. Isolierung von RNA aus eukaryotischen Zellen

Die Isolierung von Gesamt-RNA erfolgte aus $0,5-1 \times 10^7$ Zellen mit dem *RNeasy Mini Kit* (Qiagen) nach Angaben des Herstellers. Für die Homogenisierung des Zelllysates wurde der

QIAshredder nach Herstellerprotokoll verwendet. Um Kontaminationen mit genomischer DNA in den RNA-Proben zu vermeiden, wurde ein DNase-Verdau direkt am Säulchen des *RNasy Mini Kits* durchgeführt. Die RNA wurde mit RNase-freiem Wasser eluiert und bei -80°C gelagert.

4.2. Spektrometrische Konzentrationsbestimmungen der RNA

Es wurden zwei Methoden angewandt. Zur schnellen Konzentrationsbestimmung wurden 2 µl der Probe bei 260 nm mit dem Nanodrop (PqLab) gemessen. Die Qualität der RNA-Proben wurde auf Verunreinigungen durch Proteine (280 nm) und organische Verbindungen (230 nm) überprüft. Das Verhältnis der Absorption $A_{260/280}$ und $A_{260/230}$ sollte bei etwa 2 liegen. Die Qualität der RNA wurde zudem durch elektrophoretische Auftrennung in einem denaturierenden Agarose-Gel überprüft.

4.3. Agarosegelelektrophorese von RNA

Die gelelektrophoretische Auftrennung von RNA erfolgte unter reduzierenden Bedingungen. Hierzu wurde die für ein 1,2 %-iges Gel benötigte Agarosemenge mit autoklaviertem H₂O aufgeköcht, auf ca. 60°C abgekühlt und durch Zugabe von 37 %-igem Formaldehyd und 10 x MOPS-Puffer auf 2,2 M Formaldehyd und 1 x MOPS eingestellt. 5 µg RNA wurden auf Eis in 2 µl 5 x MOPS, 3,5 µl Formaldehyd (37 %), 10 µl deionisiertem Formamid (100 %) und 0,08 µl Ethidiumbromid (10 µg/µl) vermischt und 15 min bei 56°C denaturiert. Anschließend wurden die Proben 5 min auf Eis gestellt, mit 2 µl Ladepuffer versetzt und auf das Gel aufgetragen. Der Gellauf erfolgte in 1 x MOPS bei 1-2 V/cm. Die Qualität der RNA wurde anhand der Banden der 18 S und 28 S rRNA beurteilt. An der Unterseite scharf begrenzte Banden sind Zeichen intakter RNA, während degradierte RNA einen Schmier erzeugt.

10 x MOPS:	0,4 M MOPS, pH7,0; 0,1 M Na-Acetat; 0,01 M EDTA, pH 8,0
RNA-Ladepuffer:	50 % Ficoll; 1 mM EDTA; 0,4 % Bromphenolblau

4.4. Reverse Transkription

Die DNase verdauten RNA-Proben wurden mittels *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems) in cDNA umgeschrieben. Für eine Reaktion wurden 2 µg RNA, 1 x dNTP-Mix, 1 x RT-Puffer, 1 x RT-*Random-Primer* und 1 µl MultiScribe™ reverse Transkriptase nach Angaben des Herstellers eingesetzt. Um der Degradation der RNA vorzubeugen wurde zusätzlich noch 10 U RNasin (Promega) zugegeben. Die Ansätze wurden mit RNase-freiem H₂O auf 20 µl Endvolumen aufgefüllt. Als Negativkontrolle wurde ein paralleler Ansatz mit H₂O anstelle der reversen Transkriptase mitgeführt. Die reverse Transkription wurde im Thermocycler (peqSTAR 2x) nach folgendem Programm durchgeführt: 10 min bei 25°C, anschließend 2 h bei 37 °C und zum Schluss noch 5 min bei 85°C. Die cDNA wurde unverdünnt oder in einer angemessenen Verdünnung für die qPCR-Analysen eingesetzt. Die Lagerung der cDNA erfolgte bei -20°C.

4.5. Genomweite Genexpressionsanalysen (Affymetrix *GeneChip*® *Human Gene 2.0 ST Array*)

4.5.1. Probenvorbereitung für die genomweite Genexpressionsanalyse

Für die Genexpressionsanalysen wurde aus je 1×10^7 Zellen RNA isoliert (siehe 4.1) und bei -80°C eingefroren. Zur Kontrolle der RNA-Qualität wurde ein Aliquot aufgetaut und im Agarosegel die 18S und 28S rRNA überprüft. Zusätzlich wurde die Zielgenaktivierung durch das induzierte EBNA2 anhand publizierter und gut aktivierbarer Beispiel-Zielgene in qPCR-Experimenten nachgewiesen. Waren diese Qualitätskontrollen alle in Ordnung, so wurden die eingefrorenen RNA-Proben zum Genzentrum gebracht und die weitere Aufarbeitung und Arrayhybridisierung durch Kerstin Maier (AG Cramer) durchgeführt. Im Folgenden ein kurzer Überblick über die Arbeitsschritte:

Zunächst wurden die präparierten RNA-Proben mittels speziellen *engineered random* Primern (*Ambion*® *WT Expression Kit*, Applied Biosystems) revers transkribiert. Diese *engineered random* Primer beinhalten den Promotor für die T7 Polymerase und sind so entwickelt worden, dass ribosomale RNA nicht transkribiert und amplifiziert wird. Nach Synthese der dsDNA wurde die cRNA (oder *antisense* RNA) mit der T7 RNA Polymerase *in vitro* transkribiert (Van Gelder, von Zastrow et al. 1990). Ausgehend von der cRNA konnte nun *sense-strand* cDNA mit *random* Primern und unter Verwendung einer definierten Menge dUTP/dTTP revers transkribiert werden. Nach cRNA-Hydrolyse kann anhand des eingebauten dUTPs die cDNA an definierten Stellen mit UDG (*Uracil DNA glycosylase*) und APE1 (*apurinic/apyrimidinic endonuclease 1*) fragmentiert werden. In einem letzten Schritt vor der Hybridisierung werden die cDNA-Fragmente durch Zugabe einer TdT (terminal deoxynucleotidyl transferase) und einem *DNA Labeling Reagent* (*GeneChip*® *WT Terminal Labeling and Hybridization Kit*, Affymetrix) markiert. Die Hauptkomponente des *DNA Labeling Reagent* ist *Biotin Allonamide Triphosphate*. Die so markierten cDNA-Fragmente werden auf einem *GeneChip*® hybridisiert und die Fluoreszenzintensität mit einem Array-Scanner gemessen. Die gleiche Prozedur wurde parallel mit Kontroll-poly-A RNA-Proben (im Kit enthalten) durchgeführt.

4.5.2. Darstellung der Genomweiten Expressionsanalysen mit Hilfe des Programmes *Genesis*

Die graphische Darstellung der Expressionswerte erfolgte mit der Software *Genesis* da. Dabei werden die RMA-Werte (siehe erster Ergebnisteil 1.3) auf einer Skala von -2 bis +2 normalisiert, als „Text, Tabstopp-getrennt“ in das Programm geladen und farbig dargestellt. Bei der Normalisierung der RMA-Werte für *Genesis* wird für jede Transkript-ID der Mittelwert der 6 Expressionswerte (3 unabhängige Experimente, induziert und nicht induziert) berechnet, dieser von den einzelnen Expressionswerten subtrahiert und das Ergebnis durch die Standardabweichung geteilt. Für die graphische Darstellung werden die normalisierten Expressionswerte dann durch eine Farbskala repräsentiert. Diese wurde so gewählt, dass hohe

Expressionswerte (+2) in rot, mittlere (0) in schwarz und niedrige (-2) in grün dargestellt werden.

5. MicroRNA-Arbeitstechniken

5.1. Isolierung von microRNA aus eukaryotischen Zellen

Die Isolierung kleiner RNA-Moleküle erfolgte aus 1×10^6 Zellen mit dem *PureLink® microRNA Isolation Kit* (Invitrogen) nach Angaben des Herstellers. Dieses Kit basiert auf einem 2-Säulchen System. Um die Affinität kleiner RNA-Moleküle an die feste Matrix zu erhöhen wird die Alkohol-Konzentration vor der Zugabe auf das zweite Säulchen auf 70 % erhöht. Beim ersten Durchgang werden RNA-Moleküle, die größer als 200 nt sind, abgefangen und nur das Eluat weiter verwendet. Beim 2. Durchgang wird die Affinität der kleinen RNA-Moleküle (>200 nt) an die, auf Siliziumdioxid basierende Matrix, durch Zugabe von Alkohol erhöht und somit an das Säulchenmaterial gebunden. Die kleinen RNA-Moleküle (inklusive microRNAs) wurden mit 40 µl RNase-freiem Wasser eluiert und bei -80°C gelagert.

5.2. Konzentrationsbestimmung der microRNA mit dem Qubit® Fluorometer

Die Konzentration der microRNA-Proben wurde nach Anfärben mit einem Fluoreszenzfarbstoff im Qubit (Qubit® 2.0 Fluorometer, Invitrogen) bestimmt. Es wurde das *Qubit® microRNA Assay Kit* laut Herstellerprotokoll verwendet.

5.3. Oligonukleotid-Design für die microRNA-Detektion

Die Quantifizierung von microRNAs über qPCR nach reverser Transkription benötigt aufgrund der geringen Molekülgröße ein spezielles Design der Oligonukleotide (Chen, Ridzon et al. 2005, Varkonyi-Gasic, Wu et al. 2007). Für die cDNA-Synthese wurde für jede microRNA ein 50 Nukleotide langes Erststrang-Oligonukleotid erstellt, das am 5'-Ende sechs komplementäre Basen zum 3'-Ende der jeweiligen microRNA enthält (**Abbildung 3**). Die anderen 44 Nukleotide besitzen eine selbstkomplementäre Sequenz, die eine Schleife („*stem loop*“) ausbilden kann. Durch die Ausbildung dieser Schleife wird gewährleistet, dass die Bindung der microRNA auf das 3'-Ende beschränkt ist. Diese spezielle Eigenschaft verhindert zusätzlich, dass Vorläufer der jeweiligen microRNA erkannt werden. Für die qPCR werden zwei weitere Oligonukleotide benötigt. Eines dieser Oligonukleotide wird spezifisch zur jeweiligen microRNA-Sequenz erstellt und dient als 5'-Primer (*forward*), wobei die zuvor für die cDNA-Synthese verwendeten sechs Basen am 3'-Ende der microRNA ausgespart werden. Das gegenläufige Oligonukleotid, der 3'-Primer (*reverse*) ist bei dieser Methode ein universelles Oligonukleotid, das in der Schleifensequenz des Erststrang-Oligonukleotids bindet (**Abbildung 3**).

5.4. Reverse Transkription der microRNAs

Für die reverse Transkription wurde das *High Capacity cDNA reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems) verwendet. Zunächst wurden eine Mischung aus der isolierten microRNA (max. 2

µg), 8 mM dNTPs und 0,5 µM des Erstrang-Oligonukleotids in 10 µl pro Ansatz hergestellt, 5 min auf 65°C inkubiert und sofort auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 10 µl einer Mischung aus 2 µl 10 x RT-Puffer (Kit), RNasin und 1 µl MultiScribe™ reverser Transkriptase wurden die Proben nach folgendem Programm inkubiert und anschließend auf -20°C gelagert:

- | | | | | |
|----|------|--------|---|-----------|
| 1. | 16°C | 30 min | } | 60 Zyklen |
| 2. | 30°C | 30 s | | |
| 3. | 42°C | 30 s | | |
| 4. | 50°C | 1 s | | |
| 5. | 85°C | 5 min | | |

5.5. Quantifizierung der microRNAs

Es erfolgte eine relative Quantifizierung der microRNA cDNAs via qPCR im LightCycler 480 II Gerät (Roche Diagnostic) ohne Standardkurve und Kalibrator. Die Menge an 721 cDNA wurde zum Vergleich in allen Proben auf 5000 Kopien gesetzt und es wurde mit einer optimalen Amplifikationseffizienz von 2 gerechnet. Die relative Quantifizierung der microRNA cDNA wurde mit dem *SYBR-Green I*-System in einem Gesamtvolumen von jeweils 10 µl im 96-well Format durchgeführt. Die PCR-Ansätze setzten sich nach Angaben des Herstellers aus je 0,5 µM *forward* und *reverse* Primer, 2 µl cDNA-*template* und 5 µl des *SYBR Green I Master Mix* zusammen. Die cDNA wurde 1:4 verdünnt eingesetzt.

Die qPCR-Reaktion wurde nach folgendem Programm durchgeführt:

Tabelle 6: qPCR-Programm für die Quantifizierung von microRNA-cDNA

Programm	Zyklen	Segment	Temp. [°C]	Zeit
Präinkubation	1		95	15 min
Amplifikation	45	Denaturierung	95	15 s
		Primerhybridisierung	70-60 (ab Zyklus 6 Reduktion der Temp. um 0,6°C pro Zyklus bis 60 °C)	1 min
			95	15 s
			65	10s
Schmelzkurve	1	Denaturierung	95	5 s
		Hybridisierung	65	1 min
		Schmelzkurve	65-97 („ramp rate“ = 0,11°C/sec)	
Kühlung	1		40	30 s

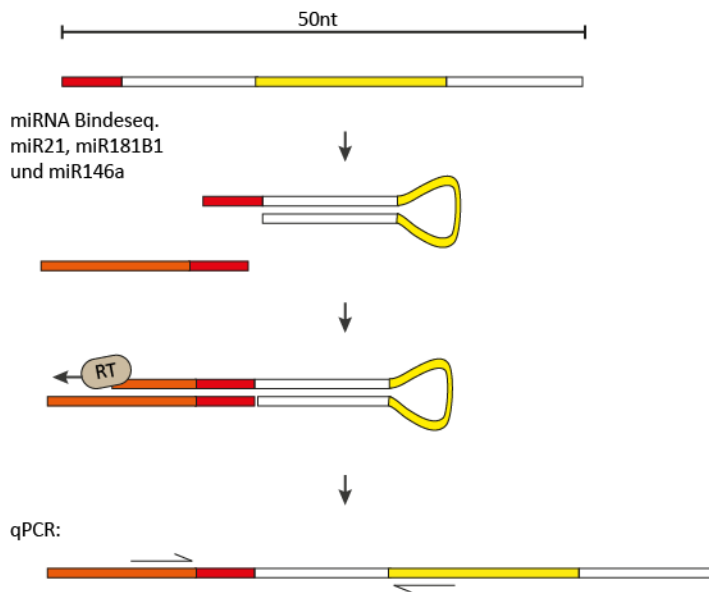


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Ablaufs der microRNA Quantifizierung.

Das Oligonukleotid für die cDNA Synthese sollte 50 nt lang sein, einen selbstkomplementären Bereich (weiß) aufweisen, der eine Schleife (gelb) ausbilden kann und 6 Nukleotide müssen komplementär zur untersuchenden microRNA sein (rot). Nach reverser Transkription (RT) wird die qPCR-Reaktion mit Primern durchgeführt, die komplementär zur neu synthetisierten cDNA (orange) und zum konstanten Bereich des Erstrang-Oligonukleotids (weiß oder gelb) sind.

6. Proteinbiochemische Methoden

6.1. Herstellung und Konzentrationsbestimmung von Zelllysaten

Zur Extraktion von Proteinen wurden $0,5 - 1 \times 10^7$ Zellen bei 300 g für 10 min abzentrifugiert, mit 1 ml PBS gewaschen und in 100 - 300 μ l RIPA-Puffer lysiert. Nach einer Inkubationszeit von 1 h bei 4°C wurde das Lysat für 10 x 30 s im Biorupter Ultraschallbad bei hoher Intensität sonifiziert. Unlösliche Bestandteile wurden abzentrifugiert (15000 g, 15 min, 4°C), der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei -80°C gelagert.

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte spektrometrisch unter Anwendung des Bradford-Assay. Zunächst wurde eine Eichkurve erstellt, indem je 1 ml 1:5 mit H₂O verdünnte Bradford-Lösung mit 1 bis 12 μ g Rinder-Serumalbumin (BSA) gemischt, und die Absorption der Lösungen im Spektralphotometer bei 595 nm gegen einen Leerwert gemessen wurden. Anschließend wurde die Absorption von 2 μ l Zelllysate gemessen und die Proteinkonzentration anhand der Eichkurve berechnet.

PBS:	37 M NaCl; 2,7 M KCl; 7,3 M Na ₂ HPO ₄ ; 1,5 M KH ₂ PO ₄ pH7,4
RIPA Puffer:	50 mM Tris/HCl pH 7,5; 150 mM NaCl; 1 % Igepal; 0,5 % DOC; 0,1 % SDS; 1x <i>Complete</i> Proteinase-Inhibitor (Roche) frisch hinzufügen
Bradford-Lösung:	0,01 % Coomassie Brilliant Blue G-250; 4,7 % Ethanol; 8,5 % Phosphorsäure

6.2. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen erfolgte unter reduzierenden Bedingungen in SDS-haltigen, diskontinuierlichen Polyacrylamid-Gelen. Das Detergens SDS wirkt denaturierend und bindet an Proteine proportional zu deren Molekulargewicht. Die negative Partialladung des SDS ermöglicht den gerichteten Lauf der Proteine im elektrischen Feld (Laemmli 1970). Es wurden 8, 10 oder 12 %-ige Trenngele und 5 %-ige Sammelgele aus einer 30 % Acrylamidlösung gegossen. Die Probe wurde in der entsprechenden Menge 2 x oder 5 x Laemmli-Puffer aufgenommen, 5 min bei 95°C gekocht und auf das Gel geladen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte pro Gel bei 25 mA für ca. 60 min in 1 x SDS Laufpuffer bei Raumtemperatur.

2 x Laemmli-Puffer:	4 % SDS; 20 % Glycerol; 120 mM Tris/HCL pH 6,8; 5 % Mercaptoethanol; Spatelspitze Bromphenol-Blau
5 x Laemmli-Puffer:	10 % SDS; 50 % Glycerol; 300 mM Tris/HCL pH 6,8; 12,5 % Mercaptoethanol; Spatelspitze Bromphenol-Blau
10 x SDS-Laufpuffer:	25 mM Tris Base; 200 mM Glycin; 0,1 % SDS

6.3. Western Blot

Die gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurden nach der SDS - PAGE auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Membran wurde zunächst durch 5 min Schwenken in 100 % Methanol aktiviert und zusammen mit Whatman-Papieren (3 mm), den Schwämmen der Western Blot-Apparatur und dem Trenngel in Transferpuffer äquilibriert. Anschließend wurde das *Blotting-Sandwich*, auf der Kathodenseite beginnend, folgendermaßen geschichtet: Schwamm, 2 Lagen Papier, Trenngel, PVDF-Membran und wiederum 2 Lagen Papier und der zweite Schwamm. Der Transfer erfolgte bei 400 mA für 1 h. Daraufhin wurde die Membran in PBS gewaschen und durch 30 - 60 min Inkubation in Blockpuffer abgesättigt. Die Inkubation mit dem in Blockpuffer oder 5 % BSA-Lösung verdünnten Primärantikörper erfolgte über Nacht bei 4°C. Nach mehrfachem Waschen der Membran mit PBS/Tween wurde die Membran 1h bei RT mit dem in Blockpuffer verdünnten, gegen den Isotyp des Primärantikörpers gerichteten Sekundärantikörper inkubiert und mehrfach mit PBS/Tween gewaschen. Der Sekundärantikörper ist mit dem Enzym Meerrettichperoxidase (HRP von *horseradish peroxidase*) gekoppelt und kann mit dem *Enhanced Chemiluminescence* (ECLTM, GE Healthcare) System nachgewiesen werden. Das im ECLTM System enthaltene Luminol wird von dem Enzym HRP mit Wasserstoffperoxid oxidiert, so dass Stickstoff und Licht emittiert werden. Die Lichtemission kann auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht werden.

Transferpuffer:	25 mM Tris Base; 192 mM Glycin; 0,1 % SDS; 20 % Methanol
Blockpuffer:	5 % Milchpulver; 50 mM Tris/HCL pH 7,5; 150 mM NaCl
PBS/Tween:	PBS mit 0,05 % Tween 20
BSA-Lösung:	5 % BSA; 50 mM Tris; 150 pH 7,4; 150 mM NaCl; 0,05 % Tween 20

6.4. Quantifizierung von Western Blot-Signalen

Das Licht, welches durch die Oxidation des Luminol im ECL™ System bei der Detektion von Western Blots emittiert wird, kann alternativ auch quantitativ durch einen CCD-Sensor (*charge-coupled device*) im Fusion FX7 aufgenommen werden. Der CCD-Sensor des Fusion-Gerätes ist ein lichtempfindliches Element mit 4,2 Megapixel. Durch den CCD-Sensor werden die durch Licht angeregten Elektronen in einer ladungsabhängigen Spannung ausgegeben. Das bedeutet, dass die detektierte Lichtmenge proportional zum ausgegebenen Signal ist und quantifiziert werden kann. Für die Quantifizierung wurde der Aufnahmemodus „*High Sensitivity*“ verwendet. Für die Quantifizierung der optischen Dichte der Signale wurde mit dem Programm Bio 1D (Vilber Lourmat) gearbeitet. In einem ersten Schritt kann man die Banden mit einem rechteckigen Rahmen auswählen. Um Fehlerquellen zu vermeiden, sollte man bei der Auswahl der Banden die Fläche des Hintergrundes im ausgewählten Rechteck so gering wie möglich halten. Als Hintergrundkorrektur wurde die „*rolling ball*“ Methode mit maximaler, vom Programm vorgegebenen, Balldurchmesser verwendet. Bei der nachfolgenden Signaltrennung wurde wieder darauf geachtet, die Hintergrundfläche so gering wie möglich zu halten. Als letzten Schritt definiert man bei der Bio 1D Software für ein Signal einen Referenzwert und bekommt relativ dazu die Werte aller anderen Signale. Für die Auswertungen wurde das Wildtyp-Signal auf 100 festgelegt.

Die Quantifizierung wurde immer in 2 aufeinanderfolgenden Western Blots mit den gleichen Lysaten durchgeführt. Beim ersten Western Blot wurden jeweils gleiche Proteinmengen des Gesamtzelllysates aufgetragen und die Signale mit dem EBNA2-spezifischen Antikörper R3 detektiert und wie beschrieben quantifiziert. Da die Menge an EBNA2-Wildtyp und -Mutanten in den Lysaten nach transienter Expression schwankt, wurde bei einem 2. Western Blot die Menge an aufgetragener Proteinmenge so angepasst, dass sich in allen Spuren die gleiche Menge an EBNA2-Wildtyp oder Mutanten befand. Von den auf diese Weise angepassten Western Blots wurden zur Kontrolle wiederum EBNA2-Quantifizierungen durchgeführt und zusätzlich Quantifizierungen von LMP1.

6.5. Immunpräzipitation

Für den Nachweis der Interaktion zweier oder mehrerer Proteine wurden Immunpräzipitationsversuche durchgeführt. Dafür wurden 1×10^7 DG75-Zellen geerntet, mit 1 ml PBS gewaschen und mit 500 µl NP-40 Lysepuffer resuspendiert (Harada, Yalamanchili et al. 2001). Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde auf Eis wurde durch Zentrifugation das restliche ungelöste Material entfernt (16000 g, 15 min, 4°C). Von den 500 µl Lysat wurden 50 µl für die Analyse im Western Blot abgenommen und mit den übrigen 450 µl die Immunpräzipitation durchgeführt. Das Lysat wurde mit 100 µl Antikörperüberstand oder je nach Antikörper 1 - 5 µg gereinigtem Antikörper gemischt und eine Stunde auf Eis inkubiert. Protein A oder G Sepharose-*beads* wurden durch dreimaliges Waschen mit NP-40 Lysepuffer äquilibriert und 15 µl einer 50 % Suspension mit Lysaten mit Antikörpern gemischt. Nun erfolgte eine weitere Inkubation bei 4°C über Nacht und unter Rollen der Proben. Am nächsten

Tag wurden die *beads* 3 Mal mit eiskaltem NP-40 Puffer gewaschen und anschließend die Proteinkomplexe mit 60 µl 2 x Laemmli von den *beads* eluiert. Die Analyse der Proben erfolgte im Western Blot

NP-40 Puffer: NP-40 (IGEPAL) 1 %; NaCl 150 mM; Tris/HCl 10 mM pH 7,4; EDTA 1 mM pH 8; Glycerol 3 %; 1 x Protease Inhibitor (*Complete*, Roche) jeweils kurz vor Gebrauch hinzufügen

6.6. Immunpräzipitation für die massenspektrometrische Analyse

Für die Immunpräzipitationsproben, die im Massenspektrometer analysiert werden sollten, musste das Protokoll in manchen Schritten angepasst werden.

Pro Immunpräzipitation wurden $1,8 - 2 \times 10^8$ DG75-Zellen geerntet, mit 10 ml PBS gewaschen und mit 4,5 - 5 ml NP-40 Lysepuffer resuspendiert (Harada, Yalamanchili et al. 2001). Nach einer Inkubationszeit von zwei Stunden wurde durch Zentrifugation das restliche ungelöste Material entfernt (4750 g, 30 min, 4°C). Die Proteinkonzentration des Lysats wurde mit dem Bradford-Test bestimmt und 20 mg für die Affinitätsreinigung eingesetzt. Ein Aliquot des Gesamtlisates wurde für die Analyse im Western Blot mit 2 x Laemmli-Puffer gemischt und eingefroren. Das Lysat (20 mg Protein) wurde mit NP-40 Lysepuffer auf 10 ml aufgefüllt und zunächst mit 300 µl äquilibrierten Protein G oder A Sepharose-*beads* 1 h vorinkubiert, um unspezifisch bindende Proteine zu depletieren. Der Überstand wurde im nächsten Schritt mit 600 µl äquilibrierten und Antikörper-gekoppelten Protein G oder A Sepharose-*beads* (siehe nächster Abschnitt) gemischt und bei 4°C über Nacht unter Rollen inkubiert. Am nächsten Tag wurden die *beads* 3 Mal mit 5 ml eiskaltem NP-40 Puffer und 2 Mal mit 5 ml eiskaltem PBS und einmal mit 1 ml eiskaltem PBS gewaschen. Die Zentrifugationsschritte wurden jeweils bei 500 g für 3 min durchgeführt. Beim letzten Waschschrift wurden die *beads* in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, der Überstand ein letztes Mal abgenommen und die Proteine mit 300 µl Laemmli von den *beads* eluiert. Zur Kontrolle wurden je 10 µl der Proben im Western Blot analysiert, der Rest der Probe wurde dem Kollaborationspartner Markus Priller (AG Hauck) zur massenspektrometrischen Analyse übergeben.

6.7. Kovalente Kopplung von Antikörpern an Protein A/G Sepharose-*beads*

Bei Immunpräzipitationsversuchen gibt es die Möglichkeit, den verwendeten Antikörper vor dem Kontakt mit dem Proteinlysate an die Protein A oder G *beads* chemisch zu koppeln. Für meine Versuche habe ich den HA 3F10-spezifischen Antikörper an Protein G Sepharose-*beads* gekoppelt. Dafür wurde 1 ml Protein G Sepharose-*beads* (Nettovolumen) zunächst 3 Mal mit PBS gewaschen. Die Zentrifugationsschritte wurden immer bei 500 g für 5 min durchgeführt. Die gewaschenen *beads* wurden mit 10 ml HA 3F10 Antikörperüberstand gemischt und 1 h bei Raumtemperatur unter Rollen inkubiert. Anschließend wurden die *beads* 2 x mit 10 ml 0,2 M Natriumborat (pH9) gewaschen. Beim 2. Waschschrift wurden zu den 11 ml *beads*-Natriumboratmischung 52 mg DMP zugegeben und 30 min unter Rollen bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Abzentrifugieren und Abnehmen des Überstandes, wurden die

beads in 0,2 M Ethanolamin (pH 8) resuspendiert und weitere 2 h unter Rollen bei Raumtemperatur inkubiert. Zum Schluss wurden die *beads* 2 Mal mit PBS gewaschen, in 1 ml PBS aufgenommen und bei 4°C gelagert.

6.8. Massenspektrometrische Analyse der Immunpräzipitate (LC-MS/MS)

Die massenspektrometrischen Analysen wurden von unserem Kooperationspartner Markus Priller (AG Hauck) durchgeführt. In diesem Kapitel soll ein kurzer Überblick über die erforderlichen Arbeitsschritte gegeben werden:

In einem ersten Schritt mussten die mit Laemmli-Puffer eluierten Proteine in einen neuen Puffer überführt und tryptisch verdaut werden. Dafür wurden die Proben zunächst verdünnt und auf einen 30 KDa *cut-off* Filter gegeben. Nach mehrmaligem Waschen wurde der tryptische Verdau der Proteine im Filter durchgeführt und die Peptide anschließend eluiert.

Im nächsten Schritt schaltet man bei sehr komplexen Proben vor die massenspektrometrische Analyse eine chromatographische Auftrennung der Peptide. In der AG Hauck wird ein Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC von *high performance liquid chromatography*) Verfahren verwendet. Das HPLC-Gerät, ein Ultimate3000 nano HPLC System (Dionex), ist über eine Elektronenspray-Ionisationsquelle direkt verbunden mit dem Massenspektrometer LTQ OrbitrapXL (Thermo Fisher Scientific). Die Peptide wurden in der HPLC nach dem Prinzip der Umkehrphasenchromatographie getrennt. Bei diesem Trennprinzip wird eine unpolare stationäre Phase verwendet und mit steigenden Konzentrationen eines polaren Lösungsmittels eluiert, bei unseren Versuchen mit 5 % bis 50 % Puffer B gemischt mit entsprechend 95 % bis 50 % Puffer A über 140 min. Alle Peptide, die bei 50 % Puffer B noch nicht eluierten wurden am Schluss mit einem Gradienten von 50 % bis 100 % Puffer B in 5 min von der Säule gewaschen.

Die Identifikation von Proteinen im Massenspektrometer basiert auf der Bestimmung des Verhältnisses von Masse zu Ladung (m/z) der Peptid-Ionen in Gasphase. Über die Elektrospray-Ionisation werden die Fraktionen von der HPLC direkt verdampft und ionisiert. Im Massenspektrometer werden die Peptid-Ionen in einem elektrischen Feld beschleunigt, nach Masse und Ladung getrennt und detektiert. Um die Selektivität und Sensitivität der nachfolgenden Quantifizierung der Proteine zu verbessern, wurde bei unseren Versuchen eine tandem-massenspektrometrische Analyse durchgeführt (MS/MS). Das bedeutet, dass 2 unterschiedliche Arten der Ionendetektion für die gleiche Probe angewandt werden. Zunächst werden die ionisierten Peptide in einer Orbitrap detektiert, einer Ionenfalle mit einer spindelförmigen Elektrode. Die 10 häufigsten Peptid-Ionen wurden nochmals fragmentiert und in einer zweiten linearen Ionenfalle erneut detektiert.

Puffer A:	5% Acetonitril; 0,1 % Methansäure
Puffer B:	80 % Acetonitril; 0,1 % Methansäure

6.8.1. Auswertung der LC-MS/MS-Daten

Die aufgenommenen Spektren der unmarkierten Peptide (*label-free*) wurden mit Hilfe der *Progenesis LC-MS Software* (Nonlinear, Version 2.5) quantifiziert. Zur Identifizierung der Peptide wurden die Spektren in Mascot exportiert und anhand der *ensembl* Datenbank zugeordnet. Mit einem *Confidence-Score* >13 wurde ein Peptid als richtig identifiziert eingestuft.

7. Chromatinimmunpräzipitation (ChIP)

7.1. Präparation von fragmentiertem Chromatin

Für die Chromatinpräparation wurden je 4×10^7 Zellen abzentrifugiert (300 g, 10 min, 4°C), zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und in 20 ml kaltem RPMI 1640 Medium (ohne Zusätze) resuspendiert. Für den Vernetzungsschritt wurde die Zellsuspension mit 540 µl 37%-igem Formaldehyd (Endkonzentration 1 %) versetzt und für 5 min (DG75-Zellen) unter rollen des 50 mL Röhrchens bei RT inkubiert. Zur Beendigung der Reaktion wurde die Suspension mit 2 ml 1,25 M Glycin gemischt, 5 min bei RT inkubiert und anschließend auf Eis gestellt. Die Zellen wurden abzentrifugiert (500 g, 5 min, 4°C), zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen (500 g, 5 min, 4°C) und dabei in ein 15 ml-Röhrchen überführt. Zur Isolierung der Zellkerne wurden die Zellen 3-mal mit 10 ml eiskaltem Lysepuffer gewaschen (300 g, 10 min, 4°C) und das Zellpellet in 2 ml SDS Lysis-Puffer resuspendiert. Die Fragmentierung des Chromatins erfolgte mit dem Covaris S220 mit fokussiertem Ultraschall

Einstellungen:

Peak Incident Power (PIP): 105 Watt

Cycles per Burst (CB): 200

Duty Factor (DF): 20 %

Dauer: 30 min

Das Chromatin wurde von den Covaris Röhrchen in beschichtete (*low binding*) 1,6 ml Reaktionsgefäße überführt und bei 15000 g und 4°C für 10 min abzentrifugiert. Die Überstände wurden anschließend in einem neuen Reaktionsgefäß vereinigt. Für die spätere Quantifizierung wurden 25 µl Aliquots (1/10 der in die Immunpräzipitation eingesetzten Chromatinmenge) als „Input-Probe“ entnommen und bei -80°C aufbewahrt. Mit jeweils 250 µl Chromatinlösung wurden die Immunpräzipitationen durchgeführt.

Zum Überprüfen der Chromatinfragmentierung wurde zunächst die Vernetzung durch Proteinase K Verdau und Hitzeinkubation bei 65 °C über Nacht revertiert, die DNA mittels des *PCR Purification Kits* (Quiagen) extrahiert und mit dem DNA 1000 Kit (Agilent) nach Angaben des Herstellers die Größe der Fragmente im Bioanalyzer (Agilent) überprüft.

Lysepuffer:	10 mM Tris/ HCl, pH 7,5; 10 mM NaCl; 3 mM MgCl ₂ ; 0,5% NP-40; 1 x Complete Proteinase Inhibitor
SDS Lysis Puffer:	50 mM Tris/ HCl, pH 8,1; 10 mM EDTA pH 8; 0,1 % SDS; 1 x Complete Proteinase Inhibitor

7.2. Immunpräzipitation der Protein-DNA-Komplexe und DNA-Extraktion

Für die Immunpräzipitation der vernetzten Protein-DNA-Komplexe wurden je 250 µl des fragmentierten Chromatins in beschichteten 1,6 ml Reaktionsgefäßen mit IP-Verdünnungspuffer auf ein Volumen von 1,25 ml gebracht (SDS-Endkonzentration 0,1 %). Dem verdünnten Chromatin wurden 5 µg Antikörper zugesetzt, falls es sich um einen aufkonzentrierten Antikörper bekannter Konzentration handelte, bzw. 100 µl Antikörper, wenn es sich um Hybridomzellüberstände unbekannter Konzentration handelte. Neben dem Ansatz mit dem spezifischen Antikörper wurde stets ein paralleler Ansatz mit einer geeigneten Isotypkontrolle mitgeführt. Die Proben wurden dann über Nacht bei 4°C rollend inkubiert. Die Präzipitation erfolgte mit Hilfe von Protein G Sepharose-*beads*. Diese wurden zunächst durch 2-maliges Waschen mit IP-Verdünnungspuffer äquilibriert und mit demselben Puffer auf eine 50 %-ige Suspension eingestellt. Die Antikörper-Chromatin-Ansätze wurden mit je 100 µl der 50 %-igen Protein G Sepharose-Suspension versetzt und für 3 h bei 4°C rollend inkubiert. Anschließend wurden die *beads* durch Zentrifugation sedimentiert (2000 g, 2 min, 4°C) und einmal mit 1 ml Waschpuffer I, ein weiteres Mal mit 1,5 ml Waschpuffer I, sowie einmal mit 1,5 ml Waschpuffer II und einmal mit 1,5 ml Waschpuffer III gewaschen. Die *beads* wurden dabei jeweils 5 min in dem jeweiligen, eiskalten Waschpuffer unter rollen der Eppendorf Gefäße in einem 50 ml Röhrchen inkubiert, anschließend abzentrifugiert (2000 g, 2 min, 4°C) und der Überstand jeweils verworfen. Anschließend erfolgten 2 Waschschrte mit einminütiger Inkubationszeit in je 1 ml eiskaltem TE (versetzt mit 1 x *Complete* Proteinase Inhibitor). Nach erneuter Sedimentation der *beads* (2000 g, 2 min, 4°C) wurde der Überstand komplett abgenommen und die Immunkomplexe eluiert. Hierzu wurden die *beads* mit 200 µl vorgewärmtem Elutionspuffer (65°C) versetzt und für 15 min bei 65°C unter Schütteln inkubiert. Die Proben wurden abzentrifugiert (5000 g, 2 min, RT) und 150 µl des Überstandes in ein neues, beschichtetes Reaktionsgefäß überführt. Der Elutionsschritt wurde anschließend mit weiteren 100 µl Elutionspuffer wiederholt und die Überstände vereinigt.

Zur Revertierung der Vernetzung wurden die Eluate der Chromatinimmunpräzipitation (je 300 µl), sowie die mit Elutionspuffer auf 300 µl aufgefüllten Input-Proben (aus 7.1) mit jeweils 22,5 µl Proteinase K (20 µg/ µl) versetzt, für 1 h bei 42°C und anschließend über Nacht bei 65°C inkubiert. Die Aufreinigung der DNA erfolgte mit dem *PCR Purification Kit* (Quiagen) nach Angaben des Herstellers. Die DNA-Proben wurden bis zur Quantifizierung mittels q-PCR-Versuchen bei -20°C gelagert.

IP-Verdünnungspuffer:	20 mM Tris/ HCl, pH 8,0; 2 mM EDTA, pH 8,0; 350 mM NaCl; 1% Triton X-100; 1 x <i>Complete</i> Proteinase Inhibitor
Waschpuffer I:	20 mM Tris/ HCl, pH 8,0; 2 mM EDTA, pH 8,0; 150 mM NaCl; 0,1% SDS; 1% Triton X-

	100; 1 x <i>Complete</i> Proteinase Inhibitor
Waschpuffer II:	20 mM Tris/ HCl, pH 8,0; 2 mM EDTA, pH 8,0; 500 mM NaCl; 0,1% SDS; 1% Triton X-100; 1 x <i>Complete</i> Proteinase Inhibitor
Waschpuffer III:	10 mM Tris/ HCl, pH 8,0; 2 mM EDTA, pH 8,0; 250 mM LiCl; 1% NP-40; 1% Natrium-Deoxycholat; 1 x <i>Complete</i> Proteinase Inhibitor
Elutionspuffer:	25 mM Tris/ HCl, pH 7,5; 10 mM EDTA, pH 8,0; 0,5% SDS

7.3. Quantifizierung von DNA nach Chromatinimmunpräzipitation

Die Quantifizierung von DNA nach Chromatinimmunpräzipitation erfolgte mit einem LightCycler 480 II Gerät (96-Loch Version) unter Verwendung des *LightCycler 480 SYBR Green I Master Kits* (beides von Roche Diagnostics) nach Angaben des Herstellers. Die PCR-Ansätze setzten sich zusammen aus je 0,5 μM *forward* und *reverse* Primer, 2 μl cDNA-*template* und 5 μl des *SYBR Green I Master-Mix*.

Für die Quantifizierung der koprizipitierten DNA-Fragmente wurde die Vernetzung von fragmentiertem Gesamtchromatin durch Proteinase K Verdau und Hitzeinkubation revertiert und die DNA extrahiert (gleiche Aufarbeitung wie die „Input-Probe“, siehe 7.1). Definierte Mengen dieser DNA wurden seriell verdünnt, unter Verwendung des entsprechenden Primerpaares amplifiziert (200, 20, 2, 0,2 und 0,02 ng DNA pro PCR-Ansatz) und die Amplifikationseffizienz bestimmt. Für die absolute Quantifizierung der im ChIP-Experiment koprizipitierten DNA erfolgte ein PCR-Lauf unter Einsatz der Input-Proben (im Duplikat) und der ChIP-Proben, sowie 2 Ansätzen eines Standards und einem Ansatz mit H_2O . In **Tabelle 5** ist das Temperaturprofil dargestellt. Als Standard diente die 10 ng/ μl DNA Verdünnungsstufe aus der Erstellung der Standardkurve. Anhand der erstellten Standardkurven konnte den Cp -Werten der Input-Probe und der ChIP-Proben die zugehörige DNA-Menge zugewiesen werden. Die im ChIP-Experiment koprizipitierte DNA-Menge wurde als prozentualer Anteil der Input-Probe berechnet. Die Anreicherung an einem bestimmten Ort im Genom nach Immunpräzipitation wird somit als „% Input“ dargestellt.

8. Kernspinresonanzspektroskopie oder NMR-Spektroskopie (von *nuclear magnetic resonance*)

8.1. Expression und Aufreinigung der END-Domäne für die NMR-Spektroskopie

Die Expression und Aufreinigung der rekombinanten END-Domäne wurde in der AG Sattler (Neuherberg) durchgeführt. Im Folgenden die wichtigsten Parameter der Experimente:

Rekombinante Proteine wurden in *Escherichia coli* BL21 (DE3) exprimiert. Nach Transformation der Bakterien wurden diese auf einer Kanamycin-Selektionsplatte ausgestrichen und davon eine 5 ml Vorkultur mit LB-Medium angeimpft. Für unmarkierte Proteine wurde für die Expression in größeren Volumen weiterhin LB Medium verwendet. Für die ^{15}N - oder ^{13}C -Isotopenmarkierung wurde Minimalmedium verwendet (M9) und als einzige

Kohlenstoff- oder Stickstoffquelle [$U\text{-}^{13}\text{C}$]-D-Glukose und/oder $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ zugegeben. Die Kultur wurde bei 37°C bis zu einer Dichte von OD 0,8 geschüttelt, anschließend auf 20°C abgekühlt und die Expression über Nacht (16 h) durch Zugabe von 0,5 mM Isopropyl β -D-1-thiogalaktopyranosid induziert (IPTG). Am nächsten Tag wurden die Bakterien geerntet (8000 g, 20 min), sonifiziert (6 min, 30 % Amplitude, Fisher Scientific F-550) und in Lysepuffer aufgenommen. Das Bakterienlysate wurde mit äquilibrierter Ni-NTA (*nickel-nitrilotriacetic acid*)-Agarose über Nacht bei 4°C inkubiert und anschließend auf eine Chromatographie-Säule (BioRad) geladen. Die Säule wurde mehrmals mit Lysepuffer gewaschen und anschließend das exprimierte Protein (END-Domäne) mit Elutionspuffer eluiert. Für den *Tabacco Etch Virus*- (TEV) Proteaseverdau musste der Elutionspuffer gegen TEV-Puffer dialysiert werden. Die TEV-Protease wurden im molaren Verhältnis 1:10 zu rekombinanten Protein eingesetzt und der Verdau über Nacht bei 4°C durchgeführt. Durch den TEV-Protease Verdau wurde ein Z-Tag von der END-Domäne entfernt, der zur besseren Löslichkeit des Proteins beiträgt. Zur Aufreinigung wurde die Probe auf einen Ionenaustauschsäule (Resource Q, GE Healthcare) gegeben und mit einem NaCl-Gradienten wieder eluiert. Ein letzter Aufreinigungsschritt erfolgte über eine Größenausschlusschromatographie (HiLoad 16/60, Superdex 75, GE Healthcare).

Lysepuffer:	20 mM Tris pH 7,5; 300 mM NaCl; 10 mM Imidazol; 0,02 % NaN_3 ; 0,2 % IGEPAL, Proteaseinhibitor, DNase, Lysozym
Elutionspuffer:	20 mM Tris pH 7,5; 300 mM NaCl; 330 mM Imidazol; 0,02 % NaN_3
TEV-Puffer:	10 mM NaP pH 6,9; 150 mM NaCl; 1 mM DTT; 0,02 % NaN_3

8.2. NMR-Spektroskopie

Die NMR-Versuche wurden von Anders Friberg (AG Sattler) durchgeführt. Hier eine Zusammenfassung der wichtigsten Daten zur Methode:

Zur Aufnahme der NMR-Spektren stand ein Bruker Instrument mit Protonenresonanzfrequenzen von 500, 600, 750, 800 und 900 MHz zur Verfügung. Mit diesem Gerät kann man Feldgradienten-NMR-Spektren aufnehmen und es besitzt für die Kühlung der Proben einen sog. Cryo-Probenkopf. Die Spektren wurden bei 323 K (50°C) von 1 mM Proteinproben in NMR-Puffer aufgenommen. Die Prozessierung der Spektren wurde mit NMRPipe (Delaglio, Grzesiek et al. 1995), die Analyse mit NMRview (Johnson and Blevins 1994) und Sparky3 (<http://www.cgl.ucsf.edu/home/sparky/>) durchgeführt.

Die folgenden multidimensionalen heteronuklearen Untersuchungen zur Bestimmung der Rückgrat-Amide und der Seitengruppen wurden durchgeführt: ^1H - ^{15}N -HSQC (*hetero nuclear single quantum coherence*), ^1H - ^{13}C -HSQC, HNCA, HNCACB, CBC(CO)NH, (H)CC(CO)NH-TOCSY (*total correlated spectroscopy*), H(C)CH-TOCSY und HCC(H)-TOCSY. Aromatische Protonen wurden durch zweidimensionale Spektren bestimmt: (HB)CB(CG, CD)HD und (HB)CB(CG, CD, CE)HE. Die räumliche Zuordnung der Methylgruppen von Leucin- und Valin-Seitengruppen erfolgte über den Unterschied von Vorhandensein oder Fehlen der skalaren Kopplung bei partieller ^{13}C Isotopenmarkierung in zweidimensionalen ^1H - ^{13}C HSQC Spektren (Neri, Szyperski et al. 1989). Die Strukturbestimmung der END-Domäne beruhte hauptsächlich auf

Abstandsbestimmungen zwischen ^1H -Kernen, ermittelt durch NOE-Kontakte (*Nuclear Overhauser Effect* (NOE) = Polarisations- oder Magnetisierungstransfer). Die Abstandsbeschränkungen in unserem Versuch wurden über dreidimensionale NOESY (*Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy*) Experimente ermittelt: ^1H - ^{15}N HSQC-NOESY, ^1H - ^{13}C -HMQC-NOESY für aliphatische und aromatische Regionen und ^{13}C -editierte- ^{15}N / ^{13}C -gefilterte NOESY für aliphatische Regionen. Für intermolekulare NOE-Spektren musste das Dimer der END-Domäne denaturiert und erneut gefaltet werden. Um dies zu erreichen wurden äquimolare Mengen nicht-markierten und isotoopenmarkierten Proteins mit 8M Harnstoff versetzt und anschließend für 10 min auf 80°C erhitzt. Zum Schluss mussten die Proben 2 Mal bei 4°C gegen NMR Puffer dialysiert werden. Um die Sensitivität einiger Experimente zu erhöhen und um die Analysen der Spektren zu vereinfachen, wurden die Proben lyophilisiert und in D_2O aufgenommen.

Die NOESY Spektren wurden mit der CYANA v3.0 (Guntert 2004) Software ausgewertet. Für die Bestimmung der Diederwinkel-Beschränkungen wurde die Software TALOS+ (Shen, Delaglio et al. 2009) verwendet. Hierfür wird ein drei-Aminosäurereste-langes Sequenzstück mit der Sequenz von 20 gut definierten Proteinstrukturen verglichen. Liegt Sequenzhomologie vor und sind die chemischen Verschiebungen für $^1\text{H}_\alpha$, $^{13}\text{C}_\alpha$, $^{13}\text{C}_\beta$, $^{13}\text{C}'$ und ^{15}N ähnlich, so wird angenommen, dass auch die Werte für die Diederwinkel vergleichbar sind. Dies wurde auch manuell überprüft und weniger glaubwürdige Vorhersagen entfernt. Die endgültige Strukturberechnung erfolgte in ARIA (Linge, O'Donoghue et al. 2001). Aus 100 berechneten Strukturen wurde eine Auswahl von 10 getroffen, deren Energien minimal sind und die den gleichen Beschränkungen folgen. Für die Qualitätsanalyse der Struktur, z.B. für die Bestimmung, ob die Beschränkungen der Winkel und Abstände eingehalten wurden, wurde mit iCing (<http://nmr.cmbi.ru.nl/NRG-CING/HTML/index.html>) gearbeitet, ein Web-Interface, mit dem man auf PROCHECK (Laskowski, Moss et al. 1993) und WHATCHECK (Vriend 1993) zugreifen kann. Abbildungen wurden in Pymol v1.5 (Schrödinger 2010) generiert.

^1H - ^{15}N heteronukleare NOEs wurden bei 318 K mit einer 500 μM ^{15}N -Isotopenmarkierten Proteinprobe gemessen (bei einer Larmor-Frequenz von 750 MHz) und mit NMRView analysiert. Bei den Hydrogen-Deuterium Austauschexperimenten (H/D-Austausch) wurden ^1H - ^{15}N HSQC-Spektren aufgenommen, 10 min nach Lösen von lyophilisierten Proteinproben in D_2O . Diese Spektren wurden mit Referenzspektren von in H_2O gelösten Proteinproben verglichen. Beide Spektren wurden bei 313 K aufgenommen um die Austauschrate der Amid-Protonen mit dem Lösungsmittel zu verringern. Alle Signale über dem Hintergrundsignal wurden als Signale von Amid-Protonen gedeutet, die nicht mit dem Lösungsmittel in Berührung kommen.

NMR-Puffer: 20 mM NaH_2PO_4 pH 6,9; 20 mM NaCl; 0,02 % NaN_3

IV. Ergebnisse Teil 1

Identifizierung von Zielgenen, die CBF1-unabhängig von EBNA2 reguliert werden können

EBNA2 wurde in der Literatur mehrfach als Transkriptionsaktivator viraler und zellulärer Zielgene beschrieben. Besonders von Bedeutung für die Transkriptionsregulation sind die zwei Transaktivierungsdomänen des Proteins, eine N-terminale und eine C-terminale. Während der erste Teil die Zielgenregulation durch EBNA2 behandelt, beschäftigt sich der zweite Ergebnisteil mit einer detaillierten Studie der Transaktivierungsdomäne am N-Terminus.

Als Vermittler der Interaktion von EBNA2 mit der DNA ist bisher hauptsächlich CBF1 beschrieben worden (siehe Einleitung 2.2). Nach ChIP-seq Versuchen in einer Studie von Zhao und Kollegen mit LCLs sind 3710 von 5151 gefundenen EBNA2-Bindestellen in der Nähe eines signifikanten CBF1 ChIP-Seq-Signals (± 100 bp). Die verbleibenden 1441 EBNA2-Bindestellen befinden sich nach der bioinformatischen Auswertung von Zhao und Kollegen nicht in der Nähe eines signifikanten CBF1-Signales und wurden „EBNA2-only“-Bindestellen genannt (Zhao, Zou et al. 2011).

Man findet in der Literatur noch 2 weitere potentielle EBNA2-DNA Adapter, PU.1 und ZNF143. ZNF143 wird in der Einleitung einer Publikation als EBNA2-DNA Adapter beschrieben, einen experimentellen Nachweis dazu wird in der Publikation nicht beschrieben (Portal, Zhou et al. 2013). PU.1 wurde mehrmals als wichtiger Transkriptionsfaktor im Zusammenhang mit EBNA2 dargestellt. 2004 konnte eine Interaktion zwischen EBNA2 und PU.1 gezeigt werden (Laux, Dugrillon et al. 1994, Johannsen, Koh et al. 1995, Sjoblom, Jansson et al. 1995, Yue, Davenport et al. 2004). In der Studie von Zhao und Kollegen überlappen 17 % der EBNA2-Bindestellen mit PU.1-Bindestellen (Zhao, Zou et al. 2011).

Es liegt nahe, dass im EBNA2-Proteinkomplex neben CBF1 noch mehr DNA-bindende Proteine zu finden sind. Gibt es also demnach Gene, die CBF1-unabhängig durch EBNA2 reguliert sind? Wie wirkt sich die Zusammensetzung des Proteinkomplexes auf die Transaktivatorfunktion von EBNA2 aus?

Eine neue Strategie, diese Fragen zu beantworten, wird in diesem Ergebnisteil ausgearbeitet. Der Ausgangspunkt dieser Strategie ist eine Zelllinie, bei der CBF1 deletiert wurde (Maier, Santak et al. 2005). Des Weiteren besitzt diese CBF1-negative Zelllinie, genauso wie die CBF1-positive Ausgangszelllinie, ein induzierbares Expressionssystem für EBNA2. Vergleiche genomweiter Expressionsstudien dieser CBF1-positiven und CBF1-negativen Zelllinie vor und nach Induktion des Transkriptionsfaktors EBNA2 können Antworten auf die im letzten Abschnitt gestellten Fragen geben.

1. Genomweite, vergleichende Genexpressionsanalyse CBF1-positiver und CBF1-negativer Zellen vor und nach EBNA2-Expression

1.1. Molekulare Eigenschaften von DG75 Burkitt-Lymphomzellen und der Einfluss von EBNA2

Die Proliferation von Burkitt-Lymphomzellen wird entscheidend durch die konstitutive Expression des Onkogens *c-myc* gesteuert. Wie in der Einleitung bereits beschrieben (Einleitung 1.1), wird MYC in Burkitt-Lymphomzellen aufgrund einer chromosomale Translokation zusammen mit IgM konstitutiv exprimiert (Spencer and Groudine 1991). Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass der virale Transkriptionsfaktor EBNA2 die Expression von IgM reprimiert. Die Repression von IgM durch EBNA2 führt zu Korepression von MYC und trägt in Burkitt-Lymphomzellen zum allmählichen Wachstumsstillstand der Zellen bei (Jochner, Eick et al. 1996). Die verwendeten DG75 Burkitt-Lymphomzellen besitzen eine Verdopplungszeit von ca. 24 Stunden (Dufva, Flodin et al. 2002). Der allmähliche, EBNA2-induzierte Wachstumsstillstand der Zellen ist eine Einschränkung des Systems, kam aber in dieser Arbeit nicht zum Tragen, da alle Versuche in kurzen Zeiträumen nach EBNA2-Induktion durchgeführt wurden (maximal 24h).

1.2. Modifizierte Burkitt-Lymphomzelllinien als Modellsysteme

Für die Expressionsstudien wurde die EBV-negative Burkitt-Lymphomzelllinie DG75 verwendet. Die Zelllinie wurde ursprünglich aus Zellen eines Pleuraergusses eines Kindes mit Abdominallymphom etabliert (Ben-Bassat, Goldblum et al. 1977). Die Zelllinie ist für die im Folgenden dargestellten Experimente gut geeignet, da es sich um schnell proliferierende Suspensionszellen handelt, die gut transfizierbar sind (ca. 60 % der Zellen werden erreicht, Daten nicht gezeigt). Eine ehemalige Doktorandin der AG Kempkes konnte das Gen für CBF1 in dieser Zelllinie deletieren und die gut proliferierende Zelllinie SM224.9^{CBF1 neg.} etablieren (Maier, Santak et al. 2005).

Zwei weitere Zelllinien standen für die Doktorarbeit aus Vorarbeiten zur Verfügung. Zum einen SM295 und zum anderen SM296^{CBF1 neg.}. SM295 wurde ausgehend von DG75 und SM296^{CBF1 neg.} ausgehend von SM224.9^{CBF1 neg.} durch stabile Transfektion eines ER/EBNA2-kodierenden Vektors etabliert. ER/EBNA2 ist ein Fusionsprotein aus EBNA2 und der Hormonbindedomäne des Östrogenrezeptors (Kempkes, Pawlita et al. 1995). Dieses Fusionsprotein wird nach dessen Expression im Zytoplasma zurückgehalten und wandert erst nach Östrogenzugabe in den Zellkern, wo es als Transkriptionsaktivator wirken kann. EBNA2-Expressionsanalysen mit dieser Kombination aus EBV-negativen, modifizierten DG75 Burkitt-Lymphomzelllinien sind bisher einzigartig. SM224.9^{CBF1 neg.} ist die einzige, derzeit existierende humane B-Zelllinie mit einer Deletion des CBF1. Durch die induzierbare Expression des ER/EBNA2 kann mit dieser Zelllinie gezielt die EBNA2-Transaktivierung in CBF1-negativen

und CBF1-positiven Zellen mit gleichem zellulärem Hintergrund untersucht werden. **Abbildung 4** zeigt schematisch, wie die eben beschriebenen Zelllinien entstanden sind.

In der Publikation von Maier et al. (2005) wird beschrieben, dass es keinen Unterschied in der Viabilität und der Proliferation zwischen DG75 und SM224.9^{CBF1 neg.} Zellen gibt. In meinen Händen proliferierten die CBF1-neg. Zellen etwas langsamer, ansonsten konnte ich keinen Unterschied im Phänotyp erkennen.

Der CBF1 k.o. wurde im Western Blot mit allen Kontrollen überprüft. Die CBF1-negativen Zelllinien SM224.9^{CBF1 neg.} und SM296^{CBF1 neg.} exprimieren kein CBF1, welches vom CBF1-spezifischen Antikörper 7A11 erkannt werden kann (Daten nicht gezeigt).

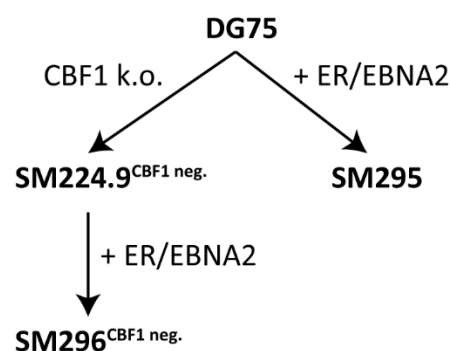


Abbildung 4: Entstehungsweg der Zelllinien für die Expressionsstudien dieser Arbeit.

SM295 ist ausgehend von DG75 stabil mit dem ER/EBNA2-Konstrukt transfiziert. SM296^{CBF1 neg.} stammt auch ursprünglich von DG75 ab, bei dieser Zelllinie wurde zuerst CBF1 deletiert und anschließend das ER/EBNA2 Konstrukt stabil transfiziert.

1.3. Genexpressionsanalyse mit dem *GeneChip® Human Gene 2.0 ST Array*

Die Genexpressionsprofile der Zelllinien DG75, SM224.9^{CBF1 neg.}, SM295 und SM296^{CBF1 neg.} wurden mit Hilfe von *GeneChip® Human Gene 2.0 ST Arrays* der Firma Affymetrix erstellt.

Mit dem *GeneChip® Human Gene 2.0 ST Array* können 30645 kodierende Transkripte, 11086 lincRNAs (*long intergenic non-coding RNA transcripts*) und 148 microRNAs detektiert werden. Jedes der 30645 kodierenden Transkripte ist im Durchschnitt mit 21 Oligonukleotiden abgedeckt. Da eines dieser Oligonukleotide 25 bp umfasst, werden bei diesem Array im Durchschnitt 525 bp pro Transkript abgefragt. Alle Oligonukleotide, die ein Transkript abdecken, werden unter einer ID zusammengefasst.

Um Signalstärkeunterschiede zu korrigieren, die aus Probenmarkierung, Hybridisierungseffekten oder anderen Faktoren resultieren können, wurden die Daten nach der RMA (*robust multichip average*)-Methode normalisiert. Für die statistische Auswertung wurde der limma (*linear models for microarray analysis*) t-test mit dem zur Basis 2

logarithmierten RMA-Werten durchgeführt. Bei der Analyse der EBNA2-regulierten Zielgene wurden nur solche mit einem p-Wert von maximal 0,05 betrachtet.

1.3.1. Grenzen des Arraysystems

Bei dem sehr sensitiven *GeneChip*® 2.0 ST Array von Affymetrix kann es vorkommen, dass Gene, die über qPCR nicht mehr eindeutig nachweisbar sind, in den Ergebnislisten der gut regulierten Zielgene auftauchen. Um ein Gefühl dafür zu bekommen, welche Werte bei den Ergebnissen der Expressionsarrays dieser Arbeit eher zum Hintergrund gezählt werden müssen, wurden die RMA-Werte von Genen, welche in qPCR-Versuchen nicht mehr einwandfrei detektiert werden konnten (Cp-Wert > 34), untersucht. Beispiele für Gene, die nach qPCR-Versuchen als nicht exprimiert eingestuft wurden (Cp-Wert > 34), sind die EBNA2-Zielgene *DNAse1L3*, *LRRN3* und *GPR183* in DG75-Zellen (nicht induziert, da kein EBNA2 vorhanden; siehe **Abbildung 11 A**). Die dazugehörigen RMA-Werte aus den Daten der *GeneChip*® 2.0 ST Arrays liegen bei Werten bis max. 52 (Mittelwert *DNAse1L3*: 52, Mittelwert *LRRN3*: 39 und Mittelwert *GPR183*: 35; siehe **Tabelle 22** auf CD). Bei den folgenden Ergebnissen werden Transkripte, die einen kleineren RMA-Wert als 52 aufweisen, gesondert erwähnt und von weiteren Analysen ausgeschlossen. Ein RMA-Wert kleiner als dieser hiermit festgelegte Schwellenwert von 52 gilt somit als Indikator dafür, dass das untersuchte Transkript möglicherweise gar nicht exprimiert wird. Eine nach der Auswertung der Genexpressionsdaten gefundene „Regulation“ eines solchen sehr schwach exprimierten Genes hat wahrscheinlich *in vivo* keinen Effekt auf die Zelle (z.B. von einem RMA-Wert 14 „aktiviert“ auf einen RMA-Wert von 39).

1.4. RNA-Präparationen und Arrayhybridisierungen

Für alle folgenden Analysen wurde die Gesamt-RNA der Zelllinien DG75, SM224.9^{CBF1 neg.}, SM295 und SM296^{CBF1 neg.} verwendet, jeweils im Grundzustand und 24 Stunden nach Östrogenzugabe. Es wurden je 3 biologische Replikate untersucht. Insgesamt wurden demnach Genexpressionsanalysen von 24 Proben durchgeführt und analysiert. Die RNA-Präparation und die Qualitätskontrolle der Proben wurde von mir vorgenommen, die Durchführung der cRNA und cDNA Synthesen, Markierung der cDNA Fragmente und die Hybridisierung der *GeneChip*® 2.0 ST Arrays (Affymetrix) wurden von Kerstin Maier (AG Cramer) am Genzentrum durchgeführt (siehe auch **Methoden 4.5**). Die Ergebnisse wurden in Zusammenarbeit mit dem Bioinformatiker Florian Erhard (AG Zimmer, Institut für Informatik, LMU) ausgewertet.

1.5. Möglichkeiten der Zielgenanalysen

Die genomweiten Expressionsanalysen wurden mit 4 Zelllinien in je 2 unterschiedlichen Zuständen durchgeführt (jeweils Grundzustand und nach Östrogenzugabe). Mathematisch gibt es bei 8 Zuständen 28 Möglichkeiten je 2 Zustände ohne Wiederholung miteinander zu vergleichen (**Abbildung 5**). Ich werde in dieser Arbeit hauptsächlich auf 6 der 28

Möglichkeiten, die biologisch am relevantesten sind, eingehen. Diese 6 Zielgenanalysen sind folgende:

1 und 2: Kontrollanalyse von exprimierten Transkripten in DG75- und SM224.9^{CBF1 neg.}-Zellen vor/nach Zugabe von Östrogen (Kontrolle des Östrogeneinflusses auf DG75-Zellen)

3 Analyse der exprimierten Transkripte in SM295-Zellen vor/nach ER/EBNA2-Induktion (EBNA2-Zielgene in CBF1-positiven DG75-Zellen)

4 Analyse der exprimierten Transkripte in SM296^{CBF1 neg.}-Zellen vor/nach ER/EBNA2-Induktion (EBNA2-Zielgene in CBF1-negativen DG75-Zellen)

5 und 6 Vergleich der exprimierten Transkripte in DG75/SM224.9^{CBF1 neg.} und SM295/SM296^{CBF1 neg.} ohne Östrogen im Medium (potentielle CBF1-reprimierte Gene in DG75abstammenden Zellen)

In **Abbildung 5** sind die Zielgenanalysen, die ich im Folgenden auswerten und diskutieren möchte, rot markiert.

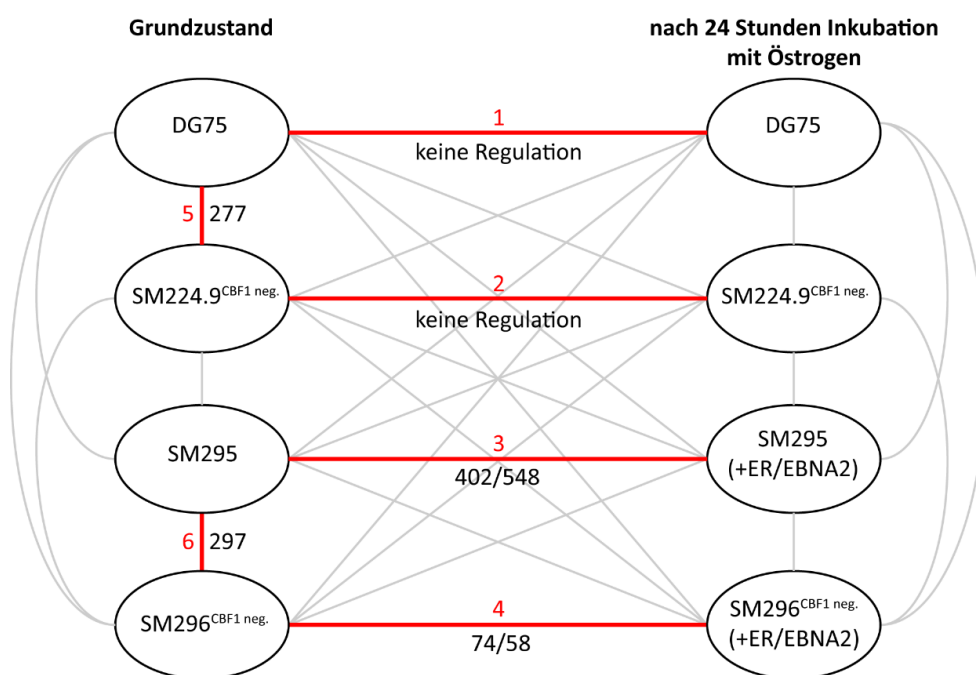


Abbildung 5: 28 Möglichkeiten 4 Zelllinien in je 2 Zuständen miteinander zu vergleichen.

Schematische Übersicht der Möglichkeiten für vergleichende Analysen der Expressionsdaten der Zelllinien DG75, SM224.9^{CBF1 neg.}, SM295, und SM296^{CBF1 neg.}. Die in dieser Arbeit durchgeführten Zielgenanalysen und Vergleiche sind rot markiert und rot nummeriert. Die Zahlenangaben des Vergleichs 3 und 4 geben die EBNA2-reprimierten/aktivierten Zielgene wider. Die Zahl, die bei Vergleich 5 und 6 angegeben ist, ist die Anzahl der jeweils potentiellen CBF1-reprimierten Transkripte.

1.6. Darstellung von 950 mindestens 2-fach EBNA2-regulierter Transkripte der 4 untersuchten Zelllinien

Abbildung 6 A gibt eine erste Übersicht zu den Ergebnissen der 24 Datensätze aus den Expressionsstudien. Die Grundlage der Darstellung sind die 950 Transkripte, die in SM295-Zellen mindestens 2-fach durch EBNA2 reguliert sind (p-Wert < 0,05; **Abbildung 6 A**, Spalte 13-18). In den Spalten 1-12 und 19-24 sind die normalisierten RMA-Werte der gleichen Transkripte aus den Daten der Expressionsstudien mit DG75, SM224.9^{CBF1 neg.} und SM296^{CBF1 neg.} zum Vergleich dargestellt (siehe auch **Tabelle 23** auf CD).

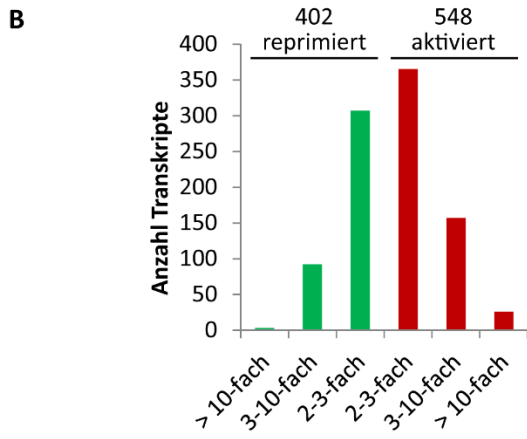
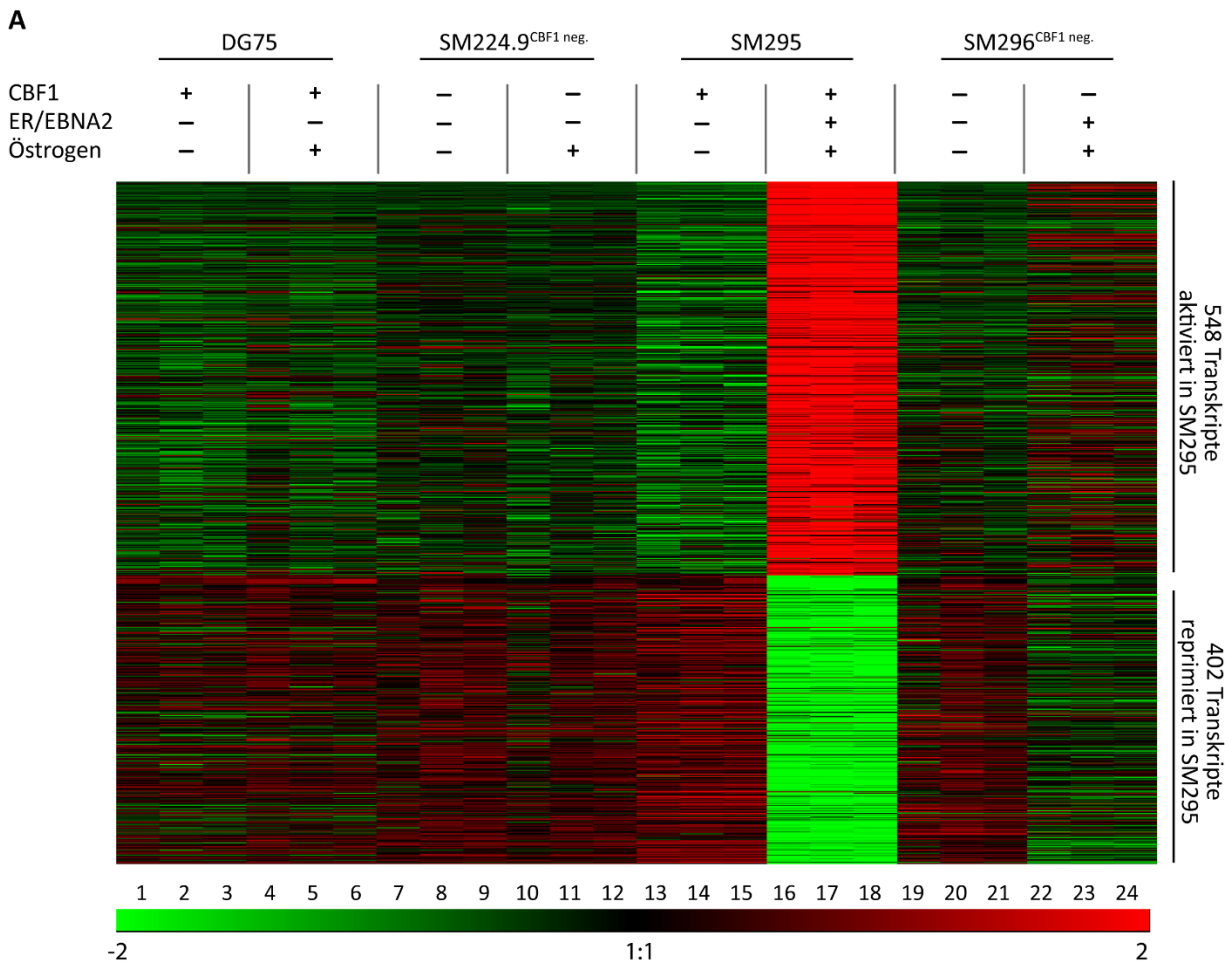


Abbildung 6: Zusammenstellung der Expressionsdaten der 950 EBNA2-regulierten Transkripte aller untersuchten Zelllinien.

(A) Das Übersichtsbild ist ausgehend von den 950 mindestens 2-fach EBNA2-regulierten Transkripten in SM295-Zellen (p -Wert $< 0,05$) entstanden (Spalte 13-18). Für jedes Transkript wurden die Expressionswerte der 24 Proben auf eine Skala von -2 bis +2 normalisiert (siehe Methoden 4.5.2.) und mit der Software *Genesis* dargestellt. Hohe Expressionswerte sind rot, mittlere in schwarz und niedrige in grün dargestellt. Spalten 1-12 zeigen die Kontrollen für die Induktion mit Östrogen (siehe auch Vergleich 4 und 5 in Kapitel 1.5). Spalte 13-18 zeigen die EBNA2-regulierten Transkripte in SM295-Zellen, Spalte 19-24 die gleichen Transkripte in SM296^{CBF1 neg.}-Zellen. (B) Das Balkendiagramm zeigt, wie stark die 950 Transkripte in SM295-Zellen aktiviert bzw. reprimiert sind.

Aus der Übersicht in **Abbildung 6 A** kann man entnehmen, dass Transkripte, die in SM295-Zellen reguliert sind (Spalte 13-18) zum Teil auch in SM296^{CBF1 neg.} reguliert sind (Spalte 19-24). Spalten 1-12 stellen Kontrollen dar, bei denen der Einfluss des Östrogens auf die Zellen überprüft wurde. Es fällt auf, dass das Expressionsniveau in SM224.9^{CBF1 neg.}-Zellen (Spalte 7-12) etwas höher ist (Übersicht zeigt mehr schwarze/rote Felder) als in DG75-Zellen (Spalte 1-6, Übersicht zeigt mehr grüne Felder). Ein höheres Expressionsniveau in SM224.9^{CBF1 neg.} im Vergleich zu DG75-Zellen wäre plausibel, da in SM224.9^{CBF1 neg.} das repressorische Protein CBF1 nicht exprimiert wird. Des Weiteren gibt es in DG75 und in SM224.9^{CBF1 neg.} keine signifikant östrogenregulierten Transkripte (siehe auch nächstes Kapitel). Insgesamt scheint das Experiment nach dieser ersten Übersicht über eines Teils der Daten erfolgreich verlaufen zu sein, da die 3 biologischen Replikate pro Zelllinie und Zustand (je 3 Spalten nebeneinander) als 3-er Blöcke erkennbar sind. Dies bedeutet, dass die Replikate ähnliche Werte aufweisen. Bemerkenswert ist, dass einige Transkripte in SM295-Zellen sehr stark durch EBNA2 induziert sind. Die meisten Transkripte sind 2-3-fach aktiviert, 157 Transkripte sind 3-10-fach aktiviert und 26 Transkripte sogar über 10-fach. Bei den reprimierten Transkripten ist die größte Gruppe auch die mit 2-3-fach reprimierten Transkripten. 92 Transkripte sind 3-10-fach reprimiert und 3 stärker als 10-fach (**Abbildung 6 B**).

1.7. Die Östrogenbehandlung von DG75-Zellen führt zu keinen signifikanten Veränderungen der Genexpressionsprofile

Aus der Analyse der Expressionsdaten von DG75- und SM224.9^{CBF1 neg.}-Zellen ergibt sich, dass es keine Veränderungen der Expression nach Zugabe von Östrogen mit einem p -Wert kleiner als 0,05 gibt. Zur Verdeutlichung dieser Aussage wird im folgenden Absatz ein Beispiel erläutert:

Führt man die Auswertung der Expressionsdaten aus DG75-Zellen durch und sortiert nach den am stärksten aktivierten Genen nach 24 Stunden Inkubation mit Östrogen, so findet man an erster Stelle die ID 16650933 mit einer x -fachen Anreicherung von 2,2-fach und einen p -Wert von 0,36. Ähnliche Ergebnisse erhält man bei der Analyse der Expressionsdaten aus SM224.9^{CBF1 neg.}-Zellen, sowohl bei „aktivierten“ als auch bei „reprimierten“ Transkripten. Das bedeutet, dass das am stärksten Östrogen-aktivierte Transkript (2,2-fach) stark schwankende Ergebnisse der 3 Replikate aufweist und demnach nicht signifikant (p -Wert $> 0,05$) reguliert

ist. Diese Analysen zeigen, dass Östrogen keine signifikanten Veränderungen der Genexpression in DG75 und SM224.9^{CBF1 neg.} auslöst.

Betrachtet man bekannte östrogenregulierte Gene wie *TFF*, *GREB* und *NRIP* (Rae, Johnson et al. 2005, Carroll, Meyer et al. 2006, Tveito, Andersen et al. 2011), so findet auch hier keine Regulation nach 24 Stunden Inkubation der DG75-Zellen unter Anwesenheit von Östrogen statt (**Abbildung 7**).

Des Weiteren ist der Östrogenrezeptor 1 (ESR1) in DG75-Zellen kaum exprimiert. Allerdings wurde der Östrogenrezeptor 2 (ESR2) als der hauptsächlich in Immunzellen exprimierte Östrogenrezeptor beschrieben (Gustafsson 2000). Auch in DG75-Zellen ist dieser schwach exprimiert (**Abbildung 7**), offensichtlich aber nicht in der ausreichenden Menge um die Transkription östrogenresponsiver Gene zu beeinflussen.

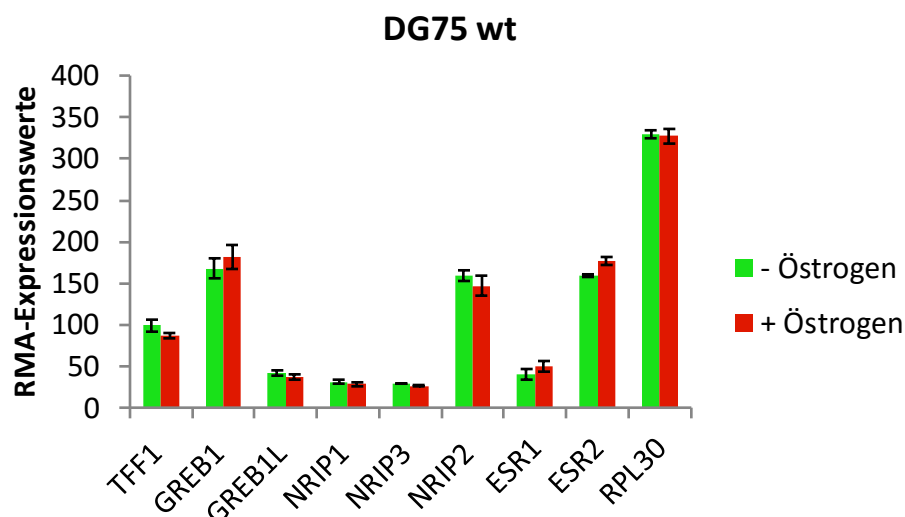


Abbildung 7: Bekannte östrogenresponsive Gene werden nicht durch Östrogen induziert.

Gezeigt sind die RMA-Expressionswerte aus dem *GeneChip® 2.0 ST Array* einiger bekannter östrogenregulierter Gene (*TFF1*, *GREB1*, *GREB1L*, *NRIP1*, *NRIP2*, *NRIP3*), des Östrogenrezeptors 1 und 2 (*ESR1* und *ESR2*) und zum Vergleich des Haushaltsgens *RPL30*. Ein Balken repräsentiert jeweils den Mittelwert aus 3 unabhängigen Versuchen mit dazugehöriger Standardabweichung. *TFF* = *trefoil factor*; *GREB* = *growth regulation by estrogen in breast cancer*; *NRIP* = *nuclear receptor interacting protein*, *ESR* = *estrogen receptor*

1.8. EBNA2-Zielgenregulation in DG75-B-Zellen

1.8.1. Die Regulation bereits publizierter EBNA2-Zielgene konnten in dieser Studie in EBNA2-induzierbaren DG75-Zellen bestätigt werden.

Genomweite EBNA2-Zielgenstudien wurden in der Vergangenheit schon mehrmals publiziert. Bisher sind Daten von 3 größeren Expressionsstudien verfügbar (Maier, Staffler et al. 2006, Spender, Lucchesi et al. 2006, Zhao, Maruo et al. 2006). Viele EBNA2-Zielgene, die in diesen

Studien beschrieben wurden, konnten mit den Daten der Expressionsstudie dieser Arbeit bestätigt werden. In **Abbildung 8** sind die RMA-Werte der SM295-Expressionsdaten einiger dieser bekannten EBNA2-Zielgene gezeigt. Einige Zielgene, wie z.B. *CD23* oder *CD21* wurden schon 1987 und 1990 als EBNA2-induzierte Gene identifiziert und konnten in DG75-abstammenden SM295-Burkitt-Lymphomzellen in dieser Arbeit bestätigt werden (Wang, Gregory et al. 1987, Cordier, Calender et al. 1990). Im unteren Teil der Abbildung sind die x-fachen Induktionswerte gezeigt. Bei diesen Daten fällt auf, dass die x-fache Induktion sehr hoch sein kann, die Expression der Gene aber gering ist, wie am Beispiel von *SLAMF1* oder *DNASE1L3* gezeigt. Die RMA-Werte der gezeigten Expressionsdaten in **Abbildung 8** sind nach Aktivierung durch EBNA2 alle höher als der unter **1.3.1** (Ergebnisse Teil1) festgelegte Grenzwert von 52. Demnach werden diese Gene wahrscheinlich exprimiert sobald EBNA2 im Zellkern aktiv ist.

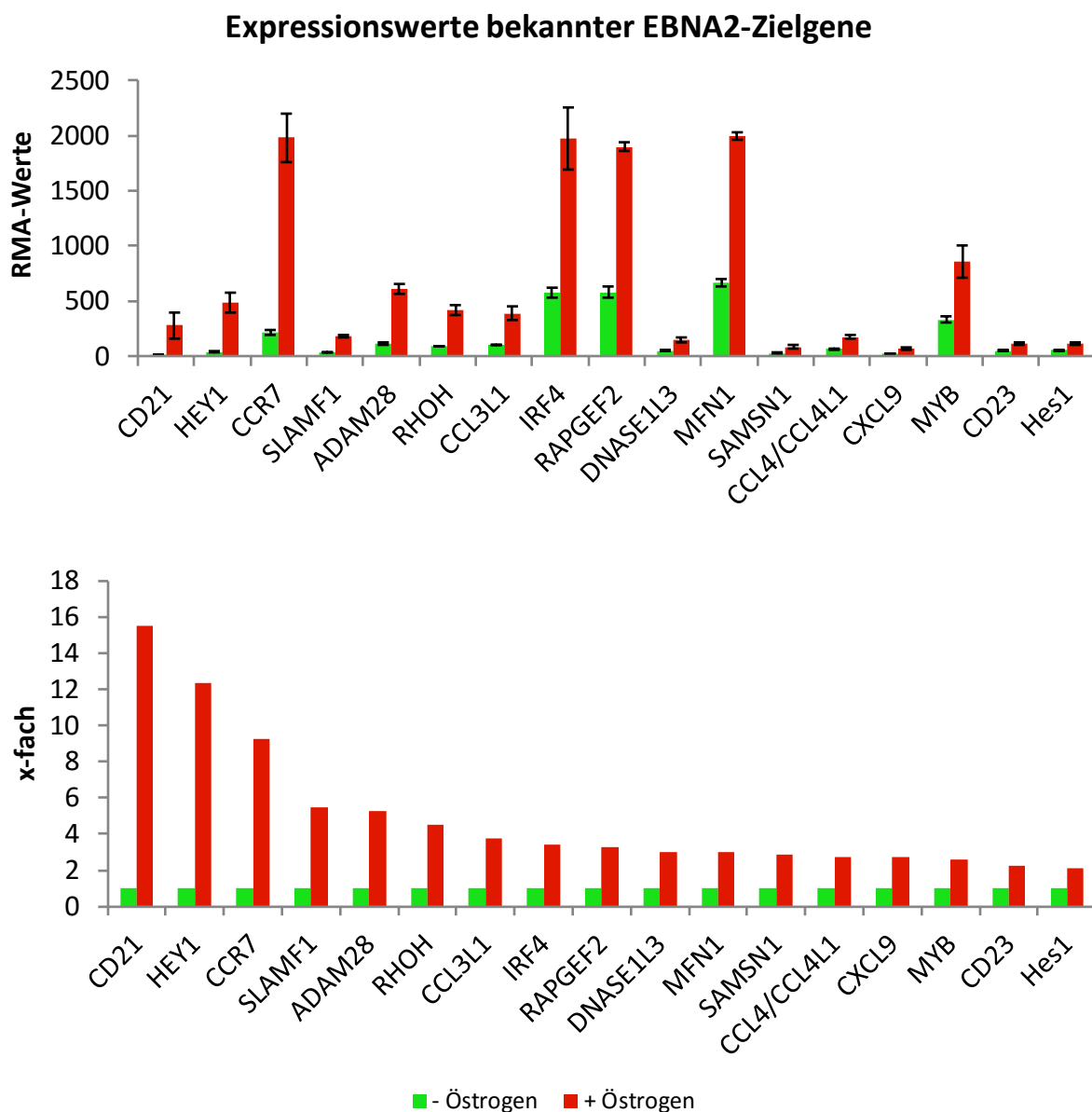


Abbildung 8: Aus der Literatur bekannte EBNA2-Zielgene.

Abbildung 8: Aus der Literatur bekannte EBNA2-Zielgene.

Im oberen Diagramm sind die RMA-Werte aus den *GeneChip® 2.0 ST Arrays* der SM295-Zellen im induzierten und nicht-induzierten Zustand von 17 bereits publizierten EBNA2-Zielgenen gezeigt. Es sind die Mittelwerte aus je 3 unabhängigen Experimenten mit den entsprechenden Standardabweichungen dargestellt. Die Anordnung erfolgte von den am stärksten induzierten (links) bis zu den am schwächsten induzierten (rechts) Zielgenen der ausgewählten Gruppe. Im unteren Diagramm sind die Werte für die x-fache Aktivierung graphisch dargestellt, wobei dem nicht-induzierten Zustand der Wert 1 zugeordnet wurde.

1.8.2. In DG75-abstammenden Burkitt-Lymphomzellen SM295 werden 99 Transkripte mindestens 4-fach durch EBNA2 aktiviert

Die Analyse der SM295-Expressionsdaten vor und nach EBNA2-Induktion mit Östrogen ergab insgesamt 950 mindestens 2-fach signifikant regulierte Transkripte, 548 hoch- und 402 herunterregulierte ($p\text{-Wert} < 0,05$, siehe **Abbildung 6** und **Tabelle 23** auf CD). In **Abbildung 9** sind die mindestens 4-fach regulierten Transkripte mit einem $p\text{-Wert} < 0,001$ gezeigt (siehe auch **Tabelle 12** im Anhang). Man findet 99 hochregulierte und 37 herunterregulierte Transkripte. Unter den 99 hochregulierten Transkripten sind 70 proteinkodierende Gene, darunter auch die bekannten EBNA2-Zielgene *CD21 (CR2)*, *HEY1*, *CCR7*, *SLAMF1*, *ADAM28* und *RHOH*, 18 lincRNAs, 4 microRNAs und 7 nicht annotierte Transkripte (hier sind nur die Transkript-IDs der *ensembl* Datenbank angegeben). Die herunterregulierten Transkripte teilen sich auf in 26 annotierte Gene, 6 lincRNAs, 1 microRNA und 4 nicht annotierte Transkripte.

Ein weiteres bekanntes EBNA2-Zielgen ist das Proto-Onkogen *MYC*. Da SM295-Zellen von der Burkitt-Lymphomzelle DG75 abstammen, wird *MYC* in diesen Zellen reprimiert. Die Repression wird durch die Translokation t(14:8) verursacht, durch die der Promotor des EBNA2-reprimierten IgM vor das *MYC*-Gen verlagert wird (siehe auch Einleitung **2.4.1**). In der Auflistung in **Abbildung 9** taucht *MYC* nicht auf, da es nur 3,5-fach reprimiert ist ($p\text{-Wert} = 6,51 \times 10^{-10}$, siehe **Tabelle 22** auf CD), und hier nur die mindestens 4-fach signifikant regulierten EBNA2-Zielgene gezeigt sind.

Betrachtet man nun die Höhe der einzelnen RMA-Werte genauer, um nicht Transkripte zu beschreiben, die kaum oder gar nicht in der Zelle exprimiert sind, so findet man unter diesen 136 EBNA2-regulierten Transkripten nur ein Transkript, das nach Aktivierung oder vor Repression unter dem RMA-Schwellenwert von 52 liegt (siehe Ergebnisse Teil 1, **1.3.1**). Dies ist die lincRNA EDIL3-1, die von RMA-Wert 8 auf 32 aktiviert wird. Alle anderen 135 Transkripte weisen höhere RMA-Werte auf.

Versucht man die Zielgene nach ihrer Funktion zu gruppieren, so finden sich einige durch EBNA2 aktivierte Transkripte, die für Oberflächenmoleküle wie CD69, CD226 und CD48 kodieren, aber auch 2 reprimierte Transkripte für Oberflächenmoleküle CD86 und CD180. Im Folgenden werden hauptsächlich die aktivierten EBNA2-Zielgene behandelt. Funktionell sind EBNA2-reprimierte Zielgene interessant. Der Mechanismus für die Repression durch dieses

virale nukleäre Antigen ist aber nur schwer zugänglich. Repression könnte durch sekundäre Effekte zustande kommen, also z.B. durch die Aktivierung von Transkriptionsrepressoren oder regulatorischen RNA-Molekülen.

Eine weitere Gruppe aus den mind. 4-fach durch EBNA2 aktivierten Genen kann man unter der Überschrift „Komponenten des G-Protein-Signalweges“ zusammenfassen, namentlich *GPR183*, *GPR174*, *GPR18*, *RGS1* und *RGS13*

Auffällig bei den aktivierten Transkripten ist die große Anzahl an stark regulierten *long intergenic noncoding* RNAs (lincRNAs), unter anderen auch ein Pärchen mit einem proteinkodierenden Transkript, *IKZF2* und einem nichtkodierenden Transkript mit gleicher Nomenklatur, *lincIKZF2-2*. Die lincRNA *IKZF2-2* ist im Genom (hg19) ca. 80 kb stromaufwärts des *IKZF2* lokalisiert.

1.9. EBNA2-Zielgenregulation in DG75-B-Zellen, die kein CBF1-Protein exprimieren

CBF1-unabhängig EBNA2-regulierte Zielgene wurden in der Literatur bisher noch nicht beschrieben. Anhand der genomweiten Expressionsstudien der CBF1-negativen Zelllinie SM296^{CBF1 neg.} konnten in dieser Arbeit 132 mindestens 2-fach regulierte Transkripte nachgewiesen werden (p-Wert < 0,05), 58 davon induziert und 74 reprimiert (**Abbildung 10 A**, siehe auch **Tabelle 13** im Anhang). Die zahlreichsten Transkripte sind die 2-3-fach reprimierten mit 59 Transkripten, darauf folgen 35 Transkripte, die 2-3-fach induziert sind. 3-10-fach EBNA2-reprimiert sind 15 Transkripte und 3-10-fach aktiviert sind 18 Transkripte. Stärker als 10-fach regulierte Transkripte findet man in CBF1-negativen Zellen nur unter den EBNA2-induzierten Transkripten mit 2 Vertretern (**Abbildung 10 A**, rechtes Diagramm).

Mindestens 4-fach reguliert (p-Wert von maximal 0,001) sind 21 Transkripte, 15 induziert und 6 reprimiert. Diese 21 Transkripte sind wahrscheinlich auch wirklich exprimiert, da alle induzierten Transkripte nach EBNA2-Aktivierung und alle reprimierten vor EBNA2-Aktivierung RMA-Werte aufweisen, die größer sind als 52 (siehe **1.3.1**). Die 15 induzierten Transkripte teilen sich auf in 12 proteinkodierende, eine lincRNA und 2 nicht annotierte Transkripte (hier sind nur die Transkript-IDs der *ensembl* Datenbank angegeben). Unter den 6 reprimierten Transkripten sind 4 proteinkodierende, eine lincRNA und ein nicht annotiertes Transkript (**Abbildung 10 B**; siehe auch **Tabelle 13** und **Tabelle 14** im Anhang).

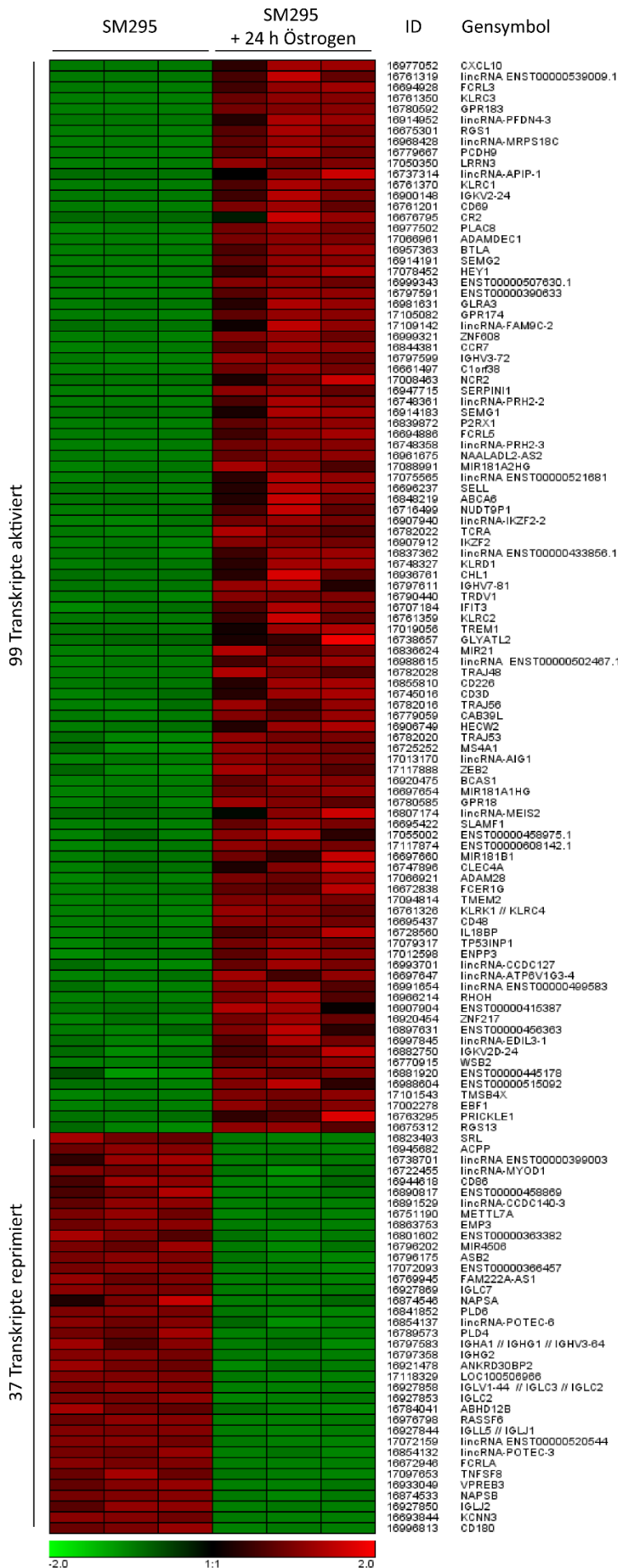
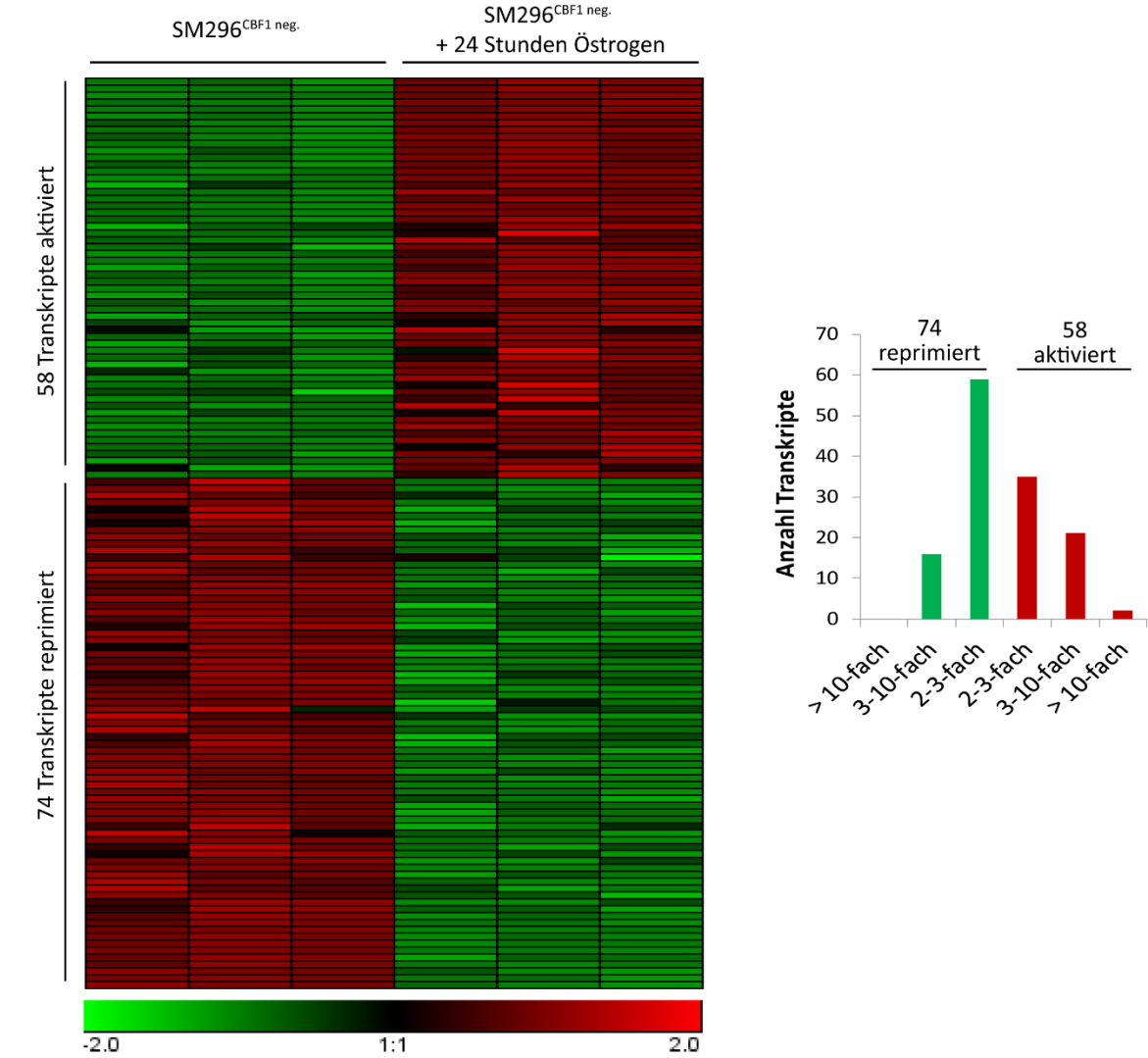


Abbildung 9: Differentielle Genexpressionsprofile von SM295-Zellen vor und nach EBNA2-Induktion.

Dargestellt sind die 136 mindestens 4-fach durch EBNA2 regulierten Transkripte (p-Wert < 0,001) aus je 3 unabhängigen *GeneChip® 2.0 ST Arrays*, absteigend geordnet nach den x-fachen Induktionswerten (*CXCL10* ist am stärksten positiv reguliert). Für jedes Transkript wurden die RMA-Expressionswerte mit der Software *Genesis* auf eine Skala von -2 bis +2 normalisiert. Hohe Expressionswerte sind rot, mittlere in schwarz und niedrige in grün dargestellt (siehe auch **Tabelle 12**).

A) 2-fache Regulation



B) 4-fache Regulation

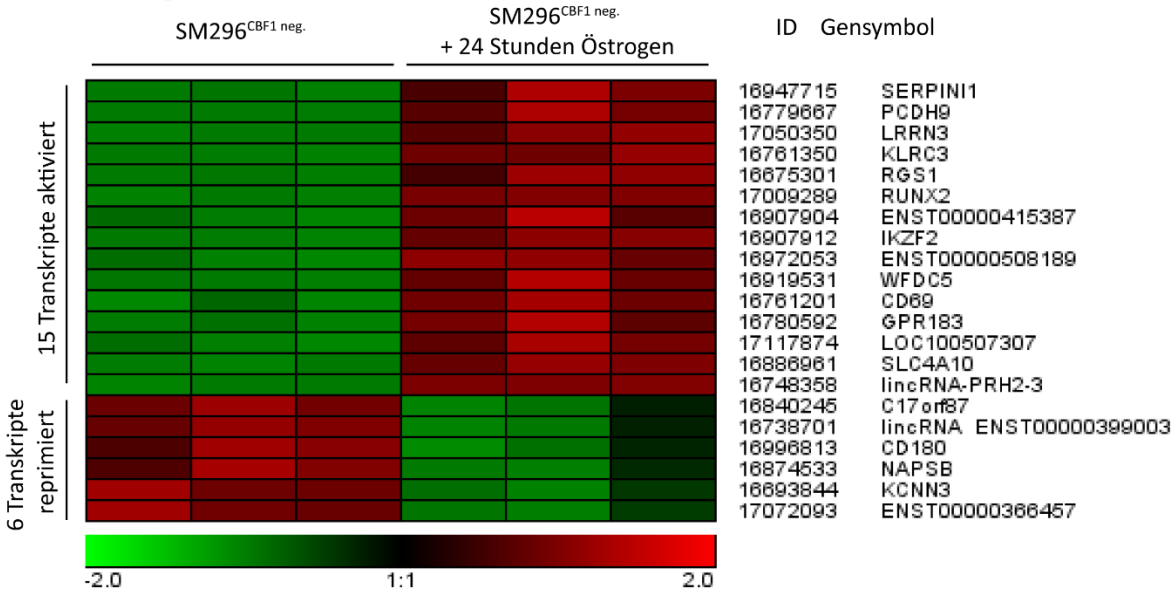


Abbildung 10: Differentielle Genexpressionsprofile von SM296^{CBF1 neg.}-Zellen vor und nach Aktivierung von EBNA2.

(A) Dargestellt sind die Expressionsdaten der mindestens 2-fach durch EBNA2-regulierten Transkripte (p -Wert $< 0,05$) aus je 3 unabhängigen *GeneChip*® 2.0 ST Arrays, absteigend geordnet nach den x-fachen Induktionswerten. Rechts neben den Expressionsdaten ist anhand eines Diagrammes veranschaulicht, wie stark die Transkripte in SM296^{CBF1 neg.}-Zellen aktiviert bzw. reprimiert sind. (B) Dargestellt sind die 21 mindestens 4-fach durch EBNA2-regulierten Transkripte (p -Wert $< 0,001$) aus je 3 unabhängigen *GeneChip*® 2.0 ST Arrays, absteigend geordnet nach den x-fachen Induktionswerten (*SERPINI1* ist am stärksten positiv reguliert). Für jedes Transkript sind die Expressionswerte von je 3 unabhängigen *GeneChip*® 2.0 ST Arrays dargestellt. Die Expressionswerte wurden mit der Software *Genesis* auf eine Skala von -2 bis +2 normalisiert. Hohe Expressionswerte sind in einer Zeile in rot, mittlere in schwarz und niedrige in grün dargestellt.

1.10. Die Expressionsdaten der SM296^{CBF1 neg.}-Zellen konnten anhand ausgewählter Zielgene bestätigt werden

Bisher wurden nur die Ergebnisse der genomweiten Expressionsstudie betrachtet. Zur Bestätigung der CBF1-abhängig und -unabhängig EBNA2-regulierten Transkripte wurden qPCR-Versuche durchgeführt (**Abbildung 11**). Aus der Gruppe der 950 mindestens 2-fach EBNA2-regulierten Transkripte (p -Wert $< 0,05$, **Tabelle 24** auf CD) wurden 12 exemplarisch ausgewählt. Dies sind *ZNF608*, *GPR183*, *GPR174*, *RGS1*, *KLRC3*, *CD69*, *LRRN3*, *IKZF2*, *SERPINI1*, *GLRA3*, *PCDH9* und *RUNX2*. Als Kontrollen wurden 2 bekannte, strikt CBF1-abhängig EBNA2-regulierte Zielgene ausgewählt, *CCL3L1/L3* und *DNase1L3*. Die qPCR-Ergebnisse lassen sich in 2 Gruppen einteilen:

1. Zielgene, die in CBF1-positiven Zellen stärker durch EBNA2 aktiviert werden oder in CBF1-positiven und CBF1-negativen Zellen ähnlich stark aktiviert werden (**Abbildung 11**) und
2. Zielgene, die in CBF1-negativen Zellen stärker durch EBNA2 aktiviert werden (**Abbildung 12**).

Zu den CBF1-abhängig stärker oder ähnlich stark EBNA2-induzierten Genen zählen *ZNF608*, *GPR183*, *GPR174*, *RGS1*, *KLRC3*, *CD69* und *LRRN3*. Die qPCR-Daten aus **Abbildung 11 A** bestätigen die RMA-Expressionswerte, die parallel in **Abbildung 11 B** dargestellt sind. Es fällt auf, dass die Expressionswerte der genomweiten Studie und die Werte der qPCR-Versuche leicht abweichende Ergebnisse zeigen. Nach den Expressionswerten der genomweiten Studien, sind alle in **Abbildung 11** gezeigten EBNA2-Zielgene in CBF1-positiven Zellen stärker reguliert als in CBF1-negativen Zellen. Die Ergebnisse der qPCR-Versuche bestätigen dies nicht für alle gezeigten EBNA2-Zielgene (*RGS1*, *KLRC3*, *CD69* und *LRRN3*). Die beiden strikt CBF1-abhängig EBNA2-induzierbaren Gene *CCL3L1/L3* und *DNase1L3* werden, wie erwartet, nur in SM295-Zellen durch EBNA2 induziert (**Abbildung 11**).

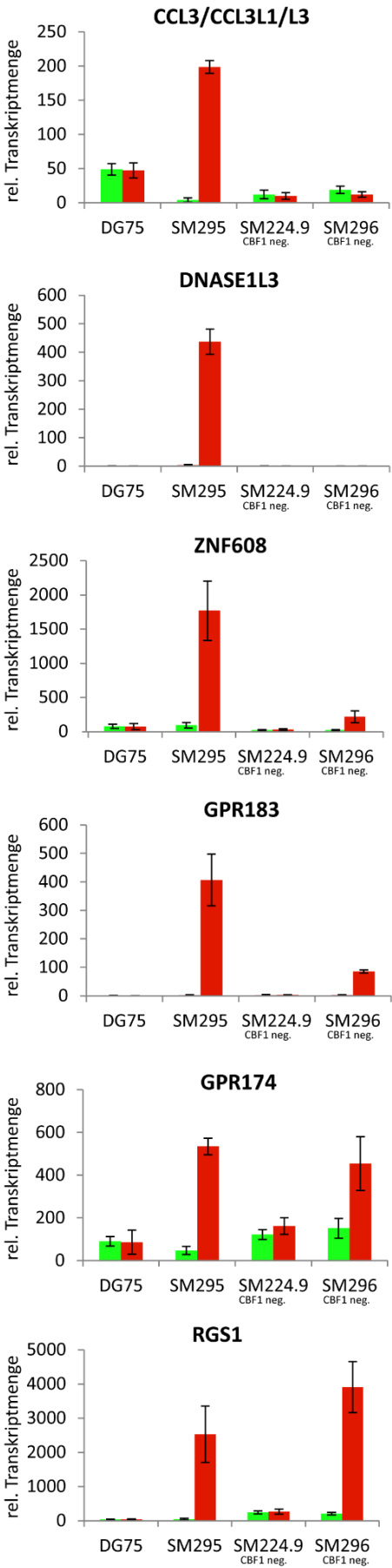
Nicht-induzierte SM295-Zellen (SM295, grüne Balken) sollten sich in ihrer Expression nicht von DG75-Zellen unterscheiden. Was die Ursache für die unterschiedlich starke Expression von

CCL3L1/L3, *GPR174* (**Abbildung 11**) und *RUNX2* (**Abbildung 12**) in SM295-Zellen vor Östrogenzugabe im Vergleich zu DG75-Zellen ist, ist bislang unklar.

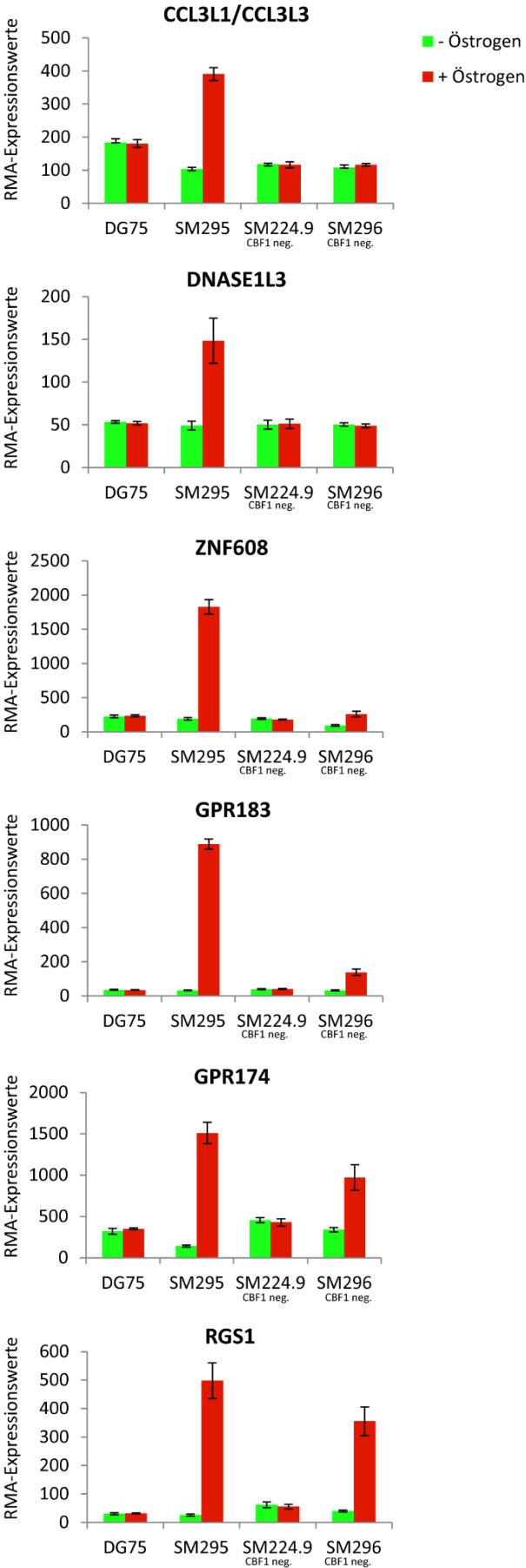
Die voneinander abweichende Bezeichnung des CCL3-Zielgenes in **Abbildung 11 A** und **B** wird unter **1.11.** erklärt.

In CBF1-negativen Zellen stärker durch EBNA2 induzierte Gene sind *IKZF2*, *SERPINI1*, *GLRA3* und *RUNX2*, sowohl nach den Ergebnissen der Expressionsdaten, als auch nach den Ergebnissen der qPCR-Daten. Die Expressionsdaten zeigen, dass *PCDH9* in CBF1-negativen und CBF1-positiven Zellen gleich stark durch EBNA2 induziert ist, die Ergebnisse der qPCR-Versuche hingegen zeigen einen stärkeren Einfluss von EBNA2 in CBF1-negativen Zellen (**Abbildung 12**). Wie es möglich ist, dass es bei einer wahrscheinlich schwächeren EBNA2-Rekrutierung in CBF1-negativen Zellen zu einer stärkeren Aktivierung kommen kann, ist derzeit noch ungeklärt. Da CBF1 auch Repressorfunktionen besitzt, könnte es sein, dass durch diese fehlende Repressorfunktion RNAs transkribiert werden die positiven Einfluss auf die Aktivierung z.B. von *IKZF2*, *SERPINI1*, *GLRA3* und *RUNX2* haben.

A) q-PCR



B) Expressionswerte



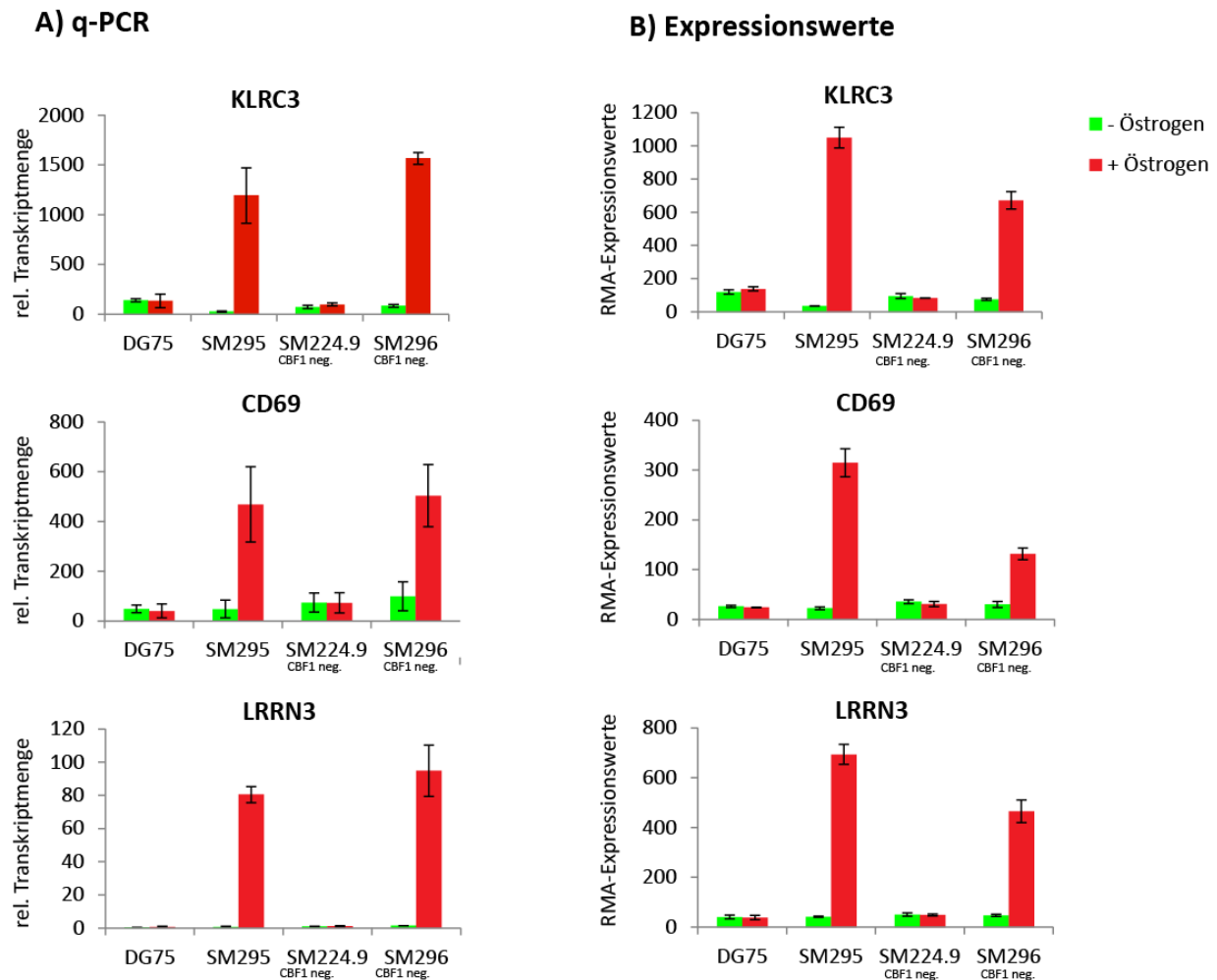
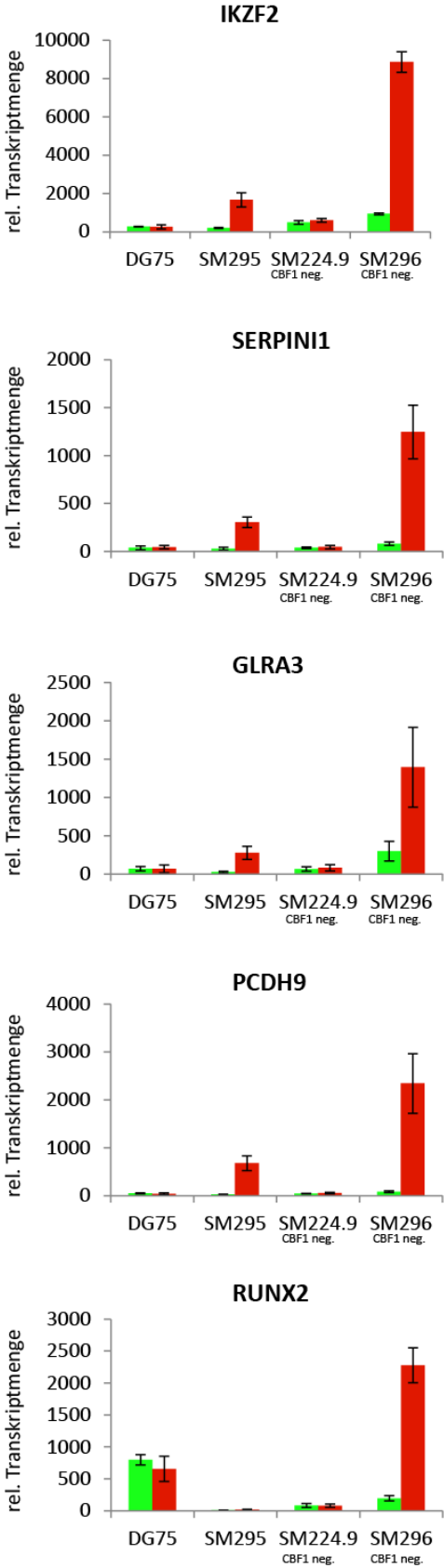
Fortsetzung **Abbildung 11:**

Abbildung 11: In SM295-Zellen stärker EBNA2-regulierte Gene - Vergleich der Ergebnisse der Expressionsanalysen mittels qPCR mit den Expressionswerten der *GeneChip 2.0 ST Arrays*.

(A) Aus Zellen der Linien DG75, SM224.9^{CBF1 neg.}, SM295, und SM296^{CBF1 neg.} wurde vor und nach EBNA2-Aktivierung RNA isoliert. Die RNA-Proben wurde mit DNase behandelt und mit Zufalls-p(dN)6-Primern revers transkribiert. Für die Quantifizierung der Transkripte wurden gen-spezifische Primer verwendet. Für alle Transkripte wurde eine Kopien-Standardkurve basierend auf deren PCR-Produkten erstellt und eine Quantifizierung durchgeführt. Die Transkriptmengen wurden gegen *Aktin B* als Haushaltsgen normalisiert. Dargestellt sind Zielgene, die in SM295-Zellen stärker durch EBNA2 induzierbar sind als in SM296^{CBF1 neg.}-Zellen. (B) Zum Vergleich mit den qPCR-Daten sind die RMA-Expressionswerte der ausgewählten Beispiele als Balkendiagramme dargestellt. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung von 3 unabhängigen biologischen Replikaten.

A) q-PCR



B) Expressionswerte

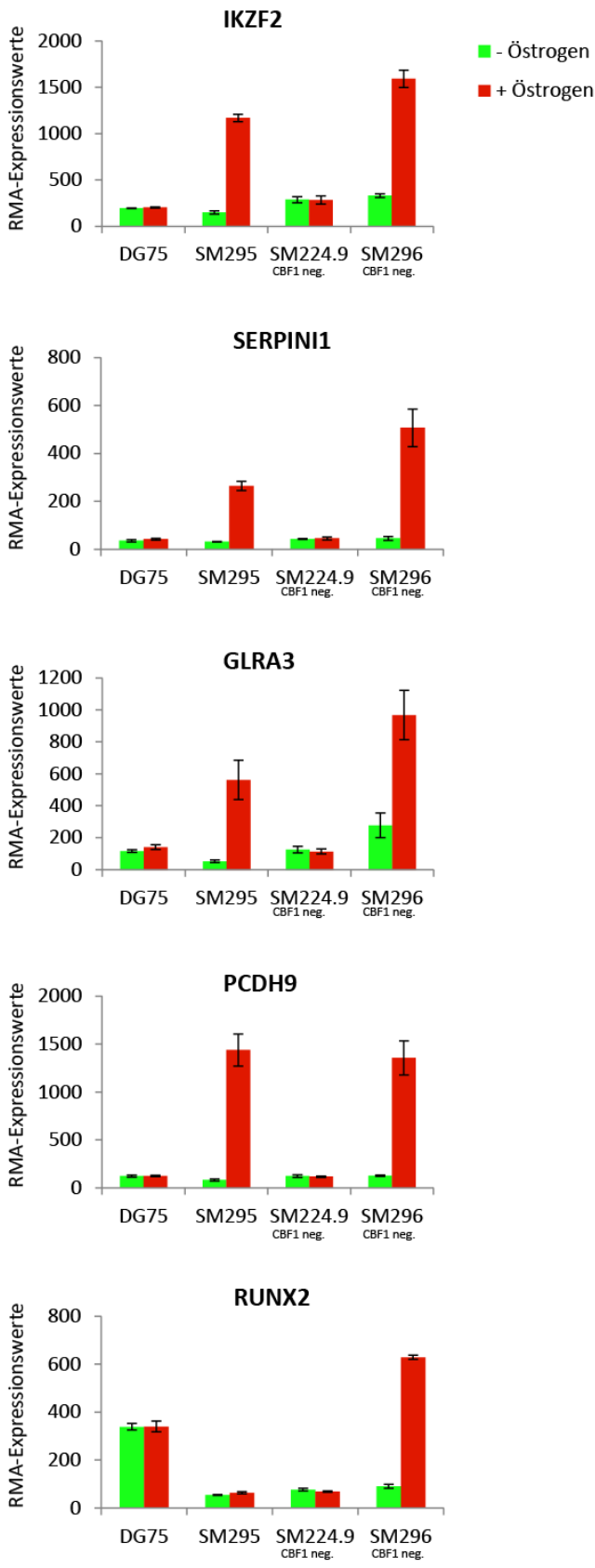


Abbildung 12: In SM296CBF1 neg. stärker EBNA2-regulierte Gene - Vergleich der Ergebnisse der Expressionsanalysen mittels qPCR mit den Expressionswerten der GeneChip 2.0 ST Arrays.

(A) Aus Zellen der Linien DG75, SM224.9^{CBF1 neg.}, SM295, und SM296^{CBF1 neg.} wurde vor und nach EBNA2-Aktivierung RNA isoliert. Die RNA-Proben wurden mit DNase behandelt und mit Zufalls-p(dN)6-Primern revers transkribiert. Für die Quantifizierung der Transkripte wurden gen-spezifische Primer verwendet. Für alle Transkripte wurde eine Kopien-Standardkurve basierend auf deren PCR-Produkten erstellt und eine Quantifizierung durchgeführt. Die Transkriptmengen wurden gegen *Aktin B* als Haushaltsgen normalisiert. Dargestellt sind Zielgene, die in SM296^{CBF1 neg.}-Zellen stärker durch EBNA2 induzierbar sind als in SM295-Zellen. (B) Zum Vergleich mit den qPCR-Daten sind die RMA-Expressionswerte der ausgewählten Beispiele als Balkendiagramme dargestellt. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung von 3 unabhängigen biologischen Replikaten.

1.11. Besonderheit des CCL3/CCL3L1/CCL3L3-Genortes

Zu *CCL3L1/L3* müssen noch einige wichtige Informationen hinzugefügt werden: in der Studie von Maier und Kollegen (Maier, Staffler et al. 2006) wird *CCL3* als EBNA2-reguliertes Gen in BJAB und BL41 beschrieben. Die Ergebnisse der genomweiten Expressionsstudie in DG75 zeigen, dass *CCL3* kaum exprimiert und reguliert ist (**Abbildung 13**). Ein weiteres Transkript, das im *GeneChip® 2.0 ST Array* den Genen *CCL3L1/L3* zugeordnet ist, ist gut reguliert (**Abbildung 11 B**). Der *CCL3* Genort liegt im Genom mehrfach dupliziert mit nur kleinen Variationen vor. Ein Alignment von *CCL3* und *CCL3L1* ergab 95,8 % Identität, ein Alignment von *CCL3* und *CCL3L3* 96,1 % Identität. Die verwendeten Primer für die qPCR-Experimente liegen in Bereichen ohne *mismatch* von *CCL3* mit *CCL3L1* oder *CCL3L3*. Das bedeutet, dass die für die qPCR-Experimente verwendeten Primer *CCL3*, *CCL3L1* und *CCL3L3* nicht unterscheiden können. *CCL3L1* und *CCL3L3* sind zu 99,6 % identisch. Der *GeneChip® 2.0 ST Array* kann zwischen *CCL3* und *CCL3L1/CCL3L3* unterscheiden. In SM295-Zellen werden demnach *CCL3L1* oder *CCL3L3* oder beide durch EBNA2 aktiviert, *CCL3* ist wahrscheinlich kaum exprimiert.

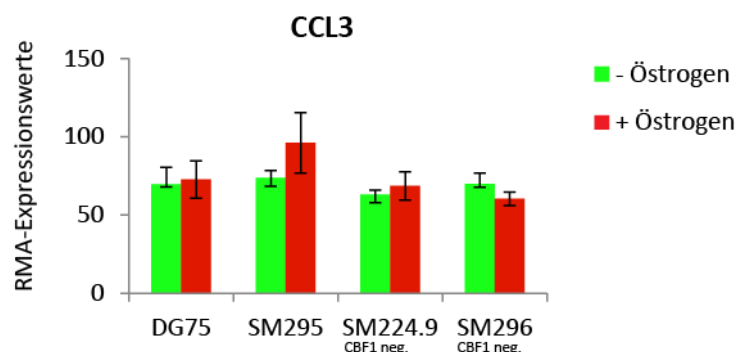


Abbildung 13: Expressionswerte aus den Daten des GeneChip® 2.0 ST Arrays für CCL3.

Die RMA-Expressionswerte des *CCL3* Genes aus DG75-, SM295-, SM224.9^{CBF1 neg.}- und SM296D3^{CBF1 neg.}-Zellen sind als Balkendiagramme dargestellt. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung von 3 unabhängigen biologischen Replikaten.

1.12. EBNA2-Zielgene werden in CBF1-positiven Zellen stärker aktiviert

Die genomweiten Expressionsstudien zeigten, dass in SM295-Zellen nach Aktivierung von EBNA2 mehr Transkripte reguliert sind als in SM296^{CBF1 neg.} (vgl. **1.8.** mit **1.9.**)

Anhand einiger Beispiele wurde bereits gezeigt, dass in CBF1-positiven und CBF1-negativen Zellen die gleichen EBNA2-Zielgene aktiviert sind. Davon sind die meisten Zielgene in CBF1-positiven Zellen stärker EBNA2-induziert (siehe **1.10**). Aus diesen Beobachtungen lässt sich die Hypothese aufstellen, dass in den CBF1-negativen SM296^{CBF1 neg.} größtenteils die identischen EBNA2-Zielgene wie in CBF1-positiven SM295-Zellen reguliert sind, dies aber wegen des fehlenden DNA-Adapters in SM296^{CBF1 neg.} nicht gleichermaßen effizient geschieht. Um diese Hypothese zu überprüfen, habe ich die mind. 2-fach signifikant (p-Wert < 0,05) aktivierten Transkripte in SM295-(548 Transkripte) und in SM296^{CBF1 neg.}-(58 Transkripte) Zellen anhand ihrer Identifikationsnummern (IDs) miteinander verglichen und überprüft, inwieweit sich die jeweiligen Gruppen überschneiden. Wie aus **Abbildung 14 A** zu entnehmen ist, überschneiden sich die Zielengruppen zu einem großen Anteil. 36 der 58 in CBF1-negativen Zellen durch EBNA2 regulierten Zielgene findet man auch in CBF1-positiven Zellen stark reguliert. In CBF1-positiven Zellen sind die meisten der 36 überlappenden Zielgene 3-10-fach aktiviert, wobei in der CBF1-negativen Zelllinie die größte Gruppe die 2-3-fach aktivierten Zielgene sind (**Abbildung 14 B**). Es zeigte sich demnach auch, dass genomweit 22 Transkripte nachgewiesen werden konnten, die einzig in der CBF1-negativen Zelllinie mindestens 2-fach signifikant durch EBNA2 induziert sind. Diese Transkripte sind 8 bisher noch nicht annotierte Transkripte und die Gene *RUNX2*, *WFDC5*, *SLC4A10*, *MAP1LC3C*, *CYBB*, *KLHL14*, *PIM1*, *RRAGD*, *THRSP*, *ACY3*, *SGK1*, *GABRG1*, *SERINC2* und *UTP3* (siehe auch **Tabelle 15** im Anhang). Eine ähnliche Verteilung zeigt der Vergleich der reprimierten Transkripte nach Aktivierung von EBNA2 in CBF1-positiven und CBF1-negativen Zellen. In CBF1-positiven Zellen findet man 402 mind. 2-fach reprimierte Zielgene und in CBF1-negativen 74 (p-Wert < 0,05). Aus beiden Zielengruppen findet man 45 doppelt vertreten (**Abbildung 14 C** und **Tabelle 16** im Anhang). Auch hier zeigt eine genauere Betrachtung der in beiden Zelllinien (CBF1-pos. und CBF1-neg.) reprimierten Zielgene, dass EBNA2 in CBF1-positiven Zellen stärkere Effekte hervorruft als in CBF1-negativen Zellen (**Abbildung 14 D**).

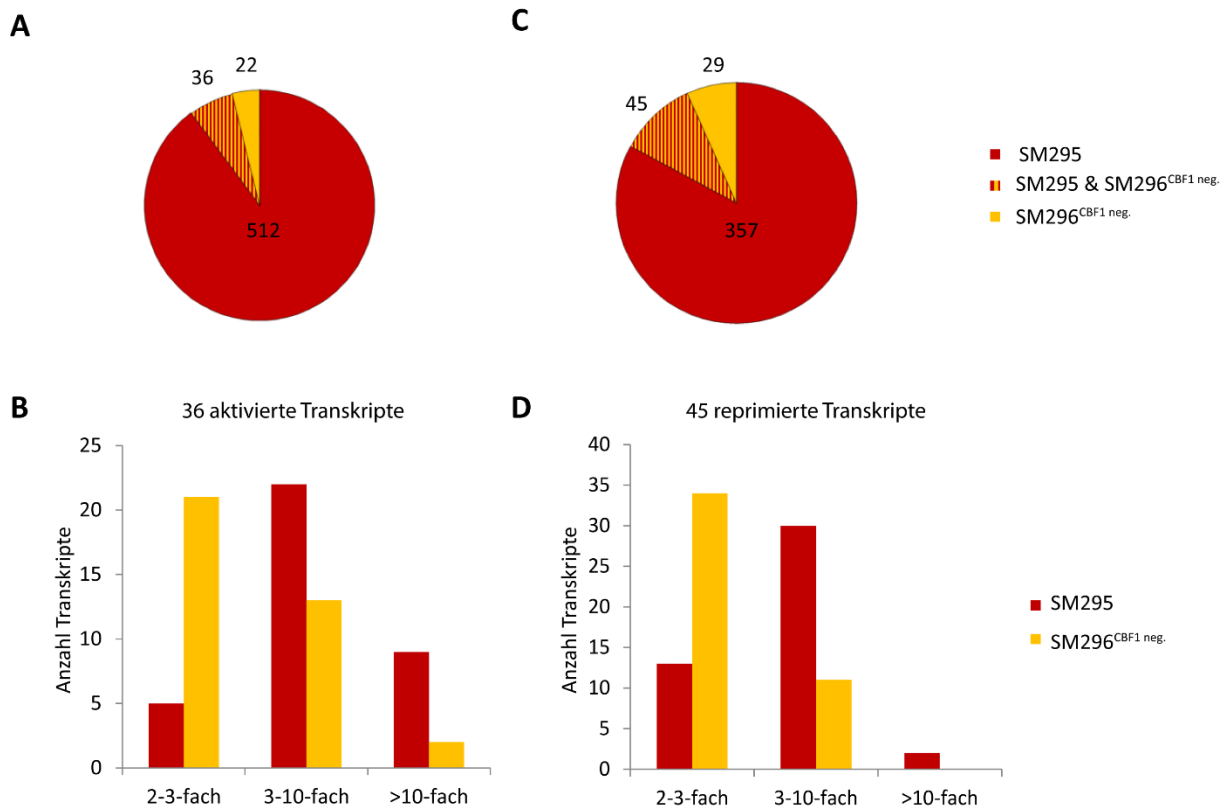


Abbildung 14: In SM296^{CBF1 neg.} EBNA2-regulierte Gene sind größtenteils auch in SM295 durch EBNA2 reguliert.

(A) Tortendiagramm nach Vergleich der IDs der mind. 2-fach EBNA2-aktivierten Transkripte in SM295- und SM296^{CBF1 neg.}-Zellen (p-Wert < 0,05). 36 aus einer Gruppe von 58 in SM296^{CBF1 neg.} mind. 2-fach EBNA2-regulierten Transkripten sind auch in SM295 reguliert. (B) Dargestellt ist die Verteilung der Aktivierungsstärke durch EBNA2 der 36 überlappenden Zielgene aus SM295 und SM296^{CBF1 neg.}. (C) und (D) Darstellungen vergleichbar mit (A) und (B), nur hier werden die nach EBNA2-Aktivierung reprimierten Transkripte betrachtet.

1.13. CBF1-reprimierte Zielgene

1.13.1. CBF1-reprimierte Transkripte in DG75-Zellen

Die Analyse der Expressionsdaten von DG75- im Vergleich zu SM224.9^{CBF1 neg.}-Zellen erlaubt nun erstmalig die genomweite Identifizierung CBF1-reprimierter Transkripte in humanen B-Zellen. Bisher gibt es nur einen Nachweis von 4 CBF1-reprimierten Genen in der Studie von Sabine Maier. Sie konnte zeigen, dass die Gene *CCL3*, *CDK5R1*, *RHOH* und *RAPGEF2* in CBF1-negativen Zellen im Vergleich zu der Ausgangszelllinie DG75 mindestens 2-fach höher exprimiert werden (Maier, Staffler et al. 2006).

Bei der Analyse der Expressionsdaten dieser Arbeit findet man 359 mindestens 2-fach unterschiedlich stark exprimierte Transkripte im Vergleich der Zelllinien DG75 und SM224.9^{CBF1 neg.} (p-Wert < 0,05). Von diesen 359 Transkripten sind 277 in den SM224.9^{CBF1 neg.}

Zellen signifikant mindestens 2-fach stärker exprimiert als in DG75-Zellen. (siehe **Tabelle 25** auf CD).

Legt man stringendere Parameter fest (mindestens 4-fach reguliert, p-Wert < 0,001), so findet man 64 Transkripte die in den beiden Zelllinien signifikant unterschiedlich stark exprimiert sind. Diese teilen sich auf in 46 in SM224.9^{CBF1neg.} höher exprimierte Transkripte (mind. 4-fach) und in 18 in DG75 höher exprimierte Transkripte (mind. 4-fach, **Abbildung 15**).

Um auch bei diesem Vergleich nicht Transkripte zu beschreiben, die kaum in der Zelle exprimiert sind, habe ich die RMA-Werte der 64 Transkripte überprüft. Sowohl bei den in DG75, also auch bei den in SM224.9^{CBF1 neg.} höher exprimierten Transkripten gibt es je einen Kandidat, der unter dem Grenzwert von 52 liegt (siehe erster Ergebnisteil **1.3.1**), dies ist LOC72875 in DG75 und LOC51152 in SM224.9^{CBF1 neg.} (**Abbildung 15**).

Welcher Mechanismus hinter der Regulation der 18 in DG75-Zellen signifikant höher exprimierten Gene steht, ist derzeit noch unklar. Vielleicht handelt es sich um sekundäre Effekte, z.B. regulatorische RNAs, die in DG75 durch CBF1 reprimiert werden, in SM224.9^{CBF1neg.} aber exprimiert werden können und dort die Transkription dieser 18 Transkripte inhibieren. Einfacher sind die in SM224.9^{CBF1 neg.} höher exprimierten Transkripte zu erklären, da in dieser Zelllinie ein wichtiger Repressor, CBF1, fehlt. Die 46 in SM224.9^{CBF1 neg.} höher exprimierten Transkripte teilen sich auf in 10 lincRNAs, 4 bislang nicht annotierte Transkripte (nur *ensembl* Nummer ist angegeben) und 32 proteinkodierende RNAs (**Abbildung 15**).

Das am stärksten durch CBF1 reprimierte Gen ist das *killer cell immunoglobulin-like receptor, 3 domains, long cytoplasmic tail KIR3DL*, wobei der *GeneChip 2.0 ST Array* nicht zwischen den stark homologen Genen *KIR3DL1* und *KIR3DL2* unterscheiden kann. Die KIRs sind Transmembranproteine, dessen Expression bisher nur in NK-Zellen und T-Zellen beschrieben wurde (Valiante, Uhrberg et al. 1997). Auf NK-Zellen sind KIRs inhibitorische Rezeptoren, die die Zelllyse verhindern können. Die Ergebnisse der Expressionsstudien zeigen, dass *KIR3DL1/KIR3DL2* in den CBF1-negativen DG75-B-Zellen 44-fach stärker exprimiert wird als in der vergleichbaren CBF1-positiven Zelllinie (**Abbildung 15** und **Tabelle 17** im Anhang).

Am zweitstärksten ist eine lincRNA durch CBF1 reprimiert, die lincRNA mit der *ensembl* Nummer ENST00000454131.1. Sie ist in SM224.9^{CBF1 neg.}-Zellen 33-fach stärker exprimiert. Für diese lincRNA ist aber bislang noch keine Funktion bekannt.

Unter den durch CBF1 reprimierten Genen möchte ich *AIM2 (absent in melanoma)* noch erwähnen. *AIM2* ist in SM224.9^{CBF1 neg.}-Zellen 9-fach höher exprimiert als in DG75-Zellen (**Abbildung 15** und **Tabelle 17** im Anhang). *AIM2* ist beteiligt an der angeborenen Immunantwort, da es bakterielle und virale DNA erkennen kann, wodurch die Ausbildung eines Inflammasoms gefördert wird. Dies kann zum programmierten Zelltod führen (Fernandes-Alnemri, Yu et al. 2009).

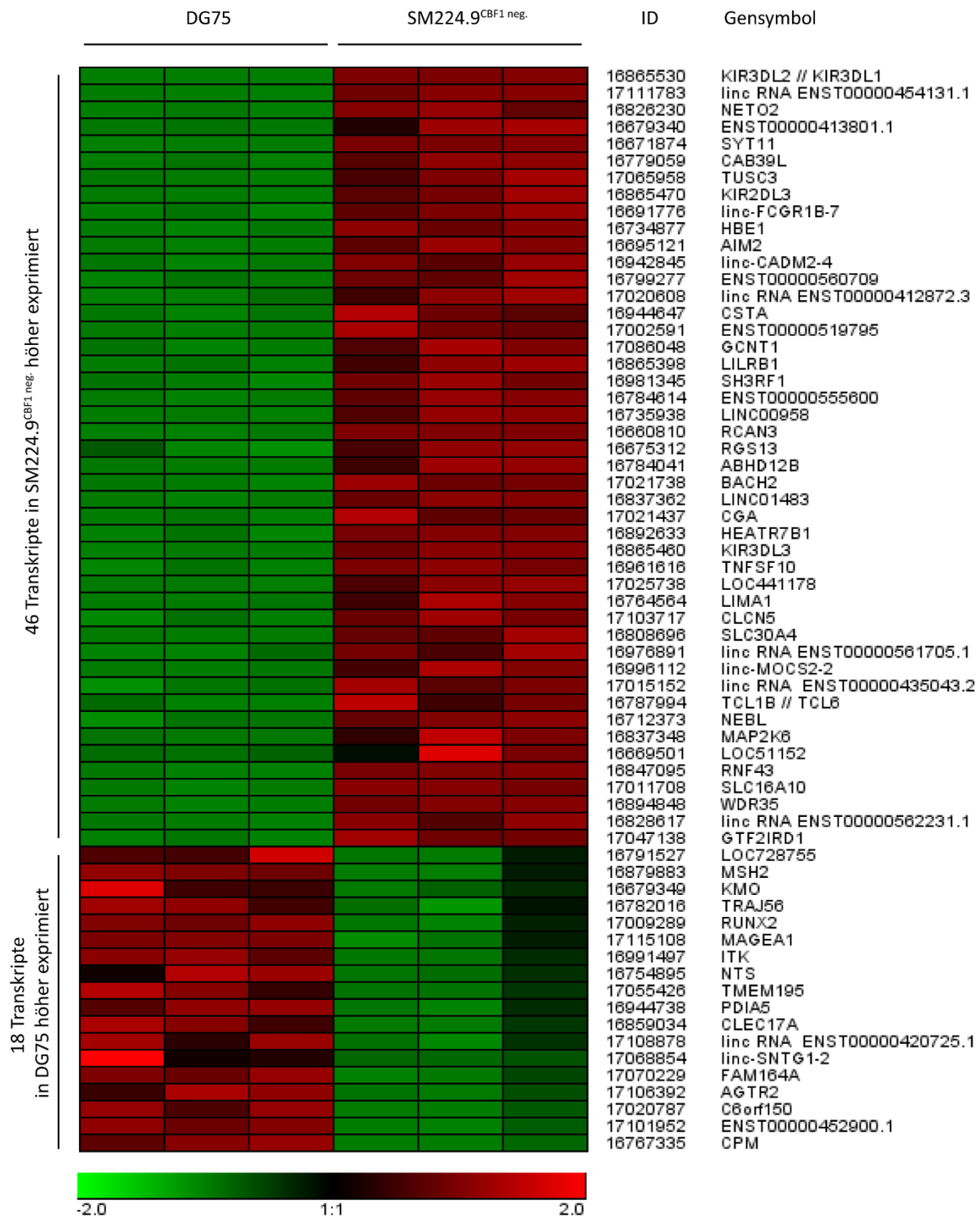


Abbildung 15: Regulation durch CBF1 - Differentielle Genexpressionsprofile von DG75- im Vergleich zu SM224.9^{CBF1 neg.}-Zellen.

Dargestellt sind die 64 mindestens 4-fach in DG75 im Vergleich zu SM224.9^{CBF1 neg.} unterschiedlich exprimierten Transkripte (p -Wert < 0,001) aus je 3 unabhängigen *GeneChip*® 2.0 *ST Arrays*. Die Transkripte sind absteigend angeordnet nach den x-fachen Werten (Unterschied SM224.9^{CBF1 neg.} zu DG75). Für jedes Transkript wurden die RMA-Expressionswerte auf einer Skala von -2 bis +2 normalisiert und mit der Software *Genesis* abgebildet. In einer Zeile sind hohe Expressionswerte in rot, mittlere in schwarz und niedrige in grün dargestellt.

1.13.2. CBF1-reprimierte Transkripte in von DG75-abstammenden SM295-Zellen

Es gibt noch weitere Möglichkeiten, potentiell CBF1-reprimierte Transkripte aus den genomweiten Expressionsdaten zu identifizieren. DG75- und SM295-Zellen sollten im Grundzustand (nicht induziert) theoretisch das gleiche Expressionsprofil aufweisen. Das gleiche gilt für SM224.9^{CBF1 neg.} und SM296^{CBF1 neg.}. Vergleicht man nun das Expressionsprofil von SM296^{CBF1 neg.}-Zellen mit dem Expressionsprofil von SM295-Zellen, kann man daraus, entsprechend dem Vorgehen im vorangegangenen Kapitel (**1.13.1**), die CBF1-reprimierten Transkripte ermitteln. Beim Vergleich des Expressionsprofils von SM296^{CBF1 neg.} mit dem Expressionsprofil von SM295-Zellen findet man 434 mindestens 2-fach signifikant unterschiedlich exprimierte Transkripte (p-Wert < 0,05), 297 davon sind stärker exprimiert in SM296^{CBF1 neg.} und 137 Transkripte sind stärker exprimiert in SM295 (siehe **Tabelle 26** auf CD). **Abbildung 16** zeigt die Anzahl der Transkripte die im Vergleich der Expressionsprofile von SM224.9^{CBF1 neg.} und DG75-Zellen stärker oder schwächer exprimiert sind und die Anzahl der Transkripte, die im Vergleich der Expressionsprofile von SM296^{CBF1 neg.} und SM295-Zellen stärker oder schwächer exprimiert sind. Die Aufschlüsselung nach den x-fachen Werten zeigt vergleichbare Werte. Bei genauerer Analyse der Daten findet man 100 in DG75 CBF1-reprimierte Transkripte auch unter den in SM295 CBF1-reprimierten Transkripten wieder (vgl. **Tabelle 25** mit **Tabelle 26** auf CD). Diese 100 Transkripte, die potentiell in DG75- und in SM295-Zellen CBF1-reprimiert sind, sind in **Tabelle 18** (im Anhang) grau hinterlegt.

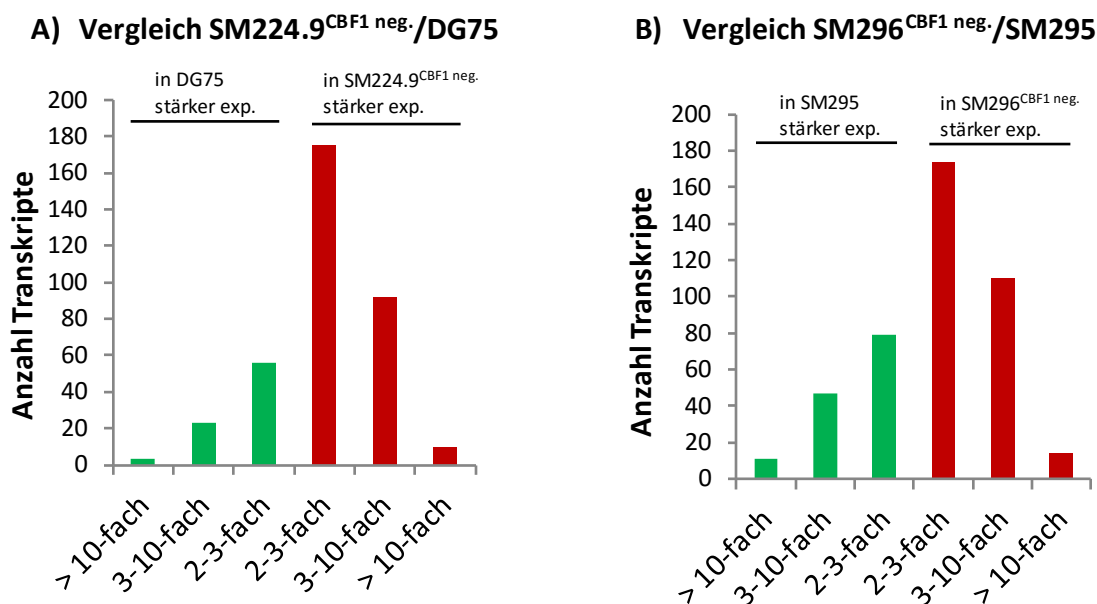


Abbildung 16: CBF1-regulierte Transkripte.

Gezeigt ist jeweils die Anzahl der mindestens 2-fach unterschiedlich stark exprimierten Transkripte (p-Wert < 0,05) in CBF1-neg. Zellen (SM224.9^{CBF1 neg.} und SM296^{CBF1 neg.}) im Vergleich zu CBF1-pos. Zellen (DG75 und SM295).

1.14. Es werden andere Gene durch EBNA2 aktiviert als durch CBF1 reprimiert

CBF1 ist nicht nur der DNA-Adapter für EBNA2 und Notch-IC, sondern besitzt, wie in der Einleitung beschrieben, auch Repressorfunktionen (siehe Einleitung **2.2**). Durch die Assoziation mit einem Korepressor-Komplex, ist DNA-gebundenes CBF1 in der Lage, die Transkription zu reprimieren (Lai 2002, Oswald, Winkler et al. 2005). Es wurde auch gezeigt, dass EBNA2 diesen Repressor-Komplex verdrängen, einen Aktivator-Komplex rekrutieren, und somit CBF1 vermittelte Transkription induzieren kann (Hsieh and Hayward 1995). In Gal4 Reportergenexperimenten konnte dieser Mechanismus bestätigt werden (Zhou, Fujimuro et al. 2000). In der Literatur gibt es bislang kein Beispiel, bei dem dieser Mechanismus an einem EBNA2-Zielgen-Promotor gezeigt werden konnte. Bei der Transkriptionsaktivierung durch Notch-IC konnte der Wechsel von CBF1-vermittelter Repression zu Notch-IC-vermittelter Transkriptionsaktivierung anhand des *HEY1*-Promotors gezeigt werden (Oswald, Winkler et al. 2005).

Bei den Analysen der genomweiten Expressionsdaten konnten erstmals Gene identifiziert werden, die in CBF1-negativen Zellen signifikant höher exprimiert sind als in CBF1-positiven Zellen (siehe Ergebnisse Teil 1, **1.13.1**). Würde der CBF1-vermittelte Repressionsmechanismus an den gleichen Promotoren stattfinden wie die CBF1-vermittelte Zielgenaktivierung durch EBNA2, so würde man erwarten, dass sich die CBF1-reprimierten (siehe **1.13.1**) und die durch EBNA2-induzierten Gene (siehe **1.8.2**) decken. Dies ist nicht der Fall. Vergleicht man z.B. die 548 2-fach EBNA2-induzierten Transkripte (Daten aus **Tabelle 24**) mit den unter **1.13.2** beschriebenen 100 CBF1-reprimierten Transkripten, so findet man lediglich 11 Transkripte, die in beiden Datensätzen signifikant reguliert sind (siehe **Tabelle 18** im Anhang, rote Markierung).

1.15. EBNA2-regulierte microRNAs und lincRNAs

1.15.1. EBNA2 reguliert die Expression von nichtkodierenden RNAs

Beschäftigt man sich mit Expressionsregulation auf Transkriptionsebene, so darf man nichtkodierende RNAs nicht außer Acht lassen. Die langen nichtkodierenden RNAs (lincRNAs von *long intergenic noncoding RNA*), welche bei den Analysen des Expressionsarrays als exprimiert und EBNA2-reguliert gefunden wurden, werden an den entsprechenden Stellen erwähnt, im Rahmen dieser Arbeit aber nicht weiter analysiert. In **Abbildung 9** sind die mindestens 4-fach durch EBNA2-regulierten lincRNAs mit aufgeführt. Bei laufenden Arbeiten der Doktorandin Simone Rieger (AG Kempkes) sollen Fragestellung zu Regulation und Funktion dieser RNA-Klasse näher untersucht werden. Nichtsdestoweniger zeigen die Daten der genomweiten Expressionsstudien, dass es einige signifikant EBNA2-regulierte lincRNAs gibt. In SM295-Zellen z.B. sind 62 der 950 mindestens 2-fach durch EBNA2-regulierten Transkripte lincRNAs (p-Wert < 0,05). In der Literatur findet man bislang noch keine Informationen zu EBNA2-regulierten lincRNAs. In den letzten Jahren wurden immer mehr transkribierte

lincRNAs entdeckt und sie erlangen eine immer größere Bedeutung z.B. bei der Regulation der Transkription, bei der posttranskriptionellen Regulation, beim Splicing, bei der Translation oder bei der epigenetischen Regulation. Es zeigt sich immer häufiger, dass nichtkodierende RNAs eine wichtige Rolle bei allen Schritten der Expressionsregulation innehaben und in folgenden Arbeiten (Simone Rieger, AG Kempkes) könnten spannende Antworten zur Funktion von EBNA2 im Zusammenhang mit lincRNAs gefunden werden.

1.15.2. Bereits beschriebene EBNA2-regulierte microRNAs konnten bestätigt werden

Weitere Analysen der genomweiten Expressionsdaten beschäftigten sich mit den kurzen, 20-24 Nukleotide umfassenden, microRNAs. MicroRNAs nehmen einen gewaltigen Einfluss auf die Regulation proteinkodierender Gene. Nach einer Publikation von 2013 waren bis dahin über 1600 reife microRNAs annotiert und jede microRNA kann mehrere hundert proteinkodierende Gene regulieren. In der Regel führt microRNA-Bindung an die Ziel-mRNA zu Repression der Transkription. MicroRNAs können auch an nicht 100 % komplementäre Zielsequenzen im 3'-Bereich des Zielgenes binden und Genexpression regulieren. Das hat zur Folge, dass microRNAs mit einer sehr großen Anzahl an Zielsequenzen interagieren können. Man nimmt an, dass alle biologischen Prozesse durch microRNAs moduliert werden oder zumindest ein „fine-tuning“ durch microRNAs erhalten (Nazarov, Reinsbach et al. 2013).

Die Analyse der genomweiten Expressionsdaten zeigte, dass microRNAs in dieser Studie schwächer EBNA2-reguliert sind als mRNAs. Es könnte sein, dass dies am gewählten Zeitpunkt der microRNA-Extraktion nach EBNA2-Induktion liegt. In der oben erwähnten Studie von Nazarov und Kollegen wurde gezeigt, dass starke Veränderungen der microRNA-Expression nach Interferon-Gamma Induktion erst zu einem späteren Zeitpunkt stattfand als die Veränderung der mRNA-Expression. Während die mRNA-Expression 12-24 Stunden nach Interferon-Gamma Stimulation reagierte, änderte sich die microRNA-Expression erst 24-48 Stunden nach Stimulation (Nazarov, Reinsbach et al. 2013). In dieser Arbeit wurde sowohl mRNA als auch microRNA nach 24 Stunden extrahiert.

Für die Identifikation der durch EBNA2 regulierten microRNAs in SM295 und SM296^{CBF1 neg.} wurden 1,5-fach aktivierte oder reprimierte microRNAs mit einem p-Wert von maximal 0,05 ausgewählt. Unter diesen Randbedingungen findet man in SM295-Zellen 19 aktivierte und 11 reprimierte microRNAs. Die am stärksten aktivierten microRNAs sind miR-21 und miR-181b1 und -b2. Unter den am stärksten reprimierten sind miR-621, miR-3142 und miR-146a (**Abbildung 17 A**). In **Abbildung 17 A** sind alle signifikant mindestens 1,5-fach durch EBNA2 regulierten microRNAs gezeigt (siehe auch **Tabelle 19** im Anhang). Betrachtet man mit den gleichen Parametern (mind. 1,5-fach reguliert, p-Wert max. 0,05) die regulierten microRNAs der CBF1-neg. Zelllinie, so findet man insgesamt nur 3, eine aktivierte und 2 reprimierte microRNAs (**Abbildung 17 B**). Die aktivierte microRNA ist miR-181b1 und ist 2-fach aktiviert. Die beiden reprimierten microRNAs sind miR-516B2 und miR-21 und sie sind 1,6-fach und 1,9-

fach reprimiert. Erstaunlicherweise ist miR-21 in den SM295-Zellen 6,6-fach aktiviert (siehe **Tabelle 19**).

In einer Studie von Rosato und Kollegen (Rosato, Anastasiadou et al. 2012) wurde die Expression von microRNAs in der *diffuse large b cell lymphoma* (DLBCL)-Zelllinie U2932 nach EBNA2-Expression untersucht. Ein Experiment dieser Studie beschreibt die Ergebnisse eines genomweiten *locked nucleic-acid-based (LNA) miRNA microarray* von EBNA2-transfizierten U2932-Zellen im Vergleich zu einer Negativkontrolle. Aus den im LNA miRNA-microarray identifizierten EBNA2-regulierten microRNAs konnten 45 zusätzlich in qPCR-Experimenten bestätigt werden (Abb. 1d der Publikation, unteres Diagramm). Aus diesem Datensatz konnten miR-21, miR-9-2, miR-16-2 und miR-146a auch in dieser Arbeit bestätigt werden (**Abbildung 17 A**)

MiR-21 und miR-146a werden in der Studie von Rosato und Kollegen noch weiter untersucht und es konnte gezeigt werden, dass miR-21 durch EBNA2 induziert und miR-146a reprimiert wird. Dies zeigen auch die Daten der genomweiten Expressionsstudien dieser Arbeit und es konnte auch durch qPCR-Versuche bestätigt werden (**Abbildung 17 A** und **Abbildung 18**). Für den Vergleich des Expressionsniveaus ist in **Abbildung 18** die relative Expressionsmenge von miR-21 und miR-146a in der EBV-positiven B-Zelllinie 721 und in der EBV-negativen Ausgangszelllinie DG75 gezeigt. Überexpression von miR-21 ist ein Kennzeichen vieler Tumorerkrankungen. Zu diesen zählen Glioblastoma, Lungenkrebs, Brustkrebs oder chronische lymphatische Leukämie (Chan, Krichevsky et al. 2005, Iorio, Ferracin et al. 2005, Volinia, Calin et al. 2006, Fulci, Chiaretti et al. 2007). Ob die Repression von miR-146a eine Bedeutung für die Bildung von Tumoren hat, ist noch ungeklärt.

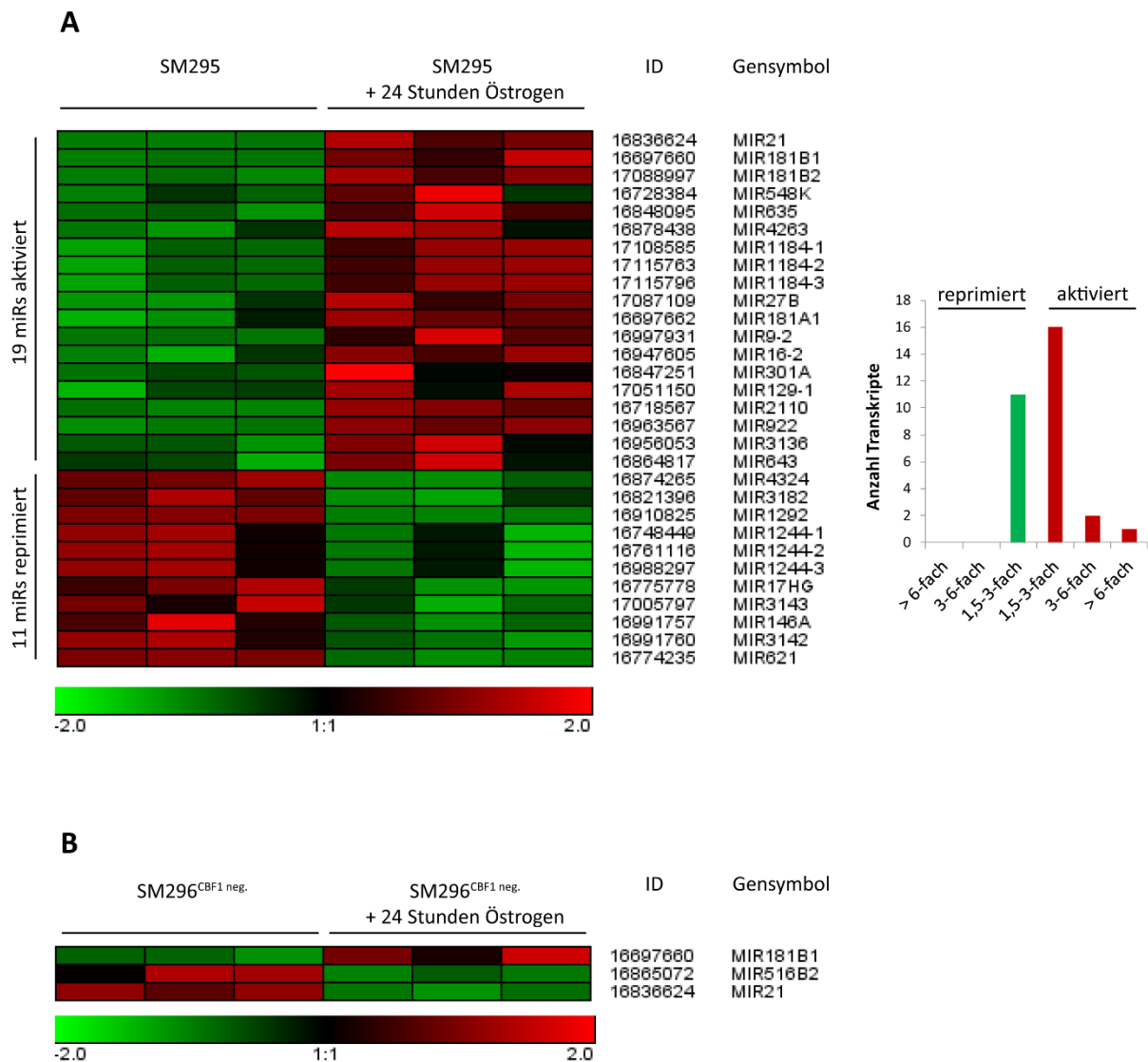


Abbildung 17: EBNA2-Regulation von microRNAs in SM295- und SM296^{CBF1 neg.}-Zellen.

Differentielle Genexpressionsprofile von mindestens 1,5-fach regulierten miRNAs (p-Wert < 0,05) in (A) SM295- und (B) SM296^{CBF1 neg.}-Zellen. Dargestellt sind die RMA-Werte nach Normalisierung aus je 3 unabhängigen *GeneChip*® 2.0 ST Arrays absteigend angeordnet nach den x-fachen Aktivierungswerten. MIR21 ist demnach die am stärksten EBNA2-regulierte microRNA in SM295-Zellen. Für die Normalisierung wurden die RMA-Expressionswerte jedes Transkriptes auf einer Skala von -2 bis +2 normalisiert und mit der Software *Genesis* abgebildet. Hohe Expressionswerte sind in einer Zeile in rot, mittlere in schwarz und niedrige in grün dargestellt. (A) In SM295-Zellen sind 31 microRNAs mindestens 1,5-fach durch EBNA2 reguliert. Das Balkendiagramm rechts in der Abbildung zeigt, wie stark die 40 miRs in SM295-Zellen reguliert sind. (B) in SM296^{CBF1 neg.} sind 3 microRNAs mindestens 1,5-fach durch EBNA2 reguliert.

1.15.3. MiR-155 ist in SM295-Zellen signifikant durch EBNA2 reguliert

Eine wichtige microRNA in Zusammenhang mit Tumorerkrankungen und EBV ist miR-155. Es wurde beschrieben, dass miR-155 unerlässlich bei der Immortalisierung durch EBV ist (Linnstaedt, Gottwein et al. 2010) und in Burkitt-Lymphomzellen hoch exprimiert ist (Metzler,

Wilda et al. 2004). Es wurde auch bereits gezeigt, dass miR-155 durch Transfektion von EBNA2 in DG75 induziert werden konnte (Lu, Weidmer et al. 2008). MiR-155 ist nach den Daten der Expressionsstudien dieser Arbeit in SM295-Zellen 1,47-fach durch EBNA2 aktiviert (p-Wert $5,17 \times 10^{-5}$). Da in **Abbildung 17 A** nur mindestens 1,5-fach regulierte microRNAs gezeigt sind, taucht miR-155 dort nicht auf, diese microRNA ist aber in SM295-Zellen auch signifikant durch EBNA2 reguliert.

1.15.4. Bestätigung der EBNA2-induzierten microRNA miR-181b1 durch qPCR

Die Analyse der genomweiten Expressionsdaten ergab, dass die microRNA mir-181b1 in SM295-Zellen, nach miR-21 die am zweitstärksten durch EBNA2 induzierte microRNA ist. MiR-181b1 wurde bisher noch nicht als EBNA2-induzierte microRNA beschrieben. Zusammen mit miR-21 und miR-146a konnte die Regulation durch EBNA2 von miR-181b1 in SM295-Zellen mit einer zusätzlichen Methode, der quantitativen PCR, bestätigt werden (**Abbildung 18**). Auch die qPCR-Ergebnisse zeigen eindeutig eine stärkere Expression der miR-181b1 in SM295-Zellen nach Zugabe von Östrogen. Auffällig ist in **Abbildung 18**, dass miR-181b1 in den EBV-positiven Zellen 721 nicht oder nur sehr schwach exprimiert ist. MiR-181b1 und miR-181b2 sind in ihrer reifen Form sequenzidentisch, die Bezeichnungen -1 und -2 am Ende weisen darauf hin, dass die Vorläufer dieser microRNAs an unterschiedlichen Orten im Genom exprimiert werden. Da miR181b1 und miR181b2 sequenzidentisch sind, werden sie in Publikationen über die Funktion dieser microRNAs daher nur mit miR-181b bezeichnet.

MiR-181b wurde bereits in verschiedenen Studien in Zusammenhang mit Tumorerkrankungen gebracht, wie z.B. Gehirntumore, Gebärmutterhalskrebs oder myeloische Leukämie (Tao, Wang et al. 2013, Zhi, Cao et al. 2013, Yang, Wang et al. 2014).

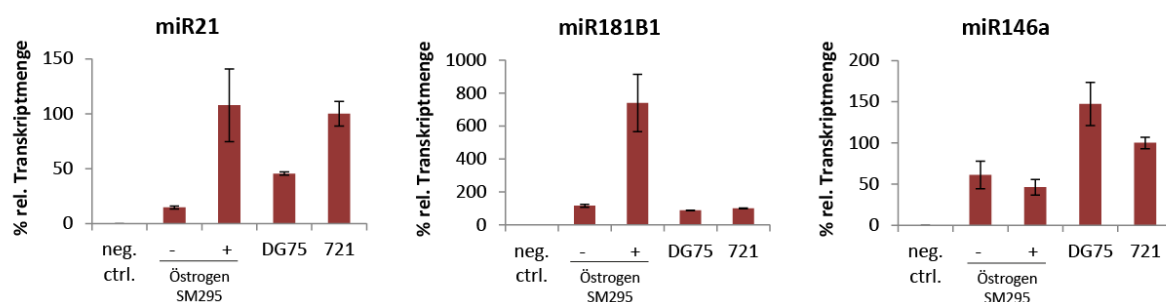


Abbildung 18: Verifizierung der EBNA2-Regulation von microRNAs mittels qPCR.

MicroRNAs wurden aus SM295-Zellen und zum Vergleich aus DG75- und 721-Zellen isoliert. Die cDNA Synthese wurde mit speziellen 50 nt langen Primern durchgeführt (siehe **Methoden 5.3**) und anschließend diese cDNAs via qPCR quantifiziert. Es sind die Mittelwerte aus je 3 unabhängigen Versuchen mit Standardabweichungen dargestellt. Als Negativkontrolle wurde eine Probe verwendet, bei der die cDNA Synthese mit H₂O anstatt mit *template*-DNA durchgeführt wurde. Der Wert für den Transkriptionslevel in 721-Zellen wurde auf 100 % festgesetzt.

2. Rekrutierung von CBF1 und EBNA2 an Chromatin

Bisher wurde in diesem Ergebnisteil der Einfluss von CBF1 und EBNA2 auf die Transkriptionsregulation in DG75 Burkitt-Lymphomzellen anhand genomweiter Expressionsstudien untersucht. Bezüglich der Transkriptionsregulation durch EBNA2 konnten in dieser Arbeit bekannte Zielgene in CBF1-positiven Zellen bestätigt werden und erstmals in CBF1-negativen Zellen regulierte Zielgene identifiziert und bestätigt werden. CBF1 wird als Haupt-Adapterprotein für EBNA2 an Chromatin beschrieben. Wie in der Einleitung dieses Ergebnisteils bereits erwähnt, wurden in einer Studie von Zhao und Kollegen ChIP-seq-Experimente mit einem CBF1-spezifischen und einem EBNA2-spezifischen Antikörper durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Studie zeigen einen großen Überlapp (72 %) der EBNA2- und CBF1-Bindestellen innerhalb eines 100 bp Fensters. Die übrigen 28 % der EBNA2-Bindestellen, bei denen kein CBF1 in der Nähe nachgewiesen werden konnte, werden als EBNA2-only Bindestellen beschrieben (Zhao, Zou et al. 2011).

Um die Ergebnisse der genomweiten Expressionsstudien dieser Arbeit besser zu verstehen, wurde die EBNA2-Chromatin Interaktion in CBF1-positiven und CBF1-negativen Zellen untersucht. Bindet EBNA2 in CBF1-negativen Zellen an den gleichen Positionen wie in CBF1-positiven Zellen und geschieht dies mit der gleichen Effizienz?

2.1. Kriterien für die Auswahl der EBNA2-Bindestellen

Die EBNA2-Chromatin Interaktion wurde in Chromatinimmunpräzipitationsversuchen mit anschließender Detektion der Fragmente via qPCR (ChIP-PCR) in CBF1-positiven und CBF1-negativen Zellen untersucht.

Es wurden genomische Bereiche für die ChIP-PCR-Versuche ausgewählt, welche durch die ChIP-seq-Analysen von Zhao und Kollegen als CBF1/EBNA2-Bindestellen identifiziert wurden (Zhao, Zou et al. 2011). In der Studie wurde für die ChIP-seq-Versuche die LCL IB4 verwendet, also eine CBF1- und EBNA2-positive Zelllinie. EBNA2-Bindestellen in einer CBF1-negativen Zelllinie sind bis jetzt noch nicht bekannt. Der Datensatz aus dieser Studie wurde von dem Bioinformatiker Christian Mertes neu ausgewertet und im Zuge dessen wurden die EBNA2-Bindestellen durchnummeriert (z.B. P-44-3 für die Bindestelle im *CD23*-Promotor, **Abbildung 19 A**). Aus den neu durchnummerierten EBNA2-Bindestellen habe ich 7 Bindestellen ausgesucht, eine in der Nähe des strikt CBF1-abhängig EBNA2-regulierten Genes *CD23* und 6 in der Nähe der in CBF1-positiven **und** CBF1-negativen Zellen EBNA2-responsiven Gene *CD69* und *RGS1*.

Eine weitere Position, die für die folgenden ChIP-PCR-Versuche ausgewählt worden ist, ist von einer ehemaligen Doktorandin der AG Kempkes als EBNA2-Bindestelle identifiziert worden. Es handelt sich um eine Position zwischen den Genen *ADAM28* und *ADAMDEC1* (Harth-Hertle, Scholz et al. 2013). Die Region zwischen den beiden Genen wird als *enhancer* beschrieben. *Enhancer* sind Bereiche im Genom, die sich durch Anhäufung der Histonmodifikation H3K4me1 und H3K27ac auszeichnen (Heintzman, Hon et al. 2009, Creighton, Cheng et al.

2010) und die über Chromatinschlaufen zu Genen, an deren Regulation sie beteiligt sind, in Kontakt stehen.

2.1.1. Es konnten keine „EBNA2-only“-Bindestellen gefunden werden

An dieser Stelle wären Untersuchungen an EBNA2-Bindestellen interessant, an denen sicher kein CBF1 in einem 100 bp Fenster bindet. An allen ausgewählten und im Folgenden analysierten Positionen findet man in den ChIP-seq Ergebnissen von Zhao und Kollegen ein Signal für eine EBNA2- und eine CBF1-Interaktion mit Chromatin. Wie in der Einleitung dieses Ergebnisteiles bereits erwähnt, beschreiben Zhao und Kollegen 1441 sog. „EBNA2-only“-Bindestellen. Dies sollen anhand der ChIP-seq Daten gefundene Positionen einer EBNA2-Chromatin-Interaktion im Genom sein, an der kein Signal für eine CBF1-Interaktion gefunden wurde. Leider wurden zu diesen Positionen keine weiteren Informationen veröffentlicht. Auch nach genauem Überprüfen konnten keine eindeutigen „EBNA2-only“-Bindestellen in den EBNA2- und CBF1-ChIP-seq Daten von Zhao und Kollegen gefunden werden. Es wurden mehrere hundert Positionen im UCSC Browser nach EBNA2- und CBF1-Bindestellen untersucht. An den Positionen der EBNA2-Signale befand sich an allen nachgeprüften Positionen auch ein Signal einer CBF1-Interaktion an der exakt gleichen Position oder in einem 100 bp Fenster. Auch die neue Auswertung durch den Bioinformatiker Christian Mertes lieferte keine eindeutigen „EBNA2-only“-Bindestellen. Eine mögliche Erklärung dafür, warum keine eindeutigen „EBNA2-only“-Bindestellen auffindbar waren, könnte sein, dass bei den bioinformatischen Auswertungen der CBF1-ChIP-seq-Daten der Grenzwert so hoch festgelegt wurde, dass geringe CBF1-Signale als negativ eingestuft wurden (Zhao, Zou et al. 2011).

2.1.2. ChIP-PCR Studien in CBF1-positiven und CBF1-negativen DG75-Zelllinien, die nach Doxyzyklinbehandlung EBNA2 exprimieren

Aus ungeklärten Gründen ist es mir nicht gelungen, eine Interaktion von ER/EBNA2 mit Chromatin in den für die genomweiten Expressionsstudien verwendeten Zelllinien nachzuweisen, weder in den CBF1-positiven SM295, noch in den CBF1-negativen SM296^{CBF1 neg.}. Erstaunlicherweise ist es mit neuen Zelllinien, die auch von DG75 und SM224.9^{CBF1 neg.} abstammen und einen doxyzyklininduzierbaren EBNA2-Expressionsvektor episomal tragen, gelungen. Die Zelllinien wurden von Cornelia Kuklik-Roos (AG Kempkes) etabliert und für die Versuche zur Verfügung gestellt. Sie entstanden durch stabile Transfektion von SM224.9^{CBF1 neg.} und DG75-Zellen mit einem doxyzyklininduzierbaren (östrogenunabhängigen) EBNA2-kodierenden Vektor. Die Versuche wurden mit nicht-induzierten Zellen und induzierten Zellen (12 Stunden nach Zugabe von Doxyzyklin) durchgeführt.

2.2. In CBF1-negativen Zellen ist die Interaktion von EBNA2 mit Chromatin schwächer

2.2.1. Interaktion von EBNA2 mit Chromatin in der Nähe CBF1-abhängig EBNA2 regulierter Gene

Zunächst wurde die EBNA2-Bindestelle P-44-3 im Promotor des bekannten EBNA2-Zielgenes *CD23* (oder *FCER2*) via ChIP-PCR in CBF1-pos. und -neg. Zellen überprüft. Nach Chromatinimmunpräzipitation mit einem EBNA2-spezifischen Antikörper wurde die Anreicherung des DNA-Fragmentes in diesem Bereich mit 101 bp umspannenden Primern quantifiziert (**Abbildung 19 A**). Es fällt auf, dass in den CBF1-positiven Zellen vor EBNA2-Induktion mit Doxyzylin (-Dox) mehr unspezifisch präzipitierte DNA nachgewiesen werden kann als in CBF1-negativen Zellen. Die Anreicherung nach Induktion und somit die Detektion spezifisch an EBNA2 gebundener DNA ist aber auch nach Abzug des unspezifischen Hintergrundes in CBF1-positiven Zellen eindeutig höher.

Als zweites Beispiel für eine EBNA2-Bindestelle, die sich in der Nähe eines CBF1-abhängig EBNA2-regulierten Genes befindet (5-fach aktiviert in SM295 und 1,7-fach aktiviert in SM296^{CBF1neg.}, p-Wert < 0,05), dient eine aus unserem Labor mehrfach bestätigte EBNA2-Bindestelle, ca. 10 kb stromabwärts des *ADAM28*-Genes, im *enhancer*-Bereich des *ADAM28* (Harth-Hertle, Scholz et al. 2013). An dieser Position konnte keine Anreicherung für EBNA2 oder CBF1 von Zhao und Kollegen in der untersuchten LCL IB4 nachgewiesen werden. Die ChIP-PCR-Versuche zeigen aber eindeutig eine EBNA2-Bindung an dieser Position in CBF1-positiven Zellen. Vergleichbar mit der Bindestelle im *CD23*-Promotor ist die Interaktion von EBNA2 mit Chromatin auch an dieser Position im *ADAM28-enhancer* bedeutend schwächer in den CBF1-negativen Zellen (**Abbildung 19 B**).

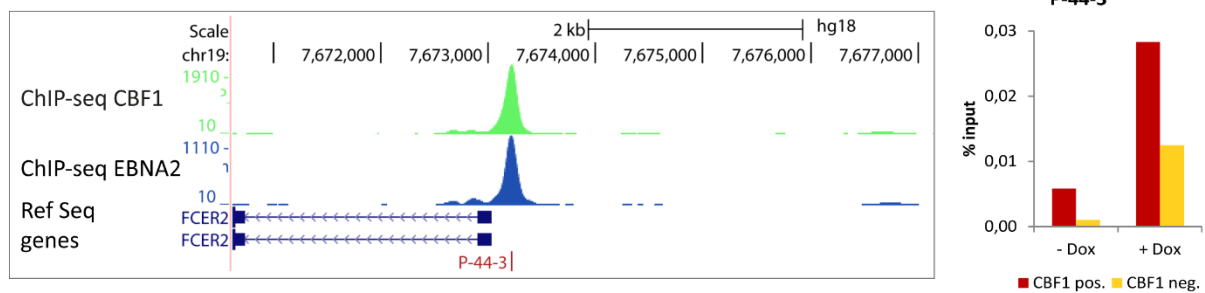
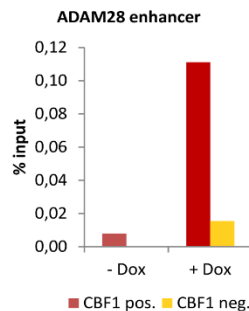
A**B**

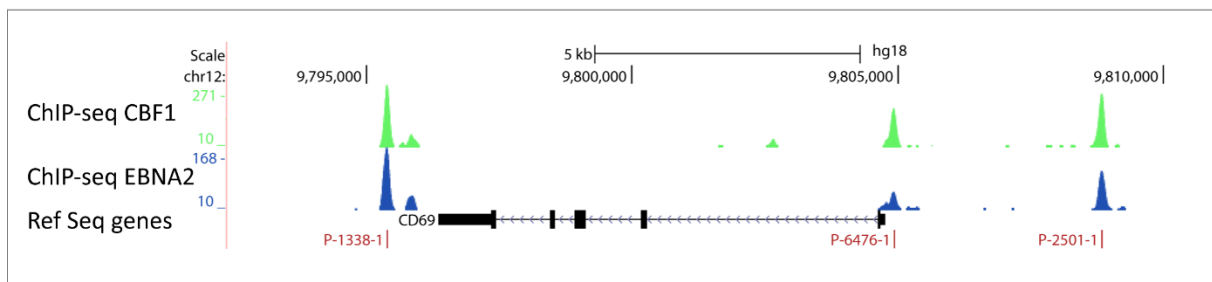
Abbildung 19: Bindet EBNA2 auch in CBF1-negativen Zellen an Chromatin?

CBF1-pos. und CBF1-neg. EBNA2-induzierbare Zellen wurden für 12 h mit Doxzyklin inkubiert, anschließend Chromatin präpariert, fragmentiert und mit einem Gemisch aus EBNA2 R3 und 1E6 Antikörper das transient exprimierte EBNA2 und die daran gebundenen Chromatinfragmente immunpräzipitiert. Nach Aufreinigung der kopräzipitierten DNA-Fragmente, wurden diese in qPCR-Versuchen quantifiziert. Für jedes Primerpaar wurde eine Standardkurve mit fragmentierten, aufgereinigten Chromatinverdünungen erstellt und eine Input Probe mit definierter Menge in Relation zu der zu untersuchenden Probe mitanalysiert. Die Ergebnisse werden als prozentualer Anteil der Input Probe (% Input) dargestellt. (A) Im rechten Teil der Abbildung ist das Balkendiagramm der % Input-Werte der Chromatinimmunpräzipitationen mit anschließender Quantifizierung der DNA-Fragmente in qPCR-Versuchen (ChIP-PCR) dargestellt. Die verwendeten Primer amplifizieren einen 101 bp großen Bereich im *CD23*-Promotor. Die Anreicherung von EBNA2 im *CD23*-Promotor wurde in induzierten und nicht induzierten CBF1-pos. und -neg. Zellen untersucht. Im linken Teil der Abbildung ist ein Ausschnitt des *CD23* (=FCER2)-Genortes dargestellt (Abbildung erstellt mit Hilfe des *UCSC Genome Browsers* (Kent, Sugnet et al. 2002)). Im oberen Teil des Ausschnittes findet man den Maßstab und die genau Position im Chromosom 19. Darunter folgen 2 ChIP-seq-Spuren für CBF1 und EBNA2 aus der Studie von Zhao und Kollegen und die schematische Darstellung des Transkriptionsstarts von *CD23* (=FCER2) nach der Ref Seq-Annotierung. Unter der schematischen Darstellung des *CD23*-Genes findet man in einer Linie mit dem EBNA2-Signal (= *peak*) die Markierung für den von Christian Mertes berechneten EBNA2-*peak* mit der dazugehörigen Nummerierung P-44-3. (B) Balkendiagramm zu den ChIP-PCR-Versuchen mit *ADAM28-enhancer* Primern, die einen knapp 100 bp großen Bereich ca. 10 kb stromabwärts des Transkriptionsstops des *ADAM28*-Genes amplifizieren.

2.2.2. Interaktion von EBNA2 mit Chromatin in der Nähe CBF1-unabhängig EBNA2-regulierter Gene

Die ChIP-PCR-Analyse von 6 Positionen in der Nähe CBF1-unabhängig regulierter EBNA2-Zielgene (*CD69* und *RGS1*) zeigte vergleichbare Ergebnisse zu den ChIP-PCR-Ergebnissen im *CD23*-Promotor und im *ADAM28-enhancer*. Wie in **Abbildung 20** und **Abbildung 21** zu sehen ist, gilt für alle Positionen, mit Ausnahme P-1717-2, dass die Anreicherung des jeweiligen Fragmentes in CBF1-positiven Zellen höher ist als die Anreicherung in CBF1-negativen Zellen. Für die Amplifikation und Quantifizierung der DNA-Fragmente in der Nähe des *CD69*-Genes habe ich Primer gewählt, die einen 160 bis 190 bp großen Bereich am Promotor (P-6476-1), ca. 3 kb stromaufwärts des Promotors (P-2501-1) und ca. 1 kb stromabwärts des *CD69*-Genes (P-1338-1), umspannen (**Abbildung 20**). In allen Beispielen ist die Anreicherung in den CBF1-positiven Zellen höher als in den CBF1-negativen Zellen, auch nach Abzug des Hintergrundes (nicht-induzierte Zellen).

A



B

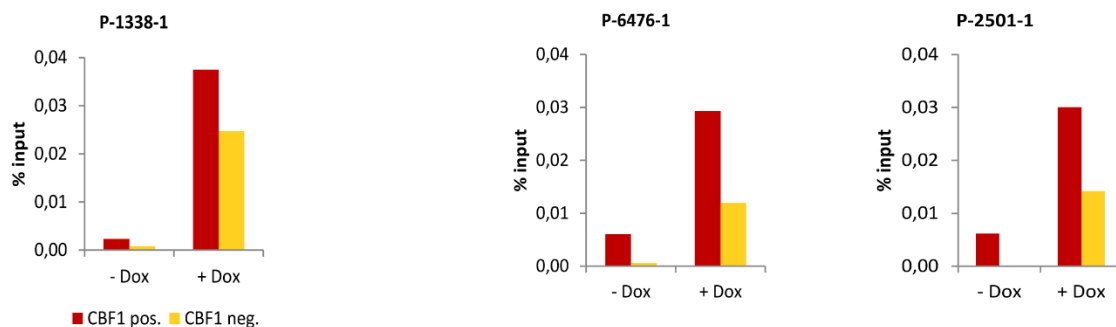


Abbildung 20: EBNA2-Chromatin Interaktion im Bereich des auch CBF1-unabhängig EBNA2-regulierten Genes *CD69*.

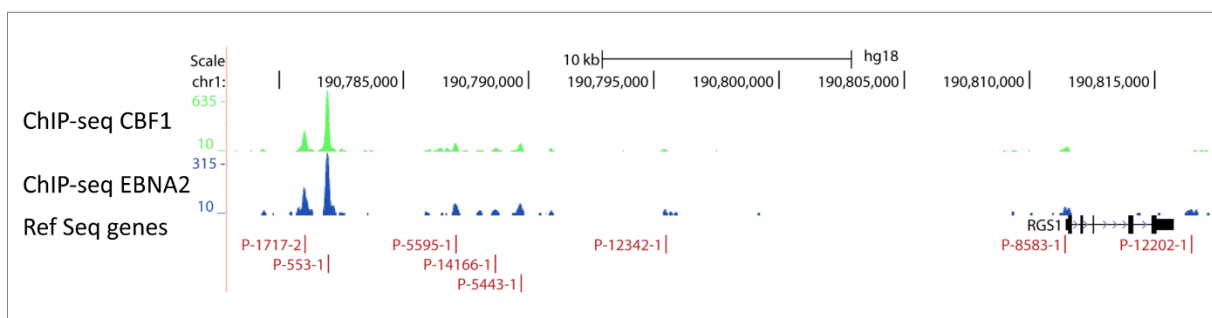
(A) Dargestellt ist der *CD69*-Genort und 5-10 kb stromauf- und stromabwärts (Abbildung erstellt mit Hilfe des *UCSC Genome Browsers* (Kent, Sugnet et al. 2002)). Der Ausschnitt zeigt im oberen Bereich den Maßstab und die genaue Position im Chromosom 12. Darunter folgen 2 ChIP-seq-Spuren für CBF1 und EBNA2 aus der Studie von Zhao und Kollegen und die schematische Darstellung des *CD69*-Genes nach der Ref Seq-Annotierung. Unter der schematischen Darstellung des *CD69*-Genes findet man in einer Linie mit dem jeweiligen EBNA2-peak der ChIP-seq-Spur, die Markierung für den von Christian Mertes berechneten peak mit den dazugehörigen Nummerierungen (P-1338-1 etc.). (B) Balkendiagramme zu den 3 EBNA2-peaks passenden ChIP-PCR-Versuchen. Dargestellt sind die % Input-Werte der ChIP-PCR-Versuche. Die ChIP-Versuche wurden mit EBNA2-spezifischen Antikörpern (R3

und 1E6) in nicht-induzierten und induzierten CBF1-pos. und -neg. Zellen durchgeführt. Die Primerpaare wurden so gewählt, dass sie an den Positionen P-1338-1, P-6476-1 und P-2501-1 einen 160 bis 190 bp großen Bereich amplifizieren.

Ein weiteres Beispiel für ein in CBF1-negativen Zellen reguliertes Gen ist *RGS1*. An diesem Genort habe wurden eine Position am Promotor (P-8583-1) und 2 Positionen ca. 30 kb stromaufwärts untersucht (P-553-1 und P-1717-2). Mit Ausnahme der Position P-1717-2 konnten die jeweiligen Chromatinfragmente mit den EBNA2-spezifischen Antikörpern auch an diesen Positionen in den CBF1-positiven Zellen stärker angereichert werden als in den CBF1-negativen Zellen (**Abbildung 21**).

Die Versuche wurden am Ende der Doktorarbeit nur einmal durchgeführt und müssen wiederholt werden, um die beobachteten Unterschiede zu bestätigen. Da mehrere Positionen im Genom untersucht wurden und sich bei fast allen Versuchen vergleichbare Ergebnisse zeigten, könnten diese aber als Wiederholungen angesehen werden und die Richtigkeit untermauern.

A



B

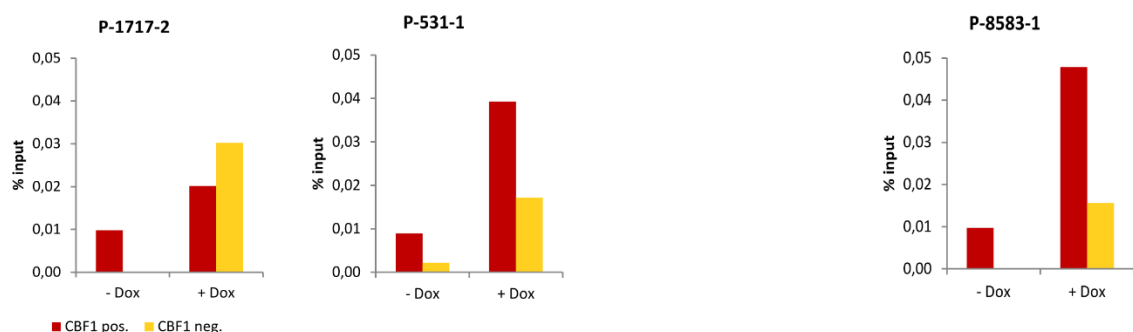


Abbildung 21: EBNA2-Chromatin Interaktion im Bereich des CBF1-unabhängig EBNA2-regulierten Genes *RGS1*.

(A) Dargestellt ist der *RGS1*-Genort und ca. 35 kb stromaufwärts (Abbildung erstellt mit Hilfe des *UCSC Genome Browsers* (Kent, Sugnet et al. 2002)). Der Ausschnitt zeigt im oberen Bereich den Maßstab und die genaue Position im Chromosom 1. Darunter folgen 2 ChIP-seq-Spuren für CBF1 und EBNA2 aus der Studie von Zhao und Kollegen und die schematische Darstellung des *RGS1*-Genes nach der Ref Seq-Annotierung. Unter der schematischen Darstellung des *RGS1*-Genes findet man in einer Linie mit dem EBNA2-peak der ChIP-seq-Spur, die Markierungen für die von Christian Mertes berechneten EBNA2-

peaks mit den dazugehörigen Nummerierungen. (B) Balkendiagramme der ChIP-PCR-Versuche zu 3 der 8 in diesen Bereich gefundenen EBNA2/CBF1-*peaks*. Dargestellt sind die % Input Werte der ChIP-PCR-Versuche. Die ChIP-Versuche wurden mit EBNA2-spezifischen Antikörpern (R3 und 1E6) in nicht-induzierten und induzierten CBF1-pos. und CBF1-neg. Zellen durchgeführt. Die Primerpaare wurden so gewählt, dass sie an den Positionen P-1717-2, P-531-1 und P-8583-1 einen 160 bis 180 bp großen Bereich amplifizieren.

3. Zusammenfassung

Die genomweiten Expressionsstudien zeigen, dass der virale Transkriptionsfaktor EBNA2 in den Burkitt-Lymphomzellen DG75 950 Transkripte (lincRNAs und proteinkodierende RNAs) signifikant mindestens 2-fach und 40 microRNAs signifikant mindestens 1,5-fach reguliert. Einige Bestandteile des Mechanismus dieser Regulation sind bekannt. Als erstes sei genannt, dass sich EBNA2 eines zellulären, ubiquitär exprimierten DNA-bindenden Proteins, CBF1, bedient, um in Kontakt mit Chromatin zu kommen.

Des Weiteren ist bekannt, dass der Proteinkomplex um EBNA2 bei der Transkriptionsinitiation aus sehr vielen weiteren Proteinen aufgebaut ist. Ein Hinweis, dass noch weitere DNA-Bindeproteine im EBNA2-Transkriptionskomplex vorhanden sein müssen, liefern die Ergebnisse dieser Arbeit: Es konnte erstmalig gezeigt und bestätigt werden, dass die Transkription auch in CBF1-negativen Zellen durch EBNA2 reguliert werden kann. In der CBF1-negativen, von DG75-abstammenden Zelllinie SM296^{CBF1 neg.} werden 132 Transkripte signifikant mindestens 2-fach durch EBNA2 induziert oder reprimiert. Anzumerken ist hier, dass die Regulation in CBF1-neg.-Zellen schwächer ist als die Regulation in CBF1-pos.-Zellen.

Ergebnisse von ChIP-PCR-Versuchen haben zudem gezeigt, dass EBNA2 in CBF1-neg.-Zellen noch mit Chromatin assoziiert ist, allerdings ist die Interaktion schwächer als in CBF1-pos.-Zellen.

V. Ergebnisse - Teil 2

Struktur- und Funktionsanalyse der EBNA2-N-terminalen Dimerisierungsdomäne

1. Mutationsanalysen basierend auf NMR-Struktur-Daten der N-terminalen Domäne

Die Proteindomäne, die im Mittelpunkt des zweiten Teils der Ergebnisse steht, umfasst die Aminosäuren 1-58 des viralen nukleären Antigens und Transkriptionsfaktors EBNA2. Es werden erstmalig Strukturdaten dieser Domäne gezeigt und die Ergebnisse funktioneller Studien dargestellt. Die im Folgenden gezeigten Studien stellen eine umfassende Charakterisierung einer EBNA2-Proteindomäne dar und wir schlagen die Bezeichnung „END-Domäne“ für EBNA2-N-terminale Dimerisierungsdomäne vor. Die Ergebnisse wurden in der wissenschaftlichen Fachzeitschrift *Plos Pathogens* publiziert (Friberg, Thumann et al. 2015).

1.1. Die END-Domäne faltet sich und dimerisiert in Lösung

Das Projekt wurde in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Professor Michael Sattler (Institut für Strukturbiologie, Helmholtz Zentrum München) durchgeführt. Anders Friberg aus der AG Sattler konnte die NMR-Struktur der END-Domäne aufklären. Im folgenden Kapitel werden zunächst die Ergebnisse der AG Sattler zusammengestellt, die dann der Ausgangspunkt der biochemischen und funktionellen Analysen dieser Arbeit waren.

1.1.1. Erste Strukturvorhersagen für die END-Domäne

Die Primärstruktur des vollständigen EBNA2-Proteins weist Bereiche auf, die ausschließlich aus Prolinen (PolyP) oder repetitiven Arginin/Glyzin (polyRG) Regionen bestehen (**Abbildung 23 A**). Zudem ist die Aminosäurezusammensetzung des EBNA2-Proteins auch außerhalb der PolyP-Region von einem insgesamt sehr hohen Gehalt an Prolinen von über 20 % geprägt. Erfahrungsgemäß ist es nicht möglich, die Struktur von Proteinen mit diesen physikochemischen Eigenschaften vollständig aufzuklären. Unsere Kooperation zur Strukturaufklärung des EBNA2-Proteins wurde durch eine Beobachtung von Anders Friberg aus der AG Sattler zu einem Zeitpunkt initiiert, an dem noch keine Information zur Struktur dieses Proteins vorlagen. Er nutzte das von McGuffin und Kollegen öffentlich zugängliche Programm PSIPRED (*Psi-blast based secondary structure prediction*), um die Sekundärstruktur von EBNA2 vorherzusagen (McGuffin, Bryson et al. 2000). Es zeigte sich, dass die ersten 58 Aminosäuren der N-terminalen Region des EBNA2-Proteins möglicherweise 4 β -Faltblattstrukturen ausbilden (**Abbildung 22**). Zudem gibt **Abbildung 22** erste Hinweise darauf, dass die END-Domäne eine essentielle Domäne für das EBNA2-Protein ist, da die Sekundärstruktur nach den Vorhersagen stark konserviert ist.

PSIPRED:

	$\beta 1$			$\beta 2$			$\beta 3$			$\beta 4$		
	<u>1</u>	<u>10</u>	<u>20</u>	<u>30</u>	<u>40</u>	<u>50</u>						
B95-8	MPTFYALALHGGQ	TYHLIVDT	DSLGNP	SLSVIP	SPNPYQEQLSDTPL	IPLTIFVGENTGV						
AKATA	MPTFYALALHGGQ	TYHLIVDT	DSVGNP	SLSVIP	SPNPYQEQLSDTPL	IPLTIFVGENTGV						
GD1	MPTFYALALHGGQ	TYHLIVDT	DSVGNP	SLSVIP	SPNPYQEQLSDTPL	IPLTIFVGENTGV						
HKNPC1	MPTXYLALHGGQ	TYHLIVDT	DSRGNP	SLSVIP	SPNPYQEQLSDTPL	IPLTIFVGENTGV						
MUTU	MPTFYALALHGGQ	TYHLIVDT	DSLGNP	SLSVIP	SPNPYQEQLSDTPL	IPLTIFVGENTGV						
AG876	MPTYYLALHGGQ	SYNLIVDT	DMSGNP	SLSVIP	TPNPYQEQLSNNPL	IQLQIVVGENTGA						
PAVIANE	MPTYYVAGRSGD	QFILDVFNDET	GRPA	ILLTPTVPALGPLSEAPLI	PLKIIVGESSDQ							
MAKAKEN	MPTYYVAVQSGG	QYILHVA	TDERGQ	PVLSLTSTLS	-TQALSDRPLIQLKIIVGD	ENEG						

Abbildung 22: Strukturvorhersagen mit dem Programm PSIPRED.

Dargestellt ist ein Alignment der EBNA2-Proteinsequenzen aus EBV Typ 1 Stämmen (B95-8, AKATA, GD1, HKNPC1 und MUTU), einem EBV Typ 2 Stamm (AG876) und den LCV-Stämmen von Pavianen und Makaken. In grau hinterlegt sind die Bereiche, die nach Vorhersagen mit Hilfe des Programmes PSIPRED eine β -Faltblatt-Struktur ausbilden.

1.1.2. Die NMR-Struktur der END-Domäne

Zur Charakterisierung der biochemischen und strukturellen Eigenschaften dieser N-terminalen Domäne, wurde sie zunächst in *E. coli* exprimiert, unter nativen Bedingungen aufgereinigt und die dreidimensionale Struktur mittels heteronuklearer kernmagnetischer Resonanzspektroskopie (oder NMR-Spektroskopie von *nuclear magnetic resonance*) bestimmt.

Die Struktur der N-terminalen Domäne in Lösung konnte anhand der NMR-Spektren in hoher Auflösung definiert werden. In die Strukturberechnung sind Informationen der Abstandsbeschränkungen eingeflossen, die von über 1250 Kern-Overhauser-Effekt (=NOE von *Nuclear Overhauser Effect*) Kreuzsignalen pro Monomer abgeleitet wurden. 205 NOE-Kreuzsignale der insgesamt 1250 NOEs beschreiben die inter-Monomer-Abstandsbeschränkungen. Das entspricht bei 58 Aminosäuren über 20 Abstandsinformationen pro Aminosäure. Mehr als 18 Abstandsbeschränkungen pro Aminosäure bedeutet schon eine sehr hohe Auflösung (Kwan, Mobli et al. 2011). Weiteres Qualitätsmerkmal einer NMR-Struktur mit hoher Auflösung ist ein RMSD (*root-mean-square deviation*)-Wert des Proteinerückgrates von 0,3-0,5 Å. Der RMSD-Wert beschreibt den mittleren Abstand der Atome von übereinandergelegten Proteinstrukturen mehrerer Strukturberechnungen. Die NMR-Struktur der N-terminalen Domäne hat einen RMSD-Wert von $0,35 \pm 0,08$.

Die Berechnungen aus den heteronuklearen NMR-Spektren zeigten, dass die N-terminale Domäne ein paralleles Homodimer ausbildet, wobei jedes Monomer aus 4 β -Faltblätter ($\beta 1$ - $\beta 4$) und einer kurzen, exponierten α -Helix ($\alpha 1$) gebildet wird. Die β -Faltblätter sind geschwungen und antiparallel angeordnet, $\beta 1$ antiparallel zu $\beta 4$ und $\beta 2$ antiparallel zu $\beta 3$. **Abbildung 23 A** zeigt eine schematische Übersicht über die funktionellen Einheiten des EBNA2-Proteins mit der N-terminalen-Domäne in blau hervorgehoben. In **Abbildung 23 B** ist das *Cartoon*-Modell der NMR-Struktur des Dimers der N-terminalen-Domäne dargestellt.

Anders Friberg hat mit den Programmen DALI und PDBeFold (EMBL/EBI) intensiv versucht in der Proteindatenbank (PDB) ähnlich gefaltete Domänen zu finden. Die Suche ergab nur Ergebnisse mit niedriger Übereinstimmung der gefundenen Strukturen aus den Datenbanken mit der END-Domäne. Die besten 20 Treffer der beiden Programme wurden zusätzlich von Hand überprüft. Von den 5 Strukturelementen ($\alpha 1$ und $\beta 1$ - $\beta 4$) der N-terminalen Domäne von EBNA2 konnten bei diesen Treffern maximal 2 ähnliche Elemente innerhalb einer Domäne gefunden werden. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Strukturkomposition des N-Terminus von EBNA2 einzigartig ist und wir schlagen die Bezeichnung **END-Domäne** (EBNA2-N-terminale Dimerisierungsdomäne) für die Aminosäuren 1-58 umfassende Domäne von EBNA2 vor.

Das Dimer der END-Domäne ist durch die Ausbildung eines hydrophoben Kerns sehr stabil. An der Ausbildung dieses hydrophoben Kerns sind die Seitenketten der hydrophoben Aminosäuren Leu8, Tyr14, Leu16, Val18, Ile46, Leu48, Ile50 und Val52 beteiligt (siehe **Abbildung 23 C**, blau markierte Aminosäuren und **Abbildung 24**, blaue Quadrate). Zusätzlich zu diesen hydrophoben Wechselwirkungen werden Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Monomeren ausgebildet. In Wasserstoff-Deuterium-Austauschexperimenten (H/D-Austausch) konnte gezeigt werden, dass viele Amid-Protonen des Proteinerückgrates so vom umgebenden Medium abgeschirmt sind, dass sie nicht mit Deuteronen ausgetauscht werden (**Abbildung 24**, grüne Rechtecke). Bei den H/D-Austauschexperimenten wurden NMR-Spektren der END-Domäne nach 10-minütiger Inkubation in schwerem Wasser (D_2O) aufgenommen. Alle Amid-Protonen, die nicht mit Deuteronen ausgetauscht wurden und weiterhin ein Signal im NMR-Spektrum zeigten, sind wahrscheinlich an der Ausbildung von inter- und intra-Monomer Wasserstoffbrückenbindungen beteiligt. Unsere Daten deuten darauf hin, dass bei der END-Domäne sowohl zwischen den β -Faltblättern 2 und 2' als auch zwischen den β -Faltblättern 4 und 4' Wasserstoffbrückenbindungen ausgebildet werden (mit/ohne Apostroph bedeutet eine Zuordnung zu den beiden Monomeren; **Abbildung 24**, grüne Rechtecke).

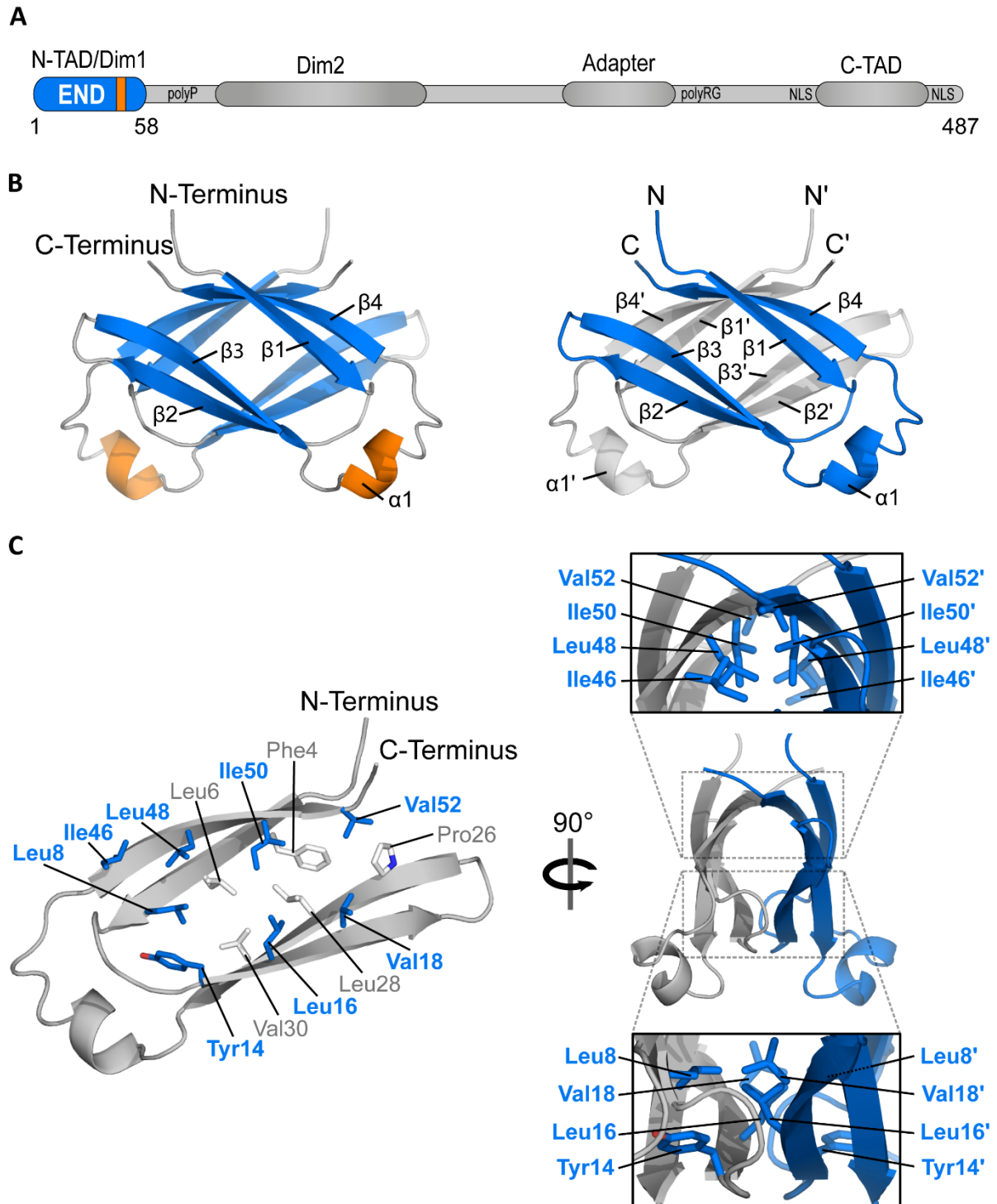


Abbildung 23: Die Struktur der END-Domäne.

(A) Schematische Darstellung der wichtigsten Domänen und Merkmale des EBNA2-Proteins. N-TAD/Dim1 = N-terminale Transaktivierungsdomäne/Dimerisierungsdomäne 1, polyP = prolinreiche Region, Dim2 = Dimerisierungsdomäne 2, Adapter = Domäne, die mit CBF1 interagiert, polyRG = arginin- und glycinreiche Region, NLS = Kernlokalisierungssignal, C-TAD = C-terminale Transaktivierungsdomäne. (B) NMR-Struktur der END-Domäne (EBNA2-N-terminale Dimerisierungsdomäne). Links: β -Faltblätter sind in blau, Helices in orange und Schleifen in grau gezeigt. Rechts: Die Monomere sind in blau und grau gezeigt. (C) Auf einer Seite jedes Monomers findet man zahlreiche hydrophobe Aminosäuren (AS), die in der Darstellung als Stäbchenmodelle

hervorgehoben sind. In fett blau sind diejenigen hydrophoben AS hervorgehoben, die in Richtung Grenzfläche des Dimers zeigen. Im Zoom auf der rechten Seite sind diese Grenzflächenamino­säuren im Dimer noch einmal vergrößert gezeigt.

1.1.3. Hydrophobe Aminosäuren der END-Domäne sind spe­zies­übergreifend stark konserviert

96 % der Aminosäuren der Primärsequenzen des N-Terminus von EBNA2-Proteinen verschiedener Typ 1 EBV-Stämme (AKATA, GD1, HKNPC1, MUTU und B95-8) sind identisch (Baer, Bankier et al. 1984, Lin, Wang et al. 2013) . Der Typ 2 EBV-Stamm AG876 weicht in seiner Sequenz etwas vom Typ 1 ab (79% identisch). Beim Vergleich von B95-8 mit den Pavian- und Makaken-Lymphokryptoviren (LCV) zeigt sich noch eine 41- bzw. 50-prozentige Identität der Primärsequenzen (**Abbildung 24**). Bezeichnend dabei ist, dass in der Gruppe der identischen Aminosäuren (AS) der Anteil an hydrophoben AS sehr hoch ist. Von den 8 hydrophoben AS, die an der Dimer-Grenzfläche positioniert sind (**Abbildung 24**, blaue Quadrate), sind zwischen Affen- und Menschen-LCV 6 identisch und 2 ähnlich hydrophob. Diese signifikante Ähnlichkeit bzw. Identität an hydrophoben AS an den identischen Positionen deutet darauf hin, dass die Dimerbildung der END-Domäne zwischen Pavianen, Makaken und Menschen konserviert, und wahrscheinlich wichtig für die Funktion von EBNA2 ist.

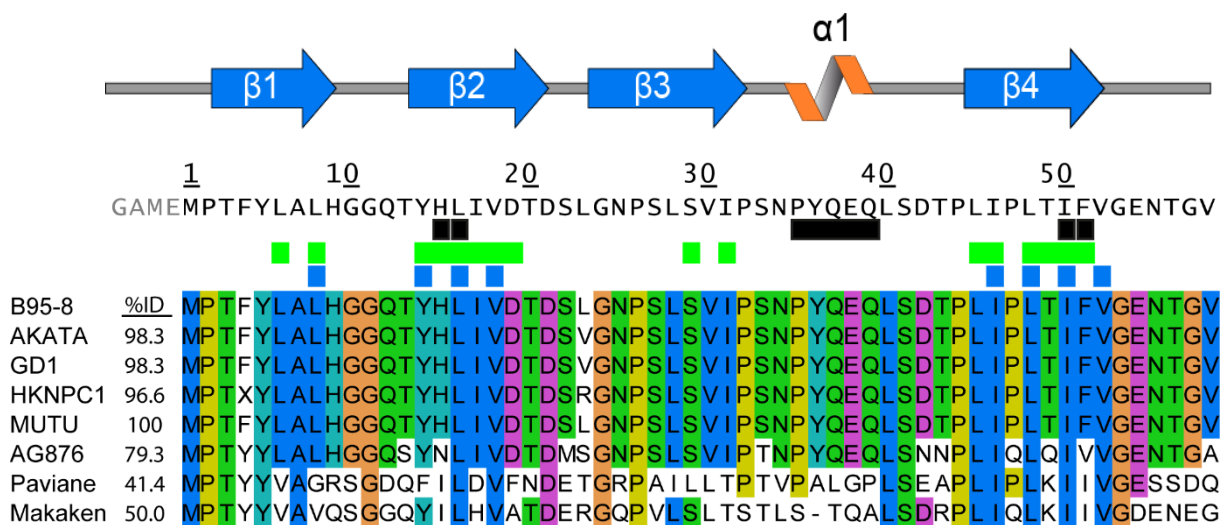


Abbildung 24: Hydrophobe Aminosäuren der END-Domäne sind spe­zies­übergreifend stark konserviert.

Alignment der DNA-Sequenzen humaner END-Domänen und den entsprechenden Sequenzen aus verwandten Affenviren. Zur Übersicht sind als erstes die Elemente der Sekundärstruktur, die aus den NMR-Daten hervorgehen, schematisch gezeigt. β1-β4 sind die β-Faltblätter und α1 ist die kurze alpha-Helix. Oberhalb des Alignments sind die Aminosäuren 1-58 der END-Domäne mit den Positionsbezeichnungen dargestellt. Die schwarzen Rechtecke zeigen die Positionen, die mutiert wurden. Grüne Rechtecke markieren die Positionen der Aminogruppen des Rückgrates, die bei H/D-Austausch-Versuchen nicht mit dem Lösungsmittel in Berührung kamen. Mit einem blauen Rechteck sind die Aminosäuren gekennzeichnet, die an der Ausbildung des hydrophoben Kerns beteiligt sind. Im Alignment wurden mehrere Typ 1 EBV-Stämme (AKATA: AFY97831.1; GD1: Q3KSV2.1; HKNPC1:

AFJ06836.1; MUTU: AFY97916.1), der Typ 2 EBV-Stamm AG876 (YP_001129441.1) und LCV-Stämme von Pavianen (AAA79034.1) und Makaken (YP_067943.1) verglichen. Eine Aminosäure ist farbig markiert, wenn die Sequenzidentität aller Sequenzen größer als 60 % ist. Die Aminosäuren sind folgendermaßen eingeteilt: hydrophob (blau; M, F, L, I, V, A) klein und polar (grün; T, Q, S, N), aromatisch polar (Cyan; Y, H), negativ geladen (magenta; D, A), Glyzin (orange) und Prolin (gelb).

1.2. Design verschiedener END-Domänen-Mutanten: Grenzflächen- und Oberflächenmutanten

Anhand der NMR-Struktur wurden 4 Aminosäuren für Mutationsstudien ausgewählt. Dies sind His15, Leu16, Ile50 und Phe51. Zusätzlich wurde eine Deletionsmutante, bei der die kurze α -Helix der Aminosäuren 35-39 deletiert ist ($\Delta\alpha 1$), untersucht. Die Mutanten kann man aufgrund der Position ihrer Mutationen im gefalteten Dimer in zwei Gruppen einteilen: Grenzflächenmutanten und Oberflächenmutanten:

1.2.1. Grenzflächenmutanten:

Leu16 und Ile50 sind hydrophobe, konservierte AS, die sich an der Grenzfläche zwischen den beiden Monomeren befinden und so positioniert sind, dass sie auch jeweils miteinander interagieren. Durch Mutation dieser Aminosäuren zu Alanin (L16A und I50A) oder Aspartat (L16D und I50D) soll diese Wechselwirkung durch den Austausch gegen eine kleinere Aminosäure (Alanin) oder gegen eine geladene Aminosäure (Aspartat) gestört werden (**Abbildung 25 A**, grün markierte AS).

1.2.2. Oberflächenmutanten:

His15, Phe51 und die Helix $\alpha 1$ zeigen in der NMR-Struktur nach außen, bzw. vom hydrophoben Kern weg. Sie könnten demnach eine wichtige Funktion bei der Interaktion mit anderen Faktoren haben, die z.B. für die Transkription wichtig sind. Die Helix $\alpha 1$ wurde für unsere funktionellen Studien deletiert, His15 und Phe51 durch Alanin ersetzt ($\Delta\alpha 1$, H15A und F51A; **Abbildung 25 A**, orange markierte AS).

1.3. Die Mutation von hydrophoben Aminosäuren zerstört die Interaktion der EBNA2-Monomere

EBNA2 besitzt mindestens 2 Dimerisierungsdomänen, zum einen den hier untersuchten N-Terminus (AS 1-58, END-Domäne) und zum anderen eine Domäne weiter C-terminal (AS 96-210) (Horvath and Schubach 1993, Harada, Yalamanchili et al. 2001, Gordadze, Onunwor et al. 2004). Eine Frage, die es zunächst zu klären gab, war, ob die Grenzflächenmutationen der END-Domäne die Dimerisierung des vollständigen EBNA2 beeinflussen. Um diese Frage zu beantworten, wurden jeweils ein N-terminales Fragment des EBNA2-Wildtyp und eine EBNA2-Mutante koexprimiert. Das Wildtyp-EBNA2-Fragment umfasst beide Dimerisierungsdomänen von EBNA2 (AS 1-199) und ist fusioniert mit einem C-terminalen FLAG-Tag (F199). Die EBNA2-Mutanten sind vollständig (AS 1-487) und fusioniert mit einem Hämaggglutinin-Tag (HA-Tag,

Übersicht siehe **Abbildung 25 B**). Es wurden alle Grenzflächen- und Oberflächenmutanten und zusätzlich zwei HA-getaggte Deletionsmutanten ($\Delta 3-30$ und $\Delta 3-52$) getestet. Die Expressionsplasmide für die Deletionsmutanten wurden freundlicherweise von Paul D. Ling (Baylor College of Medicine, Houston) zur Verfügung gestellt. Nach 24 Stunden transienter Koexpression jeweils einer EBNA2-Mutante zusammen mit EBNA2-F199 in DG75-Zellen, wurde eine Immunpräzipitation (IP) mit einem HA-spezifischen Antikörper durchgeführt und anschließend das Immunpräzipitat im Western Blot analysiert. Für die Detektion der Proteine des Immunpräzipitats nach dem Western Blot wurde ein Flag-spezifischer Antikörper und ein EBNA2-spezifischer Antikörper, der ein Epitop im C-Terminus von EBNA2 erkennt, verwendet (EBNA2 R3 Antikörper von Elisabeth Kremmer). Mit dem EBNA2 R3 Antikörper kann man das trunkierte EBNA2-F199 nicht detektieren, da der C-Terminus und somit das Epitop für diesen Antikörper fehlt. Eine intakte Dimerisierung von EBNA2 liegt vor, sobald im Immunpräzipitat EBNA2 mit dem Flag-spezifischen **und** mit dem EBNA2-spezifischen Antikörper detektiert werden können. Eine intakte Dimerisierung konnte demnach für EBNA2-Wildtyp (**Abbildung 25 C**), die Grenzflächenmutanten L16A und I50A (**Abbildung 25 D**) und die Oberflächenmutanten (**Abbildung 25 E**) beobachtet werden. Bei der Wahl der Mutanten wurde die Hypothese aufgestellt, dass sich Punktmutationen an den Positionen L16 und I50 auf die Dimerisierungseffizienz auswirken. Es stellte sich heraus, dass die Substitution der AS L16 und I50 mit Alanin kaum Einfluss auf die Dimerisierungseffizienz nimmt. Substituiert man diese hydrophoben AS (L16 und I50) mit dem geladenen Aspartat, so wird die Dimerisierung fast vollständig inhibiert (**Abbildung 25 D**).

Die Bildung eines Dimers der Oberflächenmutanten und des EBNA2-wt ist ähnlich effizient (vergleiche **Abbildung 25 C** mit **E**). Es fällt auf, dass EBNA2-H15A, $-\Delta\alpha 1$ und -F51A in diesem Versuch etwas schwächer exprimiert sind. Für dieses Experiment ist dies nicht entscheidend, da eine ausreichende Menge an EBNA2-H15A, $-\Delta\alpha 1$ und -F51A vorhanden war, um vergleichbare Mengen an EBNA2-F199 zu koimmunpräzipitieren und die effiziente Dimerisierung zu zeigen.

Im Immunpräzipitat nach Koexpression der Deletionsmutanten $\Delta 3-30$ und $\Delta 3-52$ mit F199 konnte eine schwache Interaktion nachgewiesen werden. Diese Interaktion wird wahrscheinlich über die 2. Dimerisierungsdomäne vermittelt (**Abbildung 25 F**). Überraschend dabei ist, dass die Dimerisierungseffizienz bei den Deletionsmutanten $\Delta 3-30$ und $\Delta 3-52$ etwas stärker ausgeprägt zu sein scheint als bei den beiden Punktmutanten L16D und I50D (**Abbildung 25 D**). Dies könnte bedeuten, dass die mutierten, und sich vielleicht abstoßenden N-Termini, die Dimerisierung stärker behindern, als eine Deletion dieses Bereiches. Möglich wäre, dass die N-Termini, die die Punktmutation aufweisen, eine Struktur ausbilden, welche die 2. Dimerisierungsdomäne maskiert.

Um zu prüfen, ob wichtige Teilfunktionen der EBNA2-Mutanten erhalten geblieben sind, wurden alle Immunpräzipitate im Western Blot auf die Präsenz von CBF1 untersucht. Alle END-Domänen-Mutanten interagieren noch mit endogenem CBF1-Protein (**Abbildung 25 C, D, E, F**, jeweils 3. Zeile). EBNA2 interagiert mit CBF1 im Bereich einer konservierten Region im C-

terminalen Drittel des Proteins (Aminosäuren 280 - 337) (Hsieh and Hayward 1995). Dieser Bereich wird demnach nicht durch die Mutationen beeinflusst und die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die EBNA2-Mutanten in dieser Region richtig gefaltet sind.

A

Grenzflächen-
mutanten:

L16A/D

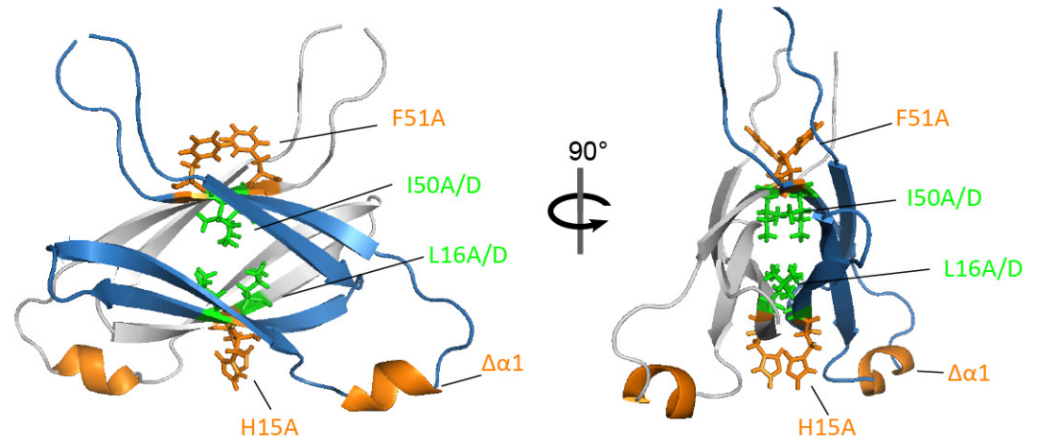
I50A/D

Oberflächen-
mutanten:

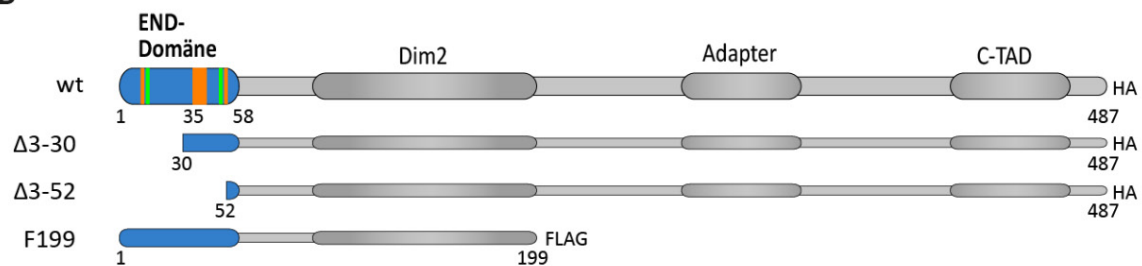
H15A

F51A

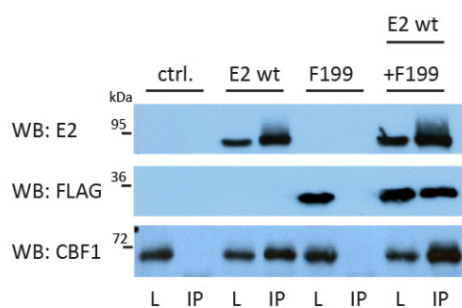
$\Delta\alpha1$



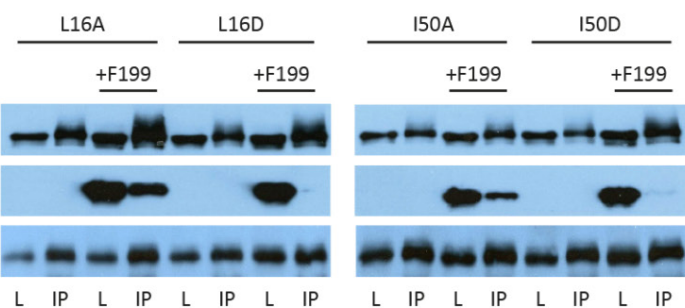
B



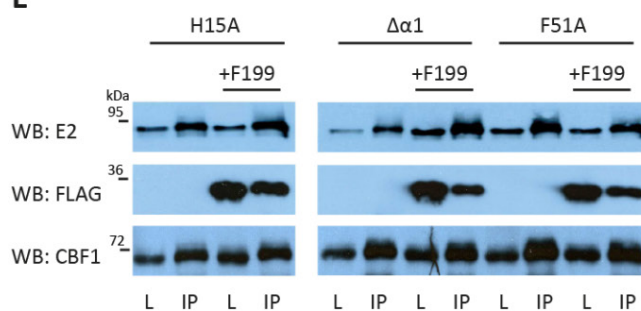
C



D



E



F

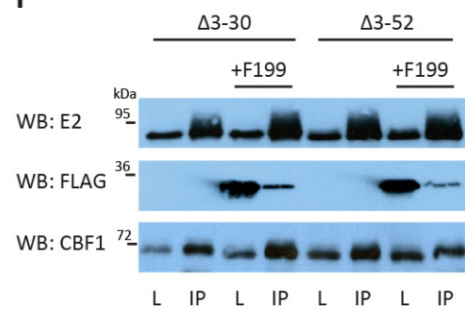


Abbildung 25: Der Einfluss der Grenzflächen- und Oberflächenmutationen auf die EBNA2-Dimerisierung.

Abbildung 25: Der Einfluss der Grenzflächen- und Oberflächenmutationen auf die EBNA2-Dimerisierung.

(A) Cartoon-Modell der END-Domäne. Mutierte Aminosäuren an der Dimer-Grenzfläche (grün) und an der Oberfläche (orange) wurden als Stäbchenmodell hervorgehoben. (B) Schematische Darstellung des vollständigen EBNA2-Proteins, der Deletionsmutanten $\Delta 3-30$ im $\Delta 3-52$ und des trunkierten EBNA2, welches Aminosäuren 1-199 umfasst (F199). Die orange und grün markierten Bereiche der END-Domäne zeigen die Positionen der Punktmutationen und der deletierten α -Helix 1 ($\Delta\alpha 1$, Aminosäuren 35-39). Das trunkierte EBNA2 ist mit einem Flag-Tag fusioniert (F199), EBNA2-Wildtyp (wt) und alle Mutanten sind mit einem HA-Tag fusioniert. (C - D) EBNA2-wt und END-Domänen-Mutanten wurden mit trunkiertem F199 in DG75 Burkitt-Lymphom-Zellen koexprimiert. Die Immunpräzipitationsversuche wurden mit einem HA-spezifischen Antikörper durchgeführt und die Detektion der präzipitierten Proteine erfolgte mit EBNA2- (E2), Flag- und CBF1-spezifischen Antikörpern im Western Blot (WB). Die Proteinkomplexe wurden nach der Immunpräzipitation (IP) in einem kleineren Volumen Laemmli-Puffer eluiert, so dass das Immunpräzipitat im Vergleich zum Lysat (L) 7,5-fach konzentriert ist.

1.4. Histidin 15, Leucin 16, Isoleucin 50 und die α -Helix 1 sind wichtig für die Funktion von EBNA2

Es wurde bereits beschrieben, dass die Dimerisierung von EBNA2 eine Voraussetzung für die Transaktivierung des viralen Zielgenes *LMP1* ist. Bei dieser Studie wurden aminoterminalen Deletionsmutanten untersucht (Gordadze, Onunwor et al. 2004). In dieser Arbeit wurde die Auswirkung von Punktmutationen und der Deletion der AS 35-39, auf die Aktivierung der viralen EBNA2-Zielgene *Cp*, *LMP1* und *LMP2A* und der zellulären EBNA2-Zielgene *CD23* und *CCL3* untersucht. Ein Maß der Aktivierungseffizienz bei diesen Versuchen war die Menge an *Cp*-, *LMP1*-, *LMP2A*-, *CD23*- oder *CCL3*-Transkripten oder die Menge an LMP1-Protein in den entsprechenden Zelllysaten, die durch EBNA2-Wildtyp oder EBNA2-Mutanten induziert werden konnte. Alle Versuche wurden in Eli-BL-Zellen durchgeführt, einer Burkitt-Lymphomzelllinie, die sich dadurch auszeichnet, dass sie EBV-positiv ist, aber nur EBNA1 exprimiert. Alle anderen nukleären Antigene und die LMPs werden nicht exprimiert. Erst nach transients Expression von funktionsfähigem EBNA2 wird in dieser Zelllinie z.B. das endogene LMP1 induziert (Rooney, Rowe et al. 1985, Rowe, Rowe et al. 1987). Diese Eigenschaft konnte für die funktionellen Analysen der EBNA2-Mutanten genutzt werden.

Eli-BL-Zellen wurden nach 24 Stunden transients Expression von EBNA2-Wildtyp und EBNA2-Mutanten geerntet und parallel RNA- und Proteinlysate präpariert. Zunächst wurde der Einfluss der EBNA2-Mutationen auf die Zielgenaktivierung auf Transkriptebe Ebene untersucht. Nach reverser Transkription (RT) der isolierten RNA wurde die Menge an Transkripten in einer quantitativen PCR-Reaktion (qPCR) ermittelt.

1.4.1. Transiente Expression von EBNA2 hat keinen Einfluss auf die Transkriptionsregulation des C-promotors in der Zelllinie Eli-BL

Da Eli-BL-Zellen EBV-positiv sind, muss zunächst geklärt werden, ob durch die transiente Transfektion von EBNA2 die Expression des endogenen EBNA2 induziert wird und somit die Analyse von transient transfizierten Mutanten nicht mehr möglich wäre. Für die Expression von EBNA-LP, EBNA2 und die EBNA3s ist in der Latenz der C-Promotor (Cp) zuständig (Woisetschlaeger, Yandava et al. 1990). Er besitzt eine CBF1-Bindestelle und kann z.B. in LCLs durch EBNA2 induziert werden (Ling, Hsieh et al. 1994). In Eli-BL-Zellen ist dieser Promotor, wahrscheinlich durch Methylierung, still gelegt (Robertson, Manns et al. 1996). Um sicher zu stellen, dass der C-promotor in den untersuchten Eli-BL-Zellen auch still gelegt ist und nicht durch EBNA2 induziert werden kann, wurden RT-qPCRs für das Transkript dieses Promoters durchgeführt. Das Transkript war in allen Proben kaum detektierbar, d.h. EBNA2-wt und alle EBNA2-Mutanten beeinflussten die Transkription des Cp nicht (**Abbildung 26**). Auch konnte über qPCR-Versuche sichergestellt werden, dass sich kein endogenes EBNA2 in den Eli-BL-Zellen befindet (Daten nicht gezeigt).

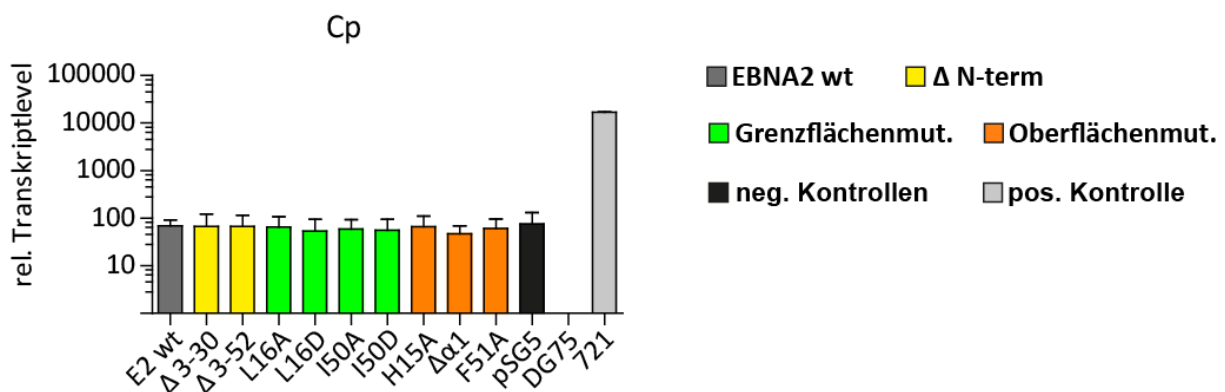


Abbildung 26: Der C-Promoter (Cp) wird in Eli-BL durch transient exprimiertes EBNA2 nicht beeinflusst.

1 x 10⁷ Eli-BL-Zellen wurden mit 5 µg Expressionsvektoren für EBNA2-wt, N-terminale Deletionsmutanten, END-Domänen Grenzflächen- und Oberflächenmutanten und einem Kontrollvektor (pSG5) transfiziert. Nach 24 Stunden transienter Expression wurde RNA isoliert und in cDNA revers transkribiert. Dargestellt ist die relative Transkriptmenge des endogenen C-Promotors nach Quantifizierung via qPCR. Die Transkriptmengen sind auf *Aktin*-Transkripte normalisiert. Als Positiv- und Negativkontrolle wurden die EBV-positive 721-Zelllinie und die EBV-negative DG75-Zelllinie mit in die Analyse einbezogen. Es sind die Mittelwerte aus 3 unabhängigen Experimenten gezeigt. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.

1.4.2. Auswirkungen der EBNA2-Punkt- und Deletionsmutationen auf die Expression von Zielgenen

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Analysen der Transkriptionsregulation von *LMP1*, *LMP2A*, *CD23* und *CCL3* in Eli-BL-Zellen nach 24 Stunden transienter Expression von EBNA2-Wildtyp und -Mutanten dargestellt.

Die vier untersuchten EBNA2-Zielgene *LMP1*, *LMP2A*, *CD23* und *CCL3* besitzen CBF1-Bindestellen in ihrem Promotorbereich (Wang, Kikutani et al. 1991, Laux, Adam et al. 1994, Ling, Hsieh et al. 1994, Yalamanchili, Tong et al. 1994, Johannsen, Koh et al. 1995). *LMP2A*, *CD23* und *CCL3* können nur strikt CBF1-abhängig aktiviert werden (Strobl, Hofelmayr et al. 1997, Maier, Staffler et al. 2006). *LMP1* nimmt dabei eine Sonderstellung ein, da es auch in Abwesenheit von CBF1 noch bis zu 50 % aktivierbar ist (Laux, Adam et al. 1994, Yalamanchili, Tong et al. 1994, Johannsen, Koh et al. 1995).

1.4.2.1. Einfluss der EBNA2-Deletionsmutanten $\Delta 3-30$ und $\Delta 3-52$ auf die Transkriptionsregulation

Die Deletionsmutanten $\Delta 3-30$ und $\Delta 3-52$ haben ihre Transaktivator-Funktion fast vollständig eingebüßt. Dies wurde in Promoter-Reportergenstudien und nach Transfektion der Deletionsmutanten anhand der *LMP1*-Expression in Eli-BL-Zellen auch bereits gezeigt (Gordadze, Onunwor et al. 2004). In den Studien dieser Arbeit zeigen sich für *LMP2A* im Vergleich zu *LMP1*, *CD23* und *CCL3* leicht abweichende Effekte. Nach 24 Stunden transienter Expression der EBNA2-Deletionsmutanten $\Delta 3-30$ und $\Delta 3-52$ kann noch fast 40 % der Menge an *LMP2A*-Transkripten nach Expression von EBNA2-wt induziert werden. Bei der Regulation von *LMP2A* scheinen andere Transkriptionsfaktoren als bei den anderen Zielgenen *LMP1*, *CD23* und *CCL3* involviert zu sein, da alle untersuchten EBNA2-Mutanten stärkere *LMP2A*-Genaktivierung vermitteln. Der Promoter von *LMP2A* trägt zwei eng benachbarte CBF1-Bindestellen, die Promotoren der anderen Zielgene dagegen nur eine. Dieser Unterschied könnte auch zu der besseren Aktivierbarkeit von *LMP2A* durch die EBNA2-Mutanten beitragen (**Abbildung 27**).

1.4.2.2. Einfluss der EBNA2-Grenzflächenmutanten auf die Transkriptionsregulation

Betrachtet man die Grenzflächenmutanten, so zeichnet sich ab, dass in allen untersuchten Zielgenen der AS-Austausch mit Aspartat die EBNA2-Funktion stärker hemmt als der Austausch mit Alanin (**Abbildung 27**, grüne Balken). Zusätzlich sieht man bei *LMP1*, *CD23* und *CCL3*, dass die L16A-Mutante eine etwas bessere Transaktivierungseffizienz aufweist als die I50A-Mutante. Dies spiegelt sich auch in der Dimerisierungseffizienz dieser Mutanten wider. Die L16A-Mutante zeigt auch eine etwas bessere Interaktion mit EBNA2-F199 als die I50A-Mutante (**Abbildung 25 D**).

1.4.2.3. Einfluss der EBNA2-Oberflächenmutanten auf die Transkriptionsregulation

Verglichen mit der Aktivität des EBNA2-wt-Proteins zeigt die Mutante F51A noch bis zu 80 % Aktivität bei der Induktion der *LMP1*-, *CD23*- und *CCL3*-Expression, die H15A- und $\Delta\alpha 1$ -

Mutante nur noch bis zu 20 %. Eine Ausnahme mit einer durchgehend etwas höheren Expression stellt auch hier *LMP2A* dar. Nachdem die Dimerisierung dieser Mutanten weitgehend erhalten geblieben ist (**Abbildung 25 E**), könnte dies bedeuten, dass das Histidin 15 und die exponierte α -Helix 1 eine wichtige Rolle bei der Interaktion mit anderen regulatorischen Faktoren spielt (**Abbildung 27**, orange Balken).

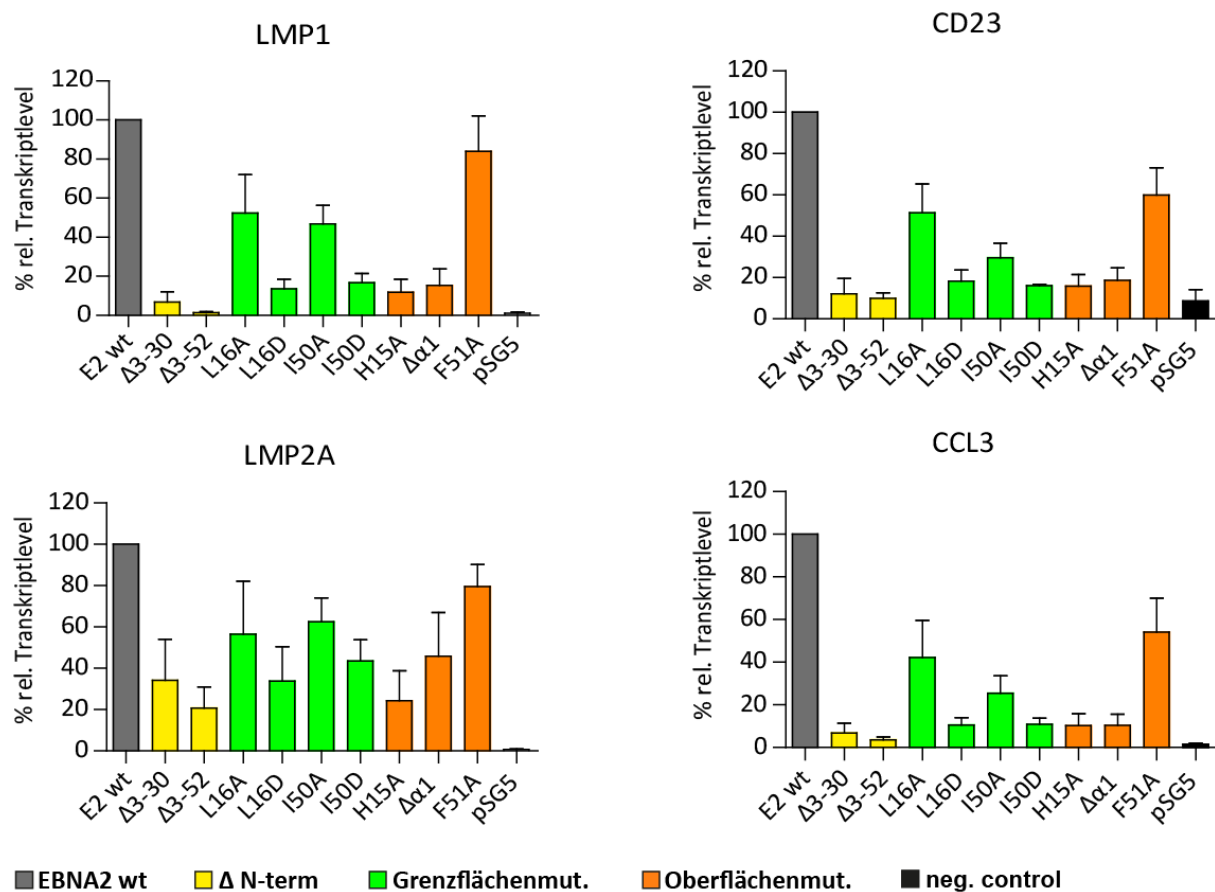


Abbildung 27: Für die Funktion von EBNA2 spielen Histidin 15, die Helix α 1 und die EBNA2-Dimerisierung eine wichtige Rolle.

1 x 10⁷ EBV-positive, EBNA2-negative Eli-BL-Zellen wurden mit 5 µg Expressionsvektoren für EBNA2-wt, N-terminale Deletionsmutanten, END-Domänen-Grenzflächen- und Oberflächenmutanten und dem Kontrollvektor (pSG5) transfiziert. Nach 24 Stunden transients Expression wurde RNA isoliert und in cDNA revers transkribiert. Dargestellt sind die relativen Transkriptmengen der endogenen viralen Zielgene *LMP1* und *LMP2A* und der zellulären Zielgene *CD23* und *CCL3* nach Quantifizierung via qPCR. Die Transkriptmengen sind auf *Aktin*-Transkripte normalisiert. Die Aktivierung durch EBNA2-wt aller Zielgene wurde auf 100 % gesetzt und es sind die Mittelwerte aus 4 unabhängigen Experimenten gezeigt. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.

1.4.2.4. Einfluss der EBNA2-Punkt- und Deletionsmutanten auf die Expression von LMP1

Für LMP1 stand ein guter Antikörper zur Detektion des Proteins im Western Blot zur Verfügung. Wie bereits erwähnt, wurden parallel zu den RNA-Proben auch

Gesamtzellproteinlysate 24 Stunden nach transientser EBNA2-Expression präpariert. Der Vergleich der relativen *LMP1*-Transkriptmenge mit der *LMP1*-Proteinmenge korreliert gut (Vergleiche **Abbildung 27** mit **Abbildung 28**). Für die Mutanten $\Delta 3-30$ und $\Delta 3-52$ bestätigte sich, wie auf Transkriptebeobachtet, dass diese Mutanten die Transkription von *LMP1* nicht mehr aktivieren können und daraufhin auch kein *LMP1*-Protein gebildet werden kann (**Abbildung 28 A**). Um die Western Blots besser beurteilen zu können, wurden die Signale für *LMP1* von 3 unabhängigen Experimenten quantifiziert (**Abbildung 28 D**). In der Gruppe der Grenzflächenmutanten sind die Punktmutanten EBNA2-L16D und -I50D am stärksten in ihrer Transaktivierungsfunktion beeinträchtigt, in der Gruppe der Oberflächenmutanten sind es die Punktmutante EBNA2-H15A und die Deletionsmutante EBNA2- $\Delta\alpha 1$.

Im Vergleich zu den Prozentwerten der Quantifizierung der Western Blots sind die Prozentwerte der qPCR-Experimente höher (Vergleiche **Abbildung 27** mit **Abbildung 28 D**). Ein Grund dafür könnte die längere Halbwertszeit des *LMP1*-Proteins im Vergleich zu der Halbwertszeit seiner mRNA sein (Johansson, Jansson et al. 2009).

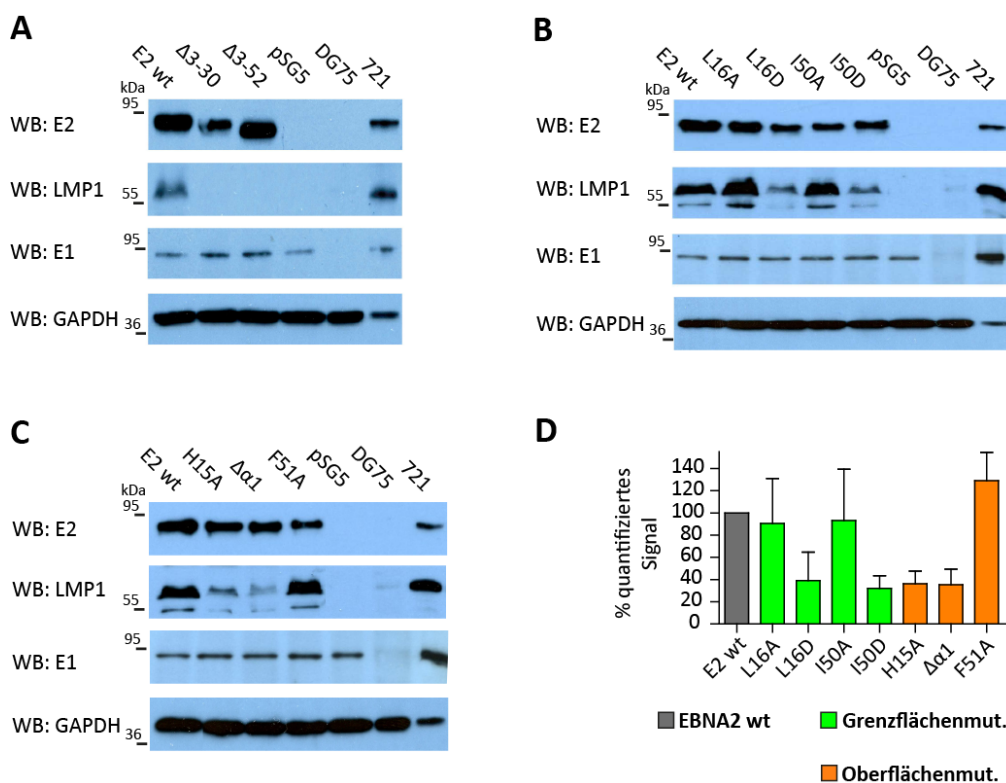


Abbildung 28: Einfluss der END-Domänen Mutationen auf die Expression von endogenem LMP1.

1×10^7 EBV-positive, EBNA2-negative Eli-BL-Zellen wurden mit 5 μ g Expressionsvektoren für EBNA2-wt, N-terminale Deletionsmutanten (A), END-Domänen-Grenzflächen- (B) und Oberflächenmutanten (C) und einem Kontrollvektor (pSG5) transfiziert. Es wurden je 30 μ g Gesamtzelllysate der transfizierten Zellen im Western Blot analysiert. EBNA1 und GAPDH dienen hier als Ladekontrollen. Mit einem EBNA2-spezifischen Antikörper wurde die EBNA2-Expression nach Transfektion überprüft. Die Aktivierung der *LMP1*-Expression durch Wildtyp- und Mutanten-EBNA2 wurde mit einem *LMP1*-spezifischen Antikörper detektiert. Gesamtzelllysate einer EBV-negativen (DG75, 30 μ g) und einer EBV-

positiven (721, 5 µg) Zelllinie wurden als Kontrollen verwendet. (D) Quantifizierung der Western Blot-Experimente. Die Signale wurden im Fusion Fx7 (Pqrlab) aufgenommen und mit der Software Bio 1D (Vilber Lourmat) quantifiziert. Dargestellt ist der Mittelwert aus 3 unabhängigen Versuchen mit den jeweiligen Standardabweichungen. Alle Signale wurden gegen die Signale der jeweils dazugehörigen EBNA2-Quantifizierungen normalisiert. Die EBNA2-wt Expression wurde auf 100 % gesetzt und die relativen Prozentwerte der Mutanten darauf bezogen berechnet.

1.4.3. Die Bedeutung der Aminosäure Histidin 15 und der α -Helix 1 für die Transaktivierung durch EBNA2 kann in Promotor-Reporterstudien bestätigt werden.

Die Oberflächenmutanten zeigten in Eli-BL-Zellbasierten Assays auf Transkript- und auf Proteinebene bei den getesteten Zielgenen, mit Ausnahme des *LMP2A*, immer das gleiche Aktivierungsmuster. Die H15A- und die $\Delta\alpha 1$ -Mutante sind nur noch sehr schwach aktiv (10 - 40 % im Vergleich zum Wildtyp), die F51A-Mutante erreicht zwischen 60 und 100 % der EBNA2-wt-Aktivierung. Diese Versuche spiegeln alle eine CBF1-vermittelte Transaktivierung wider. In einem weiteren Versuch sollte der Einfluss der Oberflächenmutationen auf die Transaktivierungseffizienz der END-Domäne in Promotor-Reporterstudien mit Gal4-Fusionsproteinen verdeutlicht werden. Für diese Versuche wurde ein Promotor-Reporter-Konstrukte mit einer Gal4-Bindestelle, bei dem CBF1 keine Rolle mehr für die Rekrutierung von EBNA2 an die DNA spielt, verwendet. Zum Vergleich wurden die Luziferasemessungen zusätzlich auch noch mit einem Promotor-Reporter-Konstrukt mit multiplen CBF1-Bindestellen durchgeführt. Die Fusionsproteine bestehen aus vollständigem EBNA2-Wildtyp, -H15A, $-\Delta\alpha 1$ und -F51A fusioniert mit der Gal4-DNA-Bindedomäne (Gal4-DBD) aus Hefe. Bei diesem Experiment zeigte sich, dass die Aktivität dieser Fusionsproteine am Gal4-responsiven Reporter vergleichbar mit der Aktivität am CBF1-responsiven Reporter ist.

Des Weiteren zeigte die Gal4-DBD- $\Delta\alpha 1$ -Mutante eine zu den Eli-BL-Zellbasierten Versuchsergebnissen vergleichbar schwache und die Gal4-DBD-F51A-Mutante eine vergleichbar starke Transaktivierungseffizienz (vergleiche **Abbildung 27** *LMP1*, *CD23* und *CCL3* mit **Abbildung 29**).

Die H15A-Mutation wirkte sich bei diesem Versuchsaufbau etwas weniger stark auf die Transaktivierungseffizienz aus. Der Vergleich mit den Ergebnissen der Eli-BL-Versuche zeigt einen Unterschied von 20 - 30 % (vergleiche **Abbildung 27** *LMP1*, *CD23* und *CCL3* mit **Abbildung 29**). Eine Erklärung dafür könnte sein, dass der unterschiedliche zelluläre Hintergrund in DG75-Zellen bei der H15A-Mutante eine Rolle spielt. Möglich ist auch, dass die Fusion des EBNA2-H15A mit der Gal4-DBD die Auswirkung dieser Punktmutation maskiert.

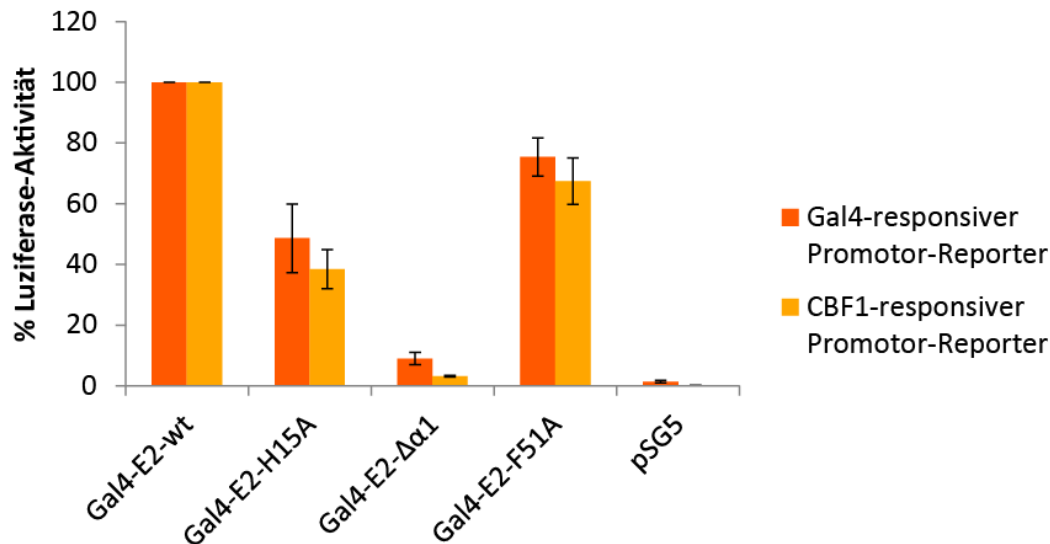


Abbildung 29: Bestätigung der Bedeutung von Histidin 15 und der Helix $\alpha 1$ für die Transaktivierung mit Gal4-Fusionsproteinen in Promotor-Reporterstudien.

Die Aktivierung der Transkription durch EBNA2-Wildtyp-, -H15A- und - $\Delta\alpha 1$ -Gal4-Fusionsproteine wurde mit zwei unterschiedlichen Promotor-Reporter-Konstrukten getestet, zum einen mit einem Gal4- und zum anderen mit einem CBF1-responsiven (Ga981.6) Promotor. Für diese Experimente wurden je 5×10^6 DG75-Zellen mit 5 μ g des jeweiligen Promotor-Reporter-Konstrukts, 5 μ g des jeweiligen EBNA2-Expressionsplasmides und 0,5 μ g eines Renilla-Reporterplasmides kotransfiziert. Die Zellen wurden nach 2 Tagen in Kultur lysiert und die Luciferaseaktivität zusammen mit der Renillaaktivität gemessen. Die Renillaaktivität diente zur Normalisierung der Transfektionseffizienz. Für die Negativkontrolle wurden 5 μ g Leervektor (pSG5) transfiziert. Jeder Versuch wurde in Triplikaten durchgeführt (je 3 technische Replikate) und der Gesamtversuch 3 Mal wiederholt (3 biologische Replikate). Es sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen aus den 3 unabhängigen Experimenten dargestellt.

1.5. Zusammenfassung: Die END-Domäne - eine neuartige Dimerisierungs- und Transaktivierungsdomäne

Dieser Teil der Arbeit, der in Kollaboration mit Anders Friberg (AG Sattler, Helmholtz Zentrum München) erstellt wurde, beschreibt eine neuartige Dimerisierungsdomäne des viralen Transkriptionsfaktors EBNA2. Anhand NMR-Strukturdaten und Mutationsstudien konnte gezeigt werden, dass die END-Domänen-Monomere über hydrophobe Wechselwirkungen interagieren. Weitere Analysen schlagen vor, dass die Art der Faltung und Dimerisierung der END-Domäne bis zum Stand der Proteindatenbanken Frühjahr 2016 neu und einzigartig ist.

Die END-Domäne ist zusätzlich an der EBNA2-vermittelten Transkriptionsregulation beteiligt. Mutationsstudien mit Grenzflächen-Punktmutationen im N-Terminus zeigten sowohl eine gestörte Dimerisierung der L16D- und I50D-Mutanten als auch eine geschwächte Transaktivierungseffizienz. Des Weiteren zeigten die Ergebnisse dieser Arbeit, dass die

Oberflächenmutationen EBNA2-H15A und $\Delta\alpha 1$, welche die Dimerisierung nachweislich nicht einschränken, stark die Transaktivierungs-Funktion von EBNA2 schädigen.

Es ist demnach wahrscheinlich, dass die α -Helix 1 und die Aminosäure Histidin 15 an der Interaktion mit anderen wichtigen regulatorischen Faktoren beteiligt sind. Um diese potentiellen Faktoren zu identifizieren, wurden die $\Delta\alpha 1$ - und die H15A-Mutante für weitergehende Versuche verwendet.

Zusammenfassende Übersicht zur Aktivität der EBNA2-Mutanten in verschiedenen biologischen Testsystemen:

Tabelle 7: Übersicht EBNA2-Mutanten: Dimerausbildung und Aktivierung von Zielgenen.

	WT	Deletionsmutanten		Grenzflächenmutanten				Oberflächenmutanten		
		$\Delta 3-30$	$\Delta 3-52$	L16A	L16D	I50A	I50D	H15A	$\Delta\alpha 1$	F51A
Ausbildung eines Dimers ^a	++++	++	+	++++	-	+++	-	++++	++++	++++
<i>LMP1</i> -Aktivierung ^b	++++	+	-	+++	+	++	+	+	+	++++
<i>LMP1</i> -Aktivierung ^c	++++	-	-	++++	++	++++	++	++	++	++++
<i>LMP2A</i> -Aktivierung ^b	++++	++	+	+++	++	+++	++	+	++	++++
<i>CD23</i> -Aktivierung ^b	++++	+	+	+++	+	++	+	+	+	+++
<i>CCL3</i> -Aktivierung ^b	++++	+	+	++	+	++	+	+	+	+++
Gal-4 Promotor-Reporter	++++	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	++	+	+++

Aktivierung der Promotoren oder Effizienz der Dimerisierung von gering + bis stark ++++

n.d. = Versuch wurde nicht durchgeführt

^a Ergebnisse der Immunpräzipitationsversuche (siehe **Abbildung 25 B bis F**)

^b Ergebnisse der Quantifizierung der cDNAs via qPCR (siehe **Abbildung 27**)

^c Ergebnisse der Western Blot Quantifizierungen in Eli-BL-Zellen (siehe **Abbildung 28 D**)

2. Zwei neue Interaktionspartner von EBNA2: PLK1 und PAXIP1

2.1. Die Suche nach END-spezifischen Interaktionspartnern

Nachdem gezeigt werden konnte, dass END-Domänen-Mutanten, die noch dimerisieren, aber dennoch nicht mehr transaktivieren, hergestellt werden können, lag es nahe zu prüfen, ob spezifisch an die END-Domäne möglicherweise weitere zelluläre Faktoren binden, die für die Transaktivator-Funktion von EBNA2 wichtig sind. Die Hypothese ist, dass durch die Mutation des Histidin 15 oder der α -Helix 1 der END-Domäne, die Interaktion mit diesen zellulären

Faktoren nicht mehr oder nur noch teilweise zustande kommt und dass diese Faktoren in vergleichenden massenspektrometrischen Analysen identifiziert werden können.

2.2. Massenspektrometrische Analyse von EBNA2-Wildtyp, -H15A und - $\Delta\alpha 1$ Immunpräzipitaten

2.2.1. Das experimentelle System

Auf der Suche nach regulatorischen Faktoren, welche spezifisch an die END-Domäne binden, habe ich massenspektrometrische Analysen von EBNA2-Immunpräzipitaten in Kollaboration mit Markus Priller (AG Hauck, Helmholtz Zentrum München) durchgeführt (LIMS ID des Projektes bei der AG Hauck: THS6412). Die gewählte Methode war eine Tandem-Massenspektrometrie gekoppelt mit einer Flüssigkeitschromatographie ohne vorherige Markierung der Proben (*label-free LC-MS/MS*, Übersicht siehe Methoden **6.8**) (Hauck, Dietter et al. 2010). Durch den Vergleich der Kopräzipitate aus EBNA2-Wildtyp mit solchen aus EBNA2-H15A oder - $\Delta\alpha 1$ Affinitätsreinigungen sollten potentielle, regulatorische Faktoren identifiziert werden, die spezifisch mit der END-Domäne interagieren.

Die kopräzipitierten EBNA2-Interaktionspartner sollten quantitativ ermittelt werden. Um bei der *label-free* Methode quantifizieren zu können, mussten pro Probe mindestens 3 biologische Replikate analysiert werden. Somit wurden insgesamt 12 unabhängige Kopräzipitate massenspektrometrisch untersucht (Triplikate von EBNA2- wt, -H15A, - $\Delta\alpha 1$ und der Negativkontrolle).

2.2.2. Zelluläres System und Probenvorbereitung

Für die Immunpräzipitationsversuche wurde, wie auch für die Dimerisierungsstudien, die EBV-negative DG75 Burkitt-Lymphomzelllinie gewählt, da diese gut transfizierbar ist (bis zu 60 % der Zellen werden erreicht) und da von dieser Zelllinie auch Expressionsdaten vorliegen (siehe erster Ergebnisteil). Die Immunpräzipitationsversuche wurden nach 24 Stunden transienter Expression von vollständigen, HA-getaggten EBNA2-Wildtyp, -H15A und - $\Delta\alpha 1$ Proteinen mit HA-spezifischen Antikörper gekoppelten *beads* (HA-*beads*). Es wurden NP-40-Gesamtzelllysate nach Harada und Kollegen präpariert (Harada, Yalamanchili et al. 2001). Für die Immunpräzipitation des nukleären Proteins EBNA2 könnte man auch Kernlysate verwenden. Die für Kernlysate verwendeten Puffer weisen aber häufig eine hohe Salzkonzentration auf, was Probleme bei der massenspektrometrischen Analyse verursachen kann. Die Verwendung von Kernlysaten stellt eine Möglichkeit dar, unspezifische Interaktionspartner zu minimieren. In dieser Arbeit wurden Gesamtzelllysate verwendet, da die Immunpräzipitation in vorangegangenen Versuchen mit diesem Puffer bereits gut etabliert war. Als Negativkontrolle wurde ein Kontrollvektor transfiziert, der nur für den HA-Tag kodiert und mit dem Gesamtzelllysate der transfizierten DG75-Zellen auch Immunpräzipitate mit HA-*beads* hergestellt.

Um sicher zu stellen, dass EBNA2 bei der Affinitätsreinigung gut angereichert wurde, wurde vor der massenspektrometrischen Analyse je ein Aliquot aller 12 Proben im Western Blot analysiert. Es wurde zusätzlich überprüft, ob das endogene CBF1 als Kopräzipitat detektierbar war. In **Abbildung 30** sind Western Blots von je einem der 3 Replikate exemplarisch gezeigt. EBNA2-wt, -H15A und - $\Delta\alpha 1$ sind ähnlich stark präzipitiert und die Kopräzipitation von CBF1 ist deutlich nachweisbar.

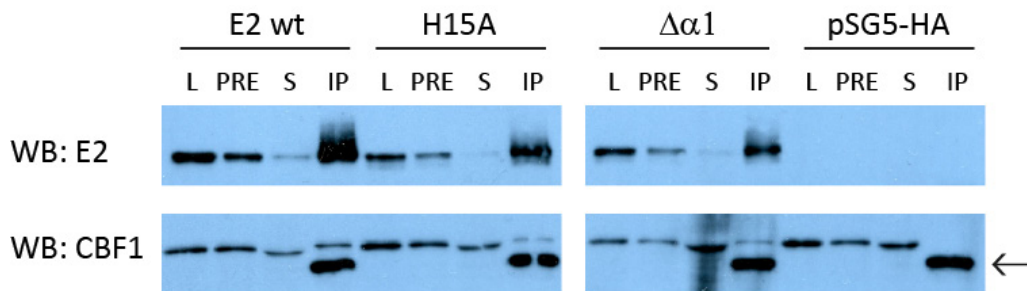


Abbildung 30: Qualitätskontrolle der Immunpräzipitationsproben für die massenspektrometrischen Analysen.

1,8 x 10⁸ DG75-Zellen wurden mit 90 µg Expressionsvektoren für EBNA2-wt, -H15A, - $\Delta\alpha 1$ und einem Kontrollvektor (pSG5-HA) transfiziert. Für die Immunpräzipitation wurden 20 mg Gesamtproteinlysat verwendet. Die Proteine sind alle mit einem HA-Tag fusioniert und die Versuche wurden mit HA-spezifischem Antikörper gekoppelten Sepharose-beads (HA-beads) durchgeführt. Die Detektion der präzipitierten Proteine erfolgte mit einem EBNA2-spezifischen Antikörper im Western Blot. Die Proteine wurden nach der Immunpräzipitation in einem kleineren Volumen Laemmli-Puffer eluiert, so dass die Immunpräzipitationsprobe (IP-Probe) im Vergleich zum Lysat (L) 30-fach aufkonzentriert ist. Die Proben wurden mit Protein G Sepharose-beads ohne Antikörper vorinkubiert, um unspezifisch bindende Proteine zu entfernen (PRE von *preclean*). Der Überstand nach Inkubation über Nacht mit HA-beads ist in der Spalte S gezeigt (S von *supernatant*). Der Pfeil zeigt auf die Position der schweren Kette des Antikörpers.

2.2.3. Besonderheiten einer Immunpräzipitationsprobe für die massenspektrometrische Analyse

Bei einer ersten LC-MS/MS-Analyse der Proben konnten nur sehr wenige Proteine identifiziert werden. Das Hauptproblem war die zu geringe Proteinmenge und -konzentration. Daraufhin wurden alle Komponenten hochskaliert und in einem geringeren Volumen eluiert, so dass letztendlich 300 µl Eluat pro IP, ausgehend von 20 mg Gesamtprotein vor der IP, zur massenspektrometrischen Analyse gegeben werden konnten.

Bei Proben für die Massenspektrometrie muss weiterhin beachtet werden, dass Verunreinigungen mit fötalem Kälberserum (FKS) möglichst gering gehalten werden. Eine Quelle dafür ist z.B. das Medium der verwendeten Zellen, welche vor der Lyse mehrmals gründlich gewaschen werden müssen. Verwendet man Antikörperüberstände für die IP, so ist das Medium in dem der Antikörper produziert wird eine weitere Quelle für FKS-Verunreinigungen. Dies war der Fall bei dem in diesen Versuchen verwendeten HA-

spezifischen Antikörper. Aus diesem Grund musste der Antikörper vor der Immunpräzipitation an die Protein G Sepharose-Affinitätsmatrix chemisch gekoppelt werden und an dieser Matrix gründlich gereinigt werden.

2.2.4. Durchführung der massenspektrometrischen Analysen und statistische Auswertung

Die Aufreinigung der Immunpräzipitate und die Messungen am Massenspektrometer wurden von Markus Priller (AG Hauck, Helmholtz Zentrum München) durchgeführt. Das Prinzip der Methode ist im Methodenteil unter **6.8.** erläutert.

Für die statistische Auswertung und die Quantifizierung wurde die Progenesis LC-MS Software (Version 2.3, Nonlinear) verwendet. Zur Identifikation der Peptide wurden die Fragmentspektren exportiert, mit Hilfe des MOWSE Algorithmus im Programm Mascot (Version 2.2) identifiziert und die Ergebnisse in Progenesis re-importiert.

2.2.5. Unter den 19 identifizierten signifikant angereicherten, potentiellen EBNA2-Interaktionspartnern ist ein bereits publizierter Interaktionspartner

Nach der qualitativen und quantitativen Analyse der Proben konnten in den EBNA2-Wildtyp, -H15A und - $\Delta\alpha 1$ -Immunpräzipitaten zusammen insgesamt 629 unterschiedliche Proteine detektiert werden. Für die Analyse wurden jeweils 2 Immunpräzipitate (wt, H15A, $\Delta\alpha 1$ und neg. Kontrolle) miteinander verglichen und ab einer Anreicherung von mindestens 1,1-fach in die Liste mitaufgenommen.

Im EBNA2-wt-Immunpräzipitat konnten von den insgesamt 629 nachgewiesenen Proteinen 19 gefunden werden, die im Vergleich zum Kontroll-Immunpräzipitat signifikant (p -Wert $\leq 0,05$) und mindestens 1,5-fach angereichert waren (**Tabelle 8**). Eines davon ist EBNA2 selbst mit einer 26-fachen Anreicherung im Vergleich zum Kontroll-Immunpräzipitat (p -Wert = 0,01). Im H15A-Immunpräzipitat ist EBNA2 11-fach angereichert (p -Wert = $2,3 \times 10^{-4}$) und im $\Delta\alpha 1$ -Immunpräzipitat 7-fach (p -Wert = 0,01; siehe **Tabelle 20** und **Tabelle 21** im Anhang).

Das EBNA2-DNA-Adapterprotein CBF1 (RBPJ) wurde in der wt-, H15A- und $\Delta\alpha 1$ -IP in gleich starker Anreicherung wie EBNA2 selbst gefunden (26-fach, 12-fach und 7-fach; **Tabelle 8**, **Tabelle 20** und **Tabelle 21**). CBF1 ist ein mehrfach publizierter EBNA2-Interaktionspartner (siehe **Einleitung 3.2.1**). Die Identifikation des CBF1 bei der LC-MS/MS-Analyse der EBNA2-Immunpräzipitate und die signifikante Anreicherung weisen darauf hin, dass der Versuch erfolgreich durchgeführt wurde und die weiteren identifizierten und signifikant im EBNA2-Immunpräzipitat angereicherten Proteine auch wirklich in der Zelle mit EBNA2 interagieren.

Tabelle 8: Ergebnisse der *label-free* LC-MS/MS-Analyse: Gezeigt sind alle Proteine, die im EBNA2-wt-Immunpräzipitat im Vergleich zum Kontroll-Immunpräzipitat mind. 1,5-fach angereichert sind (p-Wert $\leq 0,05$).

ensemble- Identifikations- nummer	Anzahl ^a Peptide	quantifizierte Peptide ^b	Confidence score ^c	Anova- Test (p)	Anreicherung ^d	Protein- Symbol	Replik 1 ^e Leervektor	Replik 2 ^e Leervektor	Replik 3 ^e Leervektor	Replik 1 ^e EBNA2 wt	Replik 2 ^e EBNA2 wt	Replik 3 ^e EBNA2 wt	Genname	Lokalisation ^f
ENSP00000248958	1	1	48	0,00	1652	SDF2L1	27	0	0	4799	33098	6503	stromal cell-derived factor 2-like 1	n.d.
ENSP00000247020	2	2	54	0,01	762	SDF2	26	0	0	2392	14742	2515	stromal cell-derived factor 2	Extrazellulär (4)
ENSP00000466102														
ENSP00000342070	2	2	85	0,04	177	CTSB	56	0	36	11264	330	4616	cathepsin B	Lysosom, Zellkern (4)
ENSP00000380376	1	1	34	0,01	164	PAXIP1	13	27	2	338	4697	1748	PAX interacting (with transcription-activation domain) protein 1	Zellkern
ENSP00000311766	13	1	336	0,04	125	ATAD3B	59	37	0	469	9408	2205	ATPase family, AAA domain containing 3B	Mitochondrium, Zellkern (2)
ENSP00000300093	7	7	172	0,01	77	PLK1	1610	407	198	14583	122709	32353	polo-like kinase 1	Zellkern und Zytoskelett
ENSP00000459688														
ENSP00000460266	5	5	207	0,01	46	DNAJB11	1645	2063	2421	20887	211659	49942	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 11	Endoplasmatisches Reticulum, Zellkern (2)
ENSP00000265028														
ENSP00000408410	5	5	162	0,01	26	EBNA2	5841	3949	3629	41868	251544	59586	Epstein-Barr nuclear antigen 2	Zellkern
P12978.1														
ENSP00000305815	1	1	26	0,01	26	RBPJ	410	121	93	1602	10431	4182	recombination signal binding protein for immunoglobulin kappa J region	Zellkern
ENSP00000261893	7	7	210	0,01	17	LACTB	5688	3130	2773	21048	129818	47963	lactamase, beta	Mitochondrium, Zellkern (2)
ENSP00000392956														
ENSP00000454085	18	6	544	0,03	11	ATAD3A	13872	9774	4851	41200	213392	45267	ATPase family, AAA domain containing 3A	Mitochondrium, Zellkern (2)
ENSP00000368030														
ENSP00000339421														
ENSP00000368015														
ENSP00000368062														
ENSP00000383631														
ENSP00000439290														
ENSP00000464661	3	2	105	0,05	10	DYNLL1	13993	9084	6329	25470	217534	46037	dynein, light chain, LC8-type 1	Zellkern, Mitochondrium und Zytoskelett
ENSP00000242577														
ENSP00000446596														
ENSP00000448834	5	4	100	0,05	7	ADD3	6551	765	819	12200	35354	9851	adducin 3 (gamma)	Zytoskelett und Plasmamembran, Zellkern (2)
ENSP00000277900														

Fortsetzung Tabelle 8: Ergebnisse der *label-free* LC-MS/MS-Analyse: Gezeigt sind alle Proteine, die im EBNA2-wt-Immunpräzipitat im Vergleich zum Kontroll-Immunpräzipitat mind. 1,5-fach angereichert sind ($p\text{-Wert} \leq 0,05$).

ensemble- Identifikations- nummer	Anzahl ^a Peptide	quantifizierte Peptide ^b	Confidence score ^c	Anova - Test (p)	Anreicherung ^d	Protein- Symbol	Replik 1 ^e Leervektor	Replik 2 ^e Leervektor	Replik 3 ^e Leervektor	Replik 1 ^e EBNA2 wt	Replik 2 ^e EBNA2 wt	Replik 3 ^e EBNA2 wt	Genname	Lokalisation ^f
ENSP00000306223	2	2	32	0,03	4	SNRPN	508	154	254	1595	1306	639	small nuclear ribonucleoprotein polypeptide N	Zellkern
ENSP00000280326	2	2	47	0,05	2	CCT5	950	950	1819	1867	3216	4077	chaperonin containing TCP1, subunit 5 (epsilon)	Zytoskelett, Zellkern (4)
ENSP00000295688 ENSP00000357242 ENSP00000413308	2	2	45	0,03	2	CCT3	1269	1133	1066	1579	1979	2715	chaperonin containing TCP1, subunit 3 (gamma)	Zytoskelett
ENSP00000261182	1	1	35	0,01	2	NAP1L1	1081	843	707	1562	1580	1540	nucleosome assembly protein 1-like 1	Zellkern
ENSP00000272163	1	1	29	0,01	2	LBR	1550	1597	1653	2133	3232	2798	lamin B receptor	Zellkern
ENSP00000238081 ENSP00000248975 ENSP00000398990	4	3	123	0,00	2	YWHAQ	5744	5869	7103	9673	10151	10026	tyrosine 3- monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, theta polypeptide	Zytosol (4)

^a Anzahl der Peptide, die in der massenspektrometrischen Analyse für das jeweilige Protein gefunden wurde.

^b Für die Quantifizierung wurden nur Peptide verwendet, die für das Protein spezifisch sind.

^c Der *Confidence Score* ist ein Maß für die Wahrscheinlichkeit, dass die Zuordnung eines Peptids zu seiner Peptid-ID korrekt ist. Er stellt den aufsummierten Wert aller Peptide, die für ein Protein gefunden wurden, dar. Je höher der *Confidence Score*, desto wahrscheinlicher ist, dass die einzelnen Peptide richtig zugeordnet wurden.

^d Anreicherung der Proteine im EBNA2-wt-Immunpräzipitat im Vergleich zum Leervektor-Immunpräzipitat. Der Wert wurde aus dem Mittelwert der *normalized abundances* errechnet (siehe ^e).

^e *Normalized abundances* aus den Quantifizierungen der massenspektrometrischen Analyse. Bei dieser Normalisierung wird zunächst ein Referenzlauf ausgewählt. Für jeden Lauf wird ein Normalisierungsfaktor berechnet in Bezug auf den Referenzlauf. Grundannahme dabei ist, dass die meisten Proteine in gleicher Abundanz in den beiden Proben vorhanden sind.

^f Information aus *GeneCards* (www.genecards.org). Die Lokalisation mit der höchsten Wahrscheinlichkeit wurde angegeben (5 auf einer Skala von 0 bis 5). Wenn eine geringere Wahrscheinlichkeit für die Lokalisation im Zellkern vorliegt, wurde dies zusätzlich in Klammern angegeben. In diesen Wert fließen Informationen aus Datenbanken, Publikationen und sequenzabhängigen Vorhersagen ein.

2.3. 4 potentielle END-Domänen-Interaktionspartner

Die LC-MS/MS-Spektren wurden ursprünglich von EBNA2-wt und END-Domänen-Mutanten-Immunpräzipitaten aufgenommen um Interaktionspartner zu finden, die spezifisch an die END-Domäne binden. Vergleicht man die Proteinanreicherung im EBNA2-wt-Immunpräzipitat mit dem H15A-Immunpräzipitat findet man von den 18 identifizierten Proteinen (**Tabelle 8**) nur 3 Proteine, die mit einem p-Wert von maximal 0,05 im H15A-Immunpräzipitat **abgereichert** sind (**Tabelle 9**), nämlich Cathepsin B (CTSB, 40-fach), *small nuclear ribonucleoprotein polypeptide N* (SNRPN, 7-fach) und *chaperonin containing TCP1, subunit 5* (CCT5, 2,5-fach). Alle 3 Proteine kommen zu hoher Wahrscheinlichkeit auch im Zellkern vor und kommen daher als END-Domänen Interaktionspartner in Frage. In **Tabelle 9** sind die 3 Kandidaten aufgeführt. Zusätzlich sind PAXIP1/PTIP und PLK1 zum Vergleich gezeigt, da diese Proteine in späteren Kapiteln noch weiter untersucht werden.

Sucht man im Vergleich wt-Immunpräzipitat zu $\Delta\alpha 1$ -Immunpräzipitat mit einem p-Wert $\leq 0,05$ nach Proteinen, die weniger effizient mit der Mutante interagieren, so findet man hier 4 Kandidaten. Davon bleiben aber nur 2 übrig, wenn man sich auf diejenigen beschränkt, die mit hoher Wahrscheinlichkeit *in vivo* im Zellkern lokalisiert sind und somit mit EBNA2 interagieren könnten: dies sind CTSB und *DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 11* (DNAJB11, **Tabelle 10**). CTSB ist 101-fach **abgereichert** im $\Delta\alpha 1$ -Immunpräzipitat und DNAJB11 29-fach. Auch hier sind zum Vergleich die Werte für PAXIP1/PTIP und PLK1 gezeigt.

Zusammengefasst sind die besten potentiellen END-Domänen-Interaktionspartner (aus den Vergleichen mit der H15A **und** der $\Delta\alpha 1$ Mutante) **CTSB, SNRPN, CCT5 und DNAJB11**.

CTSB ist in gesunden Zellen eine lysosomale Cysteinprotease. Maligne Entartung kann zu gestörter Regulation der CTSB-Expression führen. In vielen Tumorgeweben wurde CTSB-Überexpression beschrieben (Gondi and Rao 2013). In einer Studie wurde des Weiteren gezeigt, dass trunkierte Formen des Cathepsin B nicht nur in den Lysosomen vorkommen, sondern auch im Zellkern zu finden sind (Bestvater, Dallner et al. 2005). Da CTSB in beiden Immunpräzipitaten der EBNA2-Mutanten stark abgereichert ist, kommt es auf jeden Fall als möglicher END-Domänen Interaktionspartner in Frage. Es wird in SM295-Zellen schwach (1,2-fach) durch EBNA2 induziert (siehe **Tabelle 22** auf CD).

SNRPN ist ein Polypeptid eines snRNP (*small nuclear ribonucleic proteins*, sprich snurps) Komplexes der SMB/SMN Familie und ist am Spleißen von pre-mRNA beteiligt. CCT5 und DNAJB11 gehören zu den Chaperonen, einer Proteinklasse, die beim Falten von neusynthetisierten Proteinen „helfen“.

Die Proteine SDF2 und SDF2L1 sind Proteine, die bisher nicht im Zellkern vorkommend beschrieben wurden. Sie werden sehr gut spezifisch zusammen mit EBNA2 immunpräzipitiert, allerdings scheint es sich hierbei um eine Interaktion zu handeln, die vermutlich erst bei Inkubation im Gesamtzelllysat entsteht.

Tabelle 9: Potentielle END-Domänen Interaktionspartner: Signifikant geringere Anreicherung im EBNA2-H15A Immunpräzipitat (p-Wert ≤ 0,05)

ensemble- Identifikations- nummer	Anzahl ^a Peptide	quantifiziert e Peptide ^b	Confidence score ^c	Anova - Test (p)	Anreicherung ^d wt/H15A	Protein-Symbol	Replik 1 ^e EBNA2 H15A	Replik 2 ^e EBNA2 H15A	Replik 3 ^e EBNA2 H15A	Replik 1 ^e EBNA2 wt	Replik 2 ^e EBNA2 wt	Replik 3 ^e EBNA2 wt	Genname	Lokalisation ^f
ENSP00000342070	2	2	85	0,05	39,7	CTSB	54	179	176	11264	330	4616	cathepsin B	Lysosom, Zellkern (4)
ENSP00000306223	2	2	32	0,00	6,9	SNRPN	233	152	131	1595	1306	639	small nuclear ribonucleoprotein polypeptide N	Zellkern
ENSP00000280326	2	2	47	0,05	2,5	CCT5	915	1824	978	1867	3216	4077	chaperonin containing TCP1, subunit 5 (epsilon)	Zytoskelett, Zellkern (4)
ENSP00000380376	1	1	34	0,27	4,2	PAXIP1	569	64	989	338	4697	1748	PAX interacting (with transcription-activation domain) protein 1	Zellkern
ENSP00000300093	7	7	172	0,29	3,1	PLK1	13430	11532	30285	14583	122709	32353	polo-like kinase 1	Zellkern und Zytoskelett
ENSP00000459688														
ENSP00000460266														

^a Anzahl der Peptide, die in der massenspektrometrischen Analyse für das jeweilige Protein gefunden wurde.

^b Für die Quantifizierung wurden nur Peptide verwendet, die für das Protein spezifisch sind.

^c Der *Confidence Score* ist ein Maß für die Wahrscheinlichkeit, dass die Zuordnung eines Peptids zu seiner Peptid-ID korrekt ist. Er stellt den aufsummierten Wert aller Peptide, die für ein Protein gefunden wurden, dar. Je höher der *Confidence Score*, desto wahrscheinlicher ist, dass die einzelnen Peptide richtig zugeordnet wurden.

^d Anreicherung der Proteine im EBNA2-wt-Immunpräzipitat im Vergleich zum EBNA2-H15A-Immunpräzipitat. Der Wert wurde aus dem Mittelwert der *normalized abundances* errechnet (siehe ^e).

^e *Normalized abundances* aus den Quantifizierungen der massenspektrometrischen Analyse. Bei dieser Normalisierung wird zunächst ein Referenzlauf ausgewählt. Für jeden Lauf wird ein Normalisierungsfaktor berechnet in Bezug auf den Referenzlauf. Grundannahme dabei ist, dass die meisten Proteine in gleicher Abundanz in den beiden Proben vorhanden sind.

^f Information aus *GeneCards* (www.genecards.org). Die Lokalisation mit der höchsten Wahrscheinlichkeit wurde angegeben (5 auf einer Skala von 0 bis 5). Wenn eine geringere Wahrscheinlichkeit für die Lokalisation im Zellkern vorliegt, wurde dies zusätzlich in Klammern angegeben. In diesen Wert fließen Informationen aus Datenbanken, Publikationen und sequenzabhängigen Vorhersagen ein.

Tabelle 10: Potentielle END-Domänen Interaktionspartner: Signifikant geringere Anreicherung im EBNA2- $\Delta\alpha 1$ Immupräzipitat (p-Wert $\leq 0,05$)

ensemble- Identifikations- nummer	Anzahl ^a Peptide	quantifizierte Peptide ^b	Confidence score ^c	Anova - Test (p)	Anreicherung ^d wt/ $\Delta\alpha 1$	Protein-Symbol	Replik 1 ^e EBNA2 $\Delta\alpha 1$	Replik 2 ^e EBNA2 $\Delta\alpha 1$	Replik 3 ^e EBNA2 $\Delta\alpha 1$	Replik 1 ^e EBNA2 wt	Replik 2 ^e EBNA2 wt	Replik 3 ^e EBNA2 wt	Genname	Lokalisation ^f
ENSP00000248958	1	1	48	0,01	509,5	SDF2L1	0	87	0	4799	33098	6503	stromal cell-derived factor 2-like 1	Endoplasmatisches Reticulum (3), Extrazellulär (3)
ENSP00000247020 ENSP00000466102	2	2	54	0,00	259,0	SDF2	49	13	14	2392	14742	2515	stromal cell-derived factor 2	Extrazellulär (4), Endoplasmatisches Reticulum (3)
ENSP00000342070	2	2	85	0,06	100,6	CTSB	47	0	114	11264	330	4616	cathepsin B	Lysosom, Zellkern (4)
ENSP00000265028 ENSP00000408410	5	5	207	0,01	29,4	DNAJB11	2130	2641	4847	20887	211659	49942	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 11	Endoplasmatisches Reticulum, Zellkern (2)
ENSP00000300093 ENSP00000459688 ENSP00000460266	7	7	172	0,09	6,3	PLK1	6937	14875	5113	14583	122709	32353	polo-like kinase 1	Zellkern
ENSP00000380376	1	1	34	0,07	10,6	PAXIP1	188	308	143	338	4697	1748	PAX interacting (with transcription-activation domain) protein 1	Zellkern

^a Anzahl der Peptide, die in der massenspektrometrischen Analyse für das jeweilige Protein gefunden wurde.

^b Für die Quantifizierung wurden nur Peptide verwendet, die für das Protein spezifisch sind.

^c Der *Confidence Score* ist ein Maß für die Wahrscheinlichkeit, dass die Zuordnung eines Peptids zu seiner Peptid-ID korrekt ist. Er stellt den aufsummierten Wert aller Peptide, die für ein Protein gefunden wurden, dar. Je höher der *Confidence Score*, desto wahrscheinlicher ist, dass die einzelnen Peptide richtig zugeordnet wurden.

^d Anreicherung der Proteine im EBNA2-wt-Immupräzipitat im Vergleich zum EBNA2- $\Delta\alpha 1$ -Immupräzipitat. Der Wert wurde aus dem Mittelwert der *normalized abundances* errechnet (siehe ^e).

^f *Normalized abundances* aus den Quantifizierungen der massenspektrometrischen Analyse. Bei dieser Normalisierung wird zunächst ein Referenzlauf ausgewählt. Für jeden Lauf wird ein Normalisierungsfaktor berechnet in Bezug auf den Referenzlauf. Grundannahme dabei ist, dass die meisten Proteine in gleicher Abundanz in den beiden Proben vorhanden sind.

^g Information aus *GeneCards* (www.genecards.org). Die Lokalisation mit der höchsten Wahrscheinlichkeit wurde angegeben (5 auf einer Skala von 0-5). Wenn eine geringere Wahrscheinlichkeit für die Lokalisation im Zellkern vorliegt, wurde dies zusätzlich in Klammern angegeben. In diesen Wert fließen Informationen aus Datenbanken, Publikationen und sequenzabhängigen Vorhersagen ein.

2.4. EBNA2 und PAXIP/PTIP

2.4.1. PAXIP1 konnte im Komplex mit EBNA2 bestätigt werden

Die Wahl der interessantesten neuen EBNA2-Interaktionspartner erfolgte zunächst anhand der **Tabelle 8**. Die vielversprechendsten Kandidaten in dieser Auswahl sind PAXIP1/PTIP und PLK1, da beide Proteine im EBNA2-wt-Immunpräzipitat im Vergleich zur Leervektor-Kontrolle stark angereichert sind und im Zellkern lokalisiert sind. PAXIP1 wird zudem mit Brustkrebs assoziiert (Li, Katoh et al. 2013) und PLK1 mit Leukämie (Renner, Dos Santos et al. 2009, Brandwein 2015).

In diesem Kapitel werde ich zunächst die Ergebnisse bezüglich PAXIP1 behandeln, im nächsten Abschnitt die Ergebnisse im Zusammenhang mit PLK1.

PAXIP1 oder PTIP (*Pax transactivation-domain interacting protein*) besitzt 6 BRACT (*breast cancer carboxy terminal*) Domänen und besteht aus 1069 AS. Es wird in allen Geweben exprimiert (www.genecards.org). In DG75-abstammenden Zellen ist *PAXIP1* stark exprimiert, wird aber nicht durch EBNA2 reguliert, weder in SM295, noch in SM296^{CBF1 neg.} (siehe **Tabelle 22** auf CD). Die Expressionsdaten des *GeneChip® 2.0 ST Arrays* (**Tabelle 22** auf CD) zeigen, dass *PAXIP1* in DG75-Zellen ähnlich stark wie das Haushaltsgen *GAPDH* exprimiert wird. Erstaunlicherweise konnte PAXIP1 nur nach Koimmunpräzipitation mit EBNA2 im Western Blot nachgewiesen werden. In Gesamtzelllysaten ist die Konzentration des Proteins für den Nachweis im Western Blot zu gering (**Abbildung 31**).

Zur Bestätigung der massenspektrometrischen Daten, d.h. zur Bestätigung, dass PAXIP1 im EBNA2-Proteinkomplex zu finden ist, wurden Immunpräzipitationen mit HA-spezifischen (zum präzipitieren des HA-getaggten EBNA2) und PAXIP1-spezifischen Antikörpern in einer EBNA2-induzierbaren DG75-Zelllinie durchgeführt. In beiden Präzipitaten konnte der jeweils andere Interaktionspartner im Western Blot nachgewiesen werden, d.h. PAXIP1 konnte in der EBNA2-IP (**Abbildung 31 A**) und EBNA2 in der PAXIP1-IP (**Abbildung 31 B**) nachgewiesen werden.

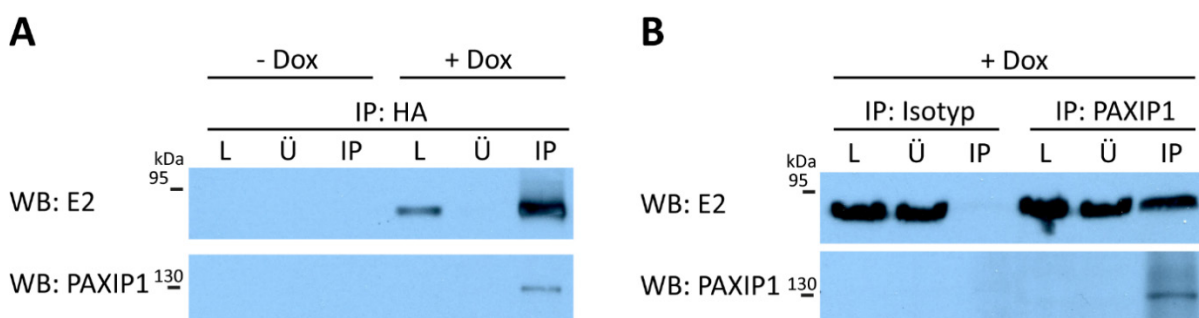


Abbildung 31: PAXIP1 interagiert mit EBNA2.

Zur Untersuchung der Interaktion von EBNA2 mit PAXIP1 wurden Immunpräzipitationen durchgeführt. Hierzu wurden je 4×10^7 DG75-Zellen mit induzierbarem EBNA2 nach NP-40-Lyse mit HA-spezifischen Antikörper gekoppelten Protein G *beads* (A) oder PAXIP1-spezifischen (ab70434) Antikörper (B) präzipitiert. Die Isotyp-Kontroll-Immunpräzipitation in (B) erfolgte mit polyklonalem IgG aus Kaninchenserum. Die Proben wurden in 12-prozentigen (EBNA2) oder 8-prozentigen (PAXIP1) SDS-

Polyacrylamid-Gelen aufgetrennt und mit EBNA2- und PAXIP1-spezifischen (R3 und ab2614) Antikörpern detektiert. Für die Immunpräzipitation mit dem PAXIP1-spezifischen Antikörper (B) wurden nur induzierte Zellen verwendet. L=Lysat, Ü=Überstand, IP=Immunpräzipitation.

2.4.2. Ist die END-Domäne an der Interaktion mit PAXIP beteiligt?

Im nächsten Schritt sollte gezeigt werden, ob eine Interaktion von PAXIP1 mit den EBNA2-Mutanten H15A und $\Delta\alpha 1$ ausgebildet werden kann. Um dies zu prüfen wurden Immunpräzipitationen mit HA-spezifischen und PAXIP1-spezifischen Antikörpern in EBNA2-wt, -H15A und - $\Delta\alpha 1$ transient transfizierten DG75-Zellen durchgeführt. Leider konnte ich die Interaktion des transient exprimierten EBNA2-wt mit PAXIP1 nicht nachweisen und kann daher zu diesem Zeitpunkt noch keine bestätigte Aussage über den Einfluss der END-Domäne auf diese Interaktion treffen.

Nach den Zahlen der Quantifizierung der massenspektrometrischen Daten wäre es durchaus möglich, dass die END-Domäne an der EBNA2-PAXIP1 Interaktion beteiligt ist. Vergleicht man die x-fachen Anreicherungen der EBNA2-Immunpräzipitate im Vergleich zur Kontroll-IP (EBNA2-wt, -H15 und - $\Delta\alpha 1$; **Tabelle 8** und **Tabelle 20** und **Tabelle 21** im Anhang), so sieht man, dass PAXIP1 sehr viel schlechter mit den EBNA2-Mutanten präzipitiert wird (**Abbildung 32**). Nur 56,3 % der PAXIP1-Menge im Wildtyp-Proteinkomplex können mit EBNA2-H15A und nur 33,3 % mit EBNA2- $\Delta\alpha 1$ präzipitiert werden.

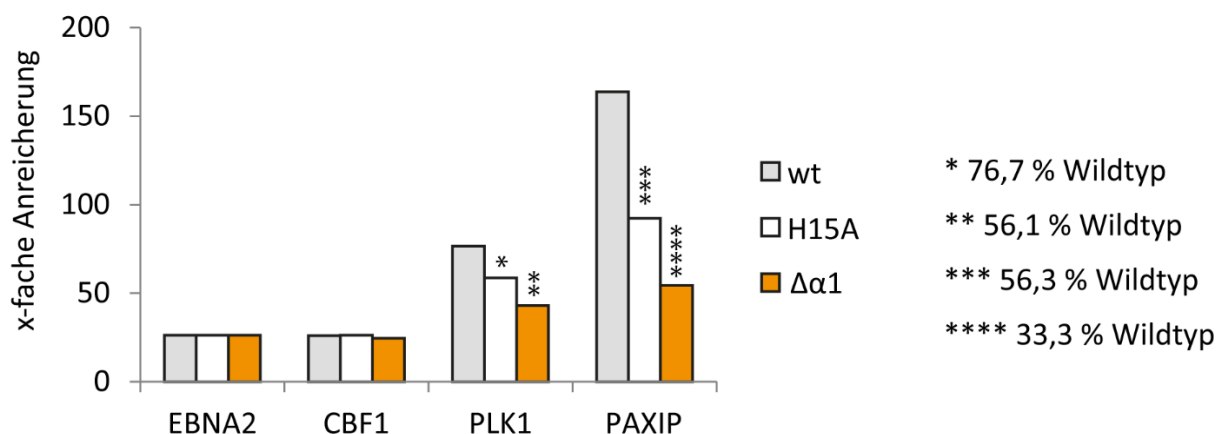


Abbildung 32: Im EBNA2- $\Delta\alpha 1$ -Immunpräzipitat kann nur 33,3% an PAXIP1-Anreicherung im Vergleich zum EBNA2-wt-Immunpräzipitat nachgewiesen werden.

Dargestellt ist jeweils die x-fache Anreicherung im Vergleich zur Kontroll-IP. Die x-fache Anreicherung wurde aus den Mittelwerten der normalisierten Quantifizierungswerte der LC-MS/MS-Analyse berechnet. Die Werte wurden mit einem Faktor korrigiert, der die unterschiedlichen EBNA2-Expressionslevels der H15A- (Faktor 2,4) und $\Delta\alpha 1$ -Mutante (Faktor 3,5) berücksichtigt.

2.4.3. Funktion von PAXIP/PTIP

PAXIP1 spielt eine wichtige Rolle bei der Reparatur von Doppelstrangbrüchen. Es kann über ATM (*ataxia telangiectasia-mutated*) - phosphorylierte Reste mit 53BP1 (*tumor protein p53 binding protein 1*) interagieren und wird so zu Doppelstrangbrüchen rekrutiert. PAXIP1 inhibiert homologe Rekombination und führt zu nichthomologem Endjoining (Escribano-Diaz and Durocher 2013).

Eine weitere wichtige Funktion von PAXIP1 ist die Rekrutierung von MLL3- und MLL4-Histonemethyltransferasen, die für die Methylierung von Lysin 4 des Histon 3 zuständig sind (Cho, Hong et al. 2007). H3K4me1 ist eine typische *enhancer*-Markierung.

2.5. PLK1 ist stark exprimiert in DG75-B-Zellen und interagiert mit EBNA2

2.5.1. PLK1 kann als EBNA2-Interaktionspartner bestätigt werden

Aus der LC-MS/MS-Liste der EBNA2-wt Interaktionspartner (**Tabelle 8**) wurde ein weiteres Protein genauer untersucht: PLK1 (*Polo-like kinase 1*). PLK1 ist eine Serin/Threoninkinase, die in allen Geweben exprimiert wird (www.genecards.org) und aus 603 Aminosäuren besteht. In DG75 Burkitt-Lymphomzellen ist *PLK1* mit RMA-Werten um 5000 sehr stark exprimiert, ca. 5-fach stärker als *PAXIP1* und 5-fach stärker als das Haushaltsgen *GAPDH*. Die Transkription von *PLK1* ist weder in SM295 noch in SM296^{CBF1 neg.} durch EBNA2 reguliert (siehe **Tabelle 22** auf CD).

Die Interaktion mit EBNA2 konnte in Koimmunpräzipitationsversuchen sowohl mit einem HA-spezifischen Antikörper (**Abbildung 33 A**), als auch mit einem PLK1-spezifischen Antikörper bestätigt werden (**Abbildung 33 B**).

2.5.2. Die Rolle der END-Domäne bei der Interaktion von PLK1 mit EBNA2

Um den Einfluss der Mutationen in der END-Domäne auf die Interaktion mit PLK1 zu überprüfen, wurden die Affinitätsreinigungen auch mit EBNA2-wt, -H15A und - $\Delta\alpha 1$ transient transfizierten DG75-Zellen durchgeführt. Vergleicht man nun die Signale nach Detektion der Western Blots mit einem PLK1-spezifischen Antikörper, so sieht man, dass PLK1 mit gleicher Effizienz an EBNA2-wt, -H15A und - $\Delta\alpha 1$ bindet (**Abbildung 33 C**). Bei der Quantifizierung der massenspektrometrischen Daten konnte bei der H15A-Mutante 76,7 % und bei der $\Delta\alpha 1$ -Mutante 56,1 % der PLK1-Menge in den jeweiligen Präzipitaten im Vergleich zum Wildtyp-Immunpräzipitat gefunden werden (**Abbildung 32**). Die Diskrepanz zwischen der massenspektrometrischen Quantifizierung und den Ergebnissen der Western Blot Analysen ist noch nicht geklärt. Es könnte zum Teil daran liegen, dass die Methode des Western Blots nicht sensitiv genug ist. Außerdem müssten die Western Blot Analysen noch mehrmals wiederholt werden, um eine endgültige Aussage treffen zu können.

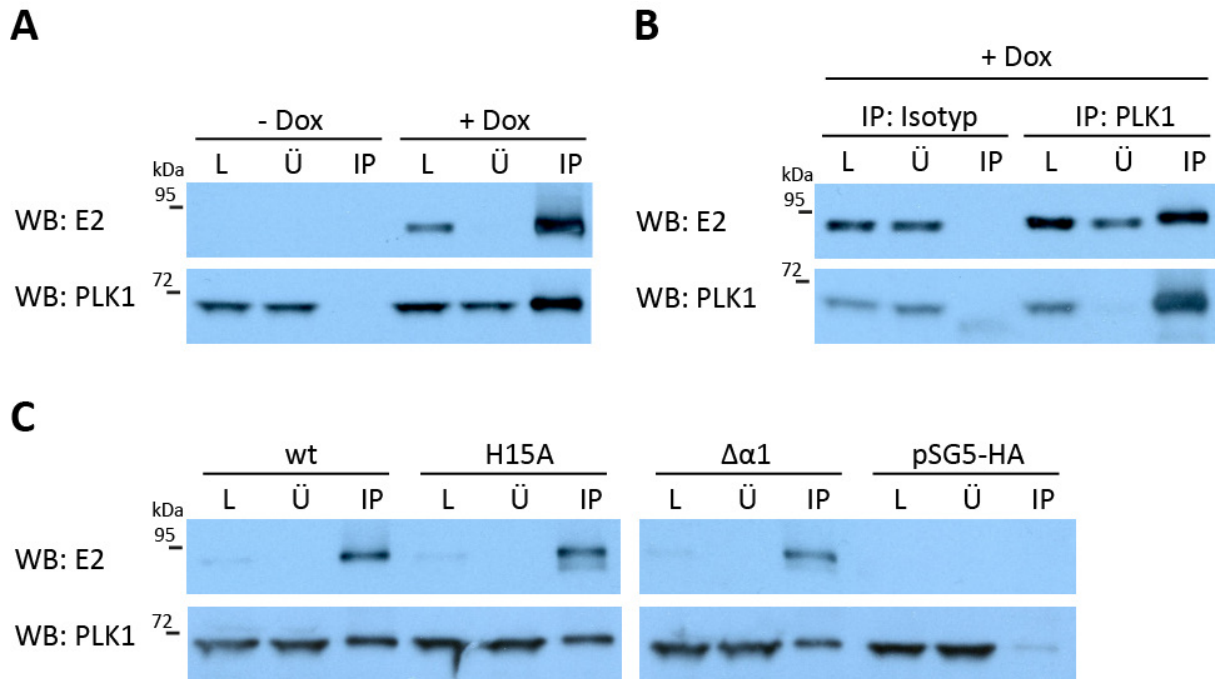


Abbildung 33: PLK1 interagiert mit EBNA2-wt und -N-terminalen Mutanten.

Zur Untersuchung der Interaktion von EBNA2 mit PLK1 wurden Immunpräzipitationen durchgeführt. Hierzu wurden je 2×10^7 DG75-Zellen mit induzierbaren EBNA2 (A und B) oder transient transfizierten EBNA2 (wt und zwei Mutanten in C) nach NP-40-Lyse immunpräzipitiert. Die Präzipitationen erfolgten mit HA-spezifischen Antikörper gekoppelten Protein G *beads* (A und C) oder mit PLK1-spezifischen (ab17056) Antikörper (B). Die Isotyp-Kontroll-IP in (B) erfolgte mit dem Maus IgG2b Antikörper C-His 3D5. Die Detektion der präzipitierten Proteine erfolgte, nach deren Auftrennung in 12 % (EBNA2) oder 8 % (PLK1) SDS-Polyacrylamid-Gelen, mit EBNA2- und PLK1-spezifischen (R3 und ab17056) Antikörpern. Für die Immunpräzipitation mit dem PLK1-spezifischen Antikörper (B) wurden nur induzierte Zellen verwendet. L=Lysat, Ü=Überstand, IP=Immunpräzipitation.

2.5.3. Funktion von PLK1

PLK1 gehört zur Familie der Serin/Threoninkinasen, die in Hefe und humanen Zellen konserviert sind. PLK1 spielt eine wichtige Rolle in Schlüsselvorgängen der Zelle wie Zellzyklus, Zellteilung und in der Reaktion auf DNA-Schäden. Außerdem ist sie involviert in die Regulation der PolIII (Fairley, Mitchell et al. 2012) und PolII Transkription (Jiang, Huang et al. 2013). In Bezug auf Zellzykluskontrolle wurde für EBNA2 beschrieben, dass EBNA2-exprimierende Zellen den MSC (*mitotic spindle checkpoint*) überspringen können und es somit bei der Zellteilung zu chromosomaler Instabilität kommen kann (Pan, Tai et al. 2009).

2.6. Zusammenfassung: potentielle END-Domänen Interaktionspartner

In Kollaboration mit der AG Sattler (Helmholtz Zentrum München) konnte die END-Domäne als funktionelle Einheit bestätigt werden. Anhand der NMR-Struktur wurden 6 Aminosäuren und eine kurze α -Helix ausgewählt, deren Mutation eine Auswirkung auf die Funktion des

Transkriptionsaktivators EBNA2 haben könnte. Die Ergebnisse der Mutationsstudien zeigten, dass neben 2 Mutationen, die die Dimerisierung negativ beeinflussen und dadurch die Funktion stören, sich besonders 2 Oberflächenmutationen auf die Transaktivierungsfunktion des EBNA2 auswirken. Diese 2 Oberflächenmutanten, EBNA2-H15A und EBNA2- $\Delta\alpha 1$ können die Transkription der getesteten Zielgene nicht mehr aktivieren. Die Ergebnisse dieser Analysen brachte die Hypothese hervor, dass die END-Domäne an der Rekrutierung von regulatorischen Faktoren für die Transkription beteiligt sein könnte. Für die Identifikation möglicher Faktoren wurden vergleichende massenspektrometrische Analysen von EBNA2-wt- und END-Mutanten-Komplexen nach Immunpräzipitation durchgeführt. Potentielle END-Interaktionspartner, die aus diesen Analysen hervorgegangen sind, sind CTSB, SNRPN, CCT5 und DNAJB11.

Fortführende Versuche zu den massenspektrometrischen Analysen waren zum Ende der Promotion an dem Punkt, dass 2 sehr interessante neue EBNA2-Interaktionspartner bestätigt werden konnten. Die Rolle der END-Domäne bei dieser Interaktion konnte aber noch nicht bestimmt werden. Die erstmalig gezeigten und mit einer zweiten Methode bestätigten EBNA2-Interaktionspartner sind PAXIP1 und PLK1.

VI. Diskussion

Die Fähigkeit des Epstein-Barr Virus, primäre humane B-Zellen *in vitro* zu infizieren und deren unbegrenzte Proliferation zu initiieren, ist seit fast 50 Jahren bekannt (Henle, Diehl et al. 1967, Pope, Horne et al. 1968). In den auswachsenden LCLs werden nur 9 virale Proteine (6 EBNAs und 3 LMPs) exprimiert und deren jeweiliger Beitrag zum Immortalisierungsprozess wurde bereits intensiv untersucht. Die ersten beiden viralen Proteine, die nach einer EBV-Infektion in primären B-Zellen exprimiert werden, sind EBNA2 und EBNA-LP (Allday, Crawford et al. 1989, Rooney, Howe et al. 1989, Alfieri, Birkenbach et al. 1991). EBNA2 wurde zudem vor etwa 25 Jahren erstmals als absolut essentiell für die B-Zellimmortalisierung klassifiziert (Cohen, Wang et al. 1989, Hammerschmidt and Sugden 1989). Untersuchungen bezüglich EBNA2, die seither durchgeführt wurden, konzentrierten sich auf die Funktion als Transkriptionsfaktor. Auch im ersten Teil dieser Arbeit wird der Einfluss von EBNA2 auf die Transkriptionsregulation untersucht, mit Schwerpunkt auf der Abhängigkeit dieser Regulation von dem DNA-Adapterprotein CBF1. Bei diesen Untersuchungen zur Transkriptionsregulation konnten bekannte EBNA2-Zielgene bestätigt werden, aber auch neue, CBF1-unabhängig regulierte Zielgene identifiziert werden. Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde eine besondere Domäne des EBNA2-Proteins genauer untersucht, die N-terminale Domäne des Proteins. Zudem konnten EBNA2-Interaktionspartner erstmalig beschrieben werden, die auf weitere Funktionen des nukleären Antigens hindeuten.

1. CBF1-abhängige und CBF1-unabhängige Transkriptionsregulation durch EBNA2

Die genomweiten Expressionsstudien zeigten, dass in CBF1-positiven DG75 B-Zellen 950 Transkripte signifikant mind. 2-fach durch EBNA2 reguliert werden, 548 aktiviert und 402 reprimiert (erster Ergebnisteil, **Abbildung 6**). In den CBF1-negativen DG75-abstammenden Zellen werden nur 132 Transkripte mind. 2-fach signifikant durch EBNA2 reguliert, davon 58 aktiviert und 74 reprimiert (erster Ergebnisteil **Abbildung 10 A**). Diese Zahlen verdeutlichen bereits, dass in CBF1-positiven Zellen sehr viel mehr EBNA2-regulierte Transkripte nachgewiesen werden können. Die Expressionsstudien wurden in EBV-negativen DG75 Burkitt-Lymphomzellen mit stabil integrierten, induzierbaren EBNA2-Expressionssystem, durchgeführt.

Ein Vergleich der 548 EBNA2-induzierten Transkripte aus CBF1-positiven Zellen mit den 58 EBNA2-induzierten Transkripten aus CBF1-negative Zellen zeigte, dass 36 der 58 in CBF1-negativen Zellen induzierten Transkripten auch in CBF1-positiven Zellen EBNA2-induziert sind. Betrachtet man die x-fachen Induktionswerte der 36 sowohl in SM295, als auch in SM296^{CBF1 neg.} induzierten Gene, so fällt auf, dass der Einfluss des EBNA2 auf die Expression dieser Transkripte in CBF1-negativen Zellen geringer ist (erster Ergebnisteil, **Abbildung 14**).

Unter der Annahme, dass diese 36 Transkripte wirklich komplett unabhängig von CBF1 durch EBNA2 aktiviert werden, dürfte kein Zusammenhang zwischen der Regulation in SM295 und SM296^{CBF1 neg.} zu finden sein. Wie aber im letzten Absatz bereits erwähnt, ist die EBNA2-Aktivierung dieser 36 Transkripte in CBF1-positiven Zellen mit wenigen Ausnahmen immer stärker.

Zwei Ergebnisse dieser Studie führen mich nun zu der Annahme, dass CBF1 das wichtigste DNA-Adapterprotein für EBNA2 ist, es aber wahrscheinlich weitere Proteine gibt, die an der Rekrutierung des EBNA2 an die DNA beteiligt sind.

1. Die Anzahl der in CBF1-negativen Zellen EBNA2-regulierten Gene ist wesentlich geringer
2. Es gibt eine Gruppe von Transkripten, die in CBF1-negativen Zellen reguliert werden kann. In Gegenwart von CBF1 wird die EBNA2-Wirkung verstärkt.

1.1. Gibt es weitere DNA-Adapterproteine im EBNA2-Komplex?

Ein weiterer Hinweis auf DNA-Rekrutierung durch zusätzliche oder andere Faktoren sind die Ergebnisse der ChIP-PCR-Analysen an bekannten EBNA2/CBF1-Bindestellen. Die Interaktion von DNA mit EBNA2 konnte an diesen Positionen in CBF1-negativen **und** CBF1-positiven Zellen nachgewiesen werden. In CBF1-negativen Zellen ist die Interaktion in den ausgewählten Beispielen um ein vielfaches schwächer (siehe erster Ergebnisteil **Abbildung 19, 20 und 21**). Ein mögliches zusätzliches DNA-bindendes Protein, das die DNA-Interaktion von EBNA2 vermitteln könnte, ist PU.1, welches in einer Publikation als direkter Interaktionspartner von EBNA2 gezeigt wurde (Yue, Davenport et al. 2004). Weitere DNA-bindende Proteine, die bereits über ChIP-seq-Versuche in der Nähe von EBNA2-Bindestellen identifiziert wurden, sind NFκB-RelA und EBF1 (Zhao, Zou et al. 2011). Ob nun mehrere DNA-bindende Proteine bei der Rekrutierung von EBNA2 beteiligt sind, wurde bisher noch nicht untersucht. EBNA2-ChIP in Verbindung mit Re-ChIP Versuchen z.B. mit PU.1-, RelA- oder EBF1-spezifischen Antikörpern könnten diese Frage beantworten, sind technisch aber schwer durchzuführen (Truax and Greer 2012).

1.2. Gibt es CBF1-unabhängig EBNA2-regulierte Zielgene?

Die Expressionsdaten CBF1-negativer SM296^{CBF1 neg.}-Zellen zeigten, dass 58 Transkripte CBF1-unabhängig durch EBNA2 aktiviert werden konnten. 36 dieser Transkripte überlappen mit den in CBF1-positiven Zellen gefundenen EBNA2-aktivierten Transkripten (erster Ergebnisteil, **Abbildung 14**). Da die Aktivierung des Großteils der 36 Transkripte in CBF1-positiven Zellen stärker ist, deutet es darauf hin, dass CBF1 nicht allein für die Stabilisierung eines Transkriptionskomplexes mit EBNA2-Beteiligung verantwortlich ist. Vermutlich sind mehrere Faktoren gleichzeitig direkt oder indirekt an der Rekrutierung des EBNA2 an die DNA beteiligt.

An dieser Stelle muss man Versuche mit dem LMP1-Promotor erwähnen, die an einem Beispiel-Promotor bestätigen, dass CBF1 nicht das einzige Protein darstellt, das die EBNA2-DNA-Interaktion vermittelt. 2 Arbeitsgruppen fanden bereits 1994 und 1995, dass für die

Aktivierung der Expression von LMP1 neben einer CBF1-Bindestelle auch eine intakte PU.1-Bindestelle essentiell für die Aktivierung des Promotors ist (Laux, Adam et al. 1994, Laux, Dugrillon et al. 1994, Johannsen, Koh et al. 1995). In der Doktorarbeit von Kristina Grabusic (AG Kempkes) wurde die Aktivierung des LMP1-Promotors auch eingehend untersucht. Unter anderem wurde für Promotor-Reportergen-Experimente eine EBNA2-Mutante verwendet, welche nicht mehr an CBF1 binden kann (WW-Mutante). Diese Mutante konnte den LMP1-Promotor immer noch aktivieren. Kristina Grabusic konnte bestätigen, dass eine intakte PU.1-Bindestelle essentiell für die Aktivierung des LMP1-Promotors ist. Da die WW-Mutante bei ihren Versuchen den LMP1-Promotor noch aktivieren kann und sich des Weiteren auch eine Deletion der CBF1-Bindestellen nur schwach auswirkte, schlägt sie vor, dass im Fall der LMP1-Aktivierung eine CBF1-unabhängige Signalweitergabe vorliegt.

Gibt es unter den 36 in SM295 und SM296^{CBF1 neg.} regulierten Transkripten (siehe **Abbildung 14**) welche in der Nähe sog. „EBNA2-only“ Bindestellen? Mit Hilfe des UCSC Browsers (Kent, Sugnet et al. 2002) wurden die genomischen Bereiche dieser 36 Transkripte und die Bereiche 10 kb stromabwärts und stromaufwärts dieser Transkripte nach „EBNA2-only“-Bindestellen (siehe erster Ergebnisteil 2.) in den Daten von Zhao und Kollegen abgesucht und keine gefunden (Zhao, Zou et al. 2011). Alle ChIP-seq-Signale in den und um die genomischen Regionen dieser 36 Transkripte weisen ein CBF1-ChIP-seq-Signal in einem 100 bp Fenster um das EBNA2-ChIP-seq-Signal auf. Diese potentiellen CBF1-Bindestellen in den und um die genomischen Bereiche dieser 36 Transkripte sind ein weiterer Hinweis dafür, dass CBF1 wahrscheinlich auch hier an der EBNA2-Rekrutierung beteiligt ist.

Es gibt noch eine Gruppe an 22 Transkripten, die sich dadurch auszeichnet, dass sie nur in CBF1-negativen Zellen mindestens 2-fach signifikant durch EBNA2 aktiviert sind (**Abbildung 14 A**). Dieses Phänomen kann im Moment noch nicht erklärt werden. Möglicherweise werden durch den in diesen Zellen fehlenden Repressor CBF1 regulatorische RNAs oder andere regulatorische Faktoren exprimiert, die dann nur in SM296^{CBF1 neg.} Transkriptionskomplexe stabilisieren können. Dies könnte zu einer spezifischen EBNA2-Transaktivierung der 22 Transkripte in SM296^{CBF1 neg.}-Zellen führen.

1.3. Übersicht zur EBNA2-Zielgenregulation in CBF1-pos. und CBF1-neg. Zellen

Das in der Einleitung in **Abbildung 2** gezeigte Modell zur Zielgenaktivierung durch EBNA2 ist sehr stark vereinfacht und z.T. überholt. Ergebnisse dieser Arbeit deuten z.B. darauf hin, dass CBF1-reprimierte und CBF1/EBNA2 aktivierte Zielgene unterschiedlich targetiert werden.

Das in **Abbildung 34** vorgeschlagene Modell berücksichtigt die Ergebnisse des ersten Ergebnisteils und ist zusätzlich ergänzt durch Informationen aus der Literatur.

Die in dieser Arbeit häufig zitierte Publikation von Zhao und Kollegen zeigte, dass CBF1/EBNA2 in ChIP-seq-Versuchen hauptsächlich in *enhancer*-Bereichen nachgewiesen werden kann (Zhao, Zou et al. 2011). Für die Transkriptionsregulation müssen CBF1/EBNA2-*enhancer*

Bereiche über Chromatinschleifen mit den jeweiligen Promotoren in Verbindung stehen (**Abbildung 34**). Es ist noch nicht klar, warum EBNA2 in ChIP-seq-Versuchen nicht häufiger in der Nähe von Promotoren detektiert werden kann (nur 14 % der Signale befanden sich in der Nähe von Promotoren), da pro *enhancer*-Kontakt auch ein Kontakt mit einem Promotorbereich entstehen müsste. Eine Erklärung könnte sein, dass viele Gene mit mehreren *enhancern* in Verbindung stehen (Li, Ruan et al. 2012, Jin, Li et al. 2013).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass EBNA2 auch in einer CBF1-negativen Zelllinie die Transkription von Zielgenen regulieren kann. Die meisten dieser regulierten Transkripte decken sich mit den in CBF1-positiven Zellen regulierten Transkripten, nur ist die Regulation weniger stark. Daher muss der Kontakt des EBNA2 mit DNA in den CBF1-negativen Zellen auch zustande kommen. Diese Aufgabe müssen in diesen Zellen andere DNA-Adapterproteine wahrnehmen (**Abbildung 34**, grün dargestellte Proteine). Auch ChIP-PCR-Versuche an bekannten CBF1/EBNA2 Bindestellen in CBF1-negativen Zellen zeigten, dass die EBNA2-DNA-Interaktion an diesen Positionen noch vorhanden ist (siehe Ergebnisse Teil 1, **2.2**).

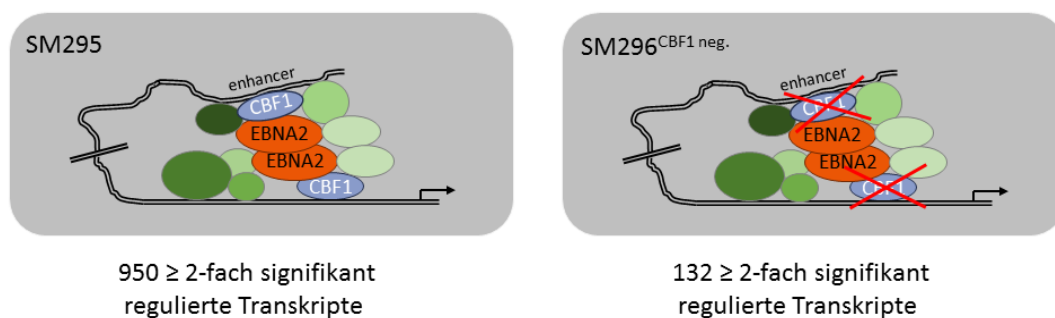


Abbildung 34: Modell zur Zielgenregulation durch EBNA2.

Modell eines CBF1/EBNA2-Transkriptions-Komplexes in einer Chromatinschleife in CBF1-positiven SM295- und CBF1-negativen SM296^{CBF1-neg.}-Zellen. Dargestellt ist jeweils ein EBNA2-Dimer, das über CBF1 und möglicherweise weitere DNA-Adaptern (in grün) direkt oder indirekt an den Promotorbereich eines Zielgenes rekrutiert wird. Gezeigt ist weiterhin exemplarisch ein *enhancer*, der über unterschiedlich große Chromatinschleifen (der Doppeltstrich deutet an, dass die Schleife größer sein kann) zum Promotorbereich gebracht werden kann. Ist CBF1 in der Zelle vorhanden, so ist die Zielgenregulation durch EBNA2 stärker und es wird auch eine größere Anzahl an Transkripten durch EBNA2 reguliert (p-Wert < 0,05).

2. CBF1-reprimierte versus CBF1/EBNA2-aktivierte Transkription

2.1. CBF1-reprimierte Transkripte

In dieser Arbeit wurden erstmalig genomweite Unterschiede der Expression CBF1-negativer und -positiver humaner B-Zellen untersucht. In den CBF1-negativen SM224.9^{CBF1 neg.}-Zellen sind 359 Transkripte im Vergleich zu den CBF1-pos. DG75 mindestens 2-fach signifikant unterschiedlich stark exprimiert, 277 davon sind in den CBF1-negativen Zellen stärker

exprimiert (siehe Ergebnisse Teil 1, **1.13.**). Das bedeutet, dass fast 80 % der gefundenen unterschiedlich stark exprimierten Transkripte in DG75 möglicherweise durch CBF1 reprimiert sind. In SM295 findet man 297 CBF1-reprimierte Transkripte beim Vergleich der Expressionsprofile von SM296^{CBF1 neg.} mit SM295. 100 in SM295 CBF1-reprimierte Transkripte findet man in DG75 unter den CBF1-reprimierten Transkripten wieder (siehe **Tabelle 18**, grau hinterlegt).

CBF1 ist ein wichtiger Bestandteil aktivierender und reprimierender Proteinkomplexe in humanen B-Zellen. Im Komplex mit verschiedenen Korepressoren wie SMRT, NCoR, HDAC1/2, Sin3A, SAP30, CIR, SKIP und CtIP/ CtBP wirkt es hauptsächlich repressorisch auf die Transkription. CBF1 interagiert auch mit den Transkriptionsaktivatoren wie Notch-IC oder EBNA2. Die in dieser Arbeit beschriebenen CBF1-reprimierten Transkripte werden wahrscheinlich durch unterschiedlich zusammengesetzte repressorische Komplexe reguliert, deren Zusammensetzung für die einzelnen Wirkorte noch nicht bekannt ist. Um mehr Informationen zu den reprimierenden Komplexen zu bekommen, könnte man ChIP-seq Versuche mit z.B. einem SMRT-spezifischen Antikörper durchführen (oder NCoR-spezifisch etc.) und untersuchen, ob die unterschiedlichen Korepressoren überlappende Bindestellen aufweisen und spezifische Cluster bilden.

Von den 277 in DG75 CBF1-reprimierten Transkripten sind die *killer cell immunoglobulin-like* Rezeptoren (KIR) am stärksten reprimiert. Insgesamt findet man 4 dieser Rezeptoren unter den am stärksten CBF1-reprimierten Genen, *KIR3DL1*, *KIR3DL2*, *KIR3DL3* und *KIR2DL3*. Diese Proteine werden von T-Zellen und NK-Zellen exprimiert. Nach Interaktion mit einem Liganden, wird ein inhibitorisches Signal ausgelöst, welches die NK-Zellaktivierung blockiert (Moretta and Moretta 2004). In B-Zellen ist keine Funktion dieser Rezeptoren bekannt. *KIR3DL1*, *KIR3DL2*, *KIR3DL3* und *KIR2DL3* werden auch nicht durch EBNA2 aktiviert (siehe **Tabelle 22** auf CD). Es könnte sein, dass diese Gene in B-Zellen dauerhaft durch CBF1 stillgelegt sind.

Auffällig bei den CBF1-reprimierten Transkripten ist, dass auch viele nichtkodierende lincRNAs zu dieser Gruppe gehören. Die Analyse der Expressionsdaten ergab, dass 10 der 46 am stärksten CBF1-reprimierten Transkripte (mindestens 4-fach), lincRNAs sind. Auch das am zweitstärksten CBF1-reprimierte Transkript ist eine lincRNA. Diese lincRNA hat bisher nur eine *ensembl*-Identifikationsnummer: ENST00000454131.1, und deren Funktion ist noch nicht bekannt. Möglicherweise beeinflusst CBF1 durch die Repression dieser nichtkodierenden RNAs weitere regulatorische Signalketten in B-Zellen.

Ein weiteres stark in DG75 CBF1-reprimiertes und interessantes Gen ist *AIM2*. Wie im ersten Ergebnisteil bereits erwähnt (**1.13**) ist AIM2 bei der Immunantwort beteiligt, ausgelöst durch virale oder bakterielle DNA (Fernandes-Alnemri, Yu et al. 2009). Des Weiteren ist *AIM2* Interferon-induzierbar und dem AIM2-Protein wurde z.B. bei Darmkrebs und Brustkrebs Tumorsuppressoreigenschaften nachgewiesen. Es konnte gezeigt werden, dass AIM2 den antiapoptotischen TNF- α /NF κ B-Signalweg inhibieren kann und somit Apoptose induziert (Chen, Ou-Yang et al. 2006, Woerner, Kloor et al. 2007). In den in dieser Arbeit untersuchten

DG75 Burkitt-Lymphomzellen wird *A/M2* durch CBF1 reprimiert. Dies trägt möglicherweise zum Überleben dieser Zellen bei.

2.2. CBF1-reprimierte und CBF1/EBNA2-aktivierte Zielgene im Vergleich

CBF1 wurde ursprünglich in vielen Modellen, besonders im Zusammenhang mit dem Notch-Signalweg, als ein statisch an DNA gebundenes Protein dargestellt, das je nach Interaktionspartnern an den jeweiligen Positionen im Genom repressorisch oder induzierend auf die Transkription wirken kann (Barolo, Stone et al. 2002). Nach diesen Modellen kann EBNA2, sobald es in der Zelle exprimiert wird, den Korepressor-Komplex am CBF1 verdrängen und transkriptionsaktivierend wirken (Hsieh and Hayward 1995). Demnach müsste ein großer Anteil der CBF1-reprimierten (im Komplex mit Korepressoren) Transkripte mit den CBF1/EBNA2-induzierten Transkripten übereinstimmen. Dies ist nicht der Fall. Die Analyse der genomweiten Expressionsstudien CBF1-positiver und -negativer und EBNA2-positiver und -negativer Zellen ergab, dass bei gleichen Bedingungen (mind. 2-fache Induktion/Repression, p-Wert < 0,05) nur 11 von 548 EBNA2-induzierten und 100 in SM295 und DG75 CBF1-reprimierten Transkripten übereinstimmen (siehe Ergebnisse Teil 1, **1.14.**). CBF1/EBNA2 wird demnach an andere Bereiche im Genom rekrutiert als CBF1 im Komplex mit Korepressoren. Für einzelne Bindestellen konnte bereits bestätigt werden, dass CBF1-Bindestellen nur in EBNA2-induzierten Zellen nachgewiesen werden konnten (Doktorarbeit Andrea Hartmann und (Mohan, Dement-Brown et al. 2006). Eine genomweite Analyse anhand ChIP-seq-Versuchen mit CBF1-spezifischen Antikörpern in EBNA2-positiven und EBNA2-negativen Zellen könnten weitere Erkenntnisse in Bezug auf die aufgeworfenen Fragen liefern.

Des Weiteren bekräftigen Ergebnisse im Zusammenhang mit NOTCH1/CBF1 und Rta/CBF1, dass das Modell mit dem statisch gebundenen CBF1 überholt ist:

Eine Publikation von 2013 beschreibt die Ergebnisse von ChIP-seq Versuchen nach Immunpräzipitationen mit CBF1-, NOTCH1-, p300-, H3K4me1-, H3K4me3- und H3K27ac-spezifischen Antikörpern in Notch-reprimierten und Notch-aktivierten Zellen (Castel, Mourikis et al. 2013). Die Autoren konnten unter anderem zeigen, dass über die Hälfte der identifizierten CBF1-Bindestellen nur in Notch-aktivierten Zellen nachgewiesen werden konnten. Sobald der Notch-Signalweg mit DAPT blockiert wurde, konnten in den ChIP-seq-Versuchen keine NOTCH1-Bindestellen und über die Hälfte der CBF1-Bindestellen nicht mehr nachgewiesen werden. In der Publikation werden diese CBF1-Bindestellen als dynamische Bindestellen beschrieben, die restlichen CBF1-Bindestellen, die auch ohne Anwesenheit von NOTCH1 in den Zellen gezeigt werden konnten, wurden als konstante CBF1-Bindestellen bezeichnet. Ein ähnlich dynamisches Modell der CBF1-Interaktion mit DNA und die Veränderten Eigenschaften nach Notch Expression wurde bereits 2007 von Krejci und Kollegen in *Drosophila* beschrieben (Krejci and Bray 2007).

Eine weitere Beobachtung bestärkt die Hypothese, dass CBF1 nicht konstant an DNA gebunden ist, sondern unterschiedliche Komplexe ausbilden kann und abhängig vom

Proteinkomplex bestimmte Bereiche im Genom targetiert: Guito und Lukac konnten zeigen, dass CBF1 eine wichtige Rolle bei der lytischen Reaktivierung von Kaposi-Sarkom-assoziierte Herpesviren (KSHV) spielt. Das KSHV Genom weist CBF1-Bindestellen auf, eine DNA-Interaktion ist aber nur zusammen mit dem lytischen „Schalterprotein“ Rta möglich (Guito and Lukac 2012).

3. Funktion von EBNA2-regulierten microRNAs

MicroRNAs sind in der Expressionsstudie dieser Arbeit schwächer durch EBNA2 reguliert als mRNAs. Die am stärksten regulierte microRNA ist 8-fach reguliert, bei den mRNAs dagegen aktiviert EBNA2 die Transkription bis zu 70-fach. Da der Einfluss des EBNA2 auf die Expression von microRNAs geringer ist, habe ich bereits 1,5-fach regulierte microRNAs in die Analysen mit einbezogen. In SM295-Zellen konnten mit den Ergebnissen der genomweiten Expressionsdaten 30 mindestens 1,5-fach signifikant regulierte microRNAs detektiert werden, 19 davon sind durch EBNA2 induziert, 11 reprimiert. In SM296^{CBF1 neg.} findet man nur 3 mindestens 1,5-fach signifikant EBNA2-regulierte microRNAs, 2 induzierte und eine reprimierte.

Trotz der etwas schwächeren Effekte haben microRNAs einen entscheidenden Einfluss auf die Regulation der Zellproliferation und auf das Überleben der Zellen. Unter den 30 EBNA2-regulierten microRNAs finden sich einige bekannte aber auch in dieser Arbeit erstmalig als EBNA2-reguliert beschriebene microRNAs.

3.1. MiR-21

MiR-21 ist in vielen Tumorarten überexprimiert und ist mitverantwortlich für die Proliferation der betreffenden Zellen. miR-21 wirkt antiapoptotisch und fördert die Migration und Invasion der Zellen und somit Metastasenbildung (Krichevsky and Gabriely 2009, Selcuklu, Donoghue et al. 2009). In einer Studie von Rosato und Kollegen konnte gezeigt werden, dass EBNA2 die Expression von miR-21 in verschiedenen Burkitt-Lymphomzelllinien (OMA, BL41), in der diffusen großzelligen B-Zelllinie (DLBCL) U2932 und in BJAB-Zellen induziert. In den DG75-abstammenden SM295-B-Zellen ist miR-21 die am stärksten durch EBNA2 induzierte microRNA. Auf molekularer Ebene wurde das miR-21-Zielgen *PTEN* in Dickdarmkrebszellen und Magenkarzinomzellen genauer untersucht. Inhibition von miR-21 und darauffolgende Expression des Tumorsuppressors *PTEN* konnte Zellproliferation und Migration der Zellen hemmen und die Apoptoserate erhöhen (Zhang, Li et al. 2012, Xiong, Cheng et al. 2013). In den untersuchten SM295-Zellen ist *PTEN* nach EBNA2-Induktion 1,87-fach induziert (p-Wert = $5,71 \times 10^{-5}$, siehe **Tabelle 22** auf CD). MiR-21 scheint demnach in SM295-Zellen *PTEN* nicht zu targetieren.

Ein Rätsel stellt die Auswirkung von EBNA2-Aktivierung auf miR-21 in CBF1-negativen DG75-abstammenden Zellen dar. In SM296^{CBF1 neg.} ist miR-21 die einzige signifikant mindestens 1,5-fach reprimierte microRNA! Wie diese Repression zustande kommt und ob man durch diese Beobachtung neue Erkenntnisse über Mechanismen der EBNA2-Transkriptionsregulation

gewinnen kann, ist derzeit fraglich. Zunächst müsste man dieses Ergebnis der genomweiten Expressionsdaten mit anderen Methoden, z.B. qPCR- oder Promotor-Reporterassays in CBF1-negativen Zellen überprüfen.

3.2. MiR-146a

Die microRNA 146a wird durch EBNA2 reprimiert. Dies zeigen die Ergebnisse der genomweiten Expressionsstudien und eine Bestätigung der Daten anhand von qPCR-Versuchen. In einer Studie von 2012 wurde die repressive Wirkung von EBNA2 auf die Transkription von miR-146a auch bereits beobachtet (Rosato, Anastasiadou et al. 2012). Erstaunlicherweise wird miR-146a durch LMP1 aktiviert (Motsch, Pfuhl et al. 2007, Cameron, Yin et al. 2008). Es könnte sein, dass die Repression von miR-146a frühe Ereignisse nach der EBV-Infektion widerspiegelt, da EBNA2, zusammen mit EBNA-LP, als erstes nach der Infektion exprimiert werden und da eine Repression von miR-146a auch in frisch infizierten primären B-Zellen nachgewiesen werden konnte (Godshalk, Bhaduri-McIntosh et al. 2008).

3.3. MiR-181b1

Im Zuge dieser Arbeit konnte miR-181b1 erstmalig als EBNA2-induzierte microRNA beschrieben und bestätigt werden. MiR-181b1 wird nach Induktion von EBNA2 in DG75-B-Zellen 5,4-fach induziert (p-Wert = $1,3 \times 10^{-7}$, siehe **Tabelle 19** im Anhang). Es gibt noch mehrere, anhand der genomweiten Expressionsdaten identifizierte microRNAs, die nach EBNA2-Induktion aktiviert oder reprimiert werden (siehe **Abbildung 17**), in dieser Arbeit wurden nur miR-21, miR-146a und miR-181b1 mit einer zweiten Methoden bestätigt.

MiR-181b1 könnte bei der Immortalisierung von B-Zellen nach EBV-Infektion eine wichtige regulatorische Bedeutung haben, da bereits einige interessante miR-181-Zielgene identifiziert wurden, z.B. *T-cell leukemia/lymphoma 1 (TCL1)*, *myeloid cell leukemia-1 (MCL-1)* und *adenylyl cyclase 9 (AC9, oder ADCY9)*. Der Zusatz -b1 bei miR181b1 weist darauf hin, dass diese microRNA von einem anderen Vorläufer wie beispielsweise miR181b2 prozessiert wurde. Alle reifen miRs der miR181-Familie sind sequenzidentisch und haben die gleiche *seed*-sequenz, eine 6-8 Nukleotide lange Bindesequenz (Neilson, Zheng et al. 2007). In Publikationen über die Funktion dieser microRNA wird deshalb häufig nur miR181 als Bezeichnung verwendet.

Das zelluläre Proto-onkogen *TCL1* ist in einigen Formen der chronischen lymphatischen Leukämie und verschiedenen Lymphomarten, darunter auch Burkitt-Lymphom und DLBCL, überexprimiert. Es gibt aber auch Formen der chronischen Lymphatischen Leukämie, die kein *TCL1* exprimieren. Auch in Hodgkin-Lymphomen oder lymphoblastischen T-Zelllymphomen wurde keine *TCL1*-Expression gefunden (Narducci, Pescarmona et al. 2000, Pekarsky, Santanam et al. 2006). Laut den Daten der genomweiten Expressionsstudie in DG75-Zellen ist *TCL1* stark exprimiert und wird nach EBNA2-Induktion schwach reprimiert (0,7-fach reguliert, p-Wert = 0,002, siehe **Tabelle 22** auf CD). Pekarsky und Kollegen konnten in Luziferase-Assays nach Kotransfektion eines *TCL1*-Reporterplasmides mit miR-181 zeigen, dass *TCL1* von miR-

181 targetiert wird. Welche Funktion miR-181b1 und die Regulation von *TCL1* bei der EBV-Infektion innehat, kann an dieser Stelle noch nicht geklärt werden.

Auch die Expression von MCL-1, ein zur Bcl-2-Familie gehörendes Protein, wird von miR-181 reguliert. Dies konnte anhand Luziferase-Assays nach Kotransfektion von miR-181 mit MCL-1-Reporterplasmiden (wt und zum Vergleich mit mutierter 3'-UTR) gezeigt werden (Zimmerman, Dollins et al. 2010). In der Studie von Zimmerman und Kollegen wird beschrieben, dass miR-181 in chronisch myeloischer Leukämie durch eine Lyn-Kinase reprimiert sein kann. Es konnte nachgewiesen werden, dass es einen Zusammenhang gibt zwischen reduzierter miR181-Expression und erhöhter MCL-1-Expression. Ein Anstieg der MCL-1-Expression kann wiederum zum Überleben der Zelle beitragen. In DG75-abstammenden Zellen ist *MCL-1* stark exprimiert und durch EBNA2 leicht reprimiert (0,8-fach reguliert, p-Wert = 0,002, siehe **Tabelle 22** auf CD). Bei diesem Beispiel kann man noch nicht sagen, ob die EBNA2-induzierte miR-181 im Zusammenhang mit MCL-1 eine Rolle spielt für das Überleben der Zellen.

Einfacher sind die Zusammenhänge der EBNA2-induzierten miR-181 mit einer möglichen proliferationsfördernden und antiapoptotischen Funktion am Beispiel des Zielgenes *ADCY9* nachzuvollziehen. Auch *ADCY9* wurde als miR-181-Zielgen in Promotor-Reporterassays nach Kotransfektion von miR-181 mit *ADCY9* (3'-UTR in wt und mutiert, fusioniert mit GFP als Reporter) bestätigt (Yang, Wang et al. 2014). Die Autoren dieser Studie zeigen, dass die Inhibition von *ADCY9* durch miR-181 in Gebärmutterhalskrebszellen antiapoptotisch wirkt. In DG75-abstammenden SM295-Zellen wird *ADCY9* stark exprimiert und schwach durch EBNA2 reprimiert (0,8-fach reguliert, p-Wert = 0,002, siehe **Tabelle 22** auf CD). Es wäre möglich, dass diese Repression durch die EBNA2-induzierte miR-181b1 vermittelt wird und die verminderte Expression der Adenylyl Cyclase 9 zum Überleben der DG75-Zellen beiträgt.

3.4. Hat die EBNA2-Regulation des *MIR17HG* einen Einfluss auf DG75-B-Zellen?

Vorläufer von microRNAs werden entweder von intergenischen oder von intragenischen Bereichen exprimiert. Die von intragenischen Bereichen stammenden microRNAs werden vorwiegend aus Introns ihrer sog. „*host genes*“ prozessiert. Das primäre Transkript dieser *host genes* wird von der RNA-Pol II transkribiert. Die microRNA-Biogenese und die Protein-Synthese ausgehend von diesem primären Transkript findet bei den *host genes* häufig parallel statt (Kim and Kim 2007).

Die Ergebnisse der genomweiten Expressionsstudien zeigten, dass die Transkription des *miR-17 host gene* (*MIR17HG*) in SM295-Zellen durch EBNA2 1,8-fach reprimiert wird (p-Wert = 0,001; siehe **Tabelle 19** im Anhang und **Abbildung 17**). *MIR17HG* kodiert für das miR-17-92 Cluster, mit den microRNAs miR-17, miR-18a, miR-19a, miR-19b, miR-20a und miR-92a. Erstaunlicherweise konnten in SM295-Zellen nur die microRNAs miR-19b und miR92a detektiert werden und diese sind nur sehr gering exprimiert und nicht EBNA2-reguliert (siehe **Tabelle 22** auf CD). Neuere Studien über die Biogenese von intragenischen microRNAs geben

erste Beweise dafür, dass microRNA-Cluster wie das miR-17-92 Cluster auch unabhängig von ihrem *host gene* reguliert sein können (Ramalingam, Palanichamy et al. 2014).

Die Dysregulation der microRNAs des miR-17-92 Clusters kann zu einer großen Anzahl von Erkrankungen führen, darunter auch solide und hämatopoietische Tumoren. Bei den meisten Lymphomen, die auf die Expression der microRNAs des miR-17-92 Clusters untersucht wurden konnte man eine Überexpression nachweisen (Mogilyansky and Rigoutsos 2013). Da bei den in dieser Arbeit untersuchten DG75-abstammenden B-Zellen nur das *host gene* des miR-17-92 Clusters exprimiert und signifikant durch EBNA2 reguliert ist, die reifen microRNAs aber nicht nachgewiesen werden konnten, spielt EBNA2 in diesem Zusammenhang vermutlich keine Rolle.

3.5. Welche Zielgene werden möglicherweise durch EBNA2-induzierte microRNAs reprimiert?

2012 wurden 2 genomweite microRNA-Zielgenstudien EBV-positiver Zelllinien veröffentlicht (Riley, Rabinowitz et al. 2012, Skalsky, Corcoran et al. 2012). Riley und Kollegen identifizierten 44 EBV-kodierte und 310 humane microRNAs in EBV-positiven (Latenz III) Jijoye Zellen. Die Autoren fanden 3026 zelluläre und 3 virale Zielgene, welche von den insgesamt 354 identifizierten microRNAs targetiert werden. Riley und Kollegen verwendeten für ihre Studien die HITS-CLIP-Methode (*High-throughput sequencing and crosslinking immunoprecipitation*).

Skalsky und Kollegen identifizierten 8 EBV-kodierte und 438 zelluläre pri-microRNAs in B95-8 infizierten LCLs. Sie verwendeten die PAR-CLIP-Methode (*photoactivatable ribonucleoside-enhanced crosslinking and immunoprecipitation*) und konnten Interaktionen von microRNAs mit den 3'-UTR Sequenzen von 3492 zellulären und 3 viralen Zielgenen nachweisen.

Die Identifikation potentieller, microRNA-vermittelter, EBNA2-reprimierter Zielgene wurde mit Hilfe der veröffentlichten microRNA-Zielgenlisten dieser beiden Studien durchgeführt. Die in **Tabelle 11** aufgeführten microRNAs miR-9-2, miR-16-2, miR-21, miR-27a/b, miR-155, miR-181 und miR-548K sind mindestens 1,5-fach signifikant EBNA2-aktivierte microRNAs (siehe **Abbildung 17**). In der 2. Spalte der **Tabelle 11** sind die in SM295-Zellen EBNA2-reprimierte Zielgene aufgeführt, die gleichzeitig eine Bindestelle für die jeweilige microRNA in ihrem 3'UTR-Bereich aufweisen.

Tabelle 11: potentielle microRNA-vermittelte EBNA2-reprimierte Zielgene

microRNA ^a	EBNA2 Zielgen ^b	Referenz ^c
miR-155	<i>WWC1</i>	1
miR-155	<i>KCNN3</i>	1
miR-181	<i>RGS16</i>	1
miR-27a/b	<i>LRRC61</i>	1
miR-27a/b, miR-181 und miR-21	<i>ZFP36L2</i>	1 und 2
miR-9-2	<i>SLC7A11</i>	2
miR-16-2	<i>DUSP2</i>	2
miR-21	<i>PM20D2</i>	2
miR-155	<i>PPARGC1B</i>	2
miR-155	<i>LHFPL2</i>	2
miR-155	<i>BIRC3</i>	2
miR-548K	<i>HERPUD1</i>	2
miR-548K	<i>TRIM14</i>	2
miR-181	<i>TCL1</i>	3
miR-181	<i>MCL-1</i>	4
miR-181	<i>ADCY9</i>	5

^a die microRNAs miR-9-2, miR-16-2, miR-21, miR-27a/b, miR-155, miR-181 und miR-548K sind in SM295-Zellen mindestens 1,5-fach signifikant durch EBNA2 induziert (p-Wert < 0,05)

^b Die EBNA2-Zielgene sind mindestens 2-fach signifikant reprimierte Zielgene (p-Wert < 0,05).

^c 1 (Riley, Rabinowitz et al. 2012); 2 (Skalsky, Corcoran et al. 2012), 3 (Pekarsky, Santanam et al. 2006), 4 (Zimmerman, Dollins et al. 2010), 5 (Yang, Wang et al. 2014)

4. Funktion von EBNA2-regulierten lincRNAs

Mit dem *GeneChip® Human Gene 2.0 ST Array* von Affymetrix war es erstmalig möglich über 11.000 lincRNAs zu detektieren. Von den insgesamt 99 mindestens 4-fach signifikant EBNA2-regulierten Transkripten in SM295-Zellen (p-Wert < 0,001) sind 24 lincRNAs, also fast ein Viertel der am stärksten EBNA2-regulierten Transkripte! Leider limitierte der zeitlichen Rahmen dieser Arbeit die Analysen dieser interessanten Molekülklasse. Weitere Untersuchungen zur Bedeutung der EBNA2-regulierten lincRNAs werden im Zuge der Doktorarbeit von Simone Rieger untersucht. Eine eventuell interessante lincRNA ist die 8-fach EBNA2-induzierte linc-IKZF2-2 (p-Wert = $2,2 \times 10^{-7}$, siehe **Tabelle 19** im Anhang). Es gibt ein 7,8-fach EBNA2-aktiviertes proteinkodierendes Gen mit der Bezeichnung *IKZF2* (p-Wert = $9,17 \times 10^{-13}$, siehe **Tabelle 19** im Anhang). Die lincRNA linc-IKZF2-2 liegt ca. 80 kb stromaufwärts des *IKZF2*-Genes, das für einen Zink-Finger-Transkriptionsfaktor aus der Ikaros Protein-Familie kodiert. Ein regulatorischer Zusammenhang wurde bisher noch nicht untersucht.

5. Die Funktion der END-Domäne (EBNA2 N-terminale Dimerisierungsdomäne)

5.1. Die END-Domäne zeigt ein neues Faltungsmodell

Die funktionellen Versuche dieser Arbeit basieren auf erstmalig für das EBNA2-Protein erhobenen Strukturdaten. Die von unserem Kollaborationspartner generierten NMR-Daten zeigen, dass die N-terminale Domäne des viralen Proteins, nun als END-Domäne bezeichnet, als Dimer in Lösung eine stabile Struktur aufweist. Die END-Domäne eines EBNA2-Monomers ist aus 5 strukturellen Elementen aufgebaut. Ausgehend vom N-Terminus sind diese Elemente 3 β -Faltblätter ($\beta 1 - \beta 3$), darauf folgend eine kurze α -Helix ($\alpha 1$) und in Richtung C-Terminus ein viertes β -Faltblatt ($\beta 4$; siehe **Abbildung 35**). Die Homodimerisierung zweier END-Domänen erfolgt auf die Art und Weise, dass sich $\beta 2$ und $\beta 2'$ ($\beta 2'$ bezieht sich auf $\beta 2$ des zweiten Monomers) und $\beta 4$ und $\beta 4'$ antiparallel anordnen. Durch diese Anordnung entsteht zwischen den beiden Monomeren eine stark hydrophobe Wechselwirkung, die maßgeblich für die Stabilität des Dimers verantwortlich ist. Dimerisierung über eine hydrophobe Grenzfläche kommt bei kleinen Proteinen (< 100 AS) häufig vor (Mei, Di Venere et al. 2005), die Faltung der END-Domäne ist aber unseres Wissens bisher einzigartig.

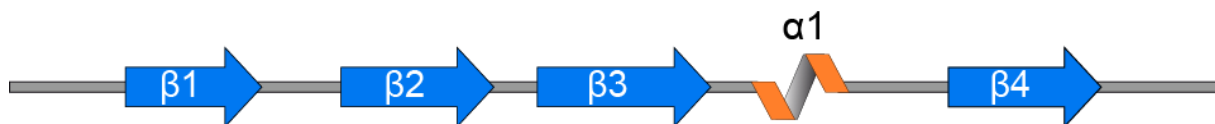


Abbildung 35: Schematische Darstellung der Sekundärstruktur der N-terminalen Domäne von EBNA2.

NMR-Daten zeigten, dass der N-Terminus von EBNA2 (Aminosäuren 1-58) in 4 β -Faltblattstrukturen organisiert ist. Zwischen $\beta 3$ und $\beta 4$ bildet sich eine kurze α -Helix aus.

5.2. Die Faltung der END-Domäne ist stark konserviert

Abbildung 24 zeigt, dass besonders diejenigen Aminosäuren, die zur Ausbildung der hydrophoben Grenzfläche führen, in humanen- und Affen-LCV-Sequenzen konserviert sind. Eine Strukturvorhersage mit der Software PSIPRED (McGuffin, Bryson et al. 2000) schlägt für alle untersuchten Sequenzen 4 β -Faltblätter an den gleichen Positionen vor (siehe **Abbildung 22**). Konservierte hydrophobe Aminosäuren und zusätzlich konservierte Elemente der Sekundärstruktur der END-Domäne führen mich zu der Annahme, dass die END-Domäne bei den untersuchten Typ 1 und Typ 2 EBV-Stämmen und bei Pavian- und Makaken-Lymphokryptoviren zur Dimerisierung des EBNA2-Proteins beitragen.

5.3. Funktion der Dimerisierung der END-Domäne

Immunpräzipitationsversuche mit EBNA2-Punktmutanten haben gezeigt, dass die Substitution des Leucin 16 oder des Isoleucin 50 mit Aspartat die Dimerisierung des Proteins stark beeinflusst (siehe **Abbildung 25**). Dies wirkt sich auch auf die Transaktivierungsfähigkeit des

EBNA2 aus. Die EBNA2-Mutanten L16D und I50D erreichen 20 % der Aktivität des EBNA2-wt bei den getesteten Zielgenen *LMP1*, *CD23* und *CCL3* (Ausnahme *LMP2A*: ca. 40 %, siehe **Abbildung 28**).

Es wurden des Weiteren Deletionsmutanten der END-Domäne untersucht ($\Delta 3-30$ und $\Delta 3-52$). Die Deletion der $\Delta 3-30$ -Mutante umfasst ca. die Hälfte der END-Domäne, bei der $\Delta 3-52$ -Mutante ist die Domäne nahezu vollständig deletiert. Der Phänotyp dieser beiden Mutanten ist nicht so einfach erklärbar. Einerseits ist die Dimerisierung nicht vollständig zerstört (**Abbildung 25 F**), andererseits besitzen sie aber keine Transaktivierungsfunktion mehr (**Abbildung 27** und **28 A**). Die schwache Interaktion der EBNA2-Monomere könnte über die 2. Dimerisierungsdomäne zustande kommen (siehe **Abbildung 23**, DIM2). Bleibt die Frage, warum bei den Punktmutanten L16D und I50D nahezu keine Interaktion der Monomere nachgewiesen werden kann. Es könnte sein, dass durch die Abstoßung der sich im Homodimer gegenüberliegenden eingeführten Aspartate der hydrophobe Kern zerstört wird und das END-Dimer auseinander fällt. Möglicherweise wird dadurch die Gesamtstruktur des EBNA2 so stark verändert, dass die 2. Dimerisierungsdomäne maskiert ist und auch keine Dimerisierungsfunktion mehr besitzt.

Bei einigen EBNA2-Zielgenen könnte die Dimerisierung eine besondere Rolle spielen. Der virale *LMP2A*-Promotor besitzt zum Beispiel zwei CBF1-Bindestellen und der *LMP1*-Promotor wird nur zusammen mit dem DNA-bindenden Protein PU.1 vollständig aktiviert (Laux, Adam et al. 1994, Yalamanchili, Tong et al. 1994, Johannsen, Koh et al. 1995). Wie bereits erwähnt, bedient sich EBNA2 des gleichen Signalweges wie der aktivierte Notch-Rezeptor. Interessanterweise bildet der aktivierte Notch-Rezeptor auch Dimere und wird häufig über 2 nebeneinanderliegenden CBF1-Bindestellen an die DNA rekrutiert (Nam, Sliz et al. 2007). Diese unterschiedlichen Beobachtungen deuten darauf hin, dass für eine Gruppe von EBNA2-Zielgenen eine effiziente Aktivierung über die Rekrutierung des EBNA2-Dimers zu nebeneinanderliegenden CBF1-Bindestellen zustande kommen könnte.

Im humanen Genom bindet EBNA2 bevorzugt in *enhancer*-Bereichen, die z.T. sehr weit von den Promotoren der Zielgene entfernt liegen (Mifsud, Tavares-Cadete et al. 2015, Zhou, Schmidt et al. 2015). Über die Dimerisierung des EBNA2-Proteins könnten größere Proteinkomplexe entstehen, die zur Vernetzung der Zielpromotoren mit den *enhancer*-Bereichen führen könnten (siehe **Abbildung 34**).

Die Daten dieser Arbeit zusammen mit den Strukturdaten des Kollaborationspartners Anders Friberg (AG Sattler, Helmholtz Zentrum München) zeigen deutlich, dass die END-Domäne ein stark konserviertes Dimerisierungsmotif besitzt. Dazu kommt, dass diese Domäne über einen langen Poly-Prolin „Arm“ mit dem Rest des Proteins verbunden ist. Die END-Domäne ist somit eine unabhängige, eigenständige, globuläre Domäne, die zur Dimerisierung des Gesamtproteins beiträgt.

5.4. Die END-Domäne - eine Transaktivierungsdomäne (TAD)

Wie im letzten Kapitel bereits erwähnt, verlieren Deletionsmutanten ($\Delta 3-30$ und $\Delta 3-52$) ihre Fähigkeit, Zielgene zu aktivieren. Diese Deletionsmutanten liegen nur noch zu einem kleinen Anteil als Dimere vor und es ist fraglich, ob die Gesamtstruktur des Proteins intakt ist. Die Interaktion mit CBF1 ist allerdings nicht beeinflusst (siehe **Abbildung 25 F**). Es wurden weitere Mutanten, im Ergebnisteil als „Oberflächenmutanten“ bezeichnete, Punkt- und Deletionsmutanten getestet, welche nachweislich dimerisieren und mit CBF1 interagieren. Die Transaktivierungseffizienz dieser Oberflächenmutanten wurde in Eli-BL-Zellen getestet. Dabei wurde die Induktion der Expression von LMP1-Protein und *LMP1*-, *LMP2A*-, *CCL3*- und *CD23*-Transkripten gemessen. Von den 3 Oberflächenmutanten EBNA2-H15A, -F51A und - $\Delta\alpha 1$ sind die Punktmutante H15A und die Deletionsmutante $\Delta\alpha 1$ stark in ihrer Transaktivierungsfunktion beeinträchtigt (**Abbildung 27** und **28**). Auffällig ist, dass bei den Versuchen kein genspezifischer Effekt entsteht. Bei der *LMP1*-, *CCL3*- und *CD23*-Aktivierung wirken sich die Mutationen stärker aus als bei der *LMP2A*-Aktivierung, dennoch zeigen sich bei den untersuchten Zielgenen immer die gleichen Unterschiede zwischen den Mutanten. Dieser genunabhängige Effekt deutet darauf hin, dass es noch weitere, bisher unbekannte Faktoren geben muss, die für die Aktivierung dieser Zielgene benötigt werden und mit der END-Domäne interagieren. EBNA-LP kommt nicht in Frage, da es in Eli-BL-Zellen nicht exprimiert wird (Peng, Moses et al. 2005). Durch die Mutation H15A oder $\Delta\alpha 1$ werden somit nach jetzigem Kenntnisstand grundlegende Mechanismen der Transkriptionsaktivierung beeinträchtigt.

5.5. Die END-Domäne - eine ungewöhnliche Transaktivierungsdomäne

Die Funktion von Transaktivierungsdomänen wurde in der Vergangenheit häufig und wird immer noch über GAL4-DBD-Fusionsproteinen nachgewiesen. Dabei wird die zu untersuchende potentielle TAD über die fusionierte DNA-Bindedomäne an künstliche Promotoren rekrutiert und die Aktivität gemessen (Keegan, Gill et al. 1986). Untersucht man die gefundenen TADs genauer, so findet man mehrfach hydrophobe oder saure Aminosäuren oder ein wiederkehrendes 9 AS-TAD-typisches Motiv (Piskacek, Gregor et al. 2007). TADs interagieren nicht nur mit Faktoren der basalen Transkriptionsmaschinerie, sondern auch mit dem Mediator, dem SAGA-Komplex oder Chromatin-*remodeling*-Komplexen. Solche „typischen“ TADs sind meist unstrukturierte Domänen, die erst zusammen mit dem jeweiligen Interaktionspartner eine Struktur annehmen (Mapp and Ansari 2007). Die C-TAD des EBNA2 lässt sich gut in diese Art Transaktivierungsdomänen einordnen (Chabot, Raiola et al. 2014). Die END-Domäne stellt dagegen eine untypische TAD dar: sie bildet auch ohne Kontakt zu anderen zellulären oder viralen Faktoren eine definiertes, globuläres Dimer.

Alle Daten über die END-Domäne zusammengefasst legen nahe, dass diese dimere Struktur essentiell für die Transkriptionsaktivierung durch EBNA2 ist. Möglicherweise spielt dabei das exponierte Histidin 15 oder die exponierte α -Helix 1 eine wichtige Rolle. Da bei den *loss-of*-

function-Versuchen alle untersuchten Zielgene gleichermaßen beeinflusst werden, sind diese beiden Elemente (H15 und $\alpha 1$) wahrscheinlich Interaktionspunkte mit anderen für die Transkriptionsregulation allgemein kritischen Faktoren.

5.6. Die Bedeutung der Erkenntnisse der Mutationsstudien für Therapieansätze

EBNA2-Expression ist ein spezifisches Kennzeichen für EBV-positive Lymphome bei immunsupprimierten Patienten. Bei dieser Art von Lymphomen wird die Proliferation der Lymphomzellen durch EBNA2 stimuliert. Da die END-Domäne entscheidend zur biologischen Aktivität des Proteins beiträgt, sollte sie als möglicher Angriffspunkt für neue Medikamente in Betracht gezogen werden. Darüber hinaus ist die END-Domäne über verschiedene EBV-Stämme hinweg und in Affen-Lymphokryptoviren stark konserviert. Wichtig ist auch anzumerken, dass die Faltung der END-Domäne und die daraus resultierende Dimerisierung über konservierte hydrophobe Aminosäuren völlig neuartig ist und auch nach intensiver Suche in verschiedenen Datenbanken keine vergleichbare zelluläre Sequenz oder Struktur gefunden werden konnte (siehe Ergebnisse Teil 2, **1.1**). Dies bedeutet, dass die END-Domäne eine bislang einzigartige Struktur ist, die sich in Lymphokryptoviren entwickelt hat und somit Virus-spezifisch ist. Fortführende Versuche haben sich auf die Suche nach Proteinen fokussiert, die an die END-Domäne binden und für diese Interaktion H15 oder die α -Helix 1 benötigen. Diese Interaktion könnte durch *small molecules* gezielt zerstört werden und die biologische Aktivität von EBNA2 stark beeinträchtigen. Die Funktion von EBNA2 auf diese Weise zu inhibieren wäre ein gezielter und spezifischer Ansatz zur Eindämmung des negativen Einflusses von EBV bei Lymphomen immunsupprimierter Patienten.

6. Die Ergebnisse der *label-free* LC-MS/MS-Versuche

6.1. Zwei neue EBNA2-Interaktionspartner

Die quantitativen massenspektrometrischen Analysen der EBNA2-wt, -H15A und - $\Delta\alpha 1$ Immunpräzipitate brachte insgesamt 629 identifizierte und möglicherweise interagierende Proteine hervor. Die Versuche wurden alle in Triplikaten durchgeführt und mit einer Negativkontrolle verglichen. Die Durchführung der Immunpräzipitation erfolgte mit Gesamtzelllysat nach Transfektion mittels Elektroporation von EBNA2-wt und EBNA2-Mutanten kodierenden Plasmiden. Leider zeigte die EBNA2-Expression nach der Transfektion, trotz gleicher Durchführung, häufig leichte Schwankungen. Dies spiegelt sich vermutlich auch in der massenspektrometrischen Quantifizierung wider. Die leicht unterschiedlich effektive Elektroporation ist wahrscheinlich nicht die einzige Ursache für die schwankenden Mengen an immunpräzipitierten EBNA2 und koimmunpräzipitierten Proteinen (siehe **Tabelle 27** auf CD). Dieser Effekt könnte sich potenziert haben, da die Immunpräzipitation sehr effizient verlief (siehe **Abbildung 30**) und bis zur massenspektrometrischen Analyse mehrere Aufreinigungsschritte erfolgten.

Die statistische Auswertung der *label-free LC-MS/MS*-Versuche ergab, dass von den 629 identifizierten, mit EBNA2-koimmunpräzipitierten Proteinen insgesamt nur 19 Proteine im Vergleich zu einer Negativkontrolle signifikant angereichert sind (mind. 1,5-fach, p-Wert < 0,05). Diese 19 Proteine sind potentielle EBNA2-Interaktionspartner.

2 der 19 Proteine wurden für weitere Versuche verwendet. Die Auswahl wurde aufgrund ihrer Lokalisation im Zellkern, der starken Anreicherung im Immunpräzipitat und wegen ihrer bereits bekannten Funktion getroffen. Diese zwei Proteine sind PAXIP1 und PLK1. Die Interaktion PAXIP und PLK1 mit EBNA2 konnte in fortführenden Immunpräzipitationsversuchen mit PAXIP1 und PLK1-spezifischen Antikörpern bestätigt werden.

6.1.1. Beeinflusst EBNA2 die PLK1-Funktion?

6.1.1.1. Kann durch EBNA2 der MSC (*Mitotic Spindle Checkpoint*) übergangen werden?

EBV-infizierte Zellen können polyploid sein oder Mikrokerne besitzen. Beides sind Phänomene, die dadurch zustande kommen können, dass der *mitotic spindle checkpoint* (MSC) übergangen wird. Am MSC überprüft die Zelle, ob der Spindelapparat richtig ausgebildet ist und jedes Chromosom mit exakt einer Spindelfaser am Kinetochor verbunden ist. Wird dieser *Checkpoint* übergangen, so kann die Anaphase der Mitose zu früh eingeleitet werden und es kann zu Fehlverteilungen der Chromosomen auf die Tochterzellen kommen. Eine Folge davon kann die Bildung von mehreren Mikronuklei in einer Zelle sein. Eine andere Fehlentwicklung bei einem defekten MSC ist der frühzeitige Abbruch der Mitose und dadurch die Bildung von polyploiden Zellen.

EBV-infizierte Zellen weisen diese Defekte auf. Mehrere Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass EBV-infizierte Zellen häufig polyploid sind oder dass Mikrokerne gebildet wurden (Humme, Reisbach et al. 2003, Leao, Anderton et al. 2007, Pan, Tai et al. 2009). Uneinigkeit herrscht bislang über den Auslöser dieser Defekte. Leao und Kollegen beschreiben, dass sie polyploide Zellen nicht nur in EBV-positiven B95.8-infizierten Zellen beobachteten, sondern auch in den EBV-positiven PRHR1-Zellen, die aber kein EBNA2 exprimieren. Dagegen zeigen Pan und Kollegen 2009, dass nur in EBNA2-exprimierenden Zellen der MSC übergangen wird und Endoreduplikation und Mikrokernbildung stattfindet. Sie schlagen vor, dass eine Dysregulation der Zellzyklus-regulierenden Faktoren PLK1 und MAD2 durch EBNA2 für diese Phänomene verantwortlich sein könnten.

6.1.1.2. PLK1 - ein Schlüsselprotein des Zellzyklus

Polo-like Kinasen (PLKs) sind von der Hefe bis zum Menschen stark konserviert und bei allen Organismen, die PLKs besitzen, nimmt eine davon eine zentrale Rolle bei der Steuerung des Zellzyklus ein. Beim Menschen ist es die PLK1, die bei einer beeindruckenden Menge an Vorgängen während des Zellzyklus beteiligt ist. PLK1 hat eine Funktion bei:

- Eintritt in die Mitose (Fu, Malureanu et al. 2008, Seki, Coppinger et al. 2008, Liang, Esposito et al. 2014)
- Reifung des Zentrosoms (Lane and Nigg 1996)
- Aufbau und Funktion des Spindelapparates (Golsteyn, Mundt et al. 1995, Sumara, Gimenez-Abian et al. 2004)
- Funktion des Kinetochors (Elowe, Hummer et al. 2007, Lenart, Petronczki et al. 2007)
- Aufbau des Zentromers (McKinley and Cheeseman 2014)
- Zytokinese (Brennan, Peters et al. 2007, Burkard, Randall et al. 2007, Neef, Gruneberg et al. 2007, Petronczki, Glotzer et al. 2007)
- Austritt aus der Mitose (Choi, Pagano et al. 2014)
- Replikation (Wu and Liu 2008, Yata, Bleuyard et al. 2014)

Es herrscht noch Uneinigkeit darüber, ob EBNA2 direkt Einfluss auf Vorgänge des Zellzyklus hat. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen eindeutig, dass EBNA2 direkt mit PLK1 interagiert. Es ist noch offen, ob diese Interaktion reprimierend oder aktivierend auf PLK1 wirkt oder ob EBNA2 Substrat für PLK1 ist und deswegen die Interaktion gezeigt werden konnte.

Aus den aufgezeigten mannigfaltigen Funktionen der PLK1 während des Zellzyklus wäre es leicht denkbar, dass ein störender Einfluss von EBNA2 auf die PLK1, den beobachteten Phänotyp EBV-induzierter Zellen (Polyploidie, Mikrokerne) erklären könnte.

6.1.1.3. Mögliche Bedeutung der EBNA2-PLK1-Interaktion für die Funktion von PLK1

Eine Möglichkeit wäre, dass sich die direkte Interaktion der beiden Proteine EBNA2 und PLK1 auf die Kinaseaktivität von PLK1 auswirkt und dadurch den Zellzyklus beeinflusst. Ein ähnliches Beispiel wurde 2002 anhand des Tax-Onkoproteins des human T-Zell Leukämie Virus type 1 (HTLV-1) beschrieben (Haller, Wu et al. 2002). Durch die direkte Interaktion des N-Terminus des Tax-Proteins mit CDK4 konnte eine erhöhte Kinaseaktivität von CDK4 nachgewiesen werden. Diese erhöhte Kinaseaktivität stimuliert wiederum den Übergang von der G1- zur S-Phase des Zellzyklus, wobei der G1-*checkpoint* übergangen werden kann. Dies ist eine häufige Strategie von Viren und eine potentieller Beitrag zur ihrer Onkogenität.

Eine erhöhte Kinaseaktivität der PLK1 durch den Einfluss von EBNA2 könnte sich dysregulatorisch auf den Zellzyklus auswirken. Wahrscheinlicher ist hier aber, dass durch eine veränderte Aktivität der PLK1, der MSC übergangen wird (siehe 6.1.1.1), wie bereits 2009 von Pan und Kollegen vermutet wurde (Pan, Tai et al. 2009).

Um zu überprüfen, ob die Kinaseaktivität von PLK1 durch EBNA2 beeinflusst wird, könnte man, wie bei Haller und Kollegen für CDK4 und CDK6 beschrieben, die Phosphorylierung eines PLK1-Substrates unter Anwesenheit und Abwesenheit von EBNA2 messen (Haller, Wu et al. 2002). Bekannte Substrate von PLK1 für diesen Test wären FOXM1, BubR1, PTEN, Rad51 oder Hbo1 (Elowe, Hummer et al. 2007, Fu, Malureanu et al. 2008, Wu and Liu 2008, Choi, Pagano et al. 2014, Yata, Bleuyard et al. 2014).

6.1.1.4. Mögliche Bedeutung der EBNA2-PLK1-Interaktion für die Funktion von EBNA2

Im einem der letzten Kapitel wurde bereits die Frage aufgeworfen, ob EBNA2 ein Substrat der PLK1 ist. EBNA2 ist während der Mitose hyperphosphoryliert und die Transaktivierungsfunktion ist stark eingeschränkt. Dies konnte am *Cp*- und *LMP1*-Promotor bereits gezeigt werden (Yue, Shackelford et al. 2006). Verantwortlich für die Hyperphosphorylierung am Serin 243 ist CDK1. Yue und Kollegen beschreiben in der Publikation auch, dass EBNA2 zusätzlich zur Position S243 noch an anderen Positionen phosphoryliert sein könnte. Abbildung 1C der Publikation (Yue, Shackelford et al. 2006) zeigt einen Immunoblot von EBNA2-wt und EBNA2-S243A aus HeLa Zelllysaten in S-, M-, und G1-Phase. Das Laufverhalten von EBNA2-wt und EBNA2-S243A ist in S- und G1-Phase ist gleich. Durch die Phosphorylierung in der M-Phase läuft EBNA2-wt deutlich höher. EBNA2-S243A, welches nicht mehr an der Position S243 phosphoryliert werden kann, zeigt während der Mitose ein Laufverhalten zwischen den phosphorylierten EBNA2-wt (während der Mitose) und dem unphosphorylierten EBNA2 (andere Zellzyklusphasen). Es wurde zusätzlich in einem λ -Phosphatase Assay gezeigt, dass der Migrationsunterschied von EBNA2-wt und EBNA2-S243A durch Phosphorylierungen zustande kommt. Es stellt sich nun die Frage, ob PLK1 EBNA2 an einer anderen Position als S243 phosphoryliert? Um zu klären, ob EBNA2 ein Substrat von PLK1 ist, könnte zunächst ein *in vitro* Kinase-Assay durchgeführt werden. Da rekombinant hergestellte PLK1 sehr teuer ist, könnte ein erster Versuch zunächst mit immunpräzipitierter PLK1 z.B. aus DG75-, Raji- oder HeK293-Zellen (siehe Masterarbeit Elena Fiestas) erfolgen. Eine mögliche weitere Phosphorylierungsposition könnte nach der von Nakajima und Kollegen ermittelten Konsensus-Sequenz D/E-X-S/T- Φ -X-D/E (Nakajima, Toyoshima-Morimoto et al. 2003) das Serin S111 sein (**Abbildung 36**). Für X ist jede beliebige Aminosäure möglich, Φ steht für eine hydrophobe Aminosäure (A, I, L, F, V, P oder G).

10	20	30	40	50
MPTFYALHGG	GQTYHLIVDT	DSLGNPSLSV	IPSNPYQEQL	SDTPLIPLTI
60	70	80	90	100
FVGENTGVPP	PLPPPPPPPP	PPPPPPPPPP	PPPPPPPPSP	PPPPPPPPPP
110	120	130	140	150
QRRDAWTQEP	SPLDRDPLGY	DVGHGPLASA	MRMLWMANYI	VRQSRGDRGL
160	170	180	190	200
ILPQGPQTAP	QARLVQPHVP	PLRPTAPTIL	SPLSQPRLTP	PQPLMMPPRP
210	220	230	240	250
TPPTPLPPAT	LTVPPRPTRP	TTLPPTPLLT	VLQRPTTELQP	TPSPPRMHLP
260	270	280	290	300
VLHVDPQSMH	PLTHQSTPND	PDSPEPRSPT	VFYNIPPMPL	PPSQLPPPPAA
310	320	330	340	350
PAQPPPGVIN	DQQLHHLPSG	PPWWPPICDP	PQPSKTQGQS	RGQSRGRGRG
360	370	380	390	400
RGRGRGKGKS	RDQQRKPGGP	WRPEPNTSSP	SMPELSPVLG	LHQGGGAGDS
410	420	430	440	450
PTPGPSNAAP	VCRNSHTATP	NVSPHIEPES	HNSPEAPILF	PDDWYPPSID
460	470	480		
PADLDESWDY	IFETTESPSS	DEDYVEGPSK	RPRPSIQ	

Abbildung 36: Proteinsequenz des EBNA2.

Gelb hinterlegt ist die Sequenz, die mit einer ermittelten Konsensussequenz für eine PLK1-Bindestelle übereinstimmt. Die Konsensussequenz stammt von Nakajima und Kollegen und lautet D/E-X-S/T-Φ-X-D/E (X = beliebige Aminosäure, Φ = hydrophobe Aminosäure).

6.1.2. EBNA2 und PAXIP1

PAXIP ist, wie unter 6.1 bereits erwähnt, ein in dieser Arbeit neu identifiziertes und mit 2 unabhängigen Methoden bestätigtes, EBNA2-interagierendes Protein. Welche zellulären Funktionen dieses Protein innehat und welche Bedeutung dies für die Wirkungsweise von EBNA2 durch die direkte Interaktion der beiden Proteine haben könnte, soll in den folgenden Kapiteln diskutiert werden.

PAXIP1 ist hauptsächlich an 2 Prozessen beteiligt. Zum einen an Reparaturmechanismen von DNA-Doppelstrangbrüchen und zum anderen an der Methylierung von Histonen.

6.1.2.1. Beeinflusst EBNA2 Reparaturmechanismen bei DNA-Doppelstrangbrüchen über PAXIP1

Die Reparatur von Doppelstrangbrüchen erfolgt entweder über homologe Rekombination oder über nicht-homologes Verknüpfen (*non-homologous end joining*) der DNA-Enden. PAXIP1 ist zusammen mit 53BP1 am nicht-homologen Verknüpfen beteiligt. Da EBNA2 bisher hauptsächlich als Transkriptionsfaktor beschrieben wurde, sehe ich hier keine Parallelen und denke nicht, dass EBNA2 eine Rolle beim nicht-homologen Verknüpfen von DNA-Enden zusammen mit PAXIP spielt. Auch die massenspektrometrischen Daten zeigen keine Ergebnisse für Proteine, die häufig in diesen DNA-Reparatur-Komplexen zu finden sind, wie z.B. 53BP1, RIF1, Rad50, MRE11 oder NBS1 (Ghosh and Kieff 1990, van den Bosch, Bree et al. 2003, Cho, Hong et al. 2007).

6.1.2.2. Wirkt sich die EBNA2-PAXIP1 Interaktion auf die H3K4 Methylierung aus?

Eine deutliche Parallele zwischen der Funktion von EBNA2 und von PAXIP1 zeigt sich dagegen bei der Methylierung von Histonen. PAXIP1 rekrutiert einen Methyltransferase-Komplex mit den Methyltransferasen MLL3 und MLL4, welche beide eine Set-Domäne besitzen und Histon 3 an Lysin 4 methylieren können (Cho, Hong et al. 2007, Patel, Kim et al. 2007). Diese Histonmarkierung findet man wiederum in *enhancer*-Bereichen, welche die Hauptbinderegionen und Wirkorte des EBNA2 sind (Zhao, Zou et al. 2011).

In der Publikation von Zhao und Kollegen wurde der H3K4-Methylierungsstatus von ruhenden B-Lymphozyten (RBLs) im Vergleich zu LCLs untersucht (Zhao, Zou et al. 2011). Es zeigte sich, dass RBLs bereits ein sehr ähnliches Methylierungsmuster aufweisen, das z.T. nur schwächer ausgebildet ist (Abb. 1c der Publikation). Die Bereiche mit hoher H3K4-Methylierung sind in RBLs darauf vorbereitet („poised“), dass nach Antigen-Stimulation die Expression an diesen Positionen aktiviert werden kann (H3k4-Methylierung ist eine aktivierende Chromatinmodifikation). Zhao und Kollegen diskutieren, dass EBNA2 dieses „vorbereitet sein“

ausnützt und genau an diesen Stellen bindet und dadurch die Expression effizient und stark ankurbeln kann. Zhao und Kollegen beobachten weiterhin, dass die H3K4-Methylierung in LCLs (EBNA2 ist exprimiert) stärker ausgeprägt ist als in RBLs (kein EBNA2). Diese Verstärkung des H3K4-Methylierungsstatus könnte mit der Rekrutierung des MLL3/MLL4 Methyltransferase-Komplexes über die EBNA2-PAXIP1 Interaktion zustande kommen.

Um zu zeigen, dass MLL3/MLL4-Methyltransferasen durch EBNA2 rekrutiert werden, könnte man ChIP-PCR-Experimente an bekannten CBF1/EBNA2-Bindestellen mit Antikörpern spezifisch für Proteine des Methyltransferase-Komplexes (Ash2L, MLL4 oder Rbbp5) durchführen, vergleichbar mit den Versuchen von Patel und Kollegen (Patel, Kim et al. 2007). Für den direkten Nachweis wäre ein Re-ChIP-Experiment mit einem EBNA2-spezifischen Antikörper erforderlich.

6.1.2.3. PAXIP1 - ein EBNA2-Koaktivator?

Für das in *Xenopus* PAXIP1-homologe Protein SWIFT konnte 2001 gezeigt werden, dass es mit SMAD2 interagiert und als Koaktivator bei der Transkriptionsregulation durch SMAD2 fungiert (Shimizu, Bourillot et al. 2001). Die direkte Interaktion kommt bei *Xenopus* über die 3 C-terminalen BRCT-Domänen des SWIFT-Proteins mit phosphoryliertem SMAD2 zustande. Für Tandem BRCT-Domänen (BRCA1-C-Terminale-Domänen) konnte auch in einer Proteomic-Studie zu Phosphopeptid-bindenden Modulen gezeigt werden, dass sie spezifisch Phosphoserine oder Phosphothreonine erkennen können (Manke, Lowery et al. 2003). PAXIP1 besitzt auch Tandem-BRCT-Domänen und EBNA2 ist im aktivierten Zustand phosphoryliert. Es könnte also sein, dass PAXIP1 über seine BRCT-Domänen an phosphoryliertes EBNA2 bindet und als Transkriptions-Koaktivator wirkt. Eine ähnliche Hypothese wurde bereits in der Diskussion von Cho und Kollegen 2007 aufgestellt (Cho, Hong et al. 2007).

Um dies zu überprüfen, müsste man zunächst Koimmunpräzipitationen mit einem PAXIP-spezifischem Antikörper durchführen und überprüfen ob phosphoryliertes und dephosphoryliertes EBNA2 gleichermaßen zusammen mit PAXIP1 präzipitiert wird.

Ob PAXIP1 direkt Einfluss auf die EBNA2-vermittelte Transkriptionsregulation nehmen kann, könnte man in Promotor-Reportergenexperimenten überprüfen. Wirken sich unterschiedliche Mengen an PAXIP1 auf die Aktivierungseffizienz durch EBNA2 aus, dann wäre PAXIP1 ein neuer EBNA2-Koaktivator.

6.2. END-Domänen Interaktionspartner

PLK1 ist nach den Ergebnissen der quantitativen massenspektrometrischen Analysen und nach Analysen im Western Blot (**Abbildung 33 C**) im EBNA2-wt, -H15A und - $\Delta\alpha 1$ -Immunpräzipitat gleich stark angereichert. Daraus habe ich gefolgert, dass Histidin 15 und die kurze alpha-Helix 1 nicht an der in dieser Arbeit gefundenen EBNA2-PLK1-Interaktion beteiligt sind.

Die unterschiedlich Starke Anreicherung von PAXIP1 im EBNA2-wt, -H15A und - $\Delta\alpha 1$ -Immunpräzipitat zeigte sich zwar anhand der massenspektrometrischen Analysen (**Abbildung**

32), weist aber einen schlechten p-Wert auf (**Tabelle 20** und **Tabelle 21**) und konnte wegen technischen Problemen bisher noch nicht mit einer anderen Methode überprüft werden. Das bedeutet, dass Histidin 15 und die alpha-Helix 1 eventuell einen Einfluss auf die EBNA2-PAXIP1 Interaktion ausüben könnten, dies aber noch überprüft werden muss. Die erwähnten technischen Probleme lagen darin, dass die Interaktion von PAXIP1 mit EBNA2 nach transienter Expression nicht nachgewiesen werden konnte. Eine Möglichkeit eine Funktion von Histidin 15 oder der alpha-Helix 1 für die Interaktion nachzuweisen wäre, die H15A- und $\Delta\alpha 1$ -Mutanten in einem induzierbaren System zu exprimieren und die Immunpräzipitation mit diesen Zellen durchzuführen. In einem induzierbaren System konnte die EBNA2-PAXIP1 Interaktion bereits bestätigt werden (siehe **Abbildung 31**). Könnte man in dem gleichen System zeigen, dass man PAXIP1 nicht mit EBNA2-H15A oder EBNA2- $\Delta\alpha 1$ koimmunpräzipitieren kann, so würde dies die Funktion dieser Bereiche für die Interaktion bestätigen.

Das primäre Konzept der vergleichenden LC-MS/MS-Versuche verfolgte den Ansatz, Proteine zu identifizieren, die nicht mehr, oder nur noch schwach an die Mutanten H15A und $\Delta\alpha 1$ binden. Die gestörte Interaktion zu anderen, eventuell transkriptionsregulatorischen Faktoren sollte eine Erklärung für die stark verminderte Transaktivierungsfunktion der H15A- und der $\Delta\alpha 1$ -Mutante darstellen. Unter den 629 identifizierten Proteinen ist nur SDF2, SDF2L1, CTSB, SNRPN, CCT5 und DNAJB11 signifikant im Immunpräzipitat mindestens einer der beiden Mutanten im Vergleich zum Wildtyp stark **ab**gereichert (mindestens 2,5-fach). SDF2 und SDF2L1 wurden von den weiteren Untersuchungen ausgenommen, da diese Proteine z.T. sekretiert werden und bisher vorwiegend im Endoplasmatischen Retikulum nachgewiesen werden konnten (Lorenzon-Ojea, Caldeira et al. 2014) und somit vermutlich nicht mit EBNA2 *in vivo* interagieren. Proteine, die eine Funktion bei der Interaktion mit EBNA2 wahrnehmen könnten, müssen, wie EBNA2 selbst, in den Zellkern wandern. CTSB, SNRPN, CCT5 und DNAJB11 erfüllen diese Voraussetzung. SNRPN ist am pre-mRNA *splicing* beteiligt und somit ein nukleäres Protein (Ohosone, Mimori et al. 1989). CTSB ist eine vorwiegend lysosomale Cysteinproteinase. In einer Studie über Schilddrüsenkrebs konnte CTSB aber eindeutig im Zellkern lokalisiert nachgewiesen werden (Tedelind, Poliakova et al. 2010). CCT5 und DNAJB11 sind beides Chaperone, welche auch in den Zellkern wandern können. Speziell CCT5 könnte von Interesse sein, da es nach dem *Human Protein Atlas*, wie EBNA2 selbst, in den Nucleoli angereichert ist (Uhlen, Oksvold et al. 2010, Uhlen, Fagerberg et al. 2015).

Für alle 4 Proteine, CTSB, SNRPN, CCT5 und DNAJB11 sind Antikörper im Handel erhältlich. In einem ersten Schritt könnte die Interaktion mit Immunpräzipitationsversuchen und anschließender Detektion des koimmunpräzipitierten CTSB, SNRPN, CCT5 oder DNAJB11 bestätigt werden. Da bereits Vektoren zur transienten Expression der EBNA2-Mutanten H15A und $\Delta\alpha 1$ in humanen Zellen zur Verfügung stehen, könnte mit den entsprechenden Antikörpern auch relativ zügig der Einfluss dieser Bereiche (H15 und alpha-Helix 1) auf die mögliche Interaktion mit CTSB, SNRPN, CCT5 und DNAJB11 überprüft werden.

VII. Anhang

1. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
α	alpha
Δ	Deletion
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μM	mikromolar
A	2'-Desoxyadenosin-5'-phosphat
Abb.	Abbildung
AG	Arbeitsgruppe
AIDS	acquired immune deficiency syndrome
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
BL	Burkitt-Lymphom
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
C	2'-Desoxycytidin-5'-phosphat
CDK	cyclin-dependent kinase
cDNA	komplementäre DNA (complementary DNA)
ChIP	Chromatinimmunpräzipitation
cm	Zentimeter
Cp	Crossing-point
cpm	Zerfälle pro Minute (counts per minute)
CTD	Carboxy-terminal domain
CTL	cytotoxic T-cell
Cy5	Cyanin 5
d	Tage (days)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	2'-Desoxyribonukleinsäure
DNMT	DNA-Methyltransferase
dNTP	3'-Desoxyribonukleotid-5'-phosphat
Dox	Doxycyclin
ds	doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
E2	EBNA2
E3A	EBNA3A
E3C	EBNA3C
EBER	Epstein-Barr Virus kodierte RNA

EBNA	Epstein-Barr Virus Nukleäres Antigen
EBV	Epstein-Barr Virus
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
END	EBNA2 N-terminale Domäne
FACS	fluorescence activated cell sorting
FC	fold change
FKS	Fötales Kälberserum
fw	forward
g	Erdbeschleunigung
G	2'-Desoxyguanosin-5'-phosphat
GAL4-DBD	DNA-Bindedomäne des Transkriptionsfaktors GAL4
GFP	Green Fluorescent Protein
GO	Gene Ontology
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunden (hours)
HA	Hemagglutinin
HCl	Hydrogenchlorid
HDAC	Histondeacetylase
HL	Hodgkin-Lymphom
HMT	Histon-Methyltransferase
HRP	Merrettich-Peroxidase (horseradish peroxidase)
ID	Identifikationsnummer
IFN γ	Interferon gamma
K	Lysin
kb	Kilobasenpaar(e)
kDa	Kilodalton
ko	knock out
kond.	konditional
LB	Luria-Bertani
LCL	Lymphoblastoide Zelllinie (lymphoblastoid cell line)
Limma	linear models for microarray analysis
LMP	latentes Membranprotein
M	Mol
mA	Milliampere
me	methyliert
min	Minute
ml	Milliliter
mM	millimolar
MM	mismatch
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
mt	Mutante

MW	Mittelwert
ng	Nanogramm
NGF-R	Nerve Growth Factor Receptor
NK	Natural Killer
nm	Nanometer
NPC	Nasopharynxkarzinom
ORF	offener Leserahmen (open reading frame)
PAA	Polyacrylamid
PBS	Phosphat gepufferte Saline
PcG	Polycomb Group
PCR	Polymerasekettenreaktion (polymease chain reaction)
p.i.	post infection
Pol	Polymerase
PTLD	post transplant lymphoproliferative disease
PVDF	Polyvinylidenfluorid
rev	reverse
RMA	robust multichip average
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale RNA
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung (standard deviation)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
sec	Sekunden
T	2'-Desoxythymidin-5'-phosphat
TAE	Tris-acetat-EDTA
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N, N, N',N'-Tetramethylethylendiamin
Temp.	Temperatur
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TSS	Transcription Start Site
U	Einheit der Enzymaktivität (Unit)
UV	Ultraviolett
V	Volt
vs.	versus
WB	Western Blot
wt	Wildtyp

2. Tabellen

Tabelle 12: 99 mindestens 4-fach signifikant EBNA2-regulierte Zielgene

ID	SM295_estr/SM295_ ctrl logFC	SM295_estr/SM295_ ctrl adj.P.Val	ST 212 SM295 D6 R1.CEL	ST 212 SM295 D6 R2.CEL	ST265 SM295 D6 R3.CEL	ST 212 SM295 D6 + 24h ER R1.CEL	ST 212 SM295 D6 + 24h ER R2.CEL	ST265 SM295 D6 +24h ER R3.CEL	symbol	description
16977052	6,152747925	8,16078E-15	4,121965237	4,439801162	4,421589517	9,981677456	10,74957146	10,71035078	CXCL10	chemokine (C-X-C motif) ligand 10
16761319	6,095791413	1,31795E-15	2,346970024	2,823174202	2,614210761	8,387795649	9,099779394	8,584154182	lincRNA ENST00000539009	
16694928	5,269938173	7,47411E-14	6,391556871	6,124779484	5,845783224	11,03412397	11,53200259	11,60580754	FCRL3	Fc receptor-like 3
16761350	4,900318053	1,42121E-15	5,154826186	5,17163437	5,072248212	9,912356146	10,11438051	10,07292627	KLRC3	killer cell lectin-like receptor subfamily C, member 3
16780592	4,776986007	2,60708E-16	5,011140195	4,957962592	5,080915832	9,729494448	9,807801044	9,843681149	GPR183	G protein-coupled receptor 183
16914952	4,416530087	8,67427E-14	5,059960222	4,950855044	4,966381021	8,863125925	9,727499648	9,636160976	lincRNA-PFDN4-3	
16675301	4,261005368	6,10292E-13	4,694804552	4,898125982	4,467357231	8,729422058	9,174280408	8,939601403	RGS1	regulator of G-protein signaling 1
16968428	4,248731561	2,83852E-14	5,394388958	5,673449043	5,132115937	9,476779512	9,78152529	9,687843819	lincRNA-MRPS18C	
16779667	4,153854276	3,59455E-14	6,563947819	6,256108784	6,159643543	10,30760087	10,70171177	10,43195033	PCDH9	protocadherin 9
17050350	4,082699024	2,37406E-12	5,272589853	5,355554489	5,450398985	9,538688545	9,335119597	9,432832258	LRRN3	leucine rich repeat neuronal 3
16737314	4,069066427	2,46665E-10	4,615606897	4,336129148	3,798172177	7,525667868	8,551011369	8,880428267	lincRNA-APIP-1	
16761370	3,961826998	5,96511E-13	3,236359147	3,218478422	3,282645888	7,037570321	7,546373785	7,339020344	KLRC1	killer cell lectin-like receptor subfamily C, member 1
16900148	3,88381326	3,05165E-12	4,340782867	4,384893616	4,23838689	7,853210504	8,527006013	8,233990836	IGKV2-24	immunoglobulin kappa variable 2-24
16761201	3,831442299	1,0983E-12	4,689394833	4,304459047	4,384866393	8,279939762	8,454343284	8,138764125	CD69	CD69 molecule
16676795	3,76682321	3,79821E-09	4,24045879	4,067220727	4,217646748	6,828866907	8,628508787	8,368420203	CR2	complement component (3d/Epstein Barr virus) receptor 2
16977502	3,717096442	2,02596E-14	6,790415259	7,278446475	7,291229027	10,77080585	10,9472056	10,79336863	PLAC8	placenta-specific 8
17069691	3,691554111	1,72984E-15	4,749061028	4,769395498	5,451581701	8,350034348	8,444954956	8,373311256	ADAMDEC1	ADAM-like, decysin 1
16957363	3,626850423	3,48014E-13	4,989927154	5,150382073	5,155251643	8,456136849	8,823273375	8,896701914	BTLA	B and T lymphocyte associated
16914191	3,622988627	4,26362E-14	5,290316524	5,316772733	5,248592556	8,73503699	9,015617311	8,973993394	SEMG2	semenogelin II
17078452	3,612737474	9,32786E-12	5,421793252	4,961755384	5,451960878	8,494441714	9,022973531	9,15630669	HEY1	hairly/enhancer-of-split related with YRPW motif 1
16999343	3,587144732	1,53528E-13	4,23973249	3,8041222	4,094971298	7,667068647	7,700902102	7,532289433	sense intronic transcript ZNF608	
16797591	3,460619864	8,44066E-13	8,534241745	8,404830698	8,598130988	11,76066574	12,08475883	12,07363845	ENST00000390633	ENST00000390633 überlappt mit ID16797591 (Oktober 2014)
16981631	3,408535568	1,98202E-09	5,39095047	5,977933927	5,683469308	8,602922525	9,394513425	9,280524461	GLRA3	glycine receptor, alpha 3
17105082	3,397706092	7,35045E-13	7,209960505	7,286347844	6,975413665	10,37838266	10,67122425	10,61523338	GPR174	G protein-coupled receptor 174
17109142	3,306563674	5,94024E-10	5,315282644	4,93663761	4,901467674	7,703995936	8,793980932	8,575102083	lincRNA-FAM9C-2	
16999321	3,272873903	7,92272E-13	7,525376771	7,749167992	7,408195804	10,84156787	10,93193442	10,72785999	ZNF608	zinc finger protein 608
16844381	3,214901688	1,7818E-13	7,490686581	7,862787066	7,842352768	10,71385787	11,09713672	11,0295369	CCR7	chemokine (C-C motif) receptor 7
16797599	3,207368563	1,01016E-11	6,733367645	6,197464247	6,484876376	9,774002851	9,687329471	9,576481633	IGHV3-72	immunoglobulin heavy variable 3-72
16661497	3,172893903	2,67047E-15	6,093183549	6,210463887	6,133000027	9,236547794	9,445002748	9,273778628	C1orf38	chromosome 1 open reading frame 38
17008463	3,163120218	1,08751E-11	7,109779237	6,903653829	7,109683158	9,658314527	10,27473872	10,67942364	NCR2	natural cytotoxicity triggering receptor 2
16947715	3,080347113	2,92997E-11	5,020032036	4,897911615	4,964928002	8,119224719	8,11646258	7,888225691	SERPINI1	serpin peptidase inhibitor, clade I (neuroserpin), member 1
16748361	3,072189626	1,95203E-10	7,138687172	7,216235115	7,072009902	9,957813993	10,42850787	10,2571792	lincRNA-PRH2-2	
16914183	3,059220106	5,89547E-10	4,054460357	4,383612598	4,066772313	6,656451122	7,54130667	7,484747795	SEMG1	semenogelin I
16839872	3,037074658	3,60502E-14	7,124680647	7,090037616	6,993975176	9,94223139	10,18332523	10,19436079	P2RX1	purinergic receptor P2X, ligand-gated ion channel, 1
16694886	3,036601073	5,46629E-11	4,064458349	4,087874286	4,115966408	6,799561406	7,244116361	7,334424494	FCRL5	Fc receptor-like 5
16748358	3,035270493	3,62915E-13	8,245636854	8,26639003	8,399160117	11,2597627	11,38268837	11,3745474	lincRNA-PRH2-3	
16961675	3,028054911	4,48969E-09	8,461507655	8,334667662	8,310685394	11,25829976	11,45663909	11,4760866	NAALADL2-AS2	
17088991	3,026210636	5,26079E-11	5,257441788	5,624655209	5,72569859	8,763700727	8,609597244	8,313129523	MIR181A2HG	MIR181A2 host gene (non-protein coding)
17075565	3,018559274	6,92958E-11	3,549404686	4,184069396	3,867462403	6,441465495	7,178453933	7,036694877	lincRNA ENST00000521681	
16696237	3,009409089	8,57075E-10	6,472805773	6,22220251	6,182174929	8,81471998	9,59693008	9,493760417	SELL	selectin L
16848219	3,001743464	1,13643E-10	3,914588661	4,135367904	3,662321836	6,41994781	7,328493691	6,969067292	ABCA6	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 6
16716499	3,000411874	1,37521E-09	3,970171837	4,155992719	4,303953024	6,882504202	7,518597973	7,030251027	NUDT9P1	nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 9 pseudogene 1
16907940	2,990572264	2,19761E-08	4,721191753	4,548033402	5,12642118	7,715823149	7,906356187	7,743404549	lincRNA-IKZF2-2	
16782022	2,987393556	4,62649E-09	3,78578795	3,427080207	3,73999435	6,881505794	6,616628477	6,416908904	TORA	
16907912	2,971690956	9,17193E-13	7,230887166	7,40165558	7,025069541	10,22199782	10,22896345	10,12172388	IKZF2	IKAROS family zinc finger 2 (Helios)
16837362	2,969304243	9,49946E-10	5,828242501	5,968774267	5,303132677	8,324443466	8,845974555	8,837644155	LOC388414	
16748327	2,96381275	3,99091E-11	3,838131981	4,183016841	4,084971092	6,544022205	7,233685094	7,219850866	KLRD1	killer cell lectin-like receptor subfamily D, member 1
16936761	2,877931103	6,23132E-10	4,84107427	4,641769397	4,736788543	7,17715427	8,129458481	7,546812768	CHL1	cell adhesion molecule with homology to L1CAM (close homolog of L1)
16797611	2,82985174	5,07888E-10	5,027091633	4,891699613	4,986791086	7,989540151	8,093114453	7,312482947	IGHV7-81	immunoglobulin heavy variable 7-81 (non-functional)
16790440	2,823454439	2,26373E-10	4,7212944	4,846787352	4,463658583	7,534219443	7,472002322	7,495881887	TRDV1	T cell receptor delta variable 1
16707184	2,803382019	3,50525E-09	3,42387863	4,163181289	4,384224054	6,554348675	7,036578255	6,790503098	IFIT3	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3

ID	SM295_estr/SM295_ ctrl logFC	SM295_estr/SM295_ ctrl adj.P.Val	ST 212 SM295 D6 R1.CEL	ST 212 SM295 D6 R2.CEL	ST265 SM295 D6 R3.CEL	ST 212 SM295 D6 + 24h ER R1.CEL	ST 212 SM295 D6 + 24h ER R2.CEL	ST265 SM295 D6 +24h ER R3.CEL	symbol	description
16761359	2,797729154	6,37131E-10	6,090155353	6,06760751	6,019894738	8,517414104	9,266388008	8,787042949	KLRC2	killer cell lectin-like receptor subfamily C, member 2
17019056	2,760606727	2,11508E-10	5,467810863	5,472625011	5,285061653	7,580562021	8,408907345	8,517848343	TREM1	triggering receptor expressed on myeloid cells 1
16738657	2,733531422	1,32146E-07	4,219219511	4,716370068	4,724378029	6,813968062	7,045154518	8,001439309	GLYATL2	glycine-N-acyltransferase-like 2
16836624	2,727525837	1,1855E-09	6,341675357	6,365144602	6,582792475	9,418904479	8,915097382	9,138188084	MIR21	microRNA 21
16988615	2,689954573	3,54522E-11	3,810490561	4,185295939	4,071404088	6,416183791	6,827759669	6,893110846	ENST00000502467	antisense transcript ZNF608
16782028	2,673065123	1,94964E-10	7,313047158	7,328742388	7,511475823	10,30468365	10,02190865	9,845868437	TRAJ48	
16855810	2,652373058	2,92952E-11	5,598922211	5,762044581	5,666993851	7,866332681	8,543451446	8,575295691	CD226	CD226 molecule
16745016	2,65193322	6,00149E-10	7,036579104	7,437811322	7,714182337	9,58722124	10,24923528	10,3079159	CD3D	CD3d molecule, delta (CD3-TCR complex)
16782016	2,607401282	3,63587E-08	4,992316111	4,900734044	5,446917358	7,877207483	7,443044027	7,841919849	TRAJ56	
16779059	2,568163976	1,68921E-09	5,617947746	5,384231997	5,593477553	8,124714708	7,956444054	8,218990461	CAB39L	calcium binding protein 39-like
16906749	2,529940469	1,21316E-10	5,331920554	5,568366701	5,692595472	7,597483751	8,24951548	8,335705584	HECW2	HECT, C2 and WW domain containing E3 ubiquitin protein ligase 2
16782020	2,511843161	1,62554E-07	4,611269498	4,01788732	4,001225057	6,80285179	6,668100211	6,694959357	TRAJ53	
16725252	2,510316208	2,711E-07	8,70552544	7,922677718	7,908175853	10,7514681	10,70546407	10,61039546	MSA41	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 1
17013170	2,503392621	7,42055E-13	7,130847609	7,457881918	7,331495095	9,867402988	9,818641456	9,74435804	lincRNA-AIG1	
17117888	2,499835584	7,19554E-08	4,273149492	3,512484663	3,42859764	6,423233256	6,248466829	6,042038465	ZEB2	zinc finger E-box binding homeobox 2
16920475	2,474804161	1,91503E-13	6,868520408	6,997334731	6,952490673	9,266327968	9,524793881	9,451636447	BCAS1	breast carcinoma amplified sequence 1
16697654	2,451538597	7,54327E-09	6,593962383	6,638730414	6,743126546	9,020047318	9,09423902	9,216148797	MIR181A1HG	familial acute myelogenous leukemia related factor (LOC100131234)
16780585	2,451280709	2,04234E-08	8,59237795	9,033438545	8,551892005	11,32728588	11,19340755	11,01085719	GPR18	G protein-coupled receptor 18
16807174	2,450080112	8,18994E-08	5,662252855	5,687991224	5,453059686	7,285400513	8,280693568	8,587450021	lincRNA-MEIS2	
16695422	2,447022832	4,82783E-10	5,047527094	5,127921076	5,040126538	7,391371583	7,668134162	7,497137458	SLAMF1	signaling lymphocytic activation molecule family member 1
17055002	2,441663489	3,86787E-07	3,485098103	4,232013375	3,616669623	6,321405091	6,518868661	5,818497816	miscRNA ENST00000458975	
17117874	2,434392703	4,33421E-11	4,704798864	4,924383674	5,037425761	7,397453047	7,300507569	7,271825792	LOC100507307	hypothetical LOC100507307 (Ref seq: withdrawn)
16697660	2,431885466	1,28729E-07	6,122565107	6,44202627	6,402555359	8,747631464	8,392580899	9,122590772	MIR181B1	microRNA 181b-1
16747896	2,420148223	1,05674E-08	4,940021346	5,529652511	5,372780522	7,215575117	7,80348947	8,08383446	CLEC4A	C-type lectin domain family 4, member A
17066921	2,401451168	2,82712E-11	6,658935949	7,070839058	6,799016955	9,217250384	9,141915288	9,373979794	ADAM28	ADAM metalloproteinase domain 28
16672838	2,380620632	1,33334E-11	6,64721681	6,741922824	6,934390679	9,028368129	8,997276634	9,439747448	FCER1G	Fc fragment of IgE, high affinity I, receptor for; gamma polypeptide
17094814	2,379198025	1,26915E-12	5,866536925	6,018476923	5,975597461	8,325728308	8,381811627	8,290665449	TEM2	transmembrane protein 2
16761326	2,362238737	3,52054E-14	8,045675614	8,150842755	8,009915271	10,54204357	10,44598804	10,30511824	KLRC1 // KLRC4	killer cell lectin-like receptor subfamily K, member 1 // killer cell lectin-like receptor subfamily C, member 4
16695437	2,306069122	3,06835E-14	9,575108376	9,647015342	9,481231165	11,90308586	11,91731089	11,8011655	CD48	CD48 molecule
16728560	2,301939828	8,72908E-11	7,0010333	7,27721267	7,269260757	9,259760142	9,431873044	9,762201623	IL18BP	interleukin 18 binding protein
17079317	2,264052967	7,88029E-11	8,810558439	9,161295044	8,907134148	11,17424728	11,32313401	11,17376524	TP53INP1	tumor protein p53 inducible nuclear protein 1
17012598	2,262178512	2,68588E-11	5,878459158	6,347796065	6,424893975	8,318596079	8,595006785	8,52408187	ENPP3	ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 3
16993701	2,238870954	9,25013E-11	5,875585289	5,446934988	5,331080297	7,67766791	7,930722717	7,761822808	lincRNA-CCDC127	
16697647	2,228696904	1,33238E-09	6,535114088	6,739751504	6,90072794	9,12147532	8,685659289	9,054513634	lincRNA-ATP6V1G3-4	
16991654	2,193844929	4,7255E-11	6,552250197	6,111918711	6,258251427	8,534938633	8,658353416	8,310663075	lincRNA ENST00000499583	
16966214	2,161647566	1,6313E-10	6,480525508	6,621936648	6,489699568	8,699458319	8,887816485	8,489829617	RHOH	ras homolog gene family, member H
16907904	2,145916929	2,84521E-07	3,798323393	3,898644843	3,872282859	6,338317453	6,26810856	5,40057587	ENST00000415387	
16920454	2,128101465	4,13695E-11	8,426256656	8,765329084	8,451983544	10,63348642	10,81655816	10,5778291	ZNF217	zinc finger protein 217
16897631	2,108491647	1,34312E-08	4,323000001	4,170371062	4,66578307	6,558030303	6,808568338	6,118030434	ENST00000456363	antisense transcript SPTBN1
16997845	2,09870321	2,65603E-09	3,181014096	2,836863302	2,761028333	4,850320299	5,238031092	4,990165303	lincRNA-EDIL3-1	
16882750	2,091288911	1,81168E-08	6,039035534	5,425925465	5,860713841	7,642381184	7,797860592	8,159299797	IGKV2D-24	immunoglobulin kappa variable 2D-24 (non-functional)
16770915	2,085149871	3,52054E-14	8,887848751	8,86337124	8,929630685	10,87451711	10,99878311	11,06300007	WSB2	WD repeat and SOCS box-containing 2
16881920	2,081998399	4,05603E-05	7,792036508	6,548287076	6,825042753	9,204171386	9,049030932	9,158159216	ENST00000445178	antisense transcript LRRMT4
16988604	2,072745931	1,19302E-08	4,528972836	4,411941448	4,194897897	6,512236834	6,755599898	6,086213242	ENST00000515092	lincRNA antisense ZNF608
17101543	2,049764026	2,61168E-14	8,850008181	8,989113668	8,992973195	10,98778496	10,94468184	11,04892032	TMSB4X	thymosin beta 4, X-linked
17002278	2,019912593	6,41047E-11	8,795608167	8,902621888	8,816180697	10,92298891	10,76373525	10,88742438	EBF1	early B-cell factor 1
16763295	2,011544803	7,7334E-09	6,799723	6,748122613	6,880034965	8,501257603	8,677717655	9,283539731	PRICKLE1	prickle homolog 1 (Drosophila)
16675312	2,003668153	0,000185671	6,39647724	6,013253044	5,83750703	8,164733535	8,176593965	7,916914273	RGS13	regulator of G-protein signaling 13
16823493	-2,011014891	2,35684E-09	9,907135147	9,698581326	9,637602909	7,835834092	7,679697966	7,916914273	SRL	sarcalumenin
16945682	-2,016476161	4,04724E-12	8,089067058	8,234962708	8,197344272	6,165417297	6,215067168	6,091461092	ACPP	acid phosphatase, prostate
16738701	-2,085094389	4,47977E-11	9,08027602	9,584087163	9,631268894	7,269267776	7,432063513	7,33901762	lincRNA ENST00000399003	
16722455	-2,126952779	2,42137E-08	6,798360341	6,745743186	6,83704225	4,84706435	4,210641824	4,942581266	lincRNA-MYOD1	
16944618	-2,166298796	2,69095E-09	8,21437989	8,62276412	8,539935337	6,216606158	6,017718406	6,643858396	CD86	CD86 molecule
16890817	-2,180470087	3,95414E-07	5,82206212	6,045120189	6,293138306	3,77558332	3,831595378	4,011731656	snoRNA ENST00000458869	
16891529	-2,255100041	2,16395E-09	8,267283778	8,482057877	8,475111575	6,135121899	6,185284833	6,138746375	lincRNA-CCDC140-3	
16751190	-2,305694782	4,22145E-13	10,21938508	10,32796666	10,16186149	7,808299011	8,114917543	7,868912337	METTL7A	methyltransferase like 7A
16863753	-2,311378426	9,42523E-13	10,27184981	10,38890348	10,40327891	8,074552549	8,041603008	8,013741359	EMP3	epithelial membrane protein 3
16801602	-2,3778840461	2,22982E-08	6,727758071	6,54471081	6,332091124	4,38213791	3,915810475	4,170090238	miscRNA ENST00000363382	

ID	SM295_estr/SM295_ ctrl logFC	SM295_estr/SM295_ ctrl adj.P.Val	ST 212 SM295 D6 R1.CEL	ST 212 SM295 D6 R2.CEL	ST265 SM295 D6 R3.CEL	ST 212 SM295 D6 + 24h ER R1.CEL	ST 212 SM295 D6 + 24h ER R2.CEL	ST265 SM295 D6 +24h ER R3.CEL	symbol	description
16796202	-2,385619333	1,32877E-05	6,241505696	6,145757867	6,39910098	3,936897211	3,599796513	4,092812822	MIR4506	
16796175	-2,43752993	9,84703E-12	9,751002084	9,823774612	9,767743017	7,578680676	7,276884549	7,174364698	ASB2	ankyrin repeat and SOCS box-containing 2
17072093	-2,452542125	3,05165E-12	10,15248821	10,22930245	10,220073005	7,865997055	7,820501862	7,538395417	ENST00000366457	
16769945	-2,452968034	2,79276E-12	7,658255351	7,455443808	7,55747867	5,086374917	5,24313227	4,98276654	FAM222A-AS1	
16927869	-2,502567489	4,1281E-10	8,647075111	8,586193118	8,551545389	6,165084716	5,946129981	6,165896454	IGLC7	immunoglobulin lambda constant 7
16874546	-2,557898298	6,64276E-07	8,128846813	8,67537968	9,022553819	5,803517953	5,927754032	6,421813433	NAPSA	napsin A aspartic peptidase
16841852	-2,559319916	8,06553E-14	11,15260728	11,20859759	11,13049495	8,804924755	8,572640695	8,436174617	PLD6	phospholipase D family, member 6
16854137	-2,570564216	5,15897E-08	8,273693694	8,148612456	8,253153635	6,188498092	5,153688693	5,621580352	lincRNA-POTEC-6	// LOC644669
16789573	-2,597279848	1,77387E-12	9,082024764	9,012115772	9,297742581	6,448858076	6,650417404	6,500768095	PLD4	phospholipase D family, member 4
16797583	-2,619132112	4,52022E-07	8,562906381	8,178786073	8,461240292	5,798334792	6,200702494	5,346499124	IGHA1 // IGHG1 // IGHV3-64	immunoglobulin heavy constant alpha 1 // immunoglobulin heavy constant gamma 1 (G1m marker) // immunoglobulin heavy variable 3-64
16797358	-2,735482205	4,66852E-12	10,85105466	10,85876209	10,7749386	8,236588325	7,948402762	8,093317644	IGHG2	immunoglobulin heavy constant gamma 2 (G2m marker)
16921478	-2,742494382	7,06081E-08	7,67490392	7,50040671	7,43976647	4,376450837	5,173081708	4,838061409	ANKRD30BP2	ankyrin repeat domain 30B pseudogene 2
17118329	-2,764653091	1,03838E-13	10,48933901	10,46655586	10,45745181	7,866367639	7,620368346	7,632651424	LOC100506966	hypothetical LOC100506966
16927858	-2,770226428	8,98775E-12	12,22358362	12,30979824	12,26250603	9,474545076	9,467902709	9,542760812	IGLV1-44 // IGLC3 // IGLC2	immunoglobulin lambda variable 1-44 // immunoglobulin lambda light chain-like // immunoglobulin lambda constant 3 (Kern-Oz+ marker) // immunoglobulin lambda constant 2 (Kern-Oz- marker) // LOC100290481
16927853	-2,780368323	6,4733E-11	12,30334919	12,27622578	12,40033048	9,340877331	9,539106692	9,758816465	IGLC2	immunoglobulin lambda constant 2 (Kern-Oz- marker)
16784041	-2,866467397	3,1253E-09	10,48518165	10,24641478	10,15073634	7,902273287	7,377958859	7,002698433	ABHD12B	abhydrolase domain containing 12B
16976798	-3,018009129	3,33584E-12	10,15881139	10,33423794	10,29735382	7,157340015	7,203409595	7,375626163	RASSF6	Ras association (RaGDS/AF-6) domain family member 6
16927844	-3,036002672	6,6855E-12	11,84876602	11,81667711	11,86315059	8,853753662	8,678927778	8,887904264	IGLL5 // IGLJ1	immunoglobulin lambda-like polypeptide 5 // immunoglobulin lambda joining 1
17072159	-3,073333489	8,63901E-13	9,485621635	9,517971196	9,397218318	6,606934535	6,35603287	6,217843277	lincRNA ENST00000520544	
16854132	-3,092232051	1,43647E-09	7,091867447	7,060661588	7,243849713	4,004414316	4,421722751	3,693545529	lincRNA-POTEC-3	
16672946	-3,150897131	1,08188E-16	10,1966605	10,11638543	10,15432835	7,065563329	6,948926822	7,000192732	FCRLA	Fc receptor-like A
17097653	-3,165208067	4,31133E-09	9,407893827	9,713526077	9,419486692	6,612656331	6,39746169	6,035164373	TNFSF8	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 8
16933049	-3,236097291	2,61168E-14	9,834404834	10,01312834	10,09850667	6,593826465	6,630522299	7,013399211	VPREB3	pre-B lymphocyte 3
16874533	-3,285142697	8,44066E-13	9,909892651	9,963694765	9,999395198	6,895946575	6,242900347	6,878707602	NAPSB	napsin B aspartic peptidase pseudogene
16927850	-3,373732681	4,2782E-10	10,54353077	10,86013968	10,84616451	7,218527991	7,611965985	7,298142938	IGLJ2	immunoglobulin lambda joining 2
16693844	-3,629228785	2,69953E-14	10,3971982	10,36216866	10,25296915	6,855988927	6,611567046	6,657093686	KCNN3	potassium intermediate/small conductance calcium-activated channel, subfamily N, member 3
16996813	-3,722169941	7,18698E-13	10,20517268	10,29859107	10,44288322	6,336220469	6,854949777	6,588966908	CD180	CD180 molecule

Legende:

ID: Affymetrix ID des *GeneChip® Human Gene 2.0 ST Arrays*

SM295_estr/SM295_ctrl logFC: logarithmische Werte der x-fachen Veränderung der Genexpression in SM295-Zellen nach Aktivierung von EBNA2 mit Östrogen.

Bsp.: LogFC=3 bedeutet, dass das jeweilige Gen 8-fach aktiviert ist.

SM295_estr/SM295_ctrl adj.P.Val: p-Wert des limma t-Tests.

ST212 SM295 D6 R1.CEL: logarithmische RMA-Werte. ST212 = Versuchsnummer Sybille Thumann; SM295 D6 = genaue Bezeichnung der untersuchten Zelllinie;

R1 = Replikat 1; CEL = Dateiformat

symbol: Gensymbol

description: Beschreibung des Gens

Tabelle 13: 132 mindestens 2-fach signifikant EBNA2-regulierte Zielgene in CBF1-neg. Zellen

ID	SM296_estr/SM296_ ctrl logFC	SM296_estr/SM296_ ctrl adj.P.Val	ST224 SM296 D3 R1.CEL	ST 241 SM296 D3 R2.CEL	ST 265 SM296 D3 R3.CEL	ST224 SM296 D3 +24h ER R1.CEL	ST 241 SM296 D3 +24h ER R2.CEL	ST 265 SM296 D3 +24h ER R3.CEL	symbol	description
16947715	3,489035254	4,64482E-11	5,469204318	5,811431604	5,153989247	8,679378655	9,23136056	8,990991716	SERPINI1	serpin peptidase inhibitor, clade I (neuroserpin), member 1
16779667	3,419884209	7,15439E-12	6,994872519	7,060012539	6,860518813	10,19095279	10,63771389	10,34638981	PCDH9	protocadherin 9
17050350	3,316580109	4,46666E-10	5,340978872	5,660317832	5,609609087	8,64924358	8,923238931	8,988163609	LRRN3	leucine rich repeat neuronal 3
16761350	3,169506218	7,15439E-12	6,378592658	6,23697031	6,040464521	9,307108651	9,314134275	9,543303217	KLRC3	killer cell lectin-like receptor subfamily C, member 3
16675301	3,140909651	4,46666E-10	5,315467361	5,463396767	5,173465655	8,153615228	8,630564124	8,590879384	RGS1	regulator of G-protein signaling 1
17009289	2,812270749	1,74661E-13	6,338026542	6,660032862	6,457790608	9,269292364	9,31609443	9,307275464	RUNX2	runt-related transcription factor 2
16907904	2,44997815	4,61517E-07	5,007883856	4,557252121	4,329487994	7,028893038	7,377091526	6,838573856		
16907912	2,258857159	4,6307E-10	8,461440216	8,406262514	8,25470741	10,51001281	10,69935302	10,68961579	IKZF2	IKAROS family zinc finger 2 (Helios)
16972053	2,218646989	1,68539E-09	8,031652544	7,658397862	7,504901981	10,02529416	10,04198651	9,783612688		
16919531	2,187609575	7,45255E-10	6,611100364	6,538362479	6,445475684	8,606400081	8,969680238	8,581686934	WFDC5	WAP four-disulfide core domain 5
16761201	2,167889854	3,66478E-08	4,642800956	5,25271042	4,702081974	6,978546042	7,20911699	6,91359988	CD69	CD69 molecule
16780592	2,096801604	2,64552E-10	4,973661453	5,176151406	4,841068201	7,083312194	7,336738226	6,861235451	GPR183	G protein-coupled receptor 183
17117874	2,070601833	4,43403E-09	6,027982602	5,723624271	5,571842941	7,712096519	8,035046783	7,788112012	LOC100507307	hypothetical LOC100507307
16886961	2,064079899	1,66273E-08	5,318228623	5,198924465	5,378875785	7,258378843	7,46982065	7,360069076	SLC4A10	solute carrier family 4, sodium bicarbonate transporter, member 10
16748358	2,047664366	9,25061E-10	8,40764738	8,593718824	8,568920802	10,55740928	10,5704209	10,58544992		
16981631	1,843050512	7,49698E-05	7,550516398	8,560777253	8,05621999	9,599646202	10,17440711	9,922611865	GLRA3	glycine receptor, alpha 3
16701110	1,716239905	3,49263E-08	7,338751788	7,25730785	7,123620921	9,187846509	8,846798719	8,833755045	MAP1LC3C	microtubule-associated protein 1 light chain 3 gamma
16797599	1,674777712	9,95072E-07	6,392421794	6,427801806	6,31419587	7,854517156	8,259683418	8,044552031	IGHV3-72	immunoglobulin heavy variable 3-72
16748361	1,638361079	1,14676E-05	8,486391495	8,295881064	8,239068878	10,0146318	9,923645624	9,998147256		
16697647	1,60864547	1,27248E-06	7,204148572	7,149915564	7,082831877	8,75140368	8,714289747	8,797138998		
16714618	1,582193786	1,08025E-06	6,09282442	5,942055012	5,81282425	7,443504067	7,805234809	7,754546162	ANK3	ankyrin 3, node of Ranvier (ankyrin G)
17102538	1,578077992	0,000587189	5,576572188	6,152331877	6,327672758	7,04356947	7,85914255	7,888098781	CYBB	cytochrome b-245, beta polypeptide
16854602	1,575926708	6,68148E-05	5,632224896	5,672506128	5,706531505	6,650891282	8,040015552	7,048135818	KLHL14	kelch-like 14 (Drosophila)
16661856	1,550451043	2,67297E-05	5,82967424	5,617601797	5,537362577	7,581042166	6,98056778	7,074381796	LOC284551	hypothetical LOC284551
16900148	1,549429444	1,14676E-05	5,057925967	5,382221383	4,591513263	6,572591794	6,75971379	6,347643361	IGKV2-24	immunoglobulin kappa variable 2-24
17105082	1,504002332	7,56718E-07	8,265065431	8,406784075	8,532501476	9,560820011	10,04561673	10,10992123	GPR174	G protein-coupled receptor 174
16949537	1,498047705	8,95679E-08	9,441116323	9,384567303	9,36696208	10,7856613	10,95495324	10,94617428	TP63	tumor protein p63
16999321	1,471630353	7,03933E-07	6,265512314	6,663357794	6,623893431	7,651761392	8,208062048	8,107831158	ZNF608	zinc finger protein 608
17008092	1,444527571	1,11506E-05	8,681732244	8,578958145	8,303522929	9,966788477	9,946848856	9,984158697	PIM1	pim-1 oncogene
16705199	1,440174619	3,36083E-08	8,787732629	8,642643043	8,600957979	10,20872703	10,16677944	9,976351039	ARID5B	AT rich interactive domain 5B (MRF1-like)
17094814	1,421604401	1,92908E-08	6,947109386	7,104486439	6,946388266	8,108230899	8,594743598	8,559822797	TMEM2	transmembrane protein 2
16961101	1,390490627	3,59878E-06	5,001365518	5,462650009	5,162651943	6,331542247	6,82860787	6,637989232		
17021596	1,367821923	3,53538E-07	7,626142556	7,296429555	7,304017729	8,7885117	8,632532082	8,909012229	RRAGD	Ras-related GTP binding D
16971019	1,310912726	2,57217E-07	9,046836987	9,063367493	8,888531107	10,33109123	10,36751205	10,23287048	GAB1	GRB2-associated binding protein 1
17083729	1,293938395	0,000268455	5,867969975	6,234232224	6,286156914	7,043188861	7,534864535	7,692120904		
16988632	1,289971073	0,006107711	5,072385399	4,594990507	4,860723613	5,563172885	6,370891224	6,463948629		
16729472	1,274232898	0,001668112	6,928085495	6,101320003	6,095726916	8,019557957	7,685288005	7,242985144	THRSP	thyroid hormone responsive
16900144	1,252921806	8,55501E-05	7,146381572	7,0888366	6,844787299	8,208282392	8,430691298	8,1997972	IGKV6-21	immunoglobulin kappa variable 6-21 (non-functional)
16741130	1,237310615	0,000137356	9,201857331	9,438610731	9,511352406	10,57493142	10,62107877	10,66774213	ACY3	aspartoacylase (aminocyclase) 3
16981652	1,237005462	0,004717167	2,336336223	2,850865551	2,35166404	3,006751171	4,483712447	3,759418583		
16976558	1,220856097	0,000149254	6,035828184	6,101492753	5,78975384	6,779880855	7,52532072	7,284441492		
17023810	1,193393244	0,002457314	7,282665206	7,805710316	7,643554173	8,749497332	8,809296639	8,753315757	SGK1	serum/glucocorticoid regulated kinase 1
16975592	1,180649766	0,000284593	9,560983017	8,996567876	8,946848982	10,32449556	10,47659861	10,245255	GABRG1	gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, gamma 1

ID	SM296_estr/SM296_ ctrl logFC	SM296_estr/SM296_ ctrl adj.P.Val	ST224 SM296 D3 R1.CEL	ST 241 SM296 D3 R2.CEL	ST 265 SM296 D3 R3.CEL	ST224 SM296 D3 +24h ER R1.CEL	ST 241 SM296 D3 +24h ER R2.CEL	ST 265 SM296 D3 +24h ER R3.CEL	symbol	description
16715170	1,174100804	7,03933E-07	7,616365372	7,725244326	7,602588564	8,992998937	8,757072219	8,716429519	PRF1	perforin 1 (pore forming protein)
16906175	1,150961877	0,018068008	3,869239482	3,948311121	3,854371402	4,566929599	5,571845171	4,986032866	FRZB	frizzled-related protein
17074465	1,139029976	0,000645161	5,727566461	5,790228948	5,069353035	6,57465384	6,82360294	6,605981594		
17122310	1,132746393	0,001936691	5,916720796	6,089790009	6,120706657	6,888412721	7,609142857	7,027901064		
16661832	1,121885622	0,000341725	8,257427903	7,989647943	8,127053477	9,551681124	8,932198132	9,255906934	SERINC2	serine incorporator 2
16837362	1,113383151	0,002401082	5,672783858	6,108312938	5,912771847	6,558958831	7,423143867	7,051915398		
16792798	1,092300756	4,46666E-10	8,90402074	8,82371679	8,839365837	9,92404613	9,968014681	9,951944826	SAV1	salvador homolog 1 (Drosophila)
16761326	1,087573079	1,92908E-08	8,25564098	8,381535697	8,377131469	9,553134324	9,384037107	9,339855953	KLRK1 // KLRG4	killer cell lectin-like receptor subfamily K, member 1 // killer cell lectin-like receptor subfamily C, member 4
16697654	1,078578721	0,002165377	6,937282394	6,929430209	7,055695164	7,846548845	8,026752997	8,284842087	LOC100131234	familial acute myelogenous leukemia related factor
17012598	1,075505496	7,93384E-06	8,813231145	8,817530514	8,738058905	9,907330168	9,767605529	9,920401356	ENPP3	ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 3
16936761	1,070127883	0,001990937	5,02550508	5,054139115	4,950586417	5,59534678	6,250268603	6,394998878	CHL1	cell adhesion molecule with homology to L1CAM (close homolog of L1)
16697660	1,049398941	0,015611173	6,69357922	6,669469673	6,366293393	7,650810174	7,315826924	7,910902011	MIR181B1	microRNA 181b-1
16967557	1,040244458	3,30432E-06	8,653048321	8,969909096	8,85136453	9,818967273	9,876364038	9,89972401	UTP3	UTP3, small subunit (SSU) processome component, homolog (S. cerevisiae)
16818440	1,038653143	0,042585537	4,379627605	3,550463757	3,613450465	4,843027855	5,237758429	4,578714973		
17122308	1,019647318	0,021747777	5,744298007	5,852060568	5,705298792	6,487834659	7,041802581	6,830962082		
17006659	-1,00353886	8,9947E-05	8,998380299	9,523697591	9,142934262	8,254910998	8,209865814	8,189618758	TNF	tumor necrosis factor
16819685	-1,007237216	4,44979E-07	7,771453822	7,956488895	7,665136447	6,814359795	6,701745062	6,855262661		
16744967	-1,007746679	0,00067656	8,09654967	7,770370984	7,608800905	7,127785432	6,76384674	6,560849349	AMICA1	adhesion molecule, interacts with CXADR antigen 1
16674289	-1,011700725	0,000366801	5,536715024	5,610682586	5,625125973	4,596955456	4,630224895	4,510241058		
16927869	-1,01355195	0,000609561	7,010634537	7,784389869	7,580573745	6,133676203	6,674641707	6,526624391	IGLC7	immunoglobulin lambda constant 7
17026267	-1,020516309	0,00014423	8,905376416	9,417644906	9,095161182	8,158312172	8,121398184	8,07692322		
16927853	-1,037029425	0,000353188	10,63033949	11,241026117	11,34071972	9,715091868	10,133392	10,25251323	IGLC2	immunoglobulin lambda constant 2 (Kern-Oz- marker)
17007257	-1,040193544	2,08543E-08	12,28989645	12,40055393	12,41239959	11,20752377	11,29759139	11,47715419	HLA-DRA	major histocompatibility complex, class II, DR alpha
17071579	-1,049192616	1,8199E-05	7,725707613	7,554810624	7,551709914	6,741679869	6,608035371	6,334935063		
16807324	-1,056397352	1,92908E-08	8,344850005	8,486314843	8,400372838	7,431758552	7,321337158	7,309249921	BMF	Bcl2 modifying factor
16763470	-1,064748474	0,005282235	7,95399472	7,671134984	7,438204387	6,69568639	6,848512574	6,324889706		
16656039	-1,071698094	0,042403989	5,107907371	5,713362934	5,06172975	4,885475791	4,374528239	3,407901743		
17058719	-1,072961076	6,58925E-08	10,59856592	10,41907742	10,49660949	9,515920063	9,435170404	9,344279139	NCF1C // NCF1	neutrophil cytosolic factor 1C pseudogene // neutrophil cytosolic factor 1
16669105	-1,081257437	0,002067188	7,759214639	7,442999925	7,491798776	6,497579529	6,240328457	6,712333043	C1orf161	chromosome 1 open reading frame 161
16674285	-1,083851117	0,000163676	7,115747236	7,177423301	7,158404134	6,102578672	5,975632215	6,121810435		
17125782	-1,085532797	3,52412E-05	8,611343086	8,856662107	8,908753729	7,568966598	7,784184354	7,767009579		
16747623	-1,08805713	1,24757E-08	10,87721146	11,12889471	11,07952921	10,06219362	9,880785284	9,878485076	PTPN6	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 6
16944618	-1,09799677	0,000207883	9,85779103	9,722459962	9,704162284	8,841393735	8,635049081	8,513980149	CD86	CD86 molecule
16781999	-1,113841762	0,001679233	7,720302829	7,934041339	7,872621857	6,40927258	6,94759447	6,82857369		
16949467	-1,11997192	5,27611E-07	7,99475048	7,992844242	7,817344413	6,874091738	6,920959696	6,649971941	LPP	LIM domain containing preferred translocation partner in lipoma
17072601	-1,12259737	6,81568E-08	8,758448505	9,078565386	8,930937238	7,684003799	7,915581942	7,800573278	TRIB1	tribbles homolog 1 (Drosophila)
16927858	-1,133270565	2,12151E-05	10,71338679	11,28122511	11,34694109	9,639556957	10,16224953	10,1399348	IGLV1-44 // LOC100290481 // IGLC3 // IGLC2	immunoglobulin lambda variable 1-44 // immunoglobulin lambda light chain-like // immunoglobulin lambda constant 3 (Kern-Oz+ marker) // immunoglobulin lambda constant 2 (Kern-Oz- marker)
16940260	-1,134618885	2,84525E-06	10,06477899	9,936686816	9,854913093	9,055182411	8,678004577	8,719335258	NBEAL2	neurobeachin-like 2
16796175	-1,148049872	3,63667E-06	9,524955223	9,471675578	9,383341123	8,579074895	8,12976261	8,226984803	ASB2	ankyrin repeat and SOCS box-containing 2
16927844	-1,154973333	4,35545E-05	10,4157922	11,11996273	11,1674124	9,517274845	9,836476823	9,884495667	IGLL5 // IGLJ1	immunoglobulin lambda-like polypeptide 5 // immunoglobulin lambda joining 1
16975007	-1,171143232	1,4981E-06	8,856014033	8,89732789	8,870351148	7,473632423	7,711335104	7,925295849		
16684310	-1,177832014	6,68821E-10	11,48768363	11,81146985	11,6944995	10,47684359	10,47224507	10,51106827	LAPTM5	lysosomal protein transmembrane 5
16896170	-1,178220837	0,00011968	5,959887902	6,10294299	5,897386802	4,754773946	4,891646132	4,779135104	CAPN14	calpain 14

ID	SM296_estr/SM296_ ctrl logFC	SM296_estr/SM296_ ctrl adj.P.Val	ST224 SM296 D3 R1.CEL	ST 241 SM296 D3 R2.CEL	ST 265 SM296 D3 R3.CEL	ST224 SM296 D3 +24h ER R1.CEL	ST 241 SM296 D3 +24h ER R2.CEL	ST 265 SM296 D3 +24h ER R3.CEL	symbol	description
17125376	-1,186204814	0,007386373	6,062881829	6,653635859	6,608684936	4,902671672	5,553419758	5,310496754		
17004518	-1,190926923	2,56091E-05	8,766613894	9,08840592	9,123002954	7,563209146	7,867479679	7,974553175	LY86	lymphocyte antigen 86
16829690	-1,196952016	2,91453E-05	7,920489526	8,112863878	8,022052718	6,972288474	6,737554409	6,754707192	RAP1GAP2	RAP1 GTPase activating protein 2
16765226	-1,197289154	1,66273E-08	9,504432626	9,557743794	9,568076589	8,404442545	8,306919969	8,327023035	ITGB7	integrin, beta 7
17032405	-1,206816271	0,015611173	5,742029757	5,678265867	5,813208159	4,068316283	5,023368185	4,521370503		
16650011	-1,219799673	0,018825447	4,717243325	5,042394271	3,622871225	2,83339026	3,481408386	3,408311155		
17075804	-1,228142826	0,000628399	10,34466594	9,72771526	9,683513733	9,006185374	8,527853648	8,537427434	C8orf80	chromosome 8 open reading frame 80
16885625	-1,230240836	1,51209E-05	10,12033956	10,09518652	10,05715757	8,859231583	8,777897059	8,944832501	LOC100216479	hypothetical LOC100216479
16976798	-1,235749007	9,3987E-06	11,15982723	10,76909136	10,67749103	9,729389863	9,498500506	9,671272223	RASSF6	Ras association (RalGDS/AF-6) domain family member 6
16921478	-1,252701408	0,0068304	6,714704135	7,310698868	7,14549941	5,417109223	5,968103385	6,027585581	ANKRD30BP2	ankyrin repeat domain 30B pseudogene 2
17121902	-1,26641444	8,54408E-05	6,436367955	6,863991572	6,668458055	5,108546708	5,581018275	5,480009279		
17122532	-1,288505325	5,36119E-05	9,041742263	9,155242156	9,006131345	7,795479711	7,93472273	7,607397349		
16669796	-1,289061694	0,000188369	9,756942681	9,719042655	9,720624272	8,506826314	8,353226965	8,469371247	TXNIP	thioredoxin interacting protein
16945682	-1,299603659	1,92908E-08	8,404205962	8,478485095	8,503184189	7,23277736	7,114569215	7,139717694	ACPP	acid phosphatase, prostate
16962608	-1,315114586	1,47399E-06	8,862578574	8,627576196	8,77817574	7,293327156	7,697947016	7,33171258		
17110670	-1,318256798	8,24577E-05	10,61574552	10,41752054	10,31673515	9,257488825	9,030421962	9,107320028	PIM2	pim-2 oncogene
17075478	-1,32577476	1,29781E-08	9,259125502	8,908350764	8,907351427	7,68852534	7,647370745	7,688099179	LOXL2	lysyl oxidase-like 2
16902809	-1,355123819	2,57217E-07	9,592945295	9,711857346	9,590292739	8,306939449	8,350959064	8,171825412	LOC100216479	hypothetical LOC100216479
16935502	-1,361254993	4,5407E-07	9,186021388	8,982315487	8,974390232	7,924858709	7,697011886	7,437091532		
17118411	-1,363518842	0,000738231	8,026920509	8,079825359	7,934247736	6,426637784	6,811034723	6,712764572		
17118415	-1,363518842	0,000738231	8,026920509	8,079825359	7,934247736	6,426637784	6,811034723	6,712764572	LOC100292922	ankyrin repeat domain-containing protein 30B-like
17124426	-1,379718071	0,001628605	7,418822695	7,548866773	7,27182482	5,94082431	6,045171876	6,114363891		
16854132	-1,391733287	0,000499867	5,88430796	6,697022608	6,092178722	4,476225269	4,75346394	5,26862022		
16657373	-1,391767009	0,014282124	4,483178637	4,128048574	3,401498019	2,74255199	2,715135589	2,379736625		
16933049	-1,412124991	2,35502E-08	9,922371155	9,987363992	9,90355767	8,588105923	8,523760642	8,46505128	VPREB3	pre-B lymphocyte 3
16782058	-1,415605458	0,00015387	7,11837372	7,892177659	7,424021628	6,091835015	5,779854188	6,316067429		
16874546	-1,438600727	0,004561666	7,744241016	8,699702995	8,593337217	6,881826051	7,178111613	6,661541383	NAPSA	napsin A aspartic peptidase
16769770	-1,454355688	1,80017E-06	8,788879794	8,886549233	8,932398803	7,246990134	7,255523822	7,742246812	SELPLG	selectin P ligand
17013079	-1,463452333	2,92076E-05	8,897476185	8,937602776	8,758925412	7,381264995	7,384342231	7,438040146		
16799277	-1,471818806	0,000402349	8,868837039	8,499218768	8,690811239	6,997026241	7,434685902	7,211698486		
16902945	-1,592049363	1,28645E-06	9,123310305	8,827082327	8,630377904	7,420414936	7,221054778	7,163152733	NCKAP5	NCK-associated protein 5
16716124	-1,601778312	0,000413392	10,07339014	9,496877916	9,470716186	8,392701388	7,793627897	8,049320019		
16796202	-1,654473929	0,005817498	6,250961709	6,167345283	5,916097423	4,687372518	4,677477216	4,006132895		
16796286	-1,660807382	1,4113E-05	7,464077006	8,109748602	8,054743604	6,093555335	6,075784599	6,476807133	SERPINA9	serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 9
16890817	-1,707311162	8,51668E-05	6,031252523	6,812795234	6,716889715	4,967144134	4,986883084	4,484976768		
16781827	-1,713224688	5,25609E-08	8,099295393	8,53366592	8,412682592	6,506486896	6,774100558	6,625382387		
16815828	-1,735719254	2,72349E-09	9,067009509	9,389740128	9,288786255	7,570796333	7,577662607	7,38991919	CIITA	class II, major histocompatibility complex, transactivator
16731754	-1,878708219	4,46666E-10	9,866526009	9,923605484	10,0246008	8,014417488	8,035139985	8,129050165	IL10RA	interleukin 10 receptor, alpha
16840245	-2,059971291	4,64482E-11	11,03704144	11,25415326	11,07098793	8,949244039	9,217913576	9,015111144	C17orf87	chromosome 17 open reading frame 87
16738701	-2,14519987	3,37877E-10	9,611676648	9,808730113	9,722850762	7,465550418	7,649038027	7,593069466		
17121406	-2,252379106	1,57058E-10	7,876921136	7,949997609	7,799814073	5,667146417	5,657180945	5,545268137		
16996813	-2,253941267	1,12118E-08	11,15334565	11,54371464	11,44112743	8,766209494	9,357543364	9,252611063	CD180	CD180 molecule
16874533	-2,302745657	1,3955E-09	9,637663617	10,04499255	9,889318524	7,596362658	7,473584438	7,593790622	NAPSB	napsin B aspartic peptidase pseudogene
16693844	-2,497899771	4,64482E-11	10,65662595	10,4228873	10,41844983	8,361097401	7,875503989	7,767662383	KCNN3	potassium intermediate/small conductance calcium-activated channel, subfamily N, member 3
16988011	-2,570397671	3,48968E-08	7,008059316	7,150710366	6,990780827	4,524655992	4,659173858	4,254527644		
17072093	-2,604745031	1,6339E-11	10,15188898	9,92635143	9,887165521	7,606405618	7,356351013	7,188414207		

Legende:

ID: Affymetrix ID des *GeneChip® Human Gene 2.0 ST Arrays*

SM296_estr/SM296_ctrl logFC: logarithmische Werte der x-fachen Veränderung der Genexpression in SM296^{CBF1 neg.}-Zellen nach Aktivierung von EBNA2 mit Östrogen. Bsp.: LogFC=3 bedeutet, dass das jeweilige Gen 8-fach aktiviert ist.

SM296_estr/SM296_ctrl adj.P.Val: p-Wert des limma t-Tests.

ST224 SM296 D3 R1.CEL: logarithmische RMA-Werte. ST224 = Versuchsnummer Sybille Thumann; SM295 D6 = genaue Bezeichnung der untersuchten Zelllinie; R1 = Replik 1; CEL = Dateiformat

symbol: Gensymbol

description: Beschreibung des Gens

Tabelle 14: 21 mindestens 4-fach signifikant EBNA2-regulierte Zielgene in CBF1-neg. Zellen

ID	SM296_estr/SM296_ctrl logFC	SM296_estr/SM296_ctrl adj.P.Val	ST224 SM296 D3 R1.CEL	ST 241 SM296 D3 R2.CEL	ST 265 SM296 D3 R3.CEL	ST224 SM296 D3 +24h ER R1.CEL	ST 241 SM296 D3 +24h ER R2.CEL	ST 265 SM296 D3 +24h ER R3.CEL	symbol	description
16947715	3,489035254	4,64482E-11	5,469204318	5,811431604	5,153989247	8,679378655	9,23136056	8,990991716	SERPINI1	serpin peptidase inhibitor, clade I (neuroserpin), member 1
16779667	3,419884209	7,15439E-12	6,994872519	7,060012539	6,860518813	10,19095279	10,63771389	10,34638981	PCDH9	protocadherin 9
17050350	3,316580109	4,46666E-10	5,340978872	5,660317832	5,609609087	8,64924358	8,923238931	8,988163609	LRRN3	leucine rich repeat neuronal 3
16761350	3,169506218	7,15439E-12	6,378592658	6,23697031	6,040464521	9,307108651	9,314134275	9,543303217	KLRC3	killer cell lectin-like receptor subfamily C, member 3
16675301	3,140909651	4,46666E-10	5,315467361	5,463396767	5,173465655	8,153615228	8,630564124	8,590879384	RGS1	regulator of G-protein signaling 1
17009289	2,812270749	1,74661E-13	6,338026542	6,660032862	6,457790608	9,269292364	9,31609443	9,307275464	RUNX2	runt-related transcription factor 2
16907904	2,44997815	4,61517E-07	5,007883856	4,557252121	4,329487994	7,028893038	7,377091526	6,838573856	ENST00000415387	
16907912	2,258857159	4,6307E-10	8,461440216	8,406262514	8,25470741	10,51001281	10,69935302	10,68961579	IKZF2	IKAROS family zinc finger 2 (Helios)
16972053	2,218646989	1,68539E-09	8,031652544	7,658397862	7,504901981	10,02529416	10,04198651	9,783612688	ENST00000508189	antisense transcript FSTL5
16919531	2,187609575	7,45255E-10	6,611100364	6,538362479	6,445475684	8,606400081	8,969680238	8,581686934	WFDC5	WAP four-disulfide core domain 5
16761201	2,167889854	3,66478E-08	4,642800956	5,25271042	4,702081974	6,978546042	7,20911699	6,91359988	CD69	CD69 molecule
16780592	2,096801604	2,64552E-10	4,973661453	5,176151406	4,841068201	7,083312194	7,336738226	6,861235451	GPR183	G protein-coupled receptor 183
17117874	2,070601833	4,43403E-09	6,027982602	5,723624271	5,571842941	7,712096519	8,035046783	7,788112012	LOC100507307	hypothetical LOC100507307
16886961	2,064079899	1,66273E-08	5,318228623	5,198924465	5,378875785	7,258378843	7,46982065	7,360069076	SLC4A10	solute carrier family 4, sodium bicarbonate transporter, member 10
16748358	2,047664366	9,25061E-10	8,40764738	8,593718824	8,568920802	10,55740928	10,5704209	10,58544992	lincRNA-PRH2-3	
16840245	-2,059971291	4,64482E-11	11,03704144	11,25415326	11,07098793	8,949244039	9,217913576	9,015111144	C17orf87	chromosome 17 open reading frame 87
16738701	-2,14519987	3,37877E-10	9,611676648	9,808730113	9,722850762	7,465550418	7,649038027	7,593069466	lincRNA ENST00000399003	
16996813	-2,253941267	1,12118E-08	11,15334565	11,54371464	11,44112743	8,766209494	9,357543364	9,252611063	CD180	CD180 molecule
16874533	-2,302745657	1,3955E-09	9,637663617	10,04499255	9,889318524	7,596362658	7,473584438	7,593790622	NAPSB	napsin B aspartic peptidase pseudogene
16693844	-2,497899771	4,64482E-11	10,65662595	10,4228873	10,41844983	8,361097401	7,875503989	7,767662383	KCNN3	potassium intermediate/small conductance calcium-activated channel, subfamily N, member 3
17072093	-2,604745031	1,6339E-11	10,15188898	9,92635143	9,887165521	7,606405618	7,356351013	7,188414207	ENST00000366457	

Legende:

ID: Affymetrix ID des *GeneChip® Human Gene 2.0 ST Arrays*

SM296_estr/SM296_ctrl logFC: logarithmische Werte der x-fachen Veränderung der Genexpression in SM296^{CBF1 neg.}-Zellen nach Aktivierung von EBNA2 mit Östrogen. Bsp.: LogFC=3 bedeutet, dass das jeweilige Gen 8-fach aktiviert ist.

SM296_estr/SM296_ctrl adj.P.Val: p-Wert des limma t-Tests.

ST224 SM296 D3 R1.CEL: logarithmische RMA-Werte. ST224 = Versuchsnummer Sybille Thumann; SM295 D6 = genaue Bezeichnung der untersuchten Zelllinie; R1 = Replikat 1; CEL = Dateiformat

symbol: Gensymbol

description: Beschreibung des Gens

Tabelle 15: Zielgene, die in SM295 und in SM296^{CBF1-neg.} oder nur in der CBF1-neg. Zelllinie SM296^{CBF1 neg.} durch EBNA2 aktiviert werden.

In orange hinterlegt sind alle Zielgene, die nur in SM296^{CBF1 neg.}-Zellen mindestens 2-fach durch EBNA2 aktiviert werden (siehe **Abbildung 14 A und B**).

ID	SM296_estr/SM296_ctrl logFC	SM296_estr/SM296_ctrl adj.P.Val	symbol
16947715	3,489035254	4,64482E-11	SERPINI1
16779667	3,419884209	7,15439E-12	PCDH9
17050350	3,316580109	4,46666E-10	LRRN3
16761350	3,169506218	7,15439E-12	KLRC3
16675301	3,140909651	4,46666E-10	RGS1
17009289	2,812270749	1,74661E-13	RUNX2
16907904	2,44997815	4,61517E-07	
16907912	2,258857159	4,6307E-10	IKZF2
16972053	2,218646989	1,68539E-09	
16919531	2,187609575	7,45255E-10	WFDC5
16761201	2,167889854	3,66478E-08	CD69
16780592	2,096801604	2,64552E-10	GPR183
17117874	2,070601833	4,43403E-09	LOC100507307
16886961	2,064079899	1,66273E-08	SLC4A10
16748358	2,047664366	9,25061E-10	
16981631	1,843050512	7,49698E-05	GLRA3
16701110	1,716239905	3,49263E-08	MAP1LC3C
16797599	1,674777712	9,95072E-07	IGHV3-72
16748361	1,638361079	1,14676E-05	
16697647	1,60864547	1,27248E-06	
16714618	1,582193786	1,08025E-06	ANK3
17102538	1,578077992	0,000587189	CYBB
16854602	1,575926708	6,68148E-05	KLHL14
16661856	1,550451043	2,67297E-05	LOC284551
16900148	1,549429444	1,14676E-05	IGKV2-24
17105082	1,504002332	7,56718E-07	GPR174
16949537	1,498047705	8,95679E-08	TP63
16999321	1,471630353	7,03933E-07	ZNF608
17008092	1,444527571	1,11506E-05	PIM1
16705199	1,440174619	3,36083E-08	ARID5B
17094814	1,421604401	1,92908E-08	TMEM2
16961101	1,390490627	3,59878E-06	
17021596	1,367821923	3,53538E-07	RRAGD
16971019	1,310912726	2,57217E-07	GAB1
17083729	1,293938395	0,000268455	
16988632	1,289971073	0,006107711	
16729472	1,274232898	0,001668112	THRSP
16900144	1,252921806	8,55501E-05	IGKV6-21
16741130	1,237310615	0,000137356	ACY3
16981652	1,237005462	0,004717167	
16976558	1,220856097	0,000149254	
17023810	1,193393244	0,002457314	SGK1
16975592	1,180649766	0,000284593	GABRG1
16715170	1,174100804	7,03933E-07	PRF1
16906175	1,150961877	0,018068008	FRZB
17074465	1,139029976	0,000645161	
17122310	1,132746393	0,001936691	
16661832	1,121885622	0,000341725	SERINC2
16837362	1,113383151	0,002401082	
16792798	1,092300756	4,46666E-10	SAV1
16761326	1,087573079	1,92908E-08	KLRC1 // KLRC4
16697654	1,078578721	0,002165377	LOC100131234
17012598	1,075505496	7,93384E-06	ENPP3
16936761	1,070127883	0,001990937	CHL1
16697660	1,049398941	0,015611173	MIR181B1
16967557	1,040244458	3,30432E-06	UTP3
16818440	1,038653143	0,042585537	
17122308	1,019647318	0,021747777	

Legende:

ID: Affymetrix ID des *GeneChip® Human Gene 2.0 ST Arrays*

SM296_estr/SM296_ctrl logFC:

logarithmische Werte der x-fachen Veränderung der Genexpression in SM296^{CBF1 neg.}-Zellen nach Aktivierung von EBNA2 mit Östrogen. Bsp.: LogFC=3 bedeutet, dass das jeweilige Gen 8-fach aktiviert ist.

SM296_estr/SM296_ctrl adj.P.Val: p-Wert des limma t-Tests.

symbol: Gensymbol

Tabelle 16: Zielgene, die in SM295 und in SM296^{CBF1-neg.} oder nur in der CBF1-neg. Zelllinie SM296^{CBF1-neg.} durch EBNA2 reprimiert werden.

In orange hinterlegt sind alle Zielgene, die nur in SM296^{CBF1-neg.}-Zellen mindestens 2-fach durch EBNA2 reprimiert werden (siehe **Abbildung 14 C und D**).

ID	SM296_estr/SM296_ctrl logFC	SM296_estr/SM296_ctrl adj.P.Val	symbol
17006659	-1,00353886	8,9947E-05	TNF
16819685	-1,007237216	4,44979E-07	
16744967	-1,007746679	0,00067656	AMICA1
16674289	-1,011700725	0,000366801	
16927869	-1,01355195	0,000609561	IGLC7
17026267	-1,020516309	0,00014423	
16927853	-1,037029425	0,000353188	IGLC2
17007257	-1,040193544	2,08543E-08	HLA-DRA
17071579	-1,049192616	1,8199E-05	
16807324	-1,056397352	1,92908E-08	BMF
16763470	-1,064748474	0,005282235	
16656039	-1,071698094	0,042403989	
17058719	-1,072961076	6,58925E-08	NCF1C // NCF1
16669105	-1,081257437	0,002067188	C1orf161
16674285	-1,083851117	0,000163676	
17125782	-1,085532797	3,52412E-05	
16747623	-1,08805713	1,24757E-08	PTPN6
16944618	-1,09799677	0,000207883	CD86
16781999	-1,113841762	0,001679233	
16949467	-1,11997192	5,27611E-07	LPP
17072601	-1,12259737	6,81568E-08	TRIB1
16927858	-1,133270565	2,12151E-05	IGLV1-44 // LOC100290481 //
16940260	-1,134618885	2,84525E-06	IGLC3 // IGLC2
16796175	-1,148049872	3,63667E-06	NBEAL2
16927844	-1,154973333	4,35545E-05	ASB2
16975007	-1,171143232	1,4981E-06	IGLL5 // IGLJ1
16684310	-1,177832014	6,68821E-10	LAPTM5
16896170	-1,178220837	0,00011968	CAPN14
17125376	-1,186204814	0,007386373	
17004518	-1,190926923	2,56091E-05	LY86
16829690	-1,196952016	2,91453E-05	RAP1GAP2
16765226	-1,197289154	1,66273E-08	ITGB7
17032405	-1,206816271	0,015611173	
16650011	-1,219799673	0,018825447	
17075804	-1,228142826	0,000628399	C8orf80
16885625	-1,230240836	1,51209E-05	LOC100216479
16976798	-1,235749007	9,3987E-06	RASSF6
16921478	-1,252701408	0,0068304	ANKRD30BP2
17121902	-1,26641444	8,54408E-05	
17122532	-1,288505325	5,36119E-05	
16669796	-1,289061694	0,000188369	TXNIP
16945682	-1,299603659	1,92908E-08	ACPP
16962608	-1,315114586	1,47399E-06	
17110670	-1,318256798	8,24577E-05	PIM2
17075478	-1,350277476	1,29781E-08	LOXL2
16902809	-1,355123819	2,57217E-07	LOC100216479
16935502	-1,361254993	4,5407E-07	
17118411	-1,363518842	0,000738231	
17118415	-1,363518842	0,000738231	LOC100292922
17124426	-1,379718071	0,001628605	
16854132	-1,391733287	0,000499867	
16657373	-1,391767009	0,014282124	
16933049	-1,412124991	2,35502E-08	VPREB3
16782058	-1,415605458	0,00015387	
16874546	-1,438600727	0,004561666	NAPSA
16769770	-1,454355688	1,80017E-06	SELPLG
17013079	-1,463452333	2,92076E-05	
16799277	-1,471818806	0,000402349	
16902945	-1,592049363	1,28645E-06	NCKAP5
16716124	-1,601778312	0,000413392	
16796202	-1,654473929	0,005817498	
16796286	-1,660807382	1,4113E-05	SERPINA9
16890817	-1,707311162	8,51668E-05	
16781827	-1,713224688	5,25609E-08	
16815828	-1,735719254	2,72349E-09	CIITA
16731754	-1,878708219	4,46666E-10	IL10RA
16840245	-2,059971291	4,64482E-11	C17orf87
16738701	-2,14519987	3,37877E-10	
17121406	-2,252379106	1,57058E-10	
16996813	-2,253941267	1,12118E-08	CD180
16874533	-2,302745657	1,3955E-09	NAPSB
16693844	-2,497899771	4,64482E-11	KCNN3
16988011	-2,570397671	3,48968E-08	
17072093	-2,604745031	1,6339E-11	

Legende:

ID: Affymetrix ID des *GeneChip® Human Gene 2.0 ST Arrays*

SM296_estr/SM296_ctrl logFC: logarithmische Werte der x-fachen Veränderung der Genexpression in SM296^{CBF1-neg.}-Zellen nach Aktivierung von EBNA2 mit Östrogen. Bsp.: LogFC=-2 bedeutet, dass das jeweilige Gen 4-fach reprimiert ist.

SM296_estr/SM296_ctrl adj.P.Val: p-Wert des limma t-Tests.

symbol: Gensymbol

Tabelle 17: mindestens 4-fach signifikant CBF1-regulierte Zielgene in DG75-Zellen.

ID	SM224.9_ctrl/DG75_ctrl logFC	SM224.9_ctrl/DG75_ctrl adj.P.Val	ST 212 DG75 R1.CEL	ST 212 DG75 R2.CEL	ST265 DG75 R3.CEL	ST224 SM224.9 R1.CEL	ST 241 SM224.9 R2.CEL	ST 265 SM224.9 R3.CEL	symbol	description
16865530	5,476194457	5,1227E-17	6,324313187	6,310823363	6,274006399	11,77870825	11,76176659	11,79725148	KIR3DL2 // KIR3DL1	killer cell immunoglobulin-like receptor, three domains, long cytoplasmic tail, 2 // killer cell immunoglobulin-like receptor, three domains, long cytoplasmic tail, 1
17111783	5,122163574	2,52027E-16	5,711865843	5,369096327	5,079822525	10,42708784	10,55073163	10,54945594	linc RNA ENST00000454131.1	
16826230	4,800281918	2,99716E-11	4,080659297	4,722834423	3,933022919	9,085051524	9,169941618	8,88236925	NETO2	neuropilin (NRP) and tolloid (TLL)-like 2
16679340	3,805785858	6,15526E-09	4,552912727	4,883372731	4,35246503	7,854675872	8,646647339	8,70478485	ENST00000413801.1	
16671874	3,591263044	3,75403E-13	5,780254744	5,893871348	5,953272072	9,445496163	9,44007047	9,515620662	SYT11	synaptotagmin XI
16779059	3,540990438	6,38301E-11	4,286634079	4,870722481	4,168749648	7,769307925	8,084501615	8,095267983	CAB39L	calcium binding protein 39-like
17065958	3,482685006	6,08114E-12	5,103139153	4,95231763	4,755498235	8,138939032	8,449949127	8,670121877	TUSC3	tumor suppressor candidate 3
16865470	3,440396366	6,98585E-12	6,314342769	6,23585566	6,139719516	9,47972858	9,645506472	9,885871993	KIR2DL3	killer cell immunoglobulin-like receptor, two domains, long cytoplasmic tail, 3
16691776	3,345498551	8,01514E-10	3,834488882	4,31231851	3,354285663	7,019526926	7,174779062	7,343282719	linc-FCGR1B-7	
16734877	3,250982307	2,3276E-13	6,953832611	6,552025298	7,081719259	10,18089455	9,99540254	10,164227	HBE1	hemoglobin, epsilon 1
16695121	3,220431518	8,84935E-11	6,485419299	6,29539569	6,378093775	9,436080504	9,747437727	9,636685086	AIM2	absent in melanoma 2
16942845	3,18161087	9,17174E-09	4,739151361	4,104121295	4,596012409	7,698315568	7,466090037	7,81971207	linc-CADM2-4	
16799277	3,167061978	6,54002E-09	4,62265326	5,353643757	5,077889894	8,109125162	8,044740308	8,401507375	ENST00000560709	
17020608	3,118520892	5,05712E-10	7,727069701	7,834843714	8,476165789	10,7949468	11,24257628	11,3561188	linc RNA ENST00000412872.3	location: chr6:68598594-68599231 (-)
16944647	3,090890066	1,0287E-10	5,775874611	5,249307011	5,899171528	9,020060406	8,66767767	8,509285273	CSTA	cystatin A (stefin A)
17002591	2,897553987	2,3276E-13	6,304297656	6,186292762	6,280767011	9,361192733	9,094307392	9,008519264	ENST00000519795	
17086048	2,895532453	1,70901E-09	6,301400309	5,740143637	6,002166486	8,673754263	9,117250767	8,93930276	GCNT1	glucosaminyl (N-acetyl) transferase 1, core 2
16865398	2,861399564	5,67101E-08	5,642535007	6,028931339	5,55639377	8,291521843	8,70496554	8,815571425	LILRB1	leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily B (with TM and ITIM domains), member 1
16981345	2,778744661	3,93346E-09	5,812632965	5,532390408	5,057214471	8,194624941	8,378136854	8,165710032	SH3RF1	SH3 domain containing ring finger 1
16784614	2,775056348	2,79981E-10	5,566729217	5,302324419	5,562631227	8,091342338	8,364070452	8,301441118	ENST00000555600	
16735938	2,765937299	2,06971E-10	5,772067848	5,836594146	5,657618829	8,295927339	8,640328122	8,62783726	LINC00958	
16660810	2,732156253	2,10402E-11	5,871804588	5,849564676	6,085635863	8,667184761	8,670993362	8,665295762	RCAN3	RCAN family member 3
16675312	2,681251719	2,56716E-05	8,308116305	7,223213527	6,72869273	9,844757043	10,20805842	10,25096226	RGS13	regulator of G-protein signaling 13
16784041	2,671153379	3,37886E-08	7,609771423	7,530176812	7,534980528	9,895422942	10,40126969	10,39169627	ABHD12B	abhydrolase domain containing 12B
17021738	2,598364376	1,89343E-11	7,886069753	7,744477068	7,526994895	10,45648465	10,22980134	10,26634886	BACH2	BTB and CNC homology 1, basic leucine zipper transcription factor 2
16837362	2,556394436	3,09477E-08	5,452269507	5,264925481	5,446496794	7,841125651	8,009873112	7,981876328	LINC01483	
17021437	2,509467517	4,54804E-07	4,627781963	4,790570302	4,501093731	7,403898214	7,012377631	7,031572703	CGA	glycoprotein hormones, alpha polypeptide
16892633	2,507759956	9,55406E-10	5,744685573	6,124473788	5,618029475	8,300806418	8,351558838	8,358103448	HEATR7B1	HEAT repeat containing 7B1
16865460	2,49902199	2,10402E-11	6,427717697	6,57150544	6,53344404	8,921030945	9,057207787	9,051494415	KIR3DL3	killer cell immunoglobulin-like receptor, three domains, long cytoplasmic tail, 3
16961616	2,481407637	6,89627E-10	5,453686827	5,954651366	5,616161693	8,150288745	8,22077356	8,097660493	TNFSF10	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10
17025738	2,471584398	1,87514E-11	6,085899774	6,090182048	5,971922816	8,284655666	8,594467596	8,683634569	LOC441178	hypothetical LOC441178
16764564	2,455597313	7,16495E-10	6,528602861	6,516912325	6,698174091	8,726456902	9,274539009	9,109485306	LIMA1	LIM domain and actin binding 1
17103717	2,442870491	1,10134E-10	5,016913792	5,647878083	5,329457903	7,67595808	7,922860712	7,724042457	CLCN5	chloride channel 5
16808696	2,423939937	2,71197E-07	6,521051763	6,449321035	6,482642319	8,801866893	8,769444975	9,153523061	SLC30A4	solute carrier family 30 (zinc transporter), member 4
16976891	2,3552164	5,84266E-09	4,185778702	4,185566346	4,764709999	6,719704688	6,5020529	6,97994666	linc RNA ENST00000561705.1	
16996112	2,335692206	1,00831E-08	5,267054908	5,206700387	5,322706903	7,324688242	7,829235126	7,649615448	linc-MOCS2-2	
17015152	2,325394812	1,0552E-08	5,467038671	6,117610971	6,204953541	8,429860472	8,088047968	8,247879178	linc RNA ENST00000435043.2	
16787994	2,267425207	6,31285E-08	7,372365556	6,867599442	6,896144192	9,617689003	9,025095162	9,295600645	TCL1B // TCL6	T-cell leukemia/lymphoma 1B // T-cell leukemia/lymphoma 6 (non-protein coding)
16712373	2,208367219	7,07563E-11	5,324489669	5,875047348	5,843807093	7,776079428	7,906568688	7,98579765	NEBL	nebullette
16837348	2,193866607	7,34584E-09	6,549828047	6,42425939	6,44342779	8,300214217	8,991539244	8,707361586	MAP2K6	mitogen-activated protein kinase kinase 6
16669501	2,156926944	4,65944E-05	2,400822717	2,224521105	2,575791098	3,798959895	5,158264305	4,71469155	LOC51152	melanoma antigen
16847095	2,127190661	4,9571E-10	6,314963045	6,148719601	6,179333444	8,309268187	8,352526346	8,362793538	RNF43	ring finger protein 43
17011708	2,124024873	9,36197E-11	6,187041011	5,974054061	6,154657315	8,27564778	8,252591115	8,159588113	SLC16A10	solute carrier family 16, member 10 (aromatic amino acid transporter)
16894848	2,021324347	1,03416E-10	4,314531209	4,173343028	4,259137803	6,214075782	6,288910615	6,307998683	WDR35	WD repeat domain 35
16828617	2,014423151	4,27588E-10	5,889737499	5,832173108	5,75397124	7,902866527	7,644943314	7,971341457	linc RNA ENST00000562231.1	

ID	SM224.9_ctrl/DG75_ctrl logFC	SM224.9_ctrl/DG75_ctrl adj.P.Val	ST 212 DG75 R1.CEL	ST 212 DG75 R2.CEL	ST265 DG75 R3.CEL	ST224 SM224.9 R1.CEL	ST 241 SM224.9 R2.CEL	ST 265 SM224.9 R3.CEL	symbol	description
17047138	2,008279899	1,79553E-08	6,09079078	6,25158395	6,02274738	8,279645849	8,064543523	8,045772436	GTF2IRD1	GTF2I repeat domain containing 1
16791527	-2,004286778	0,000115834	4,95297918	4,900987477	5,514866861	3,132795979	3,024434378	3,198742827	LOC728755	hypothetical LOC728755
16879883	-2,051956752	6,98585E-12	9,100881023	9,014529054	8,935939178	6,967526101	6,959659259	6,968293637	MSH2	mutS homolog 2, colon cancer, nonpolyposis type 1 (E. coli)
16679349	-2,059582972	2,14295E-06	9,164866359	8,44789284	8,428270414	6,433094982	6,928660851	6,500524865	KMO	kynurenine 3-monooxygenase (kynurenine 3-hydroxylase)
16782016	-2,123225256	2,34768E-06	7,306488339	7,244627475	6,861562889	5,256584848	4,403519969	5,382898118	TRAJ56	T cell receptor alpha joining 56
17009289	-2,145916753	2,24696E-12	8,410562126	8,323528837	8,464933629	6,38368569	6,123656622	6,253932023	RUNX2	runt-related transcription factor 2
17115108	-2,18019878	1,85158E-08	10,44105832	10,47536772	10,44709901	7,920657898	8,484281421	8,417989391	MAGEA1	melanoma antigen family A, 1 (directs expression of antigen MZ2-E)
16991497	-2,194188981	9,81253E-10	6,893150803	6,942377006	6,672383772	4,740548358	4,775615065	4,409181216	ITK	IL2-inducible T-cell kinase
16754895	-2,200341633	2,14295E-06	5,461449603	6,335013106	6,228578784	3,754960614	3,945892084	3,723163897	NTS	neurotensin
17055426	-2,29830286	1,18292E-09	7,593620905	7,392540827	6,970266656	5,158297176	5,161120822	4,742101809	TMEM195	transmembrane protein 195
16944738	-2,351515732	3,45875E-09	7,509127562	7,797846655	7,818664944	5,497620783	5,179741968	5,393729216	PDIA5	protein disulfide isomerase family A, member 5
16859034	-2,543597237	2,10089E-08	10,16901419	10,00252866	9,620434657	7,390890234	7,366918244	7,403377324	CLEC17A	C-type lectin domain family 17, member A
17108878	-2,572404908	1,10255E-08	7,665419289	7,022790304	7,630181885	5,087883323	4,358289784	5,155003647	linc RNA ENST00000420725.1	location: chrX:4545241-4551613 (-)
17068854	-2,722870539	3,646E-06	8,91722996	7,554368356	7,727965735	5,283206494	5,199229772	5,548516168	linc-SNTG1-2	linc-SNTG1-2
17070229	-2,969008647	2,3276E-13	8,503298506	8,388505518	8,617601716	5,446350301	5,686827054	5,469202442	FAM164A	family with sequence similarity 164, member A
17106392	-3,084376843	3,40515E-11	7,164898411	7,785952409	7,660371263	4,666981387	4,377699539	4,313410629	AGTR2	angiotensin II receptor, type 2
17020787	-3,562185422	2,3276E-13	8,296459083	7,896237265	8,295625214	4,663977656	4,560180431	4,57760721	C6orf150	chromosome 6 open reading frame 150
17101952	-3,786441715	7,96859E-15	10,31430906	10,12054607	10,2587048	6,58385101	6,292791013	6,457592771	ENST00000452900.1	hypothetical LOC100132163
16767335	-4,339661143	5,1227E-17	10,63191275	10,86177569	10,94629569	6,499673798	6,419153512	6,502173389	CPM	carboxypeptidase M

Legende:

ID: Affymetrix ID des *GeneChip® Human Gene 2.0 ST Arrays*

SM224.9_ctrl/DG75_ctrl logFC: logarithmische Werte des x-fachen Unterschieds des Expressionsprofils von SM224.9^{CBF1 neg.}-Zellen zu DG75 Zellen. Bsp.: LogFC=3 bedeutet, dass das jeweilige Gen 8-fach stärker in SM224.9^{CBF1 neg} exprimiert ist.

SM224.9_ctrl/DG75_ctrl adj.P.Val: p-Wert des limma t-Tests.

ST212 DG75 R1.CEL: logarithmische RMA-Werte. ST212 = Versuchsnummer Sybille Thumann; DG75 = untersuchte Zelllinie; R1 = Replikat 1; CEL = Dateiformat

symbol: Gensymbol

description: Beschreibung des Gens

Anhang

Tabelle 18: mindestens 2-fach signifikant CBF1-reprimierte Transkripte in DG75-Zellen.

In grau hinterlegt sind alle Transkripte, welche auch in SM295 mind. 2-fach signifikant CBF1-reprimiert sind (100 übereinstimmende Transkripte). Die rote Markierung zeigt die 11 Transkripte, die zusätzlich EBNA2-aktiviert sind.

ID	SM224.9_ctrl/DG75_ ctrl logFC	SM224.9_ctrl/DG75_ ctrl adj.P.Val	symbol		ID	SM224.9_ctrl/DG75_ ctrl logFC	SM224.9_ctrl/DG75_ ctrl adj.P.Val	symbol	
16865530	5,476194457	5,1227E-17	KIR3DL2 // KIR3DL1		16995837	1,905253337	1,32641E-08		
17111783	5,122163574	2,52027E-16			16669105	1,897660825	1,06926E-06	C1orf161	
16826230	4,800281918	2,99716E-11	NETO2		16819264	1,897276549	1,70901E-09	MT1X	
17120370	4,352365419	9,3798E-13			16782862	1,883748493	4,55798E-12	NYNRIN	
16679340	3,805785858	6,15526E-09			16754373	1,881855836	2,30073E-07	GLIPR1	
16671874	3,591263044	3,75403E-13	SYT11		16942720	1,881100599	0,005644711	MIR1324	
16779059	3,540990438	6,38301E-11	CAB39L		16801602	1,859385457	2,56545E-06		
17065958	3,482685006	6,08114E-12	TUSC3		17121624	1,859065242	7,30718E-07		
16865470	3,440396366	6,98585E-12	KIR2DL3		16876286	1,858652267	4,36742E-08		
16691776	3,345498551	8,01514E-10			16877004	1,847464218	4,9857E-07		
16734877	3,250982307	2,3276E-13	HBE1		17124112	1,834476601	7,82236E-08		
16695121	3,220431518	8,84935E-11	AIM2		16782098	1,829722429	6,72268E-05		
16942845	3,18161087	9,17174E-09			16981648	1,825884272	1,814E-05		
16799277	3,167061978	6,54002E-09			16718666	1,82339133	1,00903E-07		
16737580	3,124991749	3,77875E-11			16809761	1,817287094	9,87844E-09	ZNF280D	
17020608	3,118520892	5,05712E-10			17121622	1,813529111	1,0757E-06		
16944647	3,090890066	1,0287E-10	CSTA		16912597	1,784969216	3,47373E-09	DNMT3B	
16876269	2,938952261	1,10134E-10			17122312	1,78113818	3,76729E-08		
17002591	2,897553987	2,3276E-13			16761693	1,775895913	5,831E-07	C12orf36	
17086048	2,895532453	1,70901E-09	GCNT1		16811936	1,737686341	1,85197E-09	SCAPER	
16876242	2,867134102	9,87844E-09			17012304	1,7109669	3,37119E-10	HEY2	
16865398	2,861399564	5,67101E-08	LILRB1		16951350	1,710260837	8,134E-08		
16876297	2,844145865	9,3798E-13			16850286	1,703185999	1,10255E-08		
16981345	2,778744661	3,93346E-09	SH3RF1		17121568	1,694067222	2,51858E-07		
16784614	2,775056348	2,79981E-10			16653873	1,67247413	0,019402479		
17122310	2,774467397	8,53021E-09			17005589	1,653335267	2,55104E-06	HIST1H2AE	
16735938	2,765937299	2,06971E-10			16872163	1,642404498	5,73912E-07		
16660810	2,732156253	2,10402E-11	RCAN3		16830220	1,630234129	1,20204E-06	ALOX12P2	
17122308	2,713936756	1,54035E-07			16830235	1,629709039	1,09493E-08		
16675312	2,681251719	2,56716E-05	RGS13		16764683	1,628881736	1,80249E-11	TFCP2	
16812929	2,678870385	1,74196E-08			16977711	1,616481845	5,39887E-06	MAPK10	
16784041	2,671153379	3,37886E-08	ABHD12B		16879679	1,601932191	2,60013E-08	PRKCE	
17021738	2,598364376	1,89343E-11	BACH2		16752185	1,595494587	3,56167E-11	METTL7B	
16837362	2,556394436	3,09477E-08			17002681	1,591624347	2,8095E-07	LCP2	
17021437	2,509467517	4,54804E-07	CGA		17013848	1,589190357	1,43504E-06		
16892633	2,507759956	9,55406E-10	HEATR7B1		16764732	1,581620886	2,56545E-06	BIN2	
16865460	2,49902199	2,10402E-11	KIR3DL3		16888405	1,580591782	1,21614E-09	DUSP19	
16961616	2,481407637	6,89627E-10	TNFSF10		17062985	1,576543143	8,88304E-08	PODXL	
17025738	2,471584398	1,87514E-11	LOC441178		16773700	1,571346673	1,74086E-10	B3GALT1	
16764564	2,455597313	7,16495E-10	LIMA1		16876210	1,55703016	1,52653E-07		
17103717	2,442870491	1,10134E-10	CLCN5		16707096	1,545304403	2,09829E-06	LIPN	
17122306	2,439351029	1,32641E-08			17081447	1,542602282	3,18267E-10	ST3GAL1	
16808696	2,423939937	2,71197E-07	SLC30A4		16840442	1,536263231	2,43698E-07		
16976891	2,3552164	5,84266E-09			16663223	1,533563195	2,917E-07	RIMKLA	
16996112	2,335692206	1,00831E-08			16797389	1,53297636	0,000119854	IGHG3 // IGHM	
17015152	2,325394812	1,0552E-08			16852619	1,523648616	8,42679E-06		
16787994	2,267425207	6,31285E-08	TCL1B // TCL6		17076198	1,520158604	1,89273E-06		
17124046	2,211385493	1,52653E-07			17120042	1,517933289	5,52666E-10		
16712373	2,208367219	7,07563E-11	NEBL		16875612	1,509213277	1,32641E-08	TNNI3	
16837348	2,193866607	7,34584E-09	MAP2K6		16811886	1,504174922	5,55357E-07	NRG4	
16669501	2,156926944	4,65944E-05	LOC51152		16886257	1,498034004	4,34119E-05	DKFZp686O1327	
16847095	2,127190661	4,9571E-10	RNF43		16783215	1,49632647	2,25955E-05	ARHGAP5	
17011708	2,124024873	9,36197E-11	SLC16A10		17118411	1,486815053	0,000109419		
17126218	2,062989775	1,31697E-06			17118415	1,486815053	0,000109419	LOC100292922	
17120374	2,032564441	1,4069E-10			17010100	1,478694058	0,000358764		
17122362	2,025167987	6,23404E-12			16896170	1,477753928	2,93083E-06	CAPN14	
16894848	2,021324347	1,03416E-10	WDR35		16774319	1,469962566	1,55121E-07	DGKH	
16828617	2,014423151	4,27588E-10			17099617	1,467965764	7,93364E-12	VAV2	
17047138	2,008279899	1,79553E-08	GTF2IRD1		16875530	1,466960157	5,25116E-07	NLRP7	
16876278	2,002125913	3,56933E-09			17118754	1,460207075	1,64211E-07		
16737577	1,977977941	1,0552E-08			17092081	1,456850474	4,07546E-09	GLIS3	
16797591	1,976174643	1,00831E-08			16850428	1,44848644	0,018886103		
16907488	1,970621266	5,00191E-09	RAPH1		17004671	1,446083805	0,000301198		
17120628	1,96697309	6,54002E-09			17074465	1,434962951	1,76455E-05		
16812933	1,966044851	1,00831E-08			16859205	1,42602963	8,53299E-05		
16734886	1,93055504	1,79553E-08	OR51B5 // HBG2		16877007	1,425621271	7,88879E-08	KLF11	
17125352	1,927898281	2,62905E-06			16889016	1,41699837	2,59488E-06		

Anhang

ID	SM224.9_ctrl/DG75_ctrl logFC	SM224.9_ctrl/DG75_ctrl adj.P.Val	symbol		ID	SM224.9_ctrl/DG75_ctrl logFC	SM224.9_ctrl/DG75_ctrl adj.P.Val	symbol	
17124024	1,409836526	2,21406E-06			16658644	1,163962829	2,72722E-07	H6PD	
16746217	1,408727589	1,24515E-06			16666045	1,163769101	9,50685E-07	HHLA3	
17125624	1,402105864	1,26672E-06			16768723	1,162357165	0,000246472	USP44	
16802795	1,396460384	3,82143E-09	NEO1		16691969	1,155748087	2,75767E-05		
17125102	1,387662354	5,08609E-05			16718252	1,151897807	5,63116E-07		
16798270	1,384632419	0,001854707	SNORD115-1-42		16983692	1,151592863	9,41648E-07	PDZD2	
16798286	1,384632419	0,001854707	SNORD115-1-44		16883948	1,150556981	1,71224E-05		
16798303	1,384632419	0,001854707	SNORD115-1-44		16657013	1,150023417	0,041178162		
16798305	1,384632419	0,001854707	SNORD115-1-44		16787352	1,149087398	1,36117E-06	LOC400236	
16798402	1,384632419	0,001854707	SNORD115-1-44		16872166	1,138424009	3,7775E-06	FBXO27	
16798416	1,384632419	0,001854707	SNORD115-1-44		16795943	1,132258328	6,42549E-05	TC2N	
16798430	1,384632419	0,001854707	SNORD115-1-44		17089371	1,132164676	5,7218E-09	STXBP1	
16980021	1,379999734	5,67101E-08			16884956	1,130715528	6,24072E-06	STEAP3	
17097653	1,376216557	0,000690234	TNFSF8		16943540	1,128261216	0,003449074		
16672838	1,374334576	1,37764E-07	FCER1G		16900222	1,120309092	9,69573E-05	KRCC1	
16942325	1,371632291	1,1473E-08	LOC285401		16832350	1,114593806	5,3865E-07	KSR1	
16798345	1,370990729	0,000858573	SNORD115-11-44		16732755	1,114211373	3,47373E-09	GRAMD1B	
16802232	1,353376331	3,40404E-05	SMAD6		16887420	1,111228051	4,45607E-09	MYO3B	
16676183	1,352107057	1,32036E-06	ATP2B4		17121592	1,107286505	4,70751E-05		
16837191	1,350752018	1,31847E-09	PITPNC1		16790413	1,104621497	8,8299E-07	SALL2	
16921084	1,345755026	0,00862661			16755291	1,101046606	4,58878E-05		
17120632	1,34253997	3,68032E-06			16960911	1,100402137	4,36684E-10	LXN	
16961101	1,331839651	2,59488E-06			16750792	1,099102092	0,000189637	DNAJC22	
16926299	1,309418836	5,53038E-07			17016375	1,098834816	0,0003676	HIST1H1T	
16701045	1,30511939	0,003407776			16660401	1,098819212	6,64305E-06		
16909319	1,303961989	6,72268E-05	DNER		17121588	1,096988646	0,017386205		
16956351	1,30066844	0,012612597			16943789	1,096304367	0,000170262	CD96	
16698466	1,299917382	1,56976E-06	NUAK2		17069173	1,095052215	3,35725E-05	T1560	
16744967	1,299638716	1,39396E-05	AMICA1		16694980	1,091645182	7,54987E-05	FCRL1	
16971995	1,295868806	1,07711E-08	RAPGEF2		17121594	1,08923514	2,4556E-05		
16975084	1,294733972	3,12311E-07	ARAP2		16919543	1,082715935	1,40149E-07		
16756406	1,292676646	2,10089E-08	RIC8B		17005223	1,077648274	1,43504E-06	ID4	
17013851	1,280381595	7,99527E-05	MYCT1		16806820	1,077108004	3,68507E-06		
16670185	1,280304194	0,000490412			16672669	1,075989411	0,00011634	LY9	
17109714	1,280179522	9,23939E-07	SCARNA9L		16796412	1,075482748	9,99843E-05	C14orf139	
16748196	1,274136676	1,30765E-05			16807763	1,075089979	4,43209E-07	EHD4	
16967915	1,269688342	0,000428434	C4orf26		16748202	1,073059534	7,17759E-05		
16944120	1,267037098	5,23692E-08	GRAMD1C		17122152	1,073052844	0,00144206		
17009961	1,265232198	1,39164E-07			17120626	1,073037131	2,59488E-06		
17121352	1,254275644	6,42027E-10			17002194	1,072895776	6,1652E-05	ADAM19	
16716124	1,253377482	0,002043148			16689354	1,071765703	0,000115698	GBP2	
16731806	1,252903049	0,000695248	CD3G		16742384	1,062210595	0,023597237	LRRC32	
16693259	1,245460899	6,59197E-07	THEM4		16694176	1,05774044	6,64051E-05		
17102538	1,24191274	0,002570477	CYBB		16836528	1,05211651	0,00081658	YPEL2	
16799739	1,241792465	0,000899598	CHAC1		17012598	1,043063984	4,56845E-06	ENPP3	
16734883	1,239079338	1,69356E-06	OR51B4		17125104	1,042816141	7,24184E-05		
16650435	1,235391634	0,002034401			16938815	1,041213712	0,000489187		
16801577	1,233591715	0,00013172	FAM81A		16878731	1,040030415	0,000291933	EHD3	
16792601	1,233234877	5,05818E-06			17117622	1,037163749	0,000915432	LOC100509630	
16808300	1,225416026	0,003009073			16783879	1,037161535	8,92638E-05		
16967760	1,22412921	8,00533E-06			16808324	1,035430665	0,00019461	PPIP5K1	
16692080	1,222466129	7,84919E-05			16731279	1,035337187	2,302E-06		
16798422	1,221062086	0,009736964	SNORD115-11-44		16653371	1,033424642	0,018608884		
16699932	1,218121493	1,21614E-09	TMEM63A		16653473	1,033424642	0,018608884		
16842618	1,2133813	9,94657E-11	SLC46A1		17056326	1,033423352	0,000858125		
16789624	1,213222923	1,72623E-10	BTBD6		16846864	1,03198313	1,38755E-07	MMD	
16654241	1,212946245	0,010317315			16672323	1,022074284	0,000362759	CD1C	
16883232	1,207078993	3,76729E-08	ZAP70		16845445	1,021091411	1,30798E-06	DUSP3	
16863593	1,204291051	0,000286567	GPR77		17013174	1,020325886	7,41267E-05	AIG1	
17120696	1,202743186	2,44147E-05			16666055	1,019295211	0,011788309	CTH	
16695490	1,191872188	1,30893E-08	F11R		16983950	1,018376596	3,80677E-09	SPEF2	
16776620	1,187405297	4,76919E-08			16675301	1,017786973	0,000514888	RGS1	
16718256	1,181246451	3,12685E-06			16654227	1,016652581	0,002867398		
16673731	1,178450445	0,000155006	FMO1		17042984	1,015861538	2,34575E-06	CHST12	
16672654	1,174974601	1,00903E-07	SLAMF7		16773086	1,011445872	1,91442E-05	FGF9	
16835672	1,17405332	1,27249E-08	ITGA3		16902809	1,007895087	5,65917E-06	LOC100216479	
16824352	1,172804862	0,000107302	XYLT1		17123348	1,007728088	0,000387785		
16670188	1,167184709	0,010420771			17075271	1,005631829	2,14784E-07	DOK2	
16801122	1,167116088	1,67706E-06	TMOD2		16791620	1,00512311	0,000802176		
17070317	1,166777237	0,000341935			16802227	1,002579111	3,05572E-05		
16825997	1,164569565	7,22145E-05	PYCARD		16654369	1,000866458	0,020947306		

Legende:

ID: Affymetrix ID des *GeneChip® Human Gene 2.0 ST Arrays*

SM224.9_ctrl/DG75_ctrl logFC: logarithmische Werte des x-fachen Unterschieds des Expressionsprofils von SM224.9^{CBF1 neg.}-Zellen zu DG75-Zellen. Bsp.: LogFC=3 bedeutet, dass das jeweilige Gen 8-fach stärker in SM224.9^{CBF1 neg.} exprimiert ist.

SM224.9_ctrl/DG75_ctrl adj.P.Val: p-Wert des limma t-Tests.

symbol: Gensymbol

Tabelle 19: mindestens 1,5-fach signifikant EBNA2-regulierte microRNAs

ID	SM295_estr/SM295_ctrl logFC	SM295_estr/SM295_ctrl adj.P.Val	ST 212 SM295 D6 R1.CEL	ST 212 SM295 D6 R2.CEL	ST265 SM295 D6 R3.CEL	ST 212 SM295 D6 +24h ER R1.CEL	ST 212 SM295 D6 +24h ER R2.CEL	ST265 SM295 D6 +24h ER R3.CEL	symbol	description
16836624	2,727525837	1,1855E-09	6,341675357	6,365144602	6,582792475	9,418904479	8,915097382	9,138188084	MIR21	microRNA 21
16697660	2,431885466	1,28729E-07	6,122565107	6,44202627	6,402555359	8,747631464	8,392580899	9,122590772	MIR181B1	microRNA 181b-1
17088997	1,69617426	5,45213E-09	4,433210953	4,660581676	4,289921132	6,319390302	5,935345182	6,217501056	MIR181B2	microRNA 181b-2
16728384	1,036902248	0,027449124	3,289664961	3,990341452	3,604150472	4,774102874	5,268549	3,952211754	MIR548K	microRNA 548k
16848095	0,989018029	6,99091E-05	5,361605531	5,473016551	5,121543916	6,180029358	6,578349716	6,164841011	MIR635	microRNA 635
16878438	0,85235909	0,008343869	4,404811837	4,196136809	4,749093013	5,535988884	5,48189996	4,889230085	MIR4263	microRNA 4263
17108585	0,769392705	8,10014E-05	7,746028851	8,03698595	7,992700385	8,548305997	8,763073182	8,772514122	MIR1184-1	microRNA 1184-1 // microRNA 1184-2 // microRNA 1184-3
17115763	0,769392705	8,10014E-05	7,746028851	8,03698595	7,992700385	8,548305997	8,763073182	8,772514122	MIR1184-2	microRNA 1184-1 // microRNA 1184-2 // microRNA 1184-3
17115796	0,769392705	8,10014E-05	7,746028851	8,03698595	7,992700385	8,548305997	8,763073182	8,772514122	MIR1184-3	microRNA 1184-1 // microRNA 1184-2 // microRNA 1184-3
17087109	0,762653311	0,002041974	5,333679424	5,336375516	5,744464152	6,388647588	6,072119107	6,241712332	MIR27B	microRNA 27b // chromosome 9 open reading frame 3
16697662	0,724652496	0,008462371	2,855368004	3,007415934	3,41885872	3,905116593	3,779293782	3,771189772	MIR181A1	microRNA 181a-1
16997931	0,720376831	8,79709E-07	6,034792659	6,062668921	6,034384834	6,58821678	7,005992376	6,698767749	MIR9-2	microRNA 9-2 // hypothetical LOC645323
16947605	0,712485403	0,018045813	5,881297687	5,683002938	6,14949316	6,658124347	6,500341613	6,692784034	MIR16-2	microRNA 16-2
16847251	0,711461948	0,008225764	2,566062491	2,806984117	2,728618428	3,940956041	3,103630929	3,191463912	MIR301A	microRNA 301a
17051150	0,706354233	0,005261934	4,561795849	5,083761842	5,109210732	5,784612425	5,286180467	5,803038231	MIR129-1	microRNA 129-1
16718567	0,680043346	1,06195E-06	9,156583153	9,086959967	9,081453917	9,837008619	9,802917739	9,725200718	MIR2110	chromosome 10 open reading frame 118 // microRNA 2110
16963567	0,675958781	6,34182E-07	9,33064134	9,406833273	9,427776992	10,09209909	10,00842234	10,09260652	MIR922	KIAA0226 // microRNA 922
16956053	0,659817788	0,020159729	3,583534701	3,592620279	3,343245827	4,229618964	4,413704329	3,85553088	MIR3136	microRNA 3136
16864817	0,614830003	0,011537707	4,653138114	4,604197167	4,190479802	5,155149409	5,358144823	4,77901086	MIR643	microRNA 643
16874265	-0,586477303	2,71462E-06	8,410325298	8,440201112	8,518838092	7,833434363	7,820817541	7,955680688	MIR4324	microRNA 4324
16821396	-0,605790541	0,002991294	7,526050201	7,682540463	7,523916262	6,907056411	6,832478224	7,175600669	MIR3182	microRNA 3182
16910825	-0,660948964	3,28567E-06	10,09226382	10,1082306	10,0911336	9,443693848	9,418230957	9,446856326	MIR1292	NOP56 ribonucleoprotein homolog (yeast) // small nucleolar RNA, C/D box 86 // microRNA 1292
16748449	-0,673574732	0,000966282	10,34465471	10,38548761	10,01738609	9,555689233	9,887257434	9,283857546	MIR1244-1	microRNA 1244-1 // microRNA 1244-2 // microRNA 1244-3
16761116	-0,673574732	0,000966282	10,34465471	10,38548761	10,01738609	9,555689233	9,887257434	9,283857546	MIR1244-2	microRNA 1244-1 // microRNA 1244-2 // microRNA 1244-3
16988297	-0,673574732	0,000966282	10,34465471	10,38548761	10,01738609	9,555689233	9,887257434	9,283857546	MIR1244-3	prothymosin, alpha // microRNA 1244-1 // microRNA 1244-2 // microRNA 1244-3 // prothymosin, alpha pseudogene 5
16775778	-0,812456957	0,001248002	6,946333212	7,12201621	7,25633005	6,560814843	6,171592866	6,154900891	MIR17HG	MIR17 host gene (non-protein coding) // microRNA 92a-1 // microRNA 20a // microRNA 19a // microRNA 17 // microRNA 18a // microRNA 19b-1
17005797	-0,971773975	0,000753509	10,70868442	10,39484015	10,93882809	10,04842929	9,292335968	9,786265473	MIR3143	microRNA 3143
16991757	-1,117799127	2,75123E-05	7,21758949	7,716484613	7,072301876	6,396908146	5,948300631	6,307769822	MIR146A	microRNA 146a // hypothetical protein LOC285628
16991760	-1,138682029	0,000295002	5,696073336	5,769839548	5,295771893	4,692558761	4,477162287	4,175917641	MIR3142	microRNA 3142
16774235	-1,202720642	2,92952E-11	9,529804005	9,57749352	9,526798931	8,487588116	8,224232843	8,314113573	MIR621	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; ornithine transporter) member 15 // microRNA 621

Legende:ID: Affymetrix ID des *GeneChip® Human Gene 2.0 ST Arrays*

SM295_estr/SM295_ctrl logFC: logarithmische Werte der x-fachen Veränderung der Genexpression in SM295-Zellen nach Aktivierung von EBNA2 mit Östrogen.

Bsp.: LogFC=2 bedeutet, dass die jeweilige microRNA 4-fach aktiviert ist.

SM295_estr/SM295_ctrl adj.P.Val: p-Wert des limma t-Tests.

ST212 SM295 D6 R1.CEL: logarithmische RMA-Werte. ST212 = Versuchsnummer Sybille Thumann; SM295 D6 = genaue Bezeichnung der untersuchten Zelllinie; R1 = Replik 1; CEL = Dateiformat

symbol: Gensymbol

description: Beschreibung des Gens

Tabelle 20: Ergebnisse der *label-free* LC-MS/MS-Analyse - EBNA2-H15A IP:

Gezeigt sind alle Proteine, die in der EBNA2-H15A-IP im Vergleich zur Kontroll-IP mind 1,5-fach angereichert sind (p-Wert < 0,05)

<i>ensemble</i> - Identifikations- nummer	Anzahl ^a Peptide	quantifi- zierte Peptide ^b	<i>Confidence</i> <i>score</i> ^c	Anova - Test (p)	An- reicherung ^d	Anreicherung normalisiert auf EBNA2 wt Expression (x 2,4) ^e	Protein- Symbol	Genname	Replik 1 ^f Leervektor	Replik 2 ^f Leervektor	Replik 3 ^f Leervektor	Replik 1 ^f EBNA2 H15A	Replik 2 ^f EBNA2 H15A	Replik 3 ^f EBNA2 H15A
ENSP00000248958	1	1	48	0,00	645,4	1549,0	SDF2L1	stromal cell-derived factor 2-like 1	27	0	0	9435	3449	4460
ENSP00000247020	2	2	54	0,01	358,7	861,0	SDF2	stromal cell-derived factor 2	26	0	0	5263	1539	2454
ENSP00000466102														
ENSP00000380376	1	1	34	0,04	39,2	94,0	PAXIP1	PAX interacting (with transcription-activation domain) protein 1	13	27	2	989	64	569
ENSP00000300093	7	7	172	0,01	25,0	59,9	PLK1	polo-like kinase 1	1610	407	198	30285	11532	13430
ENSP00000459688														
ENSP00000460266														
ENSP00000265028	5	5	207	0,00	13,7	32,8	DNAJB11	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 11	1645	2063	2421	32361	23845	27583
ENSP00000408410														
ENSP00000305815	1	1	26	0,01	11,9	28,5	RBPJ	recombination signal binding protein for immunoglobulin kappa J region	410	121	93	3572	1594	2248
P12978.1	5	5	162	0,00	11,2	26,8	EBNA2	Epstein-Barr nuclear antigen 2	5841	3949	3629	62439	41495	45867
ENSP00000261893	7	7	210	0,00	5,4	12,9	LACTB	lactamase, beta	5688	3130	2773	26877	16900	18645
ENSP00000392956														
ENSP00000454085														
ENSP00000242577	3	2	105	0,02	4,8	11,6	DYNLL1	dynein, light chain, LC8-type 1	13993	9084	6329	80164	24099	37600
ENSP00000446596														
ENSP00000448834														
ENSP00000368030	18	6	544	0,02	4,2	10,0	ATAD3A	ATPase family, AAA domain containing 3A	13872	9774	4851	57841	32797	28692
ENSP00000339421														
ENSP00000368015														
ENSP00000368062														
ENSP00000383631														
ENSP00000439290														
ENSP00000464661	7	7	226	0,04	2,1	5,0	C1QBP	complement component 1, q subcomponent binding protein	57015	35768	35427	68030	76074	125316
ENSP00000225698														
ENSP00000460308	9	9	356	0,04	1,7	4,1	HSPD1	heat shock 60kDa protein 1	21711	29127	24564	52802	43190	32107
ENSP00000340019														
ENSP00000393670														
ENSP00000396460														
ENSP00000412717														
ENSP00000414446														

Legende:

^a Anzahl der Peptide, die in der massenspektrometrischen Analyse für jedes Protein gefunden wurden.

^b Für die Quantifizierung wurden nur Peptide verwendet, die für das Protein spezifisch sind.

^c Der *Confidence Score* ist ein Maß für die Wahrscheinlichkeit, dass die Zuordnung eines Peptids zu seiner Peptid-ID korrekt ist. Er stellt den aufsummierten Wert aller Peptide, die für ein Protein gefunden wurden, dar. Je höher der *Confidence Score*, desto wahrscheinlicher ist, dass die einzelnen Peptide richtig zugeordnet wurden.

^d Anreicherung der Proteine im EBNA2-wt-Immunpräzipitat im Vergleich zum Leervektor-Immunpräzipitat. Der Wert wurde aus dem Mittelwert der *normalized abundances* errechnet (siehe ^f).

^e Im EBNA2-wt-Immunpräzipitat konnte im Vergleich zum EBNA2-H15A-Immunpräzipitat 2,4-fach mehr EBNA2 quantifiziert werden. Als Orientierungswert wird hier der x-fache Anreicherungswert für berechnete gleiche Mengen an EBNA2 wt und EBNA2 H15A angegeben.

^f *Normalized abundances* aus den Quantifizierungen der massenspektrometrischen Analyse. Bei dieser Normalisierung wird zunächst ein Referenzlauf ausgewählt. Für jeden Lauf wird ein Normalisierungsfaktor berechnet in Bezug auf den Referenzlauf. Grundannahme dabei ist, dass die meisten Proteine in gleicher Abundanz in den beiden Proben vorhanden sind.

Tabelle 21: Ergebnisse der *label-free* LC-MS/MS-Analyse - EBNA2- $\Delta\alpha 1$ -IP:Gezeigt sind alle Proteine, die in der EBNA2- $\Delta\alpha 1$ -IP im Vergleich zur Kontroll-IP mind. 1,5-fach angereichert sind (p-Wert < 0,05)

<i>ensemble- Identifikations- nummer</i>	<i>Anzahl^a Peptide</i>	<i>quantifizierte Peptide^b</i>	<i>Confidence score^c</i>	<i>Anova - Test (p)</i>	<i>An- reicherung^d</i>	<i>Anreicherung normalisiert auf EBNA2 wt Expression (x 3,5)^e</i>	<i>Protein- Symbol</i>	<i>Genname</i>	<i>Replik 1^f Leervektor</i>	<i>Replik 2^f Leervektor</i>	<i>Replik 3^f Leervektor</i>	<i>Replik 1^f EBNA2 Δα1</i>	<i>Replik 2^f EBNA2 Δα1</i>	<i>Replik 3^f EBNA2 Δα1</i>
ENSP00000380376	1	1	34	0,02	15,42	54,0	PAXIP1	PAX interacting (with transcription-activation domain) protein 1	13	27	2	188	308	143
ENSP00000300093 ENSP00000459688 ENSP00000460266	7	7	172	0,02	12,16	42,6	PLK1	polo-like kinase 1	1610	407	198	6937	14875	5113
P12978.1	5	5	162	0,01	7,44	26,0	EBNA2	Epstein-Barr nuclear antigen 2	5841	3949	3629	21203	57565	21036
ENSP00000305815	1	1	26	0,05	6,92	24,2	RBPJ	recombination signal binding protein for immunoglobulin kappa J region	410	121	93	919	2854	546
ENSP00000261893 ENSP00000392956 ENSP00000454085	7	7	210	0,03	4,71	16,5	LACTB	lactamase, beta	5688	3130	2773	15802	30156	8642
ENSP00000368030 ENSP00000339421 ENSP00000368015 ENSP00000368062 ENSP00000383631 ENSP00000439290 ENSP00000464661	18	6	544	0,03	3,84	13,5	ATAD3A	ATPase family, AAA domain containing 3A	13872	9774	4851	33428	56071	20059
ENSP00000291552	1	1	31	0,04	3,40	11,9	U2AF1	U2 small nuclear RNA auxiliary factor 1	2349	1244	1054	2663	7057	6073
ENSP00000349313	1	1	20	0,05	2,46	8,6	NHEJ1	nonhomologous end-joining factor 1	1175	1126	850	2718	1373	3655
ENSP00000309558 ENSP00000465961	3	1	77	0,05	2,20	7,7	TAF15	TAF15 RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor, 68kDa	407	164	312	793	518	635
ENSP00000307863	6	6	218	0,04	1,98	6,9	U2AF2	U2 small nuclear RNA auxiliary factor 2	36694	17161	19535	46039	51698	47792

Legende:^a Anzahl der Peptide, die in der massenspektrometrischen Analyse für jedes Protein gefunden wurden.^b Für die Quantifizierung wurden nur Peptide verwendet, die für das Protein spezifisch sind.^c Der *Confidence Score* ist ein Maß für die Wahrscheinlichkeit, dass die Zuordnung eines Peptids zu seiner Peptid-ID korrekt ist. Er stellt den aufsummierten Wert aller Peptide, die für ein Protein gefunden wurden, dar. Je höher der *Confidence Score*, desto wahrscheinlicher ist, dass die einzelnen Peptide richtig zugeordnet wurden.

^d Anreicherung der Proteine im EBNA2-wt-Immunpräzipitat im Vergleich zum Leervektor-Immunpräzipitat. Der Wert wurde aus dem Mittelwert der *normalized abundances* errechnet (siehe ^f).

^e Im EBNA2-wt-Immunpräzipitat konnte im Vergleich zum EBNA2- $\Delta\alpha 1$ -Immunpräzipitat 3,5-fach mehr EBNA2 quantifiziert werden. Als Orientierungswert wird hier der x-fache Anreicherungs Wert für berechnete gleiche Mengen an EBNA2 wt und EBNA2 $\Delta\alpha 1$ angegeben.

^f *Normalized abundances* aus den Quantifizierungen der massenspektrometrischen Analyse. Bei dieser Normalisierung wird zunächst ein Referenzlauf ausgewählt. Für jeden Lauf wird ein Normalisierungsfaktor berechnet in Bezug auf den Referenzlauf. Grundannahme dabei ist, dass die meisten Proteine in gleicher Abundanz in den beiden Proben vorhanden sind.

3. Inhalte des CD-Rom Anhangs

Tabelle 22: Expressionsdaten der 24 *GeneChip® Human Gene 2.0 ST Arrays*

Tabelle 23: Daten zu Abbildung 6A

Tabelle 24: Daten zu den Transkripten, die in SM295 Zellen mind. 2-fach reguliert sind

Tabelle 25: Daten zu den Transkripten die in DG75 mind. 2-fach durch CBF1 reguliert sind.

Tabelle 26: Daten zu den Transkripten, die in SM295 mind. 2-fach durch CBF1 reguliert sind.

Tabelle 27: Daten zu den massenspektrometrischen Analysen

VIII. Literatur

- Abbot, S. D., M. Rowe, K. Cadwallader, A. Ricksten, J. Gordon, F. Wang, L. Rymo and A. B. Rickinson (1990). "Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 induces expression of the virus-encoded latent membrane protein." *J Virol* 64(5): 2126-2134.
- Alfieri, C., M. Birkenbach and E. Kieff (1991). "Early events in Epstein-Barr virus infection of human B lymphocytes." *Virology* 181(2): 595-608.
- Allday, M. J., D. H. Crawford and B. E. Griffin (1989). "Epstein-Barr virus latent gene expression during the initiation of B cell immortalization." *J Gen Virol* 70 (Pt 7): 1755-1764.
- Amoroso, R., L. Fitzsimmons, W. A. Thomas, G. L. Kelly, M. Rowe and A. I. Bell (2011). "Quantitative studies of Epstein-Barr virus-encoded microRNAs provide novel insights into their regulation." *J Virol* 85(2): 996-1010.
- Ansieau, S. and A. Leutz (2002). "The conserved Mynd domain of BS69 binds cellular and oncoviral proteins through a common PXLXP motif." *J Biol Chem* 277(7): 4906-4910.
- Baer, R., A. T. Bankier, M. D. Biggin, P. L. Deininger, P. J. Farrell, T. J. Gibson, G. Hatfull, G. S. Hudson, S. C. Satchwell, C. Seguin and et al. (1984). "DNA sequence and expression of the B95-8 Epstein-Barr virus genome." *Nature* 310(5974): 207-211.
- Barolo, S., T. Stone, A. G. Bang and J. W. Posakony (2002). "Default repression and Notch signaling: Hairless acts as an adaptor to recruit the corepressors Groucho and dCtBP to Suppressor of Hairless." *Genes Dev* 16(15): 1964-1976.
- Ben-Bassat, H., N. Goldblum, S. Mitrani, T. Goldblum, J. M. Yoffey, M. M. Cohen, Z. Bentwich, B. Ramot, E. Klein and G. Klein (1977). "Establishment in continuous culture of a new type of lymphocyte from a "Burkitt like" malignant lymphoma (line D.G.-75)." *Int J Cancer* 19(1): 27-33.
- Bestvater, F., C. Dallner and E. Spiess (2005). "The C-terminal subunit of artificially truncated human cathepsin B mediates its nuclear targeting and contributes to cell viability." *BMC Cell Biol* 6(1): 16.
- Blackwell, T. K. and H. Weintraub (1990). "Differences and similarities in DNA-binding preferences of MyoD and E2A protein complexes revealed by binding site selection." *Science* 250(4984): 1104-1110.
- Borggreffe, T. and F. Oswald (2009). "The Notch signaling pathway: transcriptional regulation at Notch target genes." *Cell Mol Life Sci* 66(10): 1631-1646.
- Bouvard, V., R. Baan, K. Straif, Y. Grosse, B. Secretan, F. El Ghissassi, L. Benbrahim-Tallaa, N. Guha, C. Freeman, L. Galichet, V. Coglianò and W. H. O. I. A. f. R. o. C. M. W. Group (2009). "A review of human carcinogens--Part B: biological agents." *Lancet Oncol* 10(4): 321-322.
- Brandwein, J. M. (2015). "Targeting polo-like kinase 1 in acute myeloid leukemia." *Ther Adv Hematol* 6(2): 80-87.

- Brennan, I. M., U. Peters, T. M. Kapoor and A. F. Straight (2007). "Polo-like kinase controls vertebrate spindle elongation and cytokinesis." *PLoS One* 2(5): e409.
- Brooks, L., Q. Y. Yao, A. B. Rickinson and L. S. Young (1992). "Epstein-Barr virus latent gene transcription in nasopharyngeal carcinoma cells: coexpression of EBNA1, LMP1, and LMP2 transcripts." *J Virol* 66(5): 2689-2697.
- Burgstahler, R., B. Kempkes, K. Steube and M. Lipp (1995). "Expression of the chemokine receptor BLR2/EBI1 is specifically transactivated by Epstein-Barr virus nuclear antigen 2." *Biochem Biophys Res Commun* 215(2): 737-743.
- Burkard, M. E., C. L. Randall, S. Larochelle, C. Zhang, K. M. Shokat, R. P. Fisher and P. V. Jallepalli (2007). "Chemical genetics reveals the requirement for Polo-like kinase 1 activity in positioning RhoA and triggering cytokinesis in human cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(11): 4383-4388.
- Burkitt, D. (1958). "A sarcoma involving the jaws in African children." *Br J Surg* 46(197): 218-223.
- Burkitt, D. (1962). "A children's cancer dependent on climatic factors." *Nature* 194: 232-234.
- Burkitt, D. (1962). "A "tumour safari" in East and Central Africa." *Br J Cancer* 16: 379-386.
- Calender, A., M. Cordier, M. Billaud and G. M. Lenoir (1990). "Modulation of cellular gene expression in B lymphoma cells following in vitro infection by Epstein-Barr virus (EBV)." *Int J Cancer* 46(4): 658-663.
- Cameron, J. E., Q. Yin, C. Fewell, M. Lacey, J. McBride, X. Wang, Z. Lin, B. C. Schaefer and E. K. Flemington (2008). "Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 induces cellular MicroRNA miR-146a, a modulator of lymphocyte signaling pathways." *J Virol* 82(4): 1946-1958.
- Carroll, J. S., C. A. Meyer, J. Song, W. Li, T. R. Geistlinger, J. Eeckhoutte, A. S. Brodsky, E. K. Keeton, K. C. Fertuck, G. F. Hall, Q. Wang, S. Bekiranov, V. Sementchenko, E. A. Fox, P. A. Silver, T. R. Gingeras, X. S. Liu and M. Brown (2006). "Genome-wide analysis of estrogen receptor binding sites." *Nat Genet* 38(11): 1289-1297.
- Castel, D., P. Mourikis, S. J. Bartels, A. B. Brinkman, S. Tajbakhsh and H. G. Stunnenberg (2013). "Dynamic binding of RBPJ is determined by Notch signaling status." *Genes Dev* 27(9): 1059-1071.
- Castillo, J. J., B. E. Beltran, R. N. Miranda, S. Paydas, E. S. Winer and J. N. Butera (2011). "Epstein-barr virus-positive diffuse large B-cell lymphoma of the elderly: what we know so far." *Oncologist* 16(1): 87-96.
- Chabot, P. R., L. Raiola, M. Lussier-Price, T. Morse, G. Arseneault, J. Archambault and J. G. Omichinski (2014). "Structural and functional characterization of a complex between the acidic transactivation domain of EBNA2 and the Tfb1/p62 subunit of TFIIF." *PLoS Pathog* 10(3): e1004042.
- Chan, J. A., A. M. Krichevsky and K. S. Kosik (2005). "MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells." *Cancer Res* 65(14): 6029-6033.

- Chen, C., D. A. Ridzon, A. J. Broomer, Z. Zhou, D. H. Lee, J. T. Nguyen, M. Barbisin, N. L. Xu, V. R. Mahuvakar, M. R. Andersen, K. Q. Lao, K. J. Livak and K. J. Guegler (2005). "Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR." *Nucleic Acids Res* 33(20): e179.
- Chen, I. F., F. Ou-Yang, J. Y. Hung, J. C. Liu, H. Wang, S. C. Wang, M. F. Hou, G. N. Hortobagyi and M. C. Hung (2006). "AIM2 suppresses human breast cancer cell proliferation in vitro and mammary tumor growth in a mouse model." *Mol Cancer Ther* 5(1): 1-7.
- Cho, Y. W., T. Hong, S. Hong, H. Guo, H. Yu, D. Kim, T. Guszczynski, G. R. Dressler, T. D. Copeland, M. Kalkum and K. Ge (2007). "PTIP associates with MLL3- and MLL4-containing histone H3 lysine 4 methyltransferase complex." *J Biol Chem* 282(28): 20395-20406.
- Choi, B. H., M. Pagano, C. Huang and W. Dai (2014). "Cdh1, a substrate recruiting component of APC/C ubiquitin E3 ligase, specifically interacts with PTEN and promotes its removal from chromatin." *J Biol Chem*.
- Cohen, J. I. (1992). "A region of herpes simplex virus VP16 can substitute for a transforming domain of Epstein-Barr virus nuclear protein 2." *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(17): 8030-8034.
- Cohen, J. I. and E. Kieff (1991). "An Epstein-Barr virus nuclear protein 2 domain essential for transformation is a direct transcriptional activator." *J Virol* 65(11): 5880-5885.
- Cohen, J. I., F. Wang and E. Kieff (1991). "Epstein-Barr virus nuclear protein 2 mutations define essential domains for transformation and transactivation." *J Virol* 65(5): 2545-2554.
- Cohen, J. I., F. Wang, J. Mannick and E. Kieff (1989). "Epstein-Barr virus nuclear protein 2 is a key determinant of lymphocyte transformation." *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(23): 9558-9562.
- Cordier, M., A. Calender, M. Billaud, U. Zimmer, G. Rousselet, O. Pavlish, J. Banchereau, T. Tursz, G. Bornkamm and G. M. Lenoir (1990). "Stable transfection of Epstein-Barr virus (EBV) nuclear antigen 2 in lymphoma cells containing the EBV P3HR1 genome induces expression of B-cell activation molecules CD21 and CD23." *J Virol* 64(3): 1002-1013.
- Creyghton, M. P., A. W. Cheng, G. G. Welstead, T. Kooistra, B. W. Carey, E. J. Steine, J. Hanna, M. A. Lodato, G. M. Frampton, P. A. Sharp, L. A. Boyer, R. A. Young and R. Jaenisch (2010). "Histone H3K27ac separates active from poised enhancers and predicts developmental state." *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(50): 21931-21936.
- Delaglio, F., S. Grzesiek, G. W. Vuister, G. Zhu, J. Pfeifer and A. Bax (1995). "NMRPipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes." *J Biomol NMR* 6(3): 277-293.
- Dou, S., X. Zeng, P. Cortes, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, T. Honjo and L. D. Vales (1994). "The recombination signal sequence-binding protein RBP-2N functions as a transcriptional repressor." *Mol Cell Biol* 14(5): 3310-3319.
- Dufva, M., J. Flodin, A. Nerstedt, U. Ruetschi and L. Rymo (2002). "Epstein-Barr virus nuclear antigen 5 inhibits pre-mRNA cleavage and polyadenylation." *Nucleic Acids Res* 30(10): 2131-2143.

- Elowe, S., S. Hummer, A. Uldschmid, X. Li and E. A. Nigg (2007). "Tension-sensitive Plk1 phosphorylation on BubR1 regulates the stability of kinetochore microtubule interactions." *Genes Dev* 21(17): 2205-2219.
- Epstein, M. A., B. G. Achong and Y. M. Barr (1964). "Virus Particles in Cultured Lymphoblasts from Burkitt's Lymphoma." *Lancet* 1(7335): 702-703.
- Ersing, I., K. Bernhardt and B. E. Gewurz (2013). "NF-kappaB and IRF7 pathway activation by Epstein-Barr virus Latent Membrane Protein 1." *Viruses* 5(6): 1587-1606.
- Escribano-Diaz, C. and D. Durocher (2013). "DNA repair pathway choice--a PTIP of the hat to 53BP1." *EMBO Rep* 14(8): 665-666.
- Fahraeus, R., A. Jansson, A. Ricksten, A. Sjoblom and L. Rymo (1990). "Epstein-Barr virus-encoded nuclear antigen 2 activates the viral latent membrane protein promoter by modulating the activity of a negative regulatory element." *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(19): 7390-7394.
- Fairley, J. A., L. E. Mitchell, T. Berg, N. S. Kenneth, C. von Schubert, H. H. Sillje, R. H. Medema, E. A. Nigg and R. J. White (2012). "Direct regulation of tRNA and 5S rRNA gene transcription by Polo-like kinase 1." *Mol Cell* 45(4): 541-552.
- Fernandes-Alnemri, T., J. W. Yu, P. Datta, J. Wu and E. S. Alnemri (2009). "AIM2 activates the inflammasome and cell death in response to cytoplasmic DNA." *Nature* 458(7237): 509-513.
- Friberg, A., S. Thumann, J. Hennig, P. Zou, E. Nossner, P. D. Ling, M. Sattler and B. Kempkes (2015). "The EBNA-2 N-Terminal Transactivation Domain Folds into a Dimeric Structure Required for Target Gene Activation." *PLoS Pathog* 11(5): e1004910.
- Fu, Z., L. Malureanu, J. Huang, W. Wang, H. Li, J. M. van Deursen, D. J. Tindall and J. Chen (2008). "Plk1-dependent phosphorylation of FoxM1 regulates a transcriptional programme required for mitotic progression." *Nat Cell Biol* 10(9): 1076-1082.
- Fulci, V., S. Chiaretti, M. Goldoni, G. Azzalin, N. Carucci, S. Tavoraro, L. Castellano, A. Magrelli, F. Citarella, M. Messina, R. Maggio, N. Peragine, S. Santangelo, F. R. Mauro, P. Landgraf, T. Tuschl, D. B. Weir, M. Chien, J. J. Russo, J. Ju, R. Sheridan, C. Sander, M. Zavolan, A. Guarini, R. Foa and G. Macino (2007). "Quantitative technologies establish a novel microRNA profile of chronic lymphocytic leukemia." *Blood* 109(11): 4944-4951.
- Gandhi, M. K., J. T. Tellam and R. Khanna (2004). "Epstein-Barr virus-associated Hodgkin's lymphoma." *Br J Haematol* 125(3): 267-281.
- Ghosh, D. and E. Kieff (1990). "cis-acting regulatory elements near the Epstein-Barr virus latent-infection membrane protein transcriptional start site." *J Virol* 64(4): 1855-1858.
- Godshalk, S. E., S. Bhaduri-McIntosh and F. J. Slack (2008). "Epstein-Barr virus-mediated dysregulation of human microRNA expression." *Cell Cycle* 7(22): 3595-3600.
- Golsteyn, R. M., K. E. Mundt, A. M. Fry and E. A. Nigg (1995). "Cell cycle regulation of the activity and subcellular localization of Plk1, a human protein kinase implicated in mitotic spindle function." *J Cell Biol* 129(6): 1617-1628.

- Gondi, C. S. and J. S. Rao (2013). "Cathepsin B as a cancer target." *Expert Opin Ther Targets* 17(3): 281-291.
- Gordadze, A. V., C. W. Onunwor, R. Peng, D. Poston, E. Kremmer and P. D. Ling (2004). "EBNA2 amino acids 3 to 30 are required for induction of LMP-1 and immortalization maintenance." *J Virol* 78(8): 3919-3929.
- Grasser, F. A., P. Haiss, S. Gottel and N. Mueller-Lantzsch (1991). "Biochemical characterization of Epstein-Barr virus nuclear antigen 2A." *J Virol* 65(7): 3779-3788.
- Grossman, S. R., E. Johannsen, X. Tong, R. Yalamanchili and E. Kieff (1994). "The Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 transactivator is directed to response elements by the J kappa recombination signal binding protein." *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(16): 7568-7572.
- Grundhoff, A. T., E. Kremmer, O. Tureci, A. Glieden, C. Gindorf, J. Atz, N. Mueller-Lantzsch, W. H. Schubach and F. A. Grasser (1999). "Characterization of DP103, a novel DEAD box protein that binds to the Epstein-Barr virus nuclear proteins EBNA2 and EBNA3C." *J Biol Chem* 274(27): 19136-19144.
- Guito, J. and D. M. Lukac (2012). "KSHV Rta Promoter Specification and Viral Reactivation." *Front Microbiol* 3: 30.
- Guntert, P. (2004). "Automated NMR structure calculation with CYANA." *Methods Mol Biol* 278: 353-378.
- Gustafsson, J. A. (2000). "Novel aspects of estrogen action." *J Soc Gynecol Investig* 7(1 Suppl): S8-9.
- Haller, K., Y. Wu, E. Derow, I. Schmitt, K. T. Jeang and R. Grassmann (2002). "Physical interaction of human T-cell leukemia virus type 1 Tax with cyclin-dependent kinase 4 stimulates the phosphorylation of retinoblastoma protein." *Mol Cell Biol* 22(10): 3327-3338.
- Hammerschmidt, W. and B. Sugden (1989). "Genetic analysis of immortalizing functions of Epstein-Barr virus in human B lymphocytes." *Nature* 340(6232): 393-397.
- Harada, S., R. Yalamanchili and E. Kieff (2001). "Epstein-Barr virus nuclear protein 2 has at least two N-terminal domains that mediate self-association." *J Virol* 75(5): 2482-2487.
- Harth-Hertle, M. L., B. A. Scholz, F. Erhard, L. V. Glaser, L. Dolken, R. Zimmer and B. Kempkes (2013). "Inactivation of intergenic enhancers by EBNA3A initiates and maintains polycomb signatures across a chromatin domain encoding CXCL10 and CXCL9." *PLoS Pathog* 9(9): e1003638.
- Hateboer, G., A. Gennissen, Y. F. Ramos, R. M. Kerkhoven, V. Sonntag-Buck, H. G. Stunnenberg and R. Bernards (1995). "BS69, a novel adenovirus E1A-associated protein that inhibits E1A transactivation." *EMBO J* 14(13): 3159-3169.
- Hauck, S. M., J. Dietter, R. L. Kramer, F. Hofmaier, J. K. Zipplies, B. Amann, A. Feuchtinger, C. A. Deeg and M. Ueffing (2010). "Deciphering membrane-associated molecular processes in target tissue of autoimmune uveitis by label-free quantitative mass spectrometry." *Mol Cell Proteomics* 9(10): 2292-2305.

- Heintzman, N. D., G. C. Hon, R. D. Hawkins, P. Kheradpour, A. Stark, L. F. Harp, Z. Ye, L. K. Lee, R. K. Stuart, C. W. Ching, K. A. Ching, J. E. Antosiewicz-Bourget, H. Liu, X. Zhang, R. D. Green, V. V. Lobanenko, R. Stewart, J. A. Thomson, G. E. Crawford, M. Kellis and B. Ren (2009). "Histone modifications at human enhancers reflect global cell-type-specific gene expression." *Nature* 459(7243): 108-112.
- Henkel, T., P. D. Ling, S. D. Hayward and M. G. Peterson (1994). "Mediation of Epstein-Barr virus EBNA2 transactivation by recombination signal-binding protein J kappa." *Science* 265(5168): 92-95.
- Henle, W., V. Diehl, G. Kohn, H. Zur Hausen and G. Henle (1967). "Herpes-type virus and chromosome marker in normal leukocytes after growth with irradiated Burkitt cells." *Science* 157(3792): 1064-1065.
- Hislop, A. D., G. S. Taylor, D. Sauce and A. B. Rickinson (2007). "Cellular responses to viral infection in humans: lessons from Epstein-Barr virus." *Annu Rev Immunol* 25: 587-617.
- Hochberg, D., J. M. Middeldorp, M. Catalina, J. L. Sullivan, K. Luzuriaga and D. A. Thorley-Lawson (2004). "Demonstration of the Burkitt's lymphoma Epstein-Barr virus phenotype in dividing latently infected memory cells in vivo." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(1): 239-244.
- Horvath, G. C. and W. H. Schubach (1993). "Identification of the Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 transactivation domain." *Biochem Biophys Res Commun* 191(1): 196-200.
- Hsieh, J. J. and S. D. Hayward (1995). "Masking of the CBF1/RBPJ kappa transcriptional repression domain by Epstein-Barr virus EBNA2." *Science* 268(5210): 560-563.
- Humme, S., G. Reisbach, R. Feederle, H. J. Delecluse, K. Bousset, W. Hammerschmidt and A. Schepers (2003). "The EBV nuclear antigen 1 (EBNA1) enhances B cell immortalization several thousandfold." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(19): 10989-10994.
- Iorio, M. V., M. Ferracin, C. G. Liu, A. Veronese, R. Spizzo, S. Sabbioni, E. Magri, M. Pedriali, M. Fabbri, M. Campiglio, S. Menard, J. P. Palazzo, A. Rosenberg, P. Musiani, S. Volinia, I. Nenci, G. A. Calin, P. Querzoli, M. Negrini and C. M. Croce (2005). "MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer." *Cancer Res* 65(16): 7065-7070.
- Jiang, L., Y. Huang, M. Deng, T. Liu, W. Lai and X. Ye (2013). "Polo-like kinase 1 inhibits the activity of positive transcription elongation factor of RNA Pol II b (P-TEFb)." *PLoS One* 8(8): e72289.
- Jin, F., Y. Li, J. R. Dixon, S. Selvaraj, Z. Ye, A. Y. Lee, C. A. Yen, A. D. Schmitt, C. A. Espinoza and B. Ren (2013). "A high-resolution map of the three-dimensional chromatin interactome in human cells." *Nature* 503(7475): 290-294.
- Jochner, N., D. Eick, U. Zimmer-Strobl, M. Pawlita, G. W. Bornkamm and B. Kempkes (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(2): 375-382.

- Johannsen, E., E. Koh, G. Mosialos, X. Tong, E. Kieff and S. R. Grossman (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(1): 253-262.
- Johansson, P., A. Jansson, U. Ruetschi and L. Rymo (2009). "Nuclear factor-kappaB binds to the Epstein-Barr Virus LMP1 promoter and upregulates its expression." *J Virol* 83(3): 1393-1401.
- Johnson, B. A. and R. A. Blevins (1994). "NMR View: A computer program for the visualization and analysis of NMR data." *J Biomol NMR* 4(5): 603-614.
- Kaiser, C., G. Laux, D. Eick, N. Jochner, G. W. Bornkamm and B. Kempkes (1999). "The proto-oncogene c-myc is a direct target gene of Epstein-Barr virus nuclear antigen 2." *J Virol* 73(5): 4481-4484.
- Kavathas, P., F. H. Bach and R. DeMars (1980). "Gamma ray-induced loss of expression of HLA and glyoxalase I alleles in lymphoblastoid cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 77(7): 4251-4255.
- Keegan, L., G. Gill and M. Ptashne (1986). "Separation of DNA binding from the transcription-activating function of a eukaryotic regulatory protein." *Science* 231(4739): 699-704.
- Kempkes, B. and P. D. Ling (2015). "EBNA2 and Its Coactivator EBNA-LP." *Curr Top Microbiol Immunol* 391: 35-59.
- Kempkes, B., M. Pawlita, U. Zimmer-Strobl, G. Eissner, G. Laux and G. W. Bornkamm (1995). "Epstein-Barr virus nuclear antigen 2-estrogen receptor fusion proteins transactivate viral and cellular genes and interact with RBP-J kappa in a conditional fashion." *Virology* 214(2): 675-679.
- Kempkes, B. and E. S. Robertson (2015). "Epstein-Barr virus latency: current and future perspectives." *Curr Opin Virol* 14: 138-144.
- Kempkes, B., D. Spitkovsky, P. Jansen-Durr, J. W. Ellwart, E. Kremmer, H. J. Delecluse, C. Rottenberger, G. W. Bornkamm and W. Hammerschmidt (1995). "B-cell proliferation and induction of early G1-regulating proteins by Epstein-Barr virus mutants conditional for EBNA2." *EMBO J* 14(1): 88-96.
- Kent, W. J., C. W. Sugnet, T. S. Furey, K. M. Roskin, T. H. Pringle, A. M. Zahler and D. Haussler (2002). "The human genome browser at UCSC." *Genome Res* 12(6): 996-1006.
- Kim, Y. K. and V. N. Kim (2007). "Processing of intronic microRNAs." *EMBO J* 26(3): 775-783.
- Klein, G. (1983). "Specific chromosomal translocations and the genesis of B-cell-derived tumors in mice and men." *Cell* 32(2): 311-315.
- Kovall, R. A. and W. A. Hendrickson (2004). "Crystal structure of the nuclear effector of Notch signaling, CSL, bound to DNA." *EMBO J* 23(17): 3441-3451.
- Krejci, A. and S. Bray (2007). "Notch activation stimulates transient and selective binding of Su(H)/CSL to target enhancers." *Genes Dev* 21(11): 1322-1327.

- Krichevsky, A. M. and G. Gabriely (2009). "miR-21: a small multi-faceted RNA." *J Cell Mol Med* 13(1): 39-53.
- Kueng, S., B. Hegemann, B. H. Peters, J. J. Lipp, A. Schleiffer, K. Mechtler and J. M. Peters (2006). "Wapl controls the dynamic association of cohesin with chromatin." *Cell* 127(5): 955-967.
- Kuppers, R. (2003). "B cells under influence: transformation of B cells by Epstein-Barr virus." *Nat Rev Immunol* 3(10): 801-812.
- Kwan, A. H., M. Mobli, P. R. Gooley, G. F. King and J. P. Mackay (2011). "Macromolecular NMR spectroscopy for the non-spectroscopist." *FEBS J* 278(5): 687-703.
- Kwiatkowski, B., S. Y. Chen and W. H. Schubach (2004). "CKII site in Epstein-Barr virus nuclear protein 2 controls binding to hSNF5/Ini1 and is important for growth transformation." *J Virol* 78(11): 6067-6072.
- Kwiatkowski, B. A., T. Ragoczy, J. Ehly and W. H. Schubach (2004). "Identification and cloning of a novel chromatin-associated protein partner of Epstein-Barr nuclear protein 2." *Exp Cell Res* 300(1): 223-233.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* 227(5259): 680-685.
- Lai, E. C. (2002). "Keeping a good pathway down: transcriptional repression of Notch pathway target genes by CSL proteins." *EMBO Rep* 3(9): 840-845.
- Lane, H. A. and E. A. Nigg (1996). "Antibody microinjection reveals an essential role for human polo-like kinase 1 (Plk1) in the functional maturation of mitotic centrosomes." *J Cell Biol* 135(6 Pt 2): 1701-1713.
- Laskowski, R. A., D. S. Moss and J. M. Thornton (1993). "Main-chain bond lengths and bond angles in protein structures." *J Mol Biol* 231(4): 1049-1067.
- Laux, G., B. Adam, L. J. Strobl and F. Moreau-Gachelin (1994). "The Spi-1/PU.1 and Spi-B ets family transcription factors and the recombination signal binding protein RBP-J kappa interact with an Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 responsive cis-element." *EMBO J* 13(23): 5624-5632.
- Laux, G., F. Dugrillon, C. Eckert, B. Adam, U. Zimmer-Strobl and G. W. Bornkamm (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(11): 6947-6958.
- Leao, M., E. Anderton, M. Wade, K. Meekings and M. J. Allday (2007). "Epstein-barr virus-induced resistance to drugs that activate the mitotic spindle assembly checkpoint in Burkitt's lymphoma cells." *J Virol* 81(1): 248-260.
- Lee, J. M., K. H. Lee, M. Weidner, B. A. Osborne and S. D. Hayward (2002). "Epstein-Barr virus EBNA2 blocks Nur77- mediated apoptosis." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(18): 11878-11883.

- Lenart, P., M. Petronczki, M. Steegmaier, B. Di Fiore, J. J. Lipp, M. Hoffmann, W. J. Rettig, N. Kraut and J. M. Peters (2007). "The small-molecule inhibitor BI 2536 reveals novel insights into mitotic roles of polo-like kinase 1." *Curr Biol* 17(4): 304-315.
- Li, G., X. Ruan, R. K. Auerbach, K. S. Sandhu, M. Zheng, P. Wang, H. M. Poh, Y. Goh, J. Lim, J. Zhang, H. S. Sim, S. Q. Peh, F. H. Mulawadi, C. T. Ong, Y. L. Orlov, S. Hong, Z. Zhang, S. Landt, D. Raha, G. Euskirchen, C. L. Wei, W. Ge, H. Wang, C. Davis, K. I. Fisher-Aylor, A. Mortazavi, M. Gerstein, T. Gingeras, B. Wold, Y. Sun, M. J. Fullwood, E. Cheung, E. Liu, W. K. Sung, M. Snyder and Y. Ruan (2012). "Extensive promoter-centered chromatin interactions provide a topological basis for transcription regulation." *Cell* 148(1-2): 84-98.
- Li, W., H. Katoh, L. Wang, X. Yu, Z. Du, X. Yan, P. Zheng and Y. Liu (2013). "FOXP3 regulates sensitivity of cancer cells to irradiation by transcriptional repression of BRCA1." *Cancer Res* 73(7): 2170-2180.
- Liang, H., A. Esposito, S. De, S. Ber, P. Collin, U. Surana and A. R. Venkitaraman (2014). "Homeostatic control of polo-like kinase-1 engenders non-genetic heterogeneity in G2 checkpoint fidelity and timing." *Nat Commun* 5: 4048.
- Lin, Z., X. Wang, M. J. Strong, M. Concha, M. Baddoo, G. Xu, C. Baribault, C. Fewell, W. Hulme, D. Hedges, C. M. Taylor and E. K. Flemington (2013). "Whole-genome sequencing of the Akata and Mutu Epstein-Barr virus strains." *J Virol* 87(2): 1172-1182.
- Ling, P. D., J. J. Hsieh, I. K. Ruf, D. R. Rawlins and S. D. Hayward (1994). "EBNA-2 upregulation of Epstein-Barr virus latency promoters and the cellular CD23 promoter utilizes a common targeting intermediate, CBF1." *J Virol* 68(9): 5375-5383.
- Ling, P. D., D. R. Rawlins and S. D. Hayward (1993). "The Epstein-Barr virus immortalizing protein EBNA-2 is targeted to DNA by a cellular enhancer-binding protein." *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(20): 9237-9241.
- Linge, J. P., S. I. O'Donoghue and M. Nilges (2001). "Automated assignment of ambiguous nuclear overhauser effects with ARIA." *Methods Enzymol* 339: 71-90.
- Linnstaedt, S. D., E. Gottwein, R. L. Skalsky, M. A. Luftig and B. R. Cullen (2010). "Virally induced cellular microRNA miR-155 plays a key role in B-cell immortalization by Epstein-Barr virus." *J Virol* 84(22): 11670-11678.
- Liu, C. D., Y. L. Chen, Y. L. Min, B. Zhao, C. P. Cheng, M. S. Kang, S. J. Chiu, E. Kieff and C. W. Peng (2012). "The nuclear chaperone nucleophosmin escorts an Epstein-Barr Virus nuclear antigen to establish transcriptional cascades for latent infection in human B cells." *PLoS Pathog* 8(12): e1003084.
- Longnecker, R. M., E. Kieff and I. J. Cohen (2013). Epstein-Barr Virus. *Fields Virology*. D. M. Knipe and P. Howley, Lippincott Williams & Wilkins. 2: 1898-1955.
- Lorenzon-Ojea, A. R., W. Caldeira, A. F. Ribeiro, S. J. Fisher, C. R. Guzzo and E. Bevilacqua (2014). "Stromal cell derived factor-2 (Sdf2): a novel protein expressed in mouse." *Int J Biochem Cell Biol* 53: 262-270.

- Lu, F., A. Weidmer, C. G. Liu, S. Volinia, C. M. Croce and P. M. Lieberman (2008). "Epstein-Barr virus-induced miR-155 attenuates NF-kappaB signaling and stabilizes latent virus persistence." *J Virol* 82(21): 10436-10443.
- Maeda, E., M. Akahane, S. Kiryu, N. Kato, T. Yoshikawa, N. Hayashi, S. Aoki, M. Minami, H. Uozaki, M. Fukayama and K. Ohtomo (2009). "Spectrum of Epstein-Barr virus-related diseases: a pictorial review." *Jpn J Radiol* 27(1): 4-19.
- Maier, S., M. Santak, A. Mantik, K. Grabusic, E. Kremmer, W. Hammerschmidt and B. Kempkes (2005). "A somatic knockout of CBF1 in a human B-cell line reveals that induction of CD21 and CCR7 by EBNA-2 is strictly CBF1 dependent and that downregulation of immunoglobulin M is partially CBF1 independent." *J Virol* 79(14): 8784-8792.
- Maier, S., G. Staffler, A. Hartmann, J. Hock, K. Henning, K. Grabusic, R. Mailhammer, R. Hoffmann, M. Wilmanns, R. Lang, J. Mages and B. Kempkes (2006). "Cellular target genes of Epstein-Barr virus nuclear antigen 2." *J Virol* 80(19): 9761-9771.
- Manke, I. A., D. M. Lowery, A. Nguyen and M. B. Yaffe (2003). "BRCT repeats as phosphopeptide-binding modules involved in protein targeting." *Science* 302(5645): 636-639.
- Manolov, G. and Y. Manolova (1972). "Marker band in one chromosome 14 from Burkitt lymphomas." *Nature* 237(5349): 33-34.
- Mapp, A. K. and A. Z. Ansari (2007). "A TAD further: exogenous control of gene activation." *ACS Chem Biol* 2(1): 62-75.
- McGuffin, L. J., K. Bryson and D. T. Jones (2000). "The PSIPRED protein structure prediction server." *Bioinformatics* 16(4): 404-405.
- McKinley, K. L. and I. M. Cheeseman (2014). "Polo-like kinase 1 licenses CENP-A deposition at centromeres." *Cell* 158(2): 397-411.
- Mei, G., A. Di Venere, N. Rosato and A. Finazzi-Agro (2005). "The importance of being dimeric." *FEBS J* 272(1): 16-27.
- Menezes, J., W. Leibold, G. Klein and G. Clements (1975). "Establishment and characterization of an Epstein-Barr virus (EBC)-negative lymphoblastoid B cell line (BJA-B) from an exceptional, EBV-genome-negative African Burkitt's lymphoma." *Biomedicine* 22(4): 276-284.
- Metzler, M., M. Wilda, K. Busch, S. Viehmann and A. Borkhardt (2004). "High expression of precursor microRNA-155/BIC RNA in children with Burkitt lymphoma." *Genes Chromosomes Cancer* 39(2): 167-169.
- Mifsud, B., F. Tavares-Cadete, A. N. Young, R. Sugar, S. Schoenfelder, L. Ferreira, S. W. Wingett, S. Andrews, W. Grey, P. A. Ewels, B. Herman, S. Happe, A. Higgs, E. LeProust, G. A. Follows, P. Fraser, N. M. Luscombe and C. S. Osborne (2015). "Mapping long-range promoter contacts in human cells with high-resolution capture Hi-C." *Nat Genet* 47(6): 598-606.

- Mogilyansky, E. and I. Rigoutsos (2013). "The miR-17/92 cluster: a comprehensive update on its genomics, genetics, functions and increasingly important and numerous roles in health and disease." *Cell Death Differ* 20(12): 1603-1614.
- Mohan, J., J. Dement-Brown, S. Maier, T. Ise, B. Kempkes and M. Tolnay (2006). "Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 induces FcRH5 expression through CBF1." *Blood* 107(11): 4433-4439.
- Moretta, L. and A. Moretta (2004). "Killer immunoglobulin-like receptors." *Curr Opin Immunol* 16(5): 626-633.
- Morscio, J., D. Dierickx and T. Tousseyn (2013). "Molecular pathogenesis of B-cell posttransplant lymphoproliferative disorder: what do we know so far?" *Clin Dev Immunol* 2013: 150835.
- Motsch, N., T. Pfuhl, J. Mrazek, S. Barth and F. A. Grasser (2007). "Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1 (LMP1) induces the expression of the cellular microRNA miR-146a." *RNA Biol* 4(3): 131-137.
- Mrazek, J., S. B. Kreutmayer, F. A. Grasser, N. Polacek and A. Huttenhofer (2007). "Subtractive hybridization identifies novel differentially expressed ncRNA species in EBV-infected human B cells." *Nucleic Acids Res* 35(10): e73.
- Nakajima, H., F. Toyoshima-Morimoto, E. Taniguchi and E. Nishida (2003). "Identification of a consensus motif for Plk (Polo-like kinase) phosphorylation reveals Myt1 as a Plk1 substrate." *J Biol Chem* 278(28): 25277-25280.
- Nam, Y., P. Sliz, W. S. Pear, J. C. Aster and S. C. Blacklow (2007). "Cooperative assembly of higher-order Notch complexes functions as a switch to induce transcription." *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(7): 2103-2108.
- Narducci, M. G., E. Pescarmona, C. Lazzeri, S. Signoretti, A. M. Lavinia, D. Remotti, E. Scala, C. D. Baroni, A. Stoppacciaro, C. M. Croce and G. Russo (2000). "Regulation of TCL1 expression in B- and T-cell lymphomas and reactive lymphoid tissues." *Cancer Res* 60(8): 2095-2100.
- Nazarov, P. V., S. E. Reinsbach, A. Muller, N. Nicot, D. Philippidou, L. Vallar and S. Kreis (2013). "Interplay of microRNAs, transcription factors and target genes: linking dynamic expression changes to function." *Nucleic Acids Res* 41(5): 2817-2831.
- Neef, R., U. Gruneberg, R. Kopajtich, X. Li, E. A. Nigg, H. Sillje and F. A. Barr (2007). "Choice of Plk1 docking partners during mitosis and cytokinesis is controlled by the activation state of Cdk1." *Nat Cell Biol* 9(4): 436-444.
- Neilson, J. R., G. X. Zheng, C. B. Burge and P. A. Sharp (2007). "Dynamic regulation of miRNA expression in ordered stages of cellular development." *Genes Dev* 21(5): 578-589.
- Neri, D., T. Szyperski, G. Otting, H. Senn and K. Wuthrich (1989). "Stereospecific nuclear magnetic resonance assignments of the methyl groups of valine and leucine in the DNA-binding domain of the 434 repressor by biosynthetically directed fractional ¹³C labeling." *Biochemistry* 28(19): 7510-7516.

- Oh, J. K. and E. Weiderpass (2014). "Infection and cancer: global distribution and burden of diseases." *Ann Glob Health* 80(5): 384-392.
- Ohosone, Y., T. Mimori, A. Griffith, M. Akizuki, M. Homma, J. Craft and J. A. Hardin (1989). "Molecular cloning of cDNA encoding Sm autoantigen: derivation of a cDNA for a B polypeptide of the U series of small nuclear ribonucleoprotein particles." *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(11): 4249-4253.
- Ok, C. Y., L. Li and K. H. Young (2015). "EBV-driven B-cell lymphoproliferative disorders: from biology, classification and differential diagnosis to clinical management." *Exp Mol Med* 47: e132.
- Ok, C. Y., T. G. Papathomas, L. J. Medeiros and K. H. Young (2013). "EBV-positive diffuse large B-cell lymphoma of the elderly." *Blood* 122(3): 328-340.
- Oswald, F., M. Winkler, Y. Cao, K. Astrahantseff, S. Bourteele, W. Knochel and T. Borggrefe (2005). "RBP-Jkappa/SHARP recruits CtIP/CtBP corepressors to silence Notch target genes." *Mol Cell Biol* 25(23): 10379-10390.
- Pan, S. H., C. C. Tai, C. S. Lin, W. B. Hsu, S. F. Chou, C. C. Lai, J. Y. Chen, H. F. Tien, F. Y. Lee and W. B. Wang (2009). "Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 disrupts mitotic checkpoint and causes chromosomal instability." *Carcinogenesis* 30(2): 366-375.
- Patel, S. R., D. Kim, I. Levitan and G. R. Dressler (2007). "The BRCT-domain containing protein PTIP links PAX2 to a histone H3, lysine 4 methyltransferase complex." *Dev Cell* 13(4): 580-592.
- Pekarsky, Y., U. Santanam, A. Cimmino, A. Palamarchuk, A. Efanov, V. Maximov, S. Volinia, H. Alder, C. G. Liu, L. Rassenti, G. A. Calin, J. P. Hagan, T. Kipps and C. M. Croce (2006). "Tcl1 expression in chronic lymphocytic leukemia is regulated by miR-29 and miR-181." *Cancer Res* 66(24): 11590-11593.
- Peng, C. W., B. Zhao and E. Kieff (2004). "Four EBNA2 domains are important for EBNA1P coactivation." *J Virol* 78(20): 11439-11442.
- Peng, R., A. V. Gordadze, E. M. Fuentes Panana, F. Wang, J. Zong, G. S. Hayward, J. Tan and P. D. Ling (2000). "Sequence and functional analysis of EBNA-LP and EBNA2 proteins from nonhuman primate lymphocryptoviruses." *J Virol* 74(1): 379-389.
- Peng, R., S. C. Moses, J. Tan, E. Kremmer and P. D. Ling (2005). "The Epstein-Barr virus EBNA-LP protein preferentially coactivates EBNA2-mediated stimulation of latent membrane proteins expressed from the viral divergent promoter." *J Virol* 79(7): 4492-4505.
- Petronczki, M., M. Glotzer, N. Kraut and J. M. Peters (2007). "Polo-like kinase 1 triggers the initiation of cytokinesis in human cells by promoting recruitment of the RhoGEF Ect2 to the central spindle." *Dev Cell* 12(5): 713-725.
- Piskacek, S., M. Gregor, M. Nemethova, M. Grabner, P. Kovarik and M. Piskacek (2007). "Nine-amino-acid transactivation domain: establishment and prediction utilities." *Genomics* 89(6): 756-768.

- Pope, J. H., M. K. Horne and W. Scott (1968). "Transformation of foetal human leukocytes in vitro by filtrates of a human leukaemic cell line containing herpes-like virus." *Int J Cancer* 3(6): 857-866.
- Portal, D., H. Zhou, B. Zhao, P. V. Kharchenko, E. Lowry, L. Wong, J. Quackenbush, D. Holloway, S. Jiang, Y. Lu and E. Kieff (2013). "Epstein-Barr virus nuclear antigen leader protein localizes to promoters and enhancers with cell transcription factors and EBNA2." *Proc Natl Acad Sci U S A* 110(46): 18537-18542.
- Rae, J. M., M. D. Johnson, J. O. Scheys, K. E. Cordero, J. M. Larios and M. E. Lippman (2005). "GREB 1 is a critical regulator of hormone dependent breast cancer growth." *Breast Cancer Res Treat* 92(2): 141-149.
- Ramalingam, P., J. K. Palanichamy, A. Singh, P. Das, M. Bhagat, M. A. Kassab, S. Sinha and P. Chattopadhyay (2014). "Biogenesis of intronic miRNAs located in clusters by independent transcription and alternative splicing." *RNA* 20(1): 76-87.
- Renner, A. G., C. Dos Santos, C. Recher, C. Bailly, L. Creancier, A. Kruczynski, B. Payrastre and S. Manenti (2009). "Polo-like kinase 1 is overexpressed in acute myeloid leukemia and its inhibition preferentially targets the proliferation of leukemic cells." *Blood* 114(3): 659-662.
- Riley, K. J., G. S. Rabinowitz, T. A. Yario, J. M. Luna, R. B. Darnell and J. A. Steitz (2012). "EBV and human microRNAs co-target oncogenic and apoptotic viral and human genes during latency." *EMBO J* 31(9): 2207-2221.
- Robertson, K. D., A. Manns, L. J. Swinnen, J. C. Zong, M. L. Gulley and R. F. Ambinder (1996). "CpG methylation of the major Epstein-Barr virus latency promoter in Burkitt's lymphoma and Hodgkin's disease." *Blood* 88(8): 3129-3136.
- Rooney, C., J. G. Howe, S. H. Speck and G. Miller (1989). "Influence of Burkitt's lymphoma and primary B cells on latent gene expression by the nonimmortalizing P3J-HR-1 strain of Epstein-Barr virus." *J Virol* 63(4): 1531-1539.
- Rooney, C. M., M. Rowe, A. B. Rickinson, G. M. Lenoir, D. M. Moss and M. A. Epstein (1985). "Endemic and sporadic cases of Epstein-Barr virus-positive Burkitt's lymphoma: immunological characterization of derived cell lines." *Haematol Blood Transfus* 29: 308-311.
- Rosato, P., E. Anastasiadou, N. Garg, D. Lenze, F. Boccellato, S. Vincenti, M. Severa, E. M. Coccia, R. Bigi, M. Cirone, E. Ferretti, A. F. Campese, M. Hummel, L. Frati, C. Presutti, A. Faggioni and P. Trivedi (2012). "Differential regulation of miR-21 and miR-146a by Epstein-Barr virus-encoded EBNA2." *Leukemia* 26(11): 2343-2352.
- Rowe, M., D. T. Rowe, C. D. Gregory, L. S. Young, P. J. Farrell, H. Rupani and A. B. Rickinson (1987). "Differences in B cell growth phenotype reflect novel patterns of Epstein-Barr virus latent gene expression in Burkitt's lymphoma cells." *EMBO J* 6(9): 2743-2751.
- Saha, A. and E. S. Robertson (2011). "Epstein-Barr virus-associated B-cell lymphomas: pathogenesis and clinical outcomes." *Clin Cancer Res* 17(10): 3056-3063.

- Sakai, T., Y. Taniguchi, K. Tamura, S. Minoguchi, T. Fukuhara, L. J. Strobl, U. Zimmer-Strobl, G. W. Bornkamm and T. Honjo (1998). "Functional replacement of the intracellular region of the Notch1 receptor by Epstein-Barr virus nuclear antigen 2." *J Virol* 72(7): 6034-6039.
- Schlager, S., S. H. Speck and M. Woisetschlager (1996). "Transcription of the Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 (EBNA1) gene occurs before induction of the BCR2 (Cp) EBNA gene promoter during the initial stages of infection in B cells." *J Virol* 70(6): 3561-3570.
- Seki, A., J. A. Coppinger, C. Y. Jang, J. R. Yates and G. Fang (2008). "Bora and the kinase Aurora a cooperatively activate the kinase Plk1 and control mitotic entry." *Science* 320(5883): 1655-1658.
- Selcuklu, S. D., M. T. Donoghue and C. Spillane (2009). "miR-21 as a key regulator of oncogenic processes." *Biochem Soc Trans* 37(Pt 4): 918-925.
- Shen, Y., F. Delaglio, G. Cornilescu and A. Bax (2009). "TALOS+: a hybrid method for predicting protein backbone torsion angles from NMR chemical shifts." *J Biomol NMR* 44(4): 213-223.
- Shimizu, K., P. Y. Bourillot, S. J. Nielsen, A. M. Zorn and J. B. Gurdon (2001). "Swift is a novel BRCT domain coactivator of Smad2 in transforming growth factor beta signaling." *Mol Cell Biol* 21(12): 3901-3912.
- Sjoberg, A., A. Jansson, W. Yang, S. Lain, T. Nilsson and L. Rymo (1995). "PU box-binding transcription factors and a POU domain protein cooperate in the Epstein-Barr virus (EBV) nuclear antigen 2-induced transactivation of the EBV latent membrane protein 1 promoter." *J Gen Virol* 76 (Pt 11): 2679-2692.
- Skalsky, R. L., D. L. Corcoran, E. Gottwein, C. L. Frank, D. Kang, M. Hafner, J. D. Nusbaum, R. Feederle, H. J. Delecluse, M. A. Luftig, T. Tuschl, U. Ohler and B. R. Cullen (2012). "The viral and cellular microRNA targetome in lymphoblastoid cell lines." *PLoS Pathog* 8(1): e1002484.
- Smith, A., D. Howell, R. Patmore, A. Jack and E. Roman (2011). "Incidence of haematological malignancy by sub-type: a report from the Haematological Malignancy Research Network." *Br J Cancer* 105(11): 1684-1692.
- Spencer, C. A. and M. Groudine (1991). "Control of c-myc regulation in normal and neoplastic cells." *Adv Cancer Res* 56: 1-48.
- Spender, L. C., G. H. Cornish, B. Rowland, B. Kempkes and P. J. Farrell (2001). "Direct and indirect regulation of cytokine and cell cycle proteins by EBNA-2 during Epstein-Barr virus infection." *J Virol* 75(8): 3537-3546.
- Spender, L. C., G. H. Cornish, A. Sullivan and P. J. Farrell (2002). "Expression of transcription factor AML-2 (RUNX3, CBF(alpha)-3) is induced by Epstein-Barr virus EBNA-2 and correlates with the B-cell activation phenotype." *J Virol* 76(10): 4919-4927.
- Spender, L. C., W. Lucchesi, G. Bodelon, A. Bilancio, C. E. Karstegl, T. Asano, O. Dittrich-Breiholz, M. Kracht, B. Vanhaesebroeck and P. J. Farrell (2006). "Cell target genes of Epstein-Barr virus transcription factor EBNA-2: induction of the p53alpha regulatory

- subunit of PI3-kinase and its role in survival of EREB2.5 cells." *J Gen Virol* 87(Pt 10): 2859-2867.
- Strobl, L. J., H. Hofelmayr, C. Stein, G. Marschall, M. Brielmeier, G. Laux, G. W. Bornkamm and U. Zimmer-Strobl (1997). "Both Epstein-Barr viral nuclear antigen 2 (EBNA2) and activated Notch1 transactivate genes by interacting with the cellular protein RBP-J kappa." *Immunobiology* 198(1-3): 299-306.
- Sumara, I., J. F. Gimenez-Abian, D. Gerlich, T. Hirota, C. Kraft, C. de la Torre, J. Ellenberg and J. M. Peters (2004). "Roles of polo-like kinase 1 in the assembly of functional mitotic spindles." *Curr Biol* 14(19): 1712-1722.
- Tao, T., Y. Wang, H. Luo, L. Yao, L. Wang, J. Wang, W. Yan, J. Zhang, H. Wang, Y. Shi, Y. Yin, T. Jiang, C. Kang, N. Liu and Y. You (2013). "Involvement of FOS-mediated miR-181b/miR-21 signalling in the progression of malignant gliomas." *Eur J Cancer* 49(14): 3055-3063.
- Tedelind, S., K. Poliakova, A. Valeta, R. Hunegnaw, E. L. Yemanaberhan, N. E. Heldin, J. Kurebayashi, E. Weber, N. Kopitar-Jerala, B. Turk, M. Bogyo and K. Brix (2010). "Nuclear cysteine cathepsin variants in thyroid carcinoma cells." *Biol Chem* 391(8): 923-935.
- Thorley-Lawson, D. A. (2001). "Epstein-Barr virus: exploiting the immune system." *Nat Rev Immunol* 1(1): 75-82.
- Tong, X., R. Drapkin, D. Reinberg and E. Kieff (1995). "The 62- and 80-kDa subunits of transcription factor IIH mediate the interaction with Epstein-Barr virus nuclear protein 2." *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(8): 3259-3263.
- Tong, X., R. Drapkin, R. Yalamanchili, G. Mosialos and E. Kieff (1995). "The Epstein-Barr virus nuclear protein 2 acidic domain forms a complex with a novel cellular coactivator that can interact with TFIIIE." *Mol Cell Biol* 15(9): 4735-4744.
- Tong, X., F. Wang, C. J. Thut and E. Kieff (1995). "The Epstein-Barr virus nuclear protein 2 acidic domain can interact with TFIIB, TAF40, and RPA70 but not with TATA-binding protein." *J Virol* 69(1): 585-588.
- Truax, A. D. and S. F. Greer (2012). "ChIP and Re-ChIP assays: investigating interactions between regulatory proteins, histone modifications, and the DNA sequences to which they bind." *Methods Mol Biol* 809: 175-188.
- Tsui, S. and W. H. Schubach (1994). "Epstein-Barr virus nuclear protein 2A forms oligomers in vitro and in vivo through a region required for B-cell transformation." *J Virol* 68(7): 4287-4294.
- Tun, T., Y. Hamaguchi, N. Matsunami, T. Furukawa, T. Honjo and M. Kawaichi (1994). "Recognition sequence of a highly conserved DNA binding protein RBP-J kappa." *Nucleic Acids Res* 22(6): 965-971.
- Tveito, S., K. Andersen, R. Karesen and O. Fodstad (2011). "Analysis of EpCAM positive cells isolated from sentinel lymph nodes of breast cancer patients identifies subpopulations of cells with distinct transcription profiles." *Breast Cancer Res* 13(4): R75.

- Uhlen, M., L. Fagerberg, B. M. Hallstrom, C. Lindskog, P. Oksvold, A. Mardinoglu, A. Sivertsson, C. Kampf, E. Sjostedt, A. Asplund, I. Olsson, K. Edlund, E. Lundberg, S. Navani, C. A. Szgyarto, J. Odeberg, D. Djureinovic, J. O. Takanen, S. Hober, T. Alm, P. H. Edqvist, H. Berling, H. Tegel, J. Mulder, J. Rockberg, P. Nilsson, J. M. Schwenk, M. Hamsten, K. von Feilitzen, M. Forsberg, L. Persson, F. Johansson, M. Zwahlen, G. von Heijne, J. Nielsen and F. Ponten (2015). "Proteomics. Tissue-based map of the human proteome." *Science* 347(6220): 1260419.
- Uhlen, M., P. Oksvold, L. Fagerberg, E. Lundberg, K. Jonasson, M. Forsberg, M. Zwahlen, C. Kampf, K. Wester, S. Hober, H. Wernerus, L. Bjorling and F. Ponten (2010). "Towards a knowledge-based Human Protein Atlas." *Nat Biotechnol* 28(12): 1248-1250.
- Valiante, N. M., M. Uhrberg, H. G. Shilling, K. Lienert-Weidenbach, K. L. Arnett, A. D'Andrea, J. H. Phillips, L. L. Lanier and P. Parham (1997). "Functionally and structurally distinct NK cell receptor repertoires in the peripheral blood of two human donors." *Immunity* 7(6): 739-751.
- van den Bosch, M., R. T. Bree and N. F. Lowndes (2003). "The MRN complex: coordinating and mediating the response to broken chromosomes." *EMBO Rep* 4(9): 844-849.
- Van Gelder, R. N., M. E. von Zastrow, A. Yool, W. C. Dement, J. D. Barchas and J. H. Eberwine (1990). "Amplified RNA synthesized from limited quantities of heterogeneous cDNA." *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(5): 1663-1667.
- Varkonyi-Gasic, E., R. Wu, M. Wood, E. F. Walton and R. P. Hellens (2007). "Protocol: a highly sensitive RT-PCR method for detection and quantification of microRNAs." *Plant Methods* 3: 12.
- Volinia, S., G. A. Calin, C. G. Liu, S. Ambs, A. Cimmino, F. Petrocca, R. Visone, M. Iorio, C. Roldo, M. Ferracin, R. L. Prueitt, N. Yanaihara, G. Lanza, A. Scarpa, A. Vecchione, M. Negrini, C. C. Harris and C. M. Croce (2006). "A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets." *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(7): 2257-2261.
- Voss, M. D., A. Hille, S. Barth, A. Spurk, F. Hennrich, D. Holzer, N. Mueller-Lantzsch, E. Kremmer and F. A. Grasser (2001). "Functional cooperation of Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 and the survival motor neuron protein in transactivation of the viral LMP1 promoter." *J Virol* 75(23): 11781-11790.
- Vriend, G., Sander, C. (1993). "Quality control of protein models: directional atomic contact analysis." *Journal of Applied Crystallography* 26: 47-60.
- Waltzer, L., F. Logeat, C. Brou, A. Israel, A. Sergeant and E. Manet (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(23): 5633-5638.
- Wang, F., C. D. Gregory, M. Rowe, A. B. Rickinson, D. Wang, M. Birkenbach, H. Kikutani, T. Kishimoto and E. Kieff (1987). "Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 specifically induces expression of the B-cell activation antigen CD23." *Proc Natl Acad Sci U S A* 84(10): 3452-3456.

- Wang, F., H. Kikutani, S. F. Tsang, T. Kishimoto and E. Kieff (1991). "Epstein-Barr virus nuclear protein 2 transactivates a cis-acting CD23 DNA element." *J Virol* 65(8): 4101-4106.
- Wang, F., S. F. Tsang, M. G. Kurilla, J. I. Cohen and E. Kieff (1990). "Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 transactivates latent membrane protein LMP1." *J Virol* 64(7): 3407-3416.
- Wang, L., S. R. Grossman and E. Kieff (2000). "Epstein-Barr virus nuclear protein 2 interacts with p300, CBP, and PCAF histone acetyltransferases in activation of the LMP1 promoter." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(1): 430-435.
- Woerner, S. M., M. Kloor, Y. Schwitalle, H. Youmans, M. Doeberitz, J. Gebert and S. Dihlmann (2007). "The putative tumor suppressor AIM2 is frequently affected by different genetic alterations in microsatellite unstable colon cancers." *Genes Chromosomes Cancer* 46(12): 1080-1089.
- Woisetschlaeger, M., C. N. Yandava, L. A. Furmanski, J. L. Strominger and S. H. Speck (1990). "Promoter switching in Epstein-Barr virus during the initial stages of infection of B lymphocytes." *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(5): 1725-1729.
- Wolf, E., C. Y. Lin, M. Eilers and D. L. Levens (2014). "Taming of the beast: shaping Myc-dependent amplification." *Trends Cell Biol.*
- Wu, D. Y., G. V. Kalpana, S. P. Goff and W. H. Schubach (1996). "Epstein-Barr virus nuclear protein 2 (EBNA2) binds to a component of the human SNF-SWI complex, hSNF5/Ini1." *J Virol* 70(9): 6020-6028.
- Wu, D. Y., A. Krumm and W. H. Schubach (2000). "Promoter-specific targeting of human SWI-SNF complex by Epstein-Barr virus nuclear protein 2." *J Virol* 74(19): 8893-8903.
- Wu, Z. Q. and X. Liu (2008). "Role for Plk1 phosphorylation of Hbo1 in regulation of replication licensing." *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(6): 1919-1924.
- Xiong, B., Y. Cheng, L. Ma and C. Zhang (2013). "MiR-21 regulates biological behavior through the PTEN/PI-3 K/Akt signaling pathway in human colorectal cancer cells." *Int J Oncol* 42(1): 219-228.
- Yalamanchili, R., S. Harada and E. Kieff (1996). "The N-terminal half of EBNA2, except for seven prolines, is not essential for primary B-lymphocyte growth transformation." *J Virol* 70(4): 2468-2473.
- Yalamanchili, R., X. Tong, S. Grossman, E. Johannsen, G. Mosialos and E. Kieff (1994). "Genetic and biochemical evidence that EBNA 2 interaction with a 63-kDa cellular GTG-binding protein is essential for B lymphocyte growth transformation by EBV." *Virology* 204(2): 634-641.
- Yang, L., Y. L. Wang, S. Liu, P. P. Zhang, Z. Chen, M. Liu and H. Tang (2014). "miR-181b promotes cell proliferation and reduces apoptosis by repressing the expression of adenyl cyclase 9 (AC9) in cervical cancer cells." *FEBS Lett* 588(1): 124-130.
- Yao, Q. Y., A. B. Rickinson and M. A. Epstein (1985). "A re-examination of the Epstein-Barr virus carrier state in healthy seropositive individuals." *Int J Cancer* 35(1): 35-42.

- Yata, K., J. Y. Bleuyard, R. Nakato, C. Ralf, Y. Katou, R. A. Schwab, W. Niedzwiedz, K. Shirahige and F. Esashi (2014). "BRCA2 Coordinates the Activities of Cell-Cycle Kinases to Promote Genome Stability." *Cell Rep*.
- Yoshioka, M., N. Ishiguro, H. Ishiko, X. Ma, H. Kikuta and K. Kobayashi (2001). "Heterogeneous, restricted patterns of Epstein-Barr virus (EBV) latent gene expression in patients with chronic active EBV infection." *J Gen Virol* 82(Pt 10): 2385-2392.
- Young, L. S. and A. B. Rickinson (2004). "Epstein-Barr virus: 40 years on." *Nat Rev Cancer* 4(10): 757-768.
- Yue, W., M. G. Davenport, J. Shackelford and J. S. Pagano (2004). "Mitosis-specific hyperphosphorylation of Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 suppresses its function." *J Virol* 78(7): 3542-3552.
- Yue, W., J. Shackelford and J. S. Pagano (2006). "cdc2/cyclin B1-dependent phosphorylation of EBNA2 at Ser243 regulates its function in mitosis." *J Virol* 80(4): 2045-2050.
- Zhang, B. G., J. F. Li, B. Q. Yu, Z. G. Zhu, B. Y. Liu and M. Yan (2012). "microRNA-21 promotes tumor proliferation and invasion in gastric cancer by targeting PTEN." *Oncol Rep* 27(4): 1019-1026.
- Zhao, B., S. Maruo, A. Cooper, R. C. M, E. Johannsen, E. Kieff and E. Cahir-McFarland (2006). "RNAs induced by Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 in lymphoblastoid cell lines." *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(6): 1900-1905.
- Zhao, B., J. Zou, H. Wang, E. Johannsen, C. W. Peng, J. Quackenbush, J. C. Mar, C. C. Morton, M. L. Freedman, S. C. Blacklow, J. C. Aster, B. E. Bernstein and E. Kieff (2011). "Epstein-Barr virus exploits intrinsic B-lymphocyte transcription programs to achieve immortal cell growth." *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(36): 14902-14907.
- Zhi, F., X. Cao, X. Xie, B. Wang, W. Dong, W. Gu, Y. Ling, R. Wang, Y. Yang and Y. Liu (2013). "Identification of circulating microRNAs as potential biomarkers for detecting acute myeloid leukemia." *PLoS One* 8(2): e56718.
- Zhou, H., S. C. Schmidt, S. Jiang, B. Willox, K. Bernhardt, J. Liang, E. C. Johannsen, P. Kharchenko, B. E. Gewurz, E. Kieff and B. Zhao (2015). "Epstein-Barr virus oncoprotein super-enhancers control B cell growth." *Cell Host Microbe* 17(2): 205-216.
- Zhou, S., M. Fujimuro, J. J. Hsieh, L. Chen and S. D. Hayward (2000). "A role for SKIP in EBNA2 activation of CBF1-repressed promoters." *J Virol* 74(4): 1939-1947.
- Zimber-Strobl, U., E. Kremmer, F. Grasser, G. Marschall, G. Laux and G. W. Bornkamm (1993). "The Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 interacts with an EBNA2 responsive cis-element of the terminal protein 1 gene promoter." *EMBO J* 12(1): 167-175.
- Zimber-Strobl, U. and L. J. Strobl (2001). "EBNA2 and Notch signalling in Epstein-Barr virus mediated immortalization of B lymphocytes." *Semin Cancer Biol* 11(6): 423-434.
- Zimber-Strobl, U., L. J. Strobl, C. Meitinger, R. Hinrichs, T. Sakai, T. Furukawa, T. Honjo and G. W. Bornkamm (1994). "Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 exerts its transactivating

function through interaction with recombination signal binding protein RBP-J kappa, the homologue of Drosophila Suppressor of Hairless." *EMBO J* 13(20): 4973-4982.

Zimber-Strobl, U., K. O. Suentzenich, G. Laux, D. Eick, M. Cordier, A. Calender, M. Billaud, G. M. Lenoir and G. W. Bornkamm (1991). "Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 activates transcription of the terminal protein gene." *J Virol* 65(1): 415-423.

Zimmerman, E. I., C. M. Dollins, M. Crawford, S. Grant, S. P. Nana-Sinkam, K. L. Richards, S. M. Hammond and L. M. Graves (2010). "Lyn kinase-dependent regulation of miR181 and myeloid cell leukemia-1 expression: implications for drug resistance in myelogenous leukemia." *Mol Pharmacol* **78**(5): 811-817.

IX. Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass die vorgelegte Dissertation mit dem Titel

„Transkriptionsregulation durch das EBV-nukleäre Antigen 2 - Abhängigkeit von DNA-Adaptoren und die Funktion der N-terminalen Domäne“

von mir selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt ist.

Diese Arbeit wurde weder in der jetzigen noch in einer abgewandelten Form einem anderen Prüfungskomitee vorgelegt.

München, März 2016, Sybille Thumann

X. Danksagung

Als erstes möchte ich Prof. Bettina Kempkes dafür danken, dass sie mir ermöglicht hat an diesen sehr interessanten und vielseitigen Projekten zu arbeiten. Auch möchte ich ihr für die sehr gute Betreuung und Zusammenarbeit, die vielen Gespräche, Diskussionen und neuen Ideen danken.

Meinen externen Betreuern PD Dr. Sandra Hake und Prof. Olivier Gires möchte ich für die vielen guten Vorschläge und Dankanstöße bei den Thesis Committee Meetings danken.

Den Bioinformatikern Florian Erhard und Christian Mertes möchte ich für die Auswertung meiner genomweiten Daten und für ein stets offenes Ohr für meine tausend Fragen danken.

Auch ein großes Dankeschön an Herrn Prof. Michael Sattler und an Anders Friberg für die tolle Kollaboration in unserem „END-Domänen“-Projekt, das auch zu einer Publikation geführt hat. Besonders Anders Friberg möchte ich für seinen unermüdlichen Einsatz für unser Projekt, sogar nach seinem Umzug in die USA, herzlich danken.

Vielen Dank an Frau Dr. Stefanie Hauck für die Ermöglichung einer Kollaboration mit der PROT Core Facility des Helmholtz Zentrums. Vielen Dank an meinen Kollaborationspartner Markus Priller, der für mich die massenspektrometrischen Daten erhoben hat. Auch ihm vielen Dank für die sehr gute Durchführung der massenspektrometrischen Messungen, für die vielen Diskussionen und Antworten auf die vielen Fragen.

Mein Dank geht auch an Dr. Dietmar Martin und Kerstin Maier ans Genzentrum. Vielen Dank für die unkomplizierte und zügige Zusammenarbeit und für die einwandfreie Durchführung der genomweiten Expressionstudien.

Ein großes Dankeschön auch an die AG Kremmer für die Produktion und Bereitstellung der Antikörper. Ein extra Dankeschön an Andrew Flatley für die immer zügige und gut gelaunte Erfüllung meiner Antikörper-Wünsche.

Ein riesen Dankeschön an alle meine tollen Laborkollgen. Zuletzt habe ich mit Laura Glaser, Simone Rieger, Elena Fiestas Carcaba und Cornelia Kuklik-Roos zusammen gearbeitet. Ehemalige Kolleginnen sind Marie Harth-Hertle, Agnes Mittner und Barbara Scholz. Vielen lieben Dank für die super Zeit mit Euch. Danke für die Diskussionen und Ratschläge und für die unkomplizierte Zusammenarbeit.

Meinen Praktikanten Ahmed Zakaria Gad, Nicole Treichel und Martina Rami möchte ich auch für Ihre guten Beiträge zu meinen Projekten danken.

Herzlichen Dank an Martin Strehle, Cornelia Finkenzeller und Nina Rehage für die Abwechslung zum Laboralltag entweder bei ein paar Tagen im Schnee oder bei Kaffeepausen. Vielen Dank für die aufheiternden Gespräche in den verschiedenen Stockwerken.

Ein großes Dankeschön auch an Erbey Özdemir, der mich immer mit Mineralwasser und guter Laune versorgt hat.

Mein Dank gilt auch allen anderen Mitarbeitern am Hämatologikum für die gute Zusammenarbeit.

Zum Schluss möchte noch den wichtigsten Menschen in meinem Leben danken:

Johannes Franken für sein immer offenes Ohr und seine bedingungslose Unterstützung. Vielen Dank, ohne Dich hätte ich das nicht so einfach geschafft. Vielen Dank für Deinen IT-Support und für Dein Interesse an meiner Arbeit.

Meinen Eltern Danke ich aus ganzem Herzen. Ohne Euch wäre dies alles nicht möglich gewesen.

XI. Lebenslauf

Sybille Thumann

Sybille_Thumann@gmx.de

Werdegang

03/15 – heute:

Wissenschaftliche Angestellte am Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr

07/2010 – 08/2014:

Promotion in der Abteilung Genvektoren , Helmholtz Zentrum München

Doktormutter: Prof. Dr. Bettina Kempkes

Titel der Dissertation: „Transkriptionsregulation durch das EBV-nukleäre Antigen 2 - Abhängigkeit von DNA-Adaptoren und die Funktion der N-terminalen Domäne“

09/2009 - 03/2010:

Wissenschaftliche Mitarbeiterin, Universität Regensburg

10/2003 - 08/2009:

Studium Diplom Biologie, Universität Regensburg

Diplomarbeit am Lehrstuhl für Mikrobiologie und Archaeenzentrum

Betreuer: PD Dr. Winfried Hausner

Titel: “Untersuchungen zur Funktion der TrmB-Familie und PF1088 bei der Regulation der Transkription in *Pyrococcus furiosus*”

01/2007 - 06/2007: Auslandsaufenthalt in Marseille, Frankreich mit Praktikum im Labor „Laboratoire de Chimie Bactérienne“ am CNRS Marseille

10/2002 - 10/2003:

Studium Lehramt Grundschule mit Biologie als Unterrichtsfach, Universität Regensburg

09/1993 - 07/2002:

Werner-von-Siemens-Gymnasium, Regensburg

Hauptfächer: Chemie und Englisch, Nebenfächer: Biologie und Erdkunde

Publikationen

Friberg A., Thumann S., Hennig J., Zou P, Nössner E., Ling P.D., Sattler M., Kempkes B. (2015). „The EBNA-2 N-Terminal Transactivation Domain Folds into a Dimeric Structure Required for Target Gene Activation”. PLoS Pathog **11**(5): e1004910.

Ochs SM, Thumann S, Richau R, Weirauch MT, Lowe TM, Thomm M, Hausner W. (2012). “Activation of archaeal transcription mediated by recruitment of transcription factor B”. J Biol Chem **287**(22):18863-71.

Waeger I, Schmid G, Thumann S, Thomm M and Hausner W. (2010). "Transformation in *Pyrococcus furiosus* using a shuttle vector" Appl Environ Microbiol **76**(10):3308-13.