

**Identifizierung und Charakterisierung von neuen
Interaktionspartnern des latenten
Membranproteins 1 (LMP1)
des Epstein-Barr Virus**

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

von

JANINE GRIESE

München, Juli 2008

Helmholtz Zentrum München
Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt

Dissertation eingereicht am: 24. Juli 2008

Gutachter: Prof. Dr. Dirk Eick
Prof. Dr. Stefan Jentsch

Tag der mündlichen Prüfung: 10. November 2008

Für meine Eltern
und für Peter

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Das Epstein-Barr Virus	1
1.1.1	Die Latenzgene von EBV	2
1.1.2	EBV-assoziierte Tumore	3
1.1.3	EBV-vermittelte Transformation von B-Zellen	4
1.2	Das Latente Membranprotein 1 (LMP1).....	4
1.2.1	LMP1 als virales Onkogen	4
1.2.2	LMP1 als virales Homolog zum CD40-Rezeptor	5
1.2.3	Der strukturelle Aufbau von LMP1.....	6
1.2.4	Signaltransduktion von LMP1.....	7
1.3	Die Phosphatase SHP-1	13
1.3.1	Die Struktur von SHP-1	13
1.3.2	Die biologischen Funktionen von SHP-1	15
1.4	Proteomics	19
1.4.1	Massenspektrometrie	19
1.5	Aufgabenstellung	22
2	Material	23
2.1	Antikörper	23
2.1.1	Primärantikörper	23
2.1.2	Phosphospezifische Antikörper	23
2.1.3	Sekundärantikörper für Western-Blot-Analysen	23
2.1.4	Sekundärantikörper zur Stimulation des B-Zell Rezeptors	23
2.1.5	Sekundärantikörper für FACS Analysen.....	23
2.2	Plasmide	24
2.3	Bakterien.....	28
2.4	Zelllinien.....	28
2.5	Oligonukleotide	29
2.6	Geräte, Chemikalien, Reagenzien und Enzyme	30
3	Methoden	33
3.1	Bakterienkultur.....	33
3.1.1	Vermehrung und Aufbewahrung von Bakterienkulturen	33
3.1.2	Herstellung und Transformation chemisch kompetenter E.coli Bakterien	33
3.1.3	Elektroporation von elektrochemisch kompetenten Bakterien.....	34
3.2	Zellkultur	34
3.2.1	Zellkulturbedingungen	34
3.2.2	Aufbewahrung von Zellen über längere Zeiträume	35
3.2.3	Elektroporation humaner Zelllinien	35
3.2.4	Nukleofektion von LCLs	35
3.2.5	Transfektion von HEK293 Zellen.....	36

3.2.6	Transfektion von TR-2/293 Zellen und Maxi-EBV Virusproduktion	36
3.2.7	Präparation primärer B-Zellen	36
3.2.8	Infektion von primären B-Zellen mit Maxi-EBVs	37
3.2.9	Induktion des lytischen Zyklus in EREB2-5 Zellen	37
3.2.10	Durchflusszytometrie (FACS-Analysen)	37
3.3	DNA-Arbeitstechniken	38
3.3.1	Plasmid-Schnellaufreinigung	38
3.3.2	Präparative Plasmidaufreinigung	38
3.3.3	Homologe Rekombination in <i>E. coli</i> zur Konstruktion von Maxi-EBV-Mutanten	38
3.3.4	Agarose-Gelelektrophorese	39
3.3.5	DNA-Fragmentisolierung aus dem Agarosegel	39
3.3.6	Polymerase Kettenreaktion (PCR)	39
3.3.7	DNA-Spaltung mit Restriktionsenzymen	40
3.3.8	Ligation	40
3.3.9	Hybridisierung von Oligonukleotiden	40
3.3.10	Sonstige DNA-Arbeitstechniken	40
3.3.11	Klonierungen	40
3.4	RNA-Arbeitstechniken	43
3.4.1	Isolierung gesamtzellulärer RNA	43
3.4.2	Reverse Transkription zellulärer mRNA	43
3.5	Proteinbiochemische Methoden	44
3.5.1	Herstellung von Zelllysaten	44
3.5.2	Proteinbestimmung nach Bradford	44
3.5.3	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese	44
3.5.4	Western-Blot Analyse	45
3.5.5	Coomassie-Färbung zur Darstellung von Proteinen im SDS-Gel	46
3.5.6	Silberfärbung zur Darstellung von Proteinen im SDS-Gel	46
3.5.7	Expression von GST-Fusionsproteinen in <i>E. coli</i>	47
3.5.8	GST-Kopräzipitationsversuche	48
3.5.9	Immunkomplex-Kinaseversuch	48
3.5.10	Luziferase-Reportergeräten Versuche	49
3.5.11	Immunpräzipitation (IP)	50
3.5.12	TEV-Verdau von immobilisiertem HA-LMP1-2xli-TEV-CT Konstrukten	51
3.6	Massenspektrometrische Methoden	51
3.6.1	Trypsin-Verdau	51
3.6.2	Nano Hochleistungs- Flüssigkeits- Chromatographie (nano HPLC)	52
3.6.3	Massenspektrometrische Analyse und Auswertung	53
4	Ergebnisse	55
4.1	Identifizierung neuer Interaktionspartner von LMP1	55
4.1.1	Generierung eines geeigneten Zellsystems	55
4.1.2	Optimierung der Immunpräzipitationsbedingungen für die Massenspektrometrie	61
4.1.3	Massenspektrometrische Analyse potentieller LMP1-bindender Proteine aus IPs	63
4.1.4	Etablierung eines weiteren Aufreinigungsschrittes: HA-LMP1-TEV-CT	66

4.1.5	Massenspektrometrische Analyse potentieller HA-LMP1-2xli-TEV-CT-interagierender Proteine aus TEV-Eluaten.....	77
4.1.6	Bestätigung der Interaktion von CD48 mit LMP1	84
4.1.7	Bestätigung der Interaktion von TNIK mit LMP1	86
4.2	Verifizierung und Charakterisierung von SHP-1 als LMP1-bindendes Protein	88
4.2.1	Verifikation von SHP-1 als LMP1-interagierendes Protein	90
4.2.2	Kartierung der SHP-1 Bindestelle von LMP1	90
4.2.3	Verifikation des SHP-1 Bindemotivs von LMP1 in humanen B-Zellen.....	96
4.2.4	SHP-1 reguliert die LMP1-induzierte NF- κ B-Aktivierung	99
4.2.5	SHP-1 reguliert die LMP1-induzierte Phosphorylierung von Jak3.....	104
4.2.6	SHP-1 beeinflusst die Inhibition des lytischen Zyklus durch LMP1 nicht.....	107
5	Diskussion.....	112
5.1	Identifikation von assoziierten Proteinen des LMP1-Multiproteinkomplexes	112
5.1.1	Aufreinigung des LMP1-Signalkomplexes.....	112
5.1.2	Analyse des LMP1-Signalkomplexes mittels MALDI-TOF/TOF	113
5.1.3	Potenzielle neue LMP1-Interaktionspartner und ihre möglichen Funktionen im Kontext von LMP1	114
5.1.4	CD48 und seine mögliche Rolle als LMP1 Interaktionspartner	118
5.1.5	TNIK und seine mögliche Rolle als LMP1 Interaktionspartner	119
5.2	SHP-1 als LMP1-assoziiertes Protein.....	120
5.2.1	Kartierung der Bindungsstelle von SHP-1 an LMP1.....	120
5.2.2	Die Rolle von SHP-1 in der Signaltransduktion von LMP1	121
6	Zusammenfassung	127
	Abkürzungsverzeichnis	128
	Anhang A: Vektorkarten der klonierten Plasmide.....	132
	Anhang B: Restriktionsfragmente von Maxi-EBV Plasmiden nach BamHI-Verdau	140
	Literaturverzeichnis	141
	Danksagungen	165
	Erklärung	166
	Curriculum Vitae	167

1 Einleitung

1.1 Das Epstein-Barr Virus

Das Epstein-Barr Virus (EBV) wurde 1964 als erstes humanes DNA Tumovirus von Epstein, Barr und Achong entdeckt (Epstein et al., 1964).

EBV lässt sich in die Familie der γ -Herpesviren einordnen. Das doppelsträngige DNA Genom besitzt bei dem oft als „Wildtyp“ bezeichneten B95.8 Stamm eine Größe von 172 kb und liegt als lineares Genom in einem Kapsid verpackt vor. Das Kapsid wird wiederum von einer Membranhülle umschlossen, die aus der inneren Kernmembran der Wirtszelle gebildet wird und mit den viralen Glykoproteinen gp350/220 besetzt ist (Rickinson and Kieff, 1996). Über diese Proteine bindet es an den C3d-Komplementrezeptor CR2 (CD21), der auf reifen B-Zellen auf der Membranoberfläche exprimiert wird. So kann das Virus durch rezeptorvermittelte Endozytose in die Zelle aufgenommen werden (Nemerow et al., 1985). Zusätzlich konnte eine Bindung des viralen Glycoproteins gp42 an HLA Typ II Moleküle nachgewiesen werden (Borza and Hutt-Fletcher, 2002). Im Zuge der Infektion wird das DNA Genom in den Zellkern der Wirtszelle transportiert, dort zirkularisiert und von der zellulären Replikationsmaschinerie repliziert, so dass es episomal in den Zellen persistiert (Spear and Longnecker, 2003).

Mit einer Durchseuchungsrate von über 90% ist EBV ein äußerst erfolgreiches Virus. Die Primärinfektion erfolgt üblicherweise in der frühen Kindheit und ist oft asymptomatisch (Evans, 1972). Zunächst infiziert das Virus die Zellen des Nasen-Rachenraums. Nach Ablauf der anfänglichen lytischen Phase, in der das Virus repliziert, werden Zellen des B-Zell-Kompartiments latent infiziert und immortalisiert (Thorley-Lawson and Mann, 1985).

Tritt die Primärinfektion erst bei Jugendlichen oder Erwachsenen auf, kann sie in 30-50% der Fälle infektiöse Mononukleose (IM), auch Pfeiffersches Drüsenfieber genannt, hervorrufen. IM ist durch die Proliferation EBV-infizierter B-lymphoider Blasten in der Parakortex des lymphatischen Gewebes in den Tonsillen gekennzeichnet. Dadurch wird eine starke Immunantwort durch zytotoxische T-Lymphozyten ausgelöst. Nach dem Abklingen der Krankheit verbleiben EBV-infizierte B-Gedächtniszellen im Patienten (Crawford, 2001).

Neben dem lytischen Zyklus besitzt EBV eine latente Phase, in denen nur noch wenige virale Gene exprimiert werden und keine Virusproduktion mehr erfolgt. Wird eine B-Zelle mit EBV infiziert, werden zunächst neun virale Latenzproteine exprimiert. Zu diesem Zeitpunkt wird die größte Anzahl an Proteinen exprimiert, nämlich die sechs Kernproteine (EBV nukleares Antigen) EBNA1, -2, -3A, -3B, -3C und -LP, sowie die drei integralen, latenten Membranproteine LMP1, LMP2A und LMP2B. Hinzu kommen zwei kleine nicht-polyadenylierte RNAs, EBER-1 und EBER-2. Anschließend wandern die infizierten B-Lymphozyten in Follikel und differenzieren zu B-Gedächtniszellen, in denen nur noch EBNA1, LMP1 und LMP2A exprimiert werden. Zu diesem Zeitpunkt erfolgt vermutlich der Übergang zum persistierenden Lebenszyklus des Virus (Thorley-Lawson, 2001).

Nach Abschluss dieser Phase persistiert EBV in ruhenden B-Gedächtniszellen, wobei das Genom in 40 bis 100 Kopien vorliegt (Miyashita et al., 1997). In dieser Phase wird ausschließlich EBNA1 exprimiert. Da die proteasomale Degradation von EBNA1 blockiert wird, können keine Peptide des Proteins durch die MHC-Klasse I Moleküle auf der Zelloberfläche präsentiert werden, so dass das Virus der Immunantwort entkommt. Eine unkontrollierte Ausbreitung der EBV-immortalisierten und proliferierenden B-Lymphozyten wird in gesunden Trägern durch zytotoxische T-Zellen verhindert (Khanna et al., 1995).

Eine Reaktivierung des Virus und damit der Übergang von dem latenten in den lytischen Zyklus ist möglich. Hierbei differenzieren die EBV-infizierten B-Gedächtniszellen zu Plasmazellen, die dann neue Viruspartikel produzieren. Der Mechanismus der Reaktivierung ist jedoch noch nicht genau bekannt, kann aber durch Stimulierung des B-Zell Rezeptors induziert werden (Kuppers, 2003).

1.1.1 Die Latenzgene von EBV

Wie bereits im vorangegangenen Kapitel erwähnt, besitzt EBV neun Latenzproteine (EBNA1, EBNA2, EBNA3A, EBNA3B, EBNA3C, EBNA-LP, LMP1, LMP2A und LMP2B), die in diesem Abschnitt kurz beschrieben werden sollen.

EBNA1 ist notwendig und hinreichend, damit EBV als Episom in den Zellen repliziert wird. Es ist das einzige Protein aus EBV, das DNA sequenzspezifisch binden kann (Rawlins et al., 1985). Es bindet an den Replikationsursprung (*Origin of replication*, oriP), der einen EBNA1-abhängigen *enhancer* darstellt und eine wichtige Rolle in der Transkriptionsregulation spielt. (Übersicht: Bornkamm and Hammerschmidt, 2001). EBNA1 ist essenziell für die Transkription der transformierenden Gene von EBV nach der Infektion von primären B-Zellen (Altmann et al., 2006). Auch die Expression von zellulären Genen wird von EBNA1 beeinflusst, so verstärkt es die Expression von STAT1 (Wood et al., 2007). Eine besondere Bedeutung besitzt EBNA1 darüber hinaus in der Rekrutierung des humanen Replikationskomplex an das EBV-Genom. EBNA1 interagiert sowohl mit oriP als auch mit dem Replikationskomplex, wobei die Affinität von EBNA1 die Replikationseffizienz des Virus bestimmt. (Lindner et al., 2008; Schepers et al., 2001).

EBNA2 und EBNA-LP gehören zu den ersten viralen Genen, die nach einer EBV-Infektion exprimiert werden (Allday et al., 1989; Rooney et al., 1989). Eine Deletion von EBNA2 resultiert im Verlust der B-Zell-Immortalisierung durch EBV (Miller et al., 1974). Der Transkriptionsfaktor EBNA2 interagiert über das zelluläre Adapterprotein CBF1 mit der DNA und kann die Transkription viraler und zellulärer Gene induzieren, unter ihnen LMP1, LMP2A, CD21, CD23 und c-myc (Cordier et al., 1990; Kaiser et al., 1999; Laux et al., 1994; Zimmer-Strobl et al., 1993). Darüber hinaus fördert EBNA2 direkt die Expression von Bfl-1, einem zellulären antiapoptotischen Gen. Die Expression von EBNA2 könnte demnach einen Überlebensvorteil während der B-Zell Infektion darstellen (Pegman et al., 2006).

Auch EBNA-LP besitzt eine Bedeutung in der Initiierung der B-Zell-Immortalisierung. Es kooperiert mit EBNA2 und verstärkt die Transaktivierungsaktivität von EBNA2 (Bornkamm and Hammerschmidt, 2001).

Die Proteine der EBNA3-Familie sind an zahlreichen zellulären Prozessen, wie die Zellzyklusregulation, die Aktivierung und Repression der Transkription beteiligt (Bornkamm and Hammerschmidt, 2001).

Die latenten, integralen Membranproteine LMP1, LMP2A und LMP2B besitzen unter anderem eine antiapoptotische Wirkung. LMP2A imitiert die Funktion des B-Zell-Rezeptors (BCR) und sendet ein Überlebenssignal an die Zelle (Thorley-Lawson, 2001). Auch wenn LMP2A für die Transformation von B-Zellen *in vitro* entbehrlich ist, ist das Protein das Überleben von B-Zellen in Keimzentren essenziell, die nicht über einen funktionellen B-Zell Rezeptor verfügen (Mancao and Hammerschmidt, 2007). Darüber hinaus kann LMP2A die B-Zell Rezeptor induzierte EBV-Reaktivierung und Apoptose durch Tyrosin-Phosphorylierung regulieren (Fukuda and Longnecker, 2005). LMP2B regelt die Funktion von LMP2A (Bornkamm and Hammerschmidt, 2001). LMP1 ist Gegenstand der vorliegenden Arbeit und wird in Abschnitt 1.2 ausführlicher beschrieben.

1.1.2 EBV-assoziierte Tumore

EBV ist mit einer Reihe von malignen Erkrankungen assoziiert (Herrmann and Niedobitek, 2003; Niedobitek et al., 2001). Eine der bedeutendsten ist das Burkitt-Lymphom (BL), das in Äquatorialafrika und Papua-Guinea als Erkrankung im Kindesalter endemisch auftritt (Burkitt et al., 1965). Hierbei ist EBV in fast allen BLs nachweisbar, während es in der sporadischen Form in den westlichen Ländern nur ca. 30% sind (Hummel et al., 1995; zur Hausen et al., 1970). Bei dem BL handelt es sich um ein nicht-Hodgkin-Lymphom mit einem Ursprung aus den B-Lymphozyten aus den Keimzentren (Gregory et al., 1987). Alle Burkitt-Lymphome weisen charakteristische chromosomale Translokationen (t(8;14), t(8;2) oder t(8;22)) auf. Dadurch wird das *c-myc* Gen unter die transkriptionelle Kontrolle eines Immunglobulin-Gen gestellt, was in der Überexpression des Onkogens *c-myc* resultiert (Croce et al., 1983; Erikson et al., 1983; Nishikura et al., 1983). In EBV-positivem BL kann in der Regel nur ein Protein, EBNA1, nachgewiesen werden. Dieses Expressionsprofil wird als Latenz I bezeichnet (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1: Expressionsmuster von EBV-Latenzgenen in Erkrankungen (Niedobitek, 1999)

Latenzgruppe	EBNA1	EBNA2	EBNA3	LMP1	LMP2	Erkrankung
Latenz I	+	-	-	-	-	Burkitt-Lymphom
Latenz II	+	-	-	+	+	Nasopharynxkarzinom, Hodgkin-Lymphom, T-Zell Non-Hodgkin-Lymphom
Latenz III	+	+	+	+	+	lymphoproliferative Erkrankungen, infektiöse Mononukleose
Sonstiges	±	-	-	-	+	gesunder Träger

Eine der häufigsten malignen Lymphomerkrankungen ist das Hodgkin-Lymphom (HD), das sich histologisch durch das Vorkommen von Hodgkin- und Reed-Sternberg-Zellen auszeichnet. In den westlichen Ländern ist EBV in 20-50% der Fälle nachweisbar, während in Entwicklungsländern der Anteil auf bis zu 100% ansteigt (Ambinder et al., 1993; Herbst et al., 1993). Alle EBV-assoziierten HD-Fälle weisen ein

Latenz II Expressionsprofil auf, d.h. die Zellen exprimieren neben EBNA1 auch LMP1 und LMP2 (siehe Tabelle 1) (Deacon et al., 1993; Grasser et al., 1994; Herbst et al., 1991; Niedobitek et al., 1997).

Bei immunsupprimierten Transplantationspatienten steigt die Prädisposition für lymphoproliferative Erkrankungen (*post-transplant lymphoid disorders*, PTLD). Hierbei handelt es sich um schwerwiegende Komplikationen, wobei in beinahe allen Fällen B-Zellen den Ursprung des Lymphoms darstellen und eine EBV-Assoziation besteht. Bei Organtransplantationen hat die EBV-Präsenz meistens beim Empfänger ihren Ursprung, bei Knochenmarkstransplantationen hingegen beim Spender (Haque and Crawford, 1998). In lymphoproliferativen Erkrankungen werden alle latenten Gene von EBV exprimiert (siehe Tabelle 1).

Trotz des B-Zell-Tropismus ist EBV auch mit malignen Erkrankungen anderer Zelltypen assoziiert. Hierbei ist neben dem T-Zell Non-Hodgkin-Lymphom das Nasopharynxkarzinom (NPC) zu erwähnen, das einen epithelialen Ursprung hat. NPCs sind in Südost-Asien, Nordafrika und einigen anderen Regionen endemisch, während sie in Europa und Nordamerika sehr selten auftreten (Niedobitek et al., 2001; Young and Rickinson, 2004).

1.1.3 EBV-vermittelte Transformation von B-Zellen

Infiziert man ruhende B-Lymphozyten mit EBV, wachsen lymphoblastoide Zelllinien (*lymphoblastoid cell lines*, LCLs) aus, die unter Standard-Zellkulturbedingungen *in vitro* proliferieren können (Rickinson and Kieff, 1996). Diese transformierten B-Zelllinien können als *in vitro* Modell der EBV-Latenz III dienen (Bornkamm and Hammerschmidt, 2001). Sie eignen sich im Besonderen als Modell für PTLDs, da sie wie diese ein Latenz III Expressionsprofil besitzen. Für die Transformation der B-Zellen sind jedoch nur fünf der elf in der Latenz III exprimierten Gene essentiell: EBNA1, EBNA2, EBNA3A, EBNA3C und LMP1 (Izumi, 2001; Young et al., 2000).

1.2 Das Latente Membranprotein 1 (LMP1)

1.2.1 LMP1 als virales Onkogen

Bei dem Latenten Membranprotein 1 (LMP1) handelt es sich um das primäre Onkogen von EBV. Wie bereits im vorherigen Kapitel erwähnt, spielt LMP1 bei der Transformation von B-Lymphozyten eine essentielle Rolle (Dirmeier et al., 2005; Dirmeier et al., 2003; Kaye et al., 1993; Kilger et al., 1998). Als einziges EBV-Protein ist es in der Lage, Nagerfibroblasten zu transformieren, so dass diese eine veränderte Zellmorphologie, den Verlust der Kontaktinhibition sowie Proliferation bei geringer Serumkonzentration aufweisen (Baichwal and Sugden, 1988; Wang et al., 1985). Dass LMP1 auch *in vivo* ein onkogenes Potential besitzt, beweist die Tatsache, dass eine ektopische Expression von LMP1 in transgenen Mäusen zu lymphoproliferativen Erkrankungen führt (Kulwichit et al., 1998).

LMP1 verfügt sowohl über ein antiapoptotisches als auch über ein mitogenes und ein antiseneszentes Potential. Es vereint damit entscheidende onkogene Funktionen in einem Molekül. Eine Schlüsselrolle zur Sicherung des Überlebens der Wirtszellen spielt die Hochregulation des Expressionsniveaus von antia-

poptotischen Genen wie *bcl-2*, *bfl-1*, *a20* und *mcl-1* (D'Souza et al., 2000; Finke et al., 1992; Fries et al., 1996; Henderson et al., 1991; Laherty et al., 1992; Wang et al., 1996). Darüber hinaus kann LMP1 das Gleichgewicht aus pro- und antiapoptotischen Signalen durch die Herunterregulation von Zelltod-fördernden Faktoren verschieben. Ein Beispiel dafür ist der Bcl-2 Antagonist Bax, der von LMP1 negativ reguliert wird (Grimm et al., 2005). Darüber hinaus unterdrückt LMP1 die p53-vermittelte Transkription und DNA-Reparatur (Li et al., 2007; Liu et al., 2005) und induziert den Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) Signaltransduktionsweg (Dawson et al., 2003).

Die mitogene Wirkung von LMP1 wird durch die Expression des Transkriptionsfaktors *c-myc* sowie durch den JNK-Signaltransduktionsweg vermittelt (Dirmeier et al., 2005; Kutz et al., 2008). Über eine Aktivierung der p38 MAP-Kinase, PI3K bzw. von NF- κ B kommt es zur Produktion der Zytokine IL-6, IL-8 und IL-10 (Eliopoulos et al., 1999; Eliopoulos et al., 1997; Lambert and Martinez, 2007; Vockerodt et al., 2001). LMP1 erhöht die Proliferation von embryonalen Mausfibroblasten (MEF) *in vitro* und Epithelzellen *in vivo* (Curran et al., 2001; Yang et al., 2000c). Weiterhin induziert LMP1 in ruhenden primären B-Lymphozyten die DNA-Synthese und den Eintritt der Zellen aus der G₀-Phase in den Zellzyklus (Kilger et al., 1998; Peng and Lundgren, 1992). Darüber hinaus ist der JNK-Signalweg für das Durchlaufen des Zellzyklus essentiell, denn eine Inhibition der JNK-Signalkaskade führt zu einem G₂/M Arrest in LCLs sowie zu einem verzögerten Tumorwachstum von LCLs in SCID-Mäusen (Kutz et al., 2008).

Die antiseneszente Wirkung von LMP1 äußert sich zum einen in der Inhibition der p16INK4a-Expression, einem Schlüsselregulator der Seneszenz (Yang et al., 2000b). Zum anderen aktiviert LMP1 die humane Telomerase reverse Transkriptase (hTERT) in NPC und EBV-positiven Lymphom-Zellen (Ding et al., 2007; Ding et al., 2005; Mei et al., 2006; Yang et al., 2004) und verhindert so Seneszenz und Krise durch Telomer-Verkürzung.

LMP1 aktiviert eine Reihe weiterer Faktoren, etwa die B-Zell-Aktivierungsmarker CD23 (Wang et al., 1990) und CD40 (Kilger et al., 1998), den epidermalen Wachstumsfaktor EGF-R (*epidermal growth factor receptor*) (Miller et al., 1995), das Adhäsionsmolekül ICAM-1 (Mehl et al., 2001), die Matrix-Metalloproteasen MMP-1, MMP-3 und MMP-8 (Chang et al., 2008; Lu et al., 2003a; Takeshita et al., 1999) sowie Zellzyklus-Moleküle wie Cyclin D2 (Arvanitakis et al., 1995).

1.2.2 LMP1 als virales Homolog zum CD40-Rezeptor

Um auf Überleben und Proliferation wirken zu können, interagiert LMP1 mit einer Vielzahl von zellulären Signaltransduktionswegen (Kieser, 2007). Hier nimmt es die Rolle eines konstitutiv aktiven Rezeptors ein, der unabhängig von einem Liganden agiert (Floettmann and Rowe, 1997; Gires et al., 1997). LMP1 zeigt überraschende Parallelen mit dem zellulären CD40-Rezeptor. Hierbei handelt es sich um ein Mitglied der *tumor necrosis factor receptor* (TNF-R) Familie, der eine große Bedeutung für die B-Zell-Aktivierung und Proliferation besitzt (D'Orlando et al., 2007). Die funktionale Ähnlichkeit zwischen LMP1 und CD40 äußert sich nicht nur in den Signaltransduktionswegen sondern auch in den beteiligten Proteinen. Zum Beispiel rekrutieren beide Proteine TRAF-Moleküle (Lam and Sugden, 2003a). Auch kann LMP1 bei der Generierung von LCLs *in vitro* durch CD40 substituiert werden (Kilger et al., 1998; Zimmer-Strobl et al., 1996). Dennoch sind beide Moleküle nicht funktionell redundant, denn in vergleichenden Mikroarray-Analysen überlappen die Genexpressionsmuster zwar, stimmen aber nicht völlig überein (Dirmeier et al., 2005).

Studien in CD40 $-/-$ Mäusen wiesen zunächst in die gleiche Richtung. So induziert LMP1 zwar die extra-follikuläre B-Zell-Differenzierung, inhibiert aber die Bildung von Keimzentren (Uchida et al., 1999). Diese Unterschiede scheinen jedoch zu einem großen Teil in dem unterschiedlichen Aktivitätsprofil der beiden Moleküle begründet zu sein. Während LMP1 konstitutiv aktiv ist, muss der CD40-Rezeptor zunächst durch seinen Liganden, CD40, aktiviert werden. Jüngste Studien in Mäusen, die ein durch CD40-Liganden induzierbares CD40/LMP1-Fusionsprotein besitzen, zeigen, dass LMP1 die CD40-Signaltransduktion funktionell ersetzen kann. Mit diesen Fusionsproteinen, die den zytoplasmatischen C-Terminus von LMP1 besitzen, jedoch durch den CD40-Liganden aktiviert werden müssen, verläuft die Entwicklung der B-Zellen normal. Das beinhaltet die Aktivierung der Zellen, die Immunantwort mit Keimzentrenbildung, die somatischer Hypermutation und den Wechsel der Antikörperklasse (*class-switch recombination*). Letzteres kann im Gegensatz zur normalen CD40-Signaltransduktion auch unabhängig von Zytokinen erfolgen (Rastelli et al., 2008).

Ein weiterer Unterschied zwischen LMP1 und CD40-Rezeptor liegt in der Zusammensetzung der jeweiligen Signalkomplexe. Im Gegensatz zu CD40 rekrutiert LMP1 das Protein TRADD (*TNF-receptor-associated death domain protein*). Darüber hinaus weist LMP1 eine höhere Effizienz der Aktivierung von Signalkaskaden auf (Dirmeier et al., 2003; Izumi and Kieff, 1997; Kaykas et al., 2001).

1.2.3 Der strukturelle Aufbau von LMP1

LMP1 ist ein integrales Membranprotein mit 386 Aminosäuren und einem scheinbaren Molekulargewicht von 63 kDa. Wenngleich es, wie in Abschnitt 1.2.1 gezeigt, auf eine Vielzahl von zellulären Faktoren wirkt und funktionell dem CD40-Rezeptor ähnelt (siehe Abschnitt 1.2.2), weist es keine Homologie zu zellulären Proteinen auf.

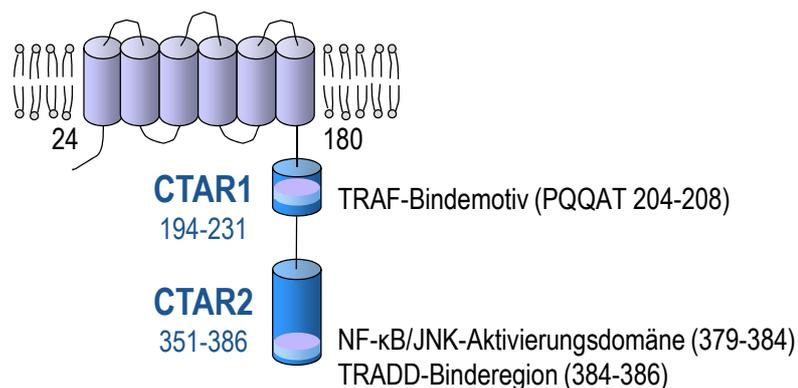


Abbildung 1: Struktureller Aufbau des LMP1-Moleküls.

LMP1 besteht aus drei Domänen: einem kurzen zytoplasmatischen N-Terminus (As 1-24), sechs hydrophoben Transmembrandomänen (As 25-180) und einem C-terminalen Schwanz (As 181-386). Letzterer umfasst die zwei funktionelle Aktivierungsregionen CTAR1 und CTAR2, die für die Bindung von Signalproteinen und die Weiterleitung intrazellulärer Signale notwendig sind. Die Zahlen geben die Position der Aminosäuren innerhalb des Moleküls an.

Obwohl die Kristallstruktur noch nicht gelöst ist, kann man LMP1 aufgrund von Primärstruktur und funktionellen Daten in drei Domänen unterteilen (Hennessy et al., 1984; Liebowitz et al., 1986): ein zytoplasmatischer N-Terminus (As 1-24), sechs hydrophobe Transmembrandomänen (As 25-180)

und eine zytoplasmatische C-terminale Domäne (As 181-386). In Abbildung 1 ist LMP1 mit seinen Domänen schematisch dargestellt.

Der N-Terminus vermittelt über seine positive Ladung die korrekte Orientierung in der Plasmamembran (Coffin et al., 2001; Izumi et al., 1994). Außerdem verfügt er über Ubiquitinierungs-Stellen und ermöglicht so einen regulierten und raschen Abbau über das Proteasom (Aviel et al., 2000). Die kurze Halbwertszeit von 1,5 bis 5 Stunden ist Zelltyp-abhängig (Baichwal and Sugden, 1987; Mann and Thorley-Lawson, 1987; Martin and Sugden, 1991) und verhindert hohe Proteinkonzentrationen, die in zytotoxischen und zytostatischen Effekten resultieren könnten (Floettmann et al., 1996; Hammerschmidt et al., 1989).

Die Transmembrandomänen vermitteln die Fähigkeit, spontan Homo-Oligomere zu bilden. Diese Autoaggregation ist notwendig und hinreichend, damit LMP1 wie ein konstitutiv aktiver Rezeptor agiert und unabhängig von Liganden über seinen C-Terminus eine Vielzahl von Signalwegen induziert (Floettmann and Rowe, 1997; Gires et al., 1997; Hatzivassiliou et al., 1998). Dazu interagieren die Transmembrandomänen (TM) 3-6 mit einem FWLY₃₈₋₄₁-Motiv in der TM1 eines weiteren LMP1-Moleküls (Soni et al., 2006). Das FWLY-Motiv ist darüber hinaus essentiell für die Lokalisation von LMP1 in *lipid rafts* (Yasui et al., 2004), wofür die ersten beiden Transmembrandomänen ausreichend sind (Coffin et al., 2003). In diesen Sphingolipid- und Cholesterin-reichen Membrankompartimenten ist LMP1 zu ca. 30% konstitutiv lokalisiert und rekrutiert Adaptermoleküle wie etwa TRAF2 und TRAF3 in die *lipid rafts* (Ardila-Osorio et al., 1999; Clause et al., 1997; Higuchi et al., 2001; Kaykas et al., 2001; Rothenberger et al., 2002; Xie and Bishop, 2004). Die Tatsache, dass LMP1-Monomere durch die gerichtete Translokation in diese Mikrodomänen Signaltransduktionswege aktivieren können, beweist die Bedeutung der Lokalisation auf die Aktivität von LMP1 (Kaykas et al., 2001)

Der zytoplasmatische C-Terminus besitzt zwei funktionale Subdomänen, die sogenannten C-terminalen Aktivierungsregionen 1 und 2 (CTAR1: As 194-232 und CTAR2: As 351-386). Sie wurden in umfangreichen Mutationsanalysen erstmals 1995 in Bezug auf ihre Funktion beschrieben (Dirmeier et al., 2003; Huen et al., 1995; Izumi et al., 1997; Izumi and Kieff, 1997; Kaye et al., 1999; Kaye et al., 1995; Mainou et al., 2005; Moorthy and Thorley-Lawson, 1993). CTAR1 ist essentiell für die initiale Transformation von primären B-Lymphozyten, es kommt aber nicht zu einem langanhaltenden Wachstum der Zellen *in vitro*. CTAR2 dagegen spielt eine essentielle Rolle in der Etablierung der transformierten Zellen und ermöglicht so die Langzeitproliferation, indem wahrscheinlich Wachstumsfaktor-ähnliche Signale vermittelt werden (Kaye et al., 1995). Auch Experimente mit dem Maxi-EBV System zeigten, dass LMP1 für eine effiziente Transformation kritisch ist. So besitzt ein EBV mit einem LMP1 ohne intakte CTAR1 noch eine Transformationseffizienz von 13,9 % gegenüber einem EBV mit Wildtyp-LMP1. Ist CTAR2 mutiert, sinkt die Transformationseffizienz auf 9,7 % (Dirmeier et al., 2003). Über den C-Terminus interagiert LMP1 mit einer Vielzahl zellulärer Proteine und induziert eine Reihe von Signalwegen, deren genauere Betrachtung im anschließenden Abschnitt 1.2.4 erfolgt.

1.2.4 Signaltransduktion von LMP1

Wie bereits in Abschnitt 1.2.3 erwähnt, wirkt EBV durch LMP1 über eine Vielzahl von Signalwegen auf die Zelle ein. Insbesondere die Signaltransduktionskaskaden, die das onkogene Potential von LMP1 bestimmen, werden seit über 15 Jahren intensiv erforscht. Über den C-Terminus bindet LMP1 eine Reihe von

Signalmolekülen. Im Folgenden soll auf diese LMP1-assoziierten Proteine und die dadurch aktivierten Signalwege genauer eingegangen werden. Diese sind in einer Übersicht mit den wichtigsten der beteiligten Moleküle schematisch in Abbildung 2 dargestellt.

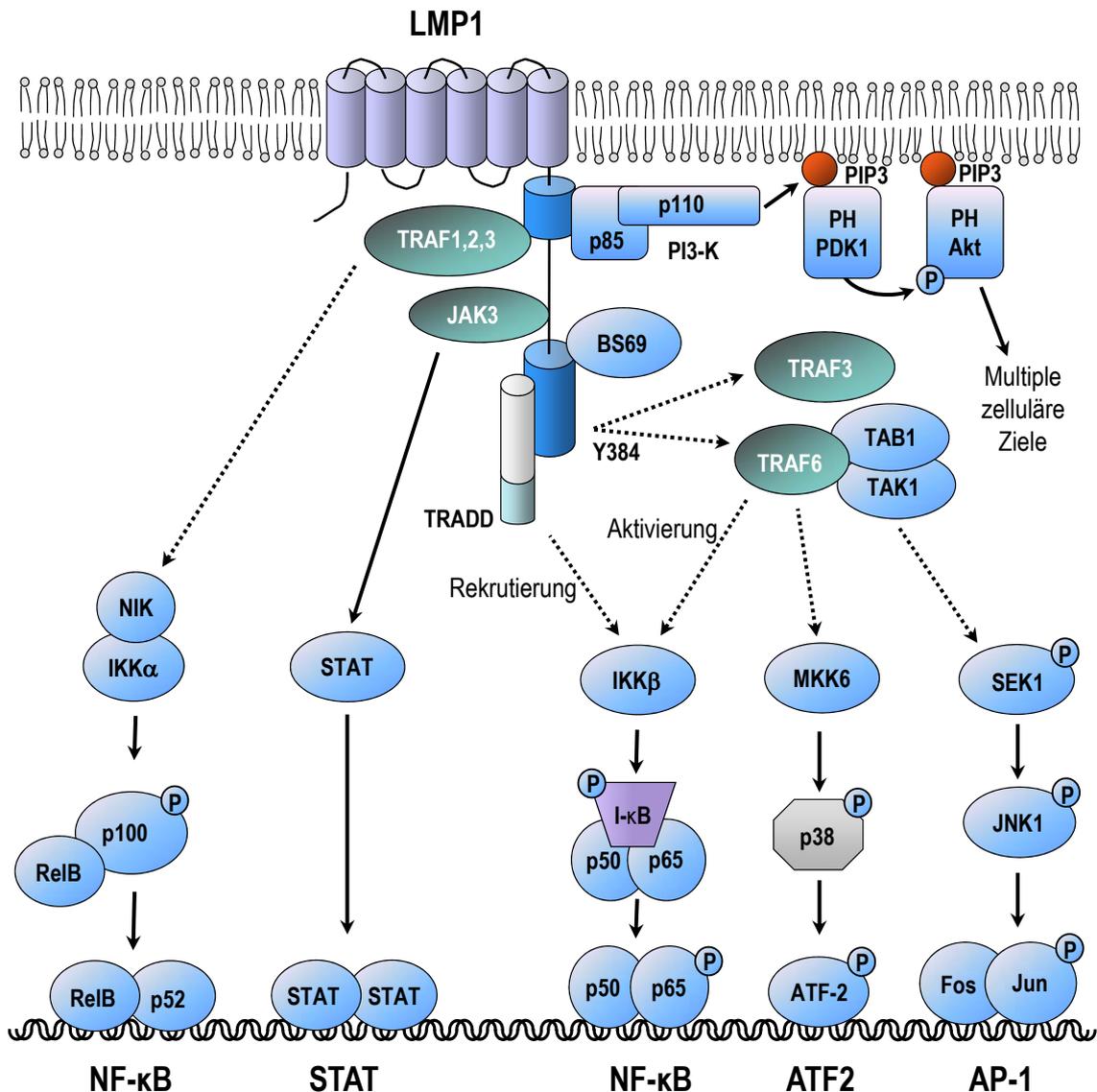


Abbildung 2: Übersicht über die wichtigsten von LMP1 aktivierten Signalwege.

LMP1 aktiviert NF-κB über den klassischen und alternativen Signalweg, JNK/AP-1, p38 MAPK/ATF-2, Jak/STAT sowie PI3-K/Akt. Die gestrichelten Pfeile geben an, wo Signalmediatoren noch nicht vollständig aufgeklärt sind.

1.2.4.1 TRAF-Moleküle

Die Familie der Tumornekrosefaktor-Rezeptor assoziierte Faktoren (TRAF) stellt Adaptermoleküle dar. Wie der Name andeutet, wurden sie ursprünglich als Signalmediatoren der TNF-Rezeptor-Familie beschrieben, insbesondere von TNFR1, TNFR2 und CD40. Sie vermitteln die Interaktion von Membranproteinen mit zytosolischen Signalproteinen und leiten so die Signalkaskade weiter. Bislang sind sieben Mitglieder der TRAF-Familie bekannt (TRAF1 bis TRAF7). Mit Ausnahme von TRAF7 verfügen alle TRAFs über eine konservierte Domäne am C-Terminus, die sowohl für die Homo- und Heterodimerisierung mit

anderen TRAF-Molekülen als auch für die Interaktion mit Rezeptoren essentiell ist (Wajant et al., 2001). TRAF2 bis TRAF7 besitzen außerdem eine RING-Finger Domäne, die bei der Ubiquitinierung der Proteine eine Rolle spielt. Die RING-Finger Domäne verleiht den TRAFs die Fähigkeit, als E3 Ubiquitin-Ligase zu agieren (Freemont, 2000). Diese Eigenschaft konnte bereits für TRAF2, 5, 6 und 7 nachgewiesen werden (Bouwmeester et al., 2004; Deng et al., 2000; Wajant et al., 2001; Xia and Chen, 2005).

1995 konnte für TRAF1 und TRAF2 eine direkte Interaktion mit LMP1 gezeigt werden, die, wie auch für andere Rezeptoren, über die C-terminale Domäne vermittelt wird (Mosialos et al., 1995). Mittlerweile wurden auch TRAF3 und TRAF5 als direkte Bindepartner von LMP1 identifiziert (Brodeur et al., 1997; Devergne et al., 1996; Kaye et al., 1996). Die Bindung erfolgt über ein PxQxT-Motiv, wobei x für eine beliebige Aminosäure steht. Diese Konsensussequenz, die auch bei CD40 für die Bindung essentiell ist (Cheng and Baltimore, 1996; Franken et al., 1996; Hu et al., 1994; Pullen et al., 1999a), ist in CTAR1 lokalisiert (₂₀₄PQQAT₂₀₈) und konnte für TRAF1, 2, 3 und 5 als Bindestelle nachgewiesen werden (Devergne et al., 1996; Mosialos et al., 1995; Sandberg et al., 1997). Neben diesen Mitgliedern der TRAF-Familie ist auch TRAF6 an der Signaltransduktion von LMP1 beteiligt. Es spielt jedoch vor allem in den von CTAR2 vermittelten Signalwegen eine Rolle (Schultheiss et al., 2001). CTAR2 verfügt über kein PxQxT-Motiv, auch fehlt eine QxPxExxE/F-Konsensussequenz, die die direkte Bindung von TRAF6 an CD40 vermittelt (Pullen et al., 1999b; Pullen et al., 1998). Vielmehr handelt es sich wahrscheinlich um eine indirekte oder transiente Interaktion.

1.2.4.2 TRADD

Das Adapterprotein TRADD (*TNF-receptor associated death domain protein*) konnte in einem *Yeast Two Hybrid Screen* als direkter Interaktionspartner von LMP1 identifiziert werden (Izumi and Kieff, 1997). Wie bereits die TRAFs wurde auch TRADD zunächst als TNF-Rezeptor 1-bindendes Protein beschrieben, wo es über seine C-terminale Todesdomäne (As 215-305) mit dem Rezeptor assoziiert (Hsu et al., 1995). Bindet es an LMP1, interagiert der N-Terminus (As 1-194) von TRADD mit CTAR2 von LMP1, wobei die letzten drei Aminosäuren von LMP1 ₃₈₄YYD₃₈₆ essentiell sind (Izumi and Kieff, 1997). Schneider et al. konnte die TRADD-Bindestelle an LMP1 auf die As 371-386 eingrenzen. Diese Bindestelle ist übertragbar und determiniert darüberhinaus den nicht-apoptotischen Phänotyp des TRADD-LMP1-Komplexes unabhängig vom Rezeptorkontext (Schneider et al., 2008). Eine intakte Todesdomäne von TRADD ist für die Bindung an LMP1 nicht notwendig (Kieser et al., 1999).

1.2.4.3 RIP

Auch RIP (Rezeptor-interagierendes Protein) wurde als direkter Interaktionspartner von LMP1 in einem *Yeast Two Hybrid Screen* identifiziert (Izumi et al., 1999b). Wie TRADD bindet es über CTAR2 an LMP1, wobei die Mutation von ₃₈₄YYD₃₈₆ zu ID die RIP Interaktion schwächt. Allerdings scheinen die Aminosäuren 355 bis 386 von LMP1 für die Interaktion nicht ausreichend zu sein, so dass sich die Bindestelle über eine größere Region des LMP1-Moleküls zu erstrecken scheint (Izumi et al., 1999b). RIP verfügt über eine Kinasedomäne am N-Terminus und über eine C-terminale Todesdomäne. Potenzielle Substrate oder die Funktion der Kinaseaktivität sind bislang noch weitgehend unklar (Baker and Reddy, 1998; Meylan and Tschopp, 2005). Neue Untersuchungen haben allerdings eine Bedeutung von RIP auf die Interferon-Signaltransduktion nachgewiesen. So stimuliert LMP1 die Ubiquitinierung von RIP sowie dessen Interakti-

on mit dem Interferon-regulierenden Faktors 7 (IRF7) (Huye et al., 2007). IRF7 stellt den Hauptregulator der Typ I Interferon Immunantwort dar (Honda et al., 2005). RIP vermittelt die LMP1 induzierte Ubiquitinierung von IRF7 an K63, was die Aktivität von IRF7 erhöht (Huye et al., 2007). Damit spielt RIP eine entscheidende Rolle in der Regulation der Interferon- α/β -Antwort.

1.2.4.4 LMP1 induziert NF- κ B durch TRAFs und TRADD

In der Reihe der verschiedenen Signalwege, die durch LMP1 induziert werden, hat der NF- κ B-Signalweg eine Schlüsselrolle. Er ist essentiell für die LMP1-vermittelte Transformation von primären B-Lymphozyten (Cahir McFarland et al., 1999; Devergne et al., 1996). So überrascht es nicht, dass LMP1 die Induktion von anti-apoptotischen Genen, die Hochregulation von B-Zell-Aktivierungsmarker und die Herunterregulation von pro-apoptotischen Genen über NF- κ B vermittelt (Cahir-McFarland et al., 2004; Devergne et al., 1998; Dudziak et al., 2003; Grimm et al., 2005; Krikos et al., 1992; Laherty et al., 1992).

Die NF- κ B/Rel-Familie besteht aus fünf Mitgliedern, die heterodimere Transkriptionsfaktoren bilden: p50/NF- κ B1 mit dem Vorläuferprotein p105, p52/NF- κ B2 mit dem Vorläuferprotein p100, p65/RelA, Rel/c-Rel und RelB (Ghosh and Karin, 2002). NF- κ B wird sowohl über CTAR1 als auch über CTAR2 aktiviert, wobei jede Bindedomäne unterschiedliche Signalwege unter Beteiligung verschiedener Proteine induziert.

Der klassische oder kanonische NF- κ B-Weg wird über CTAR2 vermittelt und trägt zu über 70% der von LMP1 vermittelten NF- κ B-Aktivität bei (Huen et al., 1995; Mitchell and Sugden, 1995). Hierbei wird I- κ B (*inhibitor of κ B*) durch den I- κ B Kinase (IKK) Komplex phosphoryliert, was die proteasomale Degradation einleitet. Der IKK-Komplex setzt sich aus den beiden katalytischen Untereinheiten IKK α /IKK1 und IKK β /IKK2 sowie aus der regulatorischen Komponente IKK γ /NEMO zusammen (Karin and Greten, 2005). Für den klassischen NF- κ B-Signaltransduktionsweg ist IKK β entscheidend (Luftig et al., 2003). Anders als in der TNF-, IL-1-, LPS- oder poly(IC)-vermittelten NF- κ B-Aktivierung ist der klassische LMP1-induzierte NF- κ B-Signalweg unabhängig von IKK γ (Luftig et al., 2003). Durch die Phosphorylierung und anschließende Degradation des Inhibitors I κ B α wird das Heterodimer p50/p65 freigesetzt und kann in den Nukleus translozieren, wo es die Transkription NF- κ B-abhängiger Gene aktiviert (Bonizzi and Karin, 2004).

TRADD spielt bei der Induktion des klassischen NF- κ B-Signalwegs durch LMP1 eine entscheidende Rolle. So inhibiert eine TRADD-Mutante, der die Todesdomäne fehlt, eine NF- κ B-Aktivierung über CTAR2 (Kieser et al., 1999). Auch wenn Studien mit TRADD-spezifischer siRNA nur einen minimalen Effekt auf die LMP1-induzierte NF- κ B-Aktivierung zeigten, konnte die TRADD-Abhängigkeit des Signalweges mit TRADD-defizienten Zellen endgültig bewiesen werden (Schneider et al., 2008). So wird IKK β in Abwesenheit von TRADD nicht an den LMP1-Multiproteinkomplex rekrutiert. In Anwesenheit von TRADD hingegen aktiviert TRAF6 das von TRADD rekrutierte IKK β (Luftig et al., 2003; Schneider et al., 2008; Schultheiss et al., 2001; Wu et al., 2006; Xie and Bishop, 2004; Xie et al., 2004). Eine Beteiligung von TAK1 an der NF- κ B-Aktivierung durch CTAR2 ist umstritten (Uemura et al., 2006; Wu et al., 2006). Über welchen Faktor TRAF6 an CTAR2 von LMP1 bindet, ist noch nicht bekannt, da TRAF-Moleküle weder mit TRADD noch mit CTAR2 direkt interagieren können (Arch et al., 1998). Es gibt Hinweise darauf, dass das Protein BS69 den Mediator dieser Interaktion darstellen könnte. Allerdings hat BS69-spezifische siRNA keinen Effekt auf die Aktivität von NF- κ B (Wan et al., 2006).

Auch beim alternativen oder nicht-kanonischen NF- κ B Signalweg spielen TRAFs eine entscheidende Rolle. Durch Analysen mit überexprimiertem bzw. dominant-negativem TRAF2 wurde diese TRAF-Isoform als Mediator der CTAR1-induzierten NF- κ B-Aktivierung identifiziert (Devergne et al., 1996; Kaye et al., 1996). Studien in TRAF2- bzw. TRAF3-defizienten Zellen bewiesen hingegen, dass TRAF3 essentiell ist, während eine Abwesenheit von TRAF2 keine Auswirkung auf die NF- κ B-Aktivität hat (Luftig et al., 2004; Xie et al., 2004). Neue Untersuchungen von Soni et al. weisen jedoch auf eine Beteiligung von TRAF2 in CTAR1 vermittelten NF- κ B-Signaltransduktion hin (Soni et al., 2007), denn in TRAF2-defizienten MEF-Zellen wurde nur eine CTAR2 abhängige NF- κ B-Aktivität gefunden (Soni et al, unpublizierte Daten). In der alternativen NF- κ B-Signalkaskade könnte TRAF2 als Adapter zwischen NIK und IKK α fungieren, da es mit beiden Proteinen interagieren kann (Arch et al., 1998; Ishida et al., 1996; Pullen et al., 1998). Die Rolle von TRAF2 in der Signaltransduktion von CTAR1 ist damit Gegenstand der momentanen wissenschaftlichen Diskussion.

TRAF3 wird eine weitreichende Bedeutung für die NF- κ B-Induktion durch LMP1 zugeschrieben. Während die Überexpression von TRAF3 eine NF- κ B-Aktivierung antagonisiert (Devergne et al., 1996), wird in Abwesenheit von TRAF3 in murinen Zellen I- κ B α nicht mehr LMP1-induziert phosphoryliert, während die NF- κ B-Reporter Aktivität auf 50 % gegenüber Wildtypzellen reduziert ist (Xie et al., 2004). Bei Untersuchungen dieser Art muss allerdings beachtet werden, dass TRAF3 sowohl in der CTAR1- als auch in der CTAR2-vermittelten LMP1 Signaltransduktion von Bedeutung ist, was in diesen Analysen nicht genau unterschieden wurde. TRAF3 interagiert direkt mit CTAR1 und bildet damit eine Plattform, an die andere Signalproteine binden können. So wird die NF- κ B induzierende Kinase (NIK) rekrutiert und aktiviert (Luftig et al., 2004; Xie and Bishop, 2004). NIK phosphoryliert und aktiviert die Kinase IKK α , die wiederum das Vorläufermolekül p100 phosphoryliert. Durch die Phosphorylierung wird p100 proteolytisch gespalten und p52 freigesetzt (Bonizzi and Karin, 2004). Dieses kann nun einen heterodimeren Komplex mit RelB eingehen und in den Nukleus translozieren, wo es die Transkription NF- κ B-abhängiger Gene induziert. (Eliopoulos et al., 2003a; Luftig et al., 2004).

1.2.4.5 LMP1 aktiviert AP1 über den JNK-Signalweg

AP1 wird von LMP1 über die c-Jun N-terminale Kinase 1 (JNK1) aktiviert, die auch SAPK1 genannt wird. Der Name lässt bereits auf die Funktion schließen, denn JNK1 phosphoryliert die aminoterminalen Transaktivator-domäne von c-Jun. Durch diese Phosphorylierung wird c-Jun aktiviert und kann mit Fos das Heterodimer AP1 bilden, das als Transkriptionsfaktor die Expression von AP1-abhängigen Genen veranlasst (Kieser et al., 1997). Im Gegensatz zum NF- κ B-Signalweg wird der JNK-Signalweg vorwiegend über CTAR2 aktiviert (Eliopoulos and Young, 1998; Kieser et al., 1997). In bestimmten Zelltypen kann allerdings auch CTAR1 einen Beitrag zu JNK-Aktivierung beitragen (Eliopoulos et al., 2003b; Kutz et al., 2008). Eine Feinkartierung konnte die JNK-Aktivierungsregion (JAR) innerhalb von CTAR2 auf die Aminosäuren 379-384 festlegen (Kieser et al., 1999). Da diese Region mit der TRADD-Bindestelle von LMP1 überlappt, lag zunächst die Vermutung nahe, dass der JNK-Signalweg von TRADD vermittelt wird (Eliopoulos et al., 1999; Floettmann and Rowe, 1997; Izumi and Kieff, 1997). In diese Richtung weisen Beobachtungen, dass eine Mutation in diesem Bereich sowohl den Verlust der TRADD-Bindung als auch den der LMP1-vermittelten JNK1-Aktivierung zur Folge hat. Jedoch konnte weder mit dominant-negativem TRADD noch mit TRADD-spezifischer siRNA der JNK-Signalweg von LMP1 blockiert werden (Kieser et al., 1999; Wan et al., 2004). Den endgültigen Beweis, dass TRADD für die Aktivierung von JNK durch LMP1 nicht not-

wendig ist, konnte von Schneider et al. erbracht werden, denn auch in TRADD-defizienten B-Lymphozyten konnte LMP1 die JNK-Signalkaskade induzieren (Schneider et al., 2008). Der Signalweg ist stattdessen von TRAF3 und TRAF6 abhängig (Kieser et al., 1999; Wan et al., 2004; Xie and Bishop, 2004; Xie et al., 2004). Wie TRAF3 und TRAF6 jedoch mit LMP1 zur Induktion von JNK interagieren, konnte jedoch bis jetzt nicht aufgeklärt werden. BS69 könnte, wie auch bei der CTAR2-vermittelten NF- κ B Signaltransduktion, hier eine Rolle spielen. So konnte Wan et al. einen Effekt von BS69-spezifischer shRNA auf die LMP1-induzierte JNK1 Aktivität zeigen (Wan et al., 2006). Weitere wichtige Komponenten des JNK-Signalwegs unterhalb der TRAF-Moleküle sind die Kinase TAK1, das TAK1-bindende Protein 1 (TAB1) und die JNK-Kinase SEK1 (MKK4) (Kieser et al., 1997; Wan et al., 2004; Xie and Bishop, 2004).

1.2.4.6 LMP1 induziert den p38- MAPK-Signalweg

Der p38 MAPK-Signalweg wird sowohl über CTAR1 als auch über CTAR2 von LMP1 aktiviert (Eliopoulos et al., 1999; Schultheiss et al., 2001). Eine Mutation des PxQxT-Motivs zu AxAxA halbiert hierbei die Induktion, während eine Mutation des Tyr₃₈₄ sie beinahe vollständig auslöscht (Eliopoulos et al., 1999; Schultheiss et al., 2001). Für die Aktivierung von p38 ist TRAF6 und MKK6 essenziell (Schultheiss et al., 2001). Ein weiterer wichtiger Faktor ist IRAK1, ein direkter Interaktionspartner von TRAF6 (Song et al., 2006). In Burkitt-Lymphomzellen konnte gezeigt werden, dass LMP1 über den p38-MAPK-Signalweg den Transkriptionsfaktor ATF-2 aktiviert und so die Expression von IL-6, IL-8 und IL-10 induziert (Eliopoulos et al., 1999; Vockerodt et al., 2001).

1.2.4.7 Der PI3K/Akt1-Signalweg wird von LMP1 aktiviert

Ein weiterer Signalweg, der durch LMP1 induziert wird, ist der PI3K/Akt1-Signalweg. p85, die regulatorische Untereinheit der Phosphoinositol 3-Kinase (PI3K), kopräzipitiert mit CTAR1 von LMP1, wobei das PxQxT-Motiv für eine Aktivierung verantwortlich ist (Dawson et al., 2003; Mainou et al., 2005). Über die katalytische Untereinheit p110 generiert PI3K Phosphatidylinositol-3,4,5-Triphosphat (PIP₃). PIP₃ rekrutiert die Kinase Akt1 an die Membran, wo sie von der Kinase PDK1 phosphoryliert und aktiviert wird (Fresno Vara et al., 2004). Akt1 wirkt auf eine Vielzahl zellulärer Signalwege. So inhibiert Akt1 Apoptose, indem sie die Phosphorylierung von Bad, einem Mitglied der Bcl-2-Familie, steigert und das Protein so inaktiviert (Datta et al., 1997). Außerdem aktiviert die Kinase GTPasen der Rho-Familie, über die das Aktin-Zytoskelett reorganisiert und Stressfilamente aufgebaut werden. Diese Vorgänge sind für die morphologische Transformation von Nagerfibroblasten durch LMP1 essentiell (Dawson et al., 2003; Mainou et al., 2005).

1.2.4.8 LMP1 vermittelt die Aktivierung des Jak/STAT Signaltransduktionsweges

Neben den bisher aufgezeigten Signalwegen induziert und aktiviert LMP1 Transkriptionsfaktoren der STAT-Familie (*signal transducer and activator of transcription*). So konnte die Phosphorylierung von STAT1 und STAT3 in HEK293 und LCLs bereits 15-30 min nach LMP1-Aktivierung nachgewiesen werden (Dirmeier et al., 2005; Gires et al., 1999), was für die Existenz eines direkten Signaltransduktionsweges spricht. Zwischen CTAR1 und CTAR2 sind zwei Jak-Box1-Motive und ein Jak-Box2-Motiv lokalisiert, an die nach Gires et al. die Janus Kinase Jak3 binden kann (Gires et al., 1999). Die Existenz dieser Bindestelle wird jedoch kontrovers diskutiert. Higushi et al. konnten zwar eine generelle Interaktion von LMP1

und Jak3 bestätigen, doch zeigte auch eine LCL mit einer LMP1-Mutante, in der die Jak-Boxen deletiert waren, diese Interaktion (Higuchi et al., 2002).

Die funktionelle Bedeutung des Jak/STAT-Signalwegs ist bis zum heutigen Zeitpunkt nicht klar. So ist der Signalweg zwar in LCLs aktiv, hat aber keine Relevanz bei der Transformation der Zellen (Izumi et al., 1999a).

1.3 Die Phosphatase SHP-1

Die Phosphatase SHP-1 (*SH2 domain-containing phosphatase 1*) wurde im Rahmen bisheriger massenspektrometrischen Analysen dieses Labors als potenzielle LMP1 bindendes Protein identifiziert. Dieses Kapitel beschäftigt sich daher mit diesem Protein und seiner Bedeutung für die Signaltransduktion.

Tyrosin-Phosphorylierungen sind posttranslationale Modifikationen, um die funktionellen Eigenschaften eines Proteins zu verändern. Besonders im Bereich der Signaltransduktion wird die Aktivität eines Proteins häufig durch Tyrosin-Phosphorylierung reguliert. Daher müssen den Protein-Tyrosin-Kinasen (PTK) Protein-Tyrosin-Phosphatasen (PTP) entgegenstehen, so dass eine Balance zwischen Phosphorylierung und Dephosphorylierung gegeben ist. Es sind heute 81 Proteine bekannt, die Phosphotyrosine dephosphorylieren können (Alonso et al., 2004). Denen gegenüber stehen 85 katalytisch aktive PTKs im menschlichen Genom (Alonso et al., 2004). Die Phosphatase SHP-1 gehört zu den am besten untersuchten Kinasen und ist als Mitglied der klassischen PTPs strikt Tyrosin-spezifisch. Die klassischen PTPs können weiter unterteilt werden in rezeptorähnliche PTPs und zytosolische PTPs, wobei SHP-1 den zytosolischen zuzurechnen ist (Poole and Jones, 2005).

Es existieren verschiedene Isoformen von SHP-1, eine hämatopoietische, eine nicht-hämatopoietische sowie eine längere Form, SHP-1L. Die hämatopoietische unterscheidet sich von der nicht-hämatopoietischen durch eine andere Translationsinitiationsstelle, was eine Abweichung von drei Aminosäuren am N-Terminus zur Folge hat (Banville et al., 1995). Die Unterschiede zwischen den beiden Isoformen sind damit marginal und können in der Regel vernachlässigt werden (Plutzky et al., 1992; Walton and Dixon, 1993). SHP-1L hingegen kommt durch alternatives Spleißen zustande, bei dem es zu einer Verschiebung des Leserasters kommt. SHP-1L unterscheidet sich in 66 As am C-Terminus und ist 29 As größer, so dass ein 70 kDa Protein anstelle des 68 kDa Proteins entsteht (Jin et al., 1999).

1.3.1 Die Struktur von SHP-1

Wie der Name bereits besagt, verfügt SHP-1 über zwei SH2-Domänen, die am N-Terminus lokalisiert sind. Die Abkürzung SH2 steht für *Src-homology 2*. Die ca. 100 Aminosäuren langen Domänen erkennen insbesondere Peptide mit phosphoryliertem Tyrosin. Darüber hinaus besitzt SHP-1 eine Phosphatasedomäne und einen C-terminalen Schwanz. Eine schematische Darstellung der Struktur von SHP-1 ist in Abbildung 3 zu sehen.

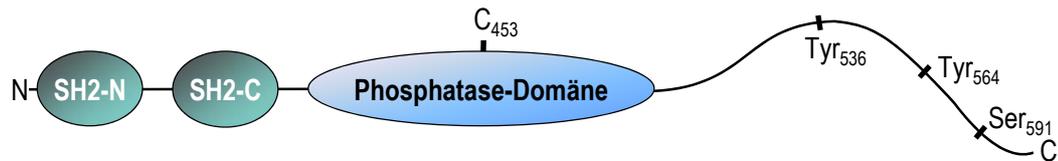


Abbildung 3: Struktureller Aufbau des SHP-1-Moleküls.

SHP-1 besitzt zwei SH2-Domänen am N-Terminus, eine Phosphatasedomäne und einen C-terminalen Schwanz, der durch posttranskriptionelle Modifikationen die Aktivität der Phosphatase regulieren kann.

Die Kristallstruktur von SHP-1 wurde in verschiedenen Konformationen bereits gelöst (Liang et al., 1997; Yang et al., 2000a; Yang et al., 2001; Yang et al., 1998a; Yang et al., 2003). Hierbei wird die Bedeutung der N-terminalen SH2-Domäne augenfällig. Im inaktiven Zustand tritt sie mit der Phosphatasedomäne über coulombsche Wechselwirkungen in Kontakt und blockiert die katalytische Tasche und damit den Zugang des Substrats. Die C-terminale SH2-Domäne hingegen ist nach außen gerichtet und kann mit dem Substrat in Kontakt treten. Bindet das Substrat an die C-terminale SH2-Domäne, findet ein allosterischer Konformationswechsel statt, der die selbstinhibierende Interaktion zwischen der N-terminalen SH2-Domäne und der Phosphatasedomäne schwächt. Das aktive Zentrum wird frei, so dass das Substrat Zugang erhält und umgesetzt werden kann.

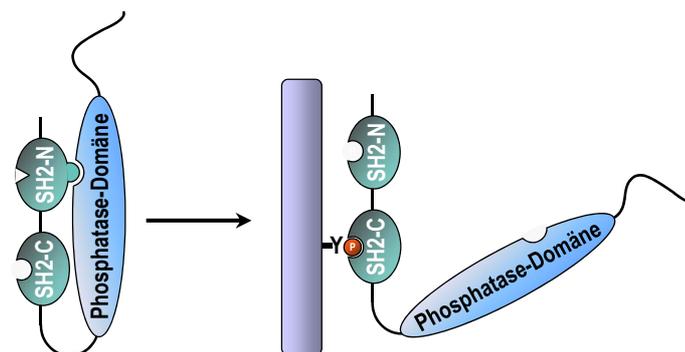


Abbildung 4: Modell der Konformationsänderung von SHP-1 nach Substratbindung.

Im inaktiven Basiszustand (a) bindet die N-terminale SH2-Domäne von SHP-1 über Wasserstoffbrückenbindungen und coulombsche Wechselwirkungen an die Phosphatasedomäne, so dass die Phosphatasedomäne inaktiviert ist. Darüber hinaus wird durch die Wechselwirkung der N-terminalen SH2-Domäne mit der Phosphatasedomäne die Affinität der Bindetasche der N-terminalen SH2-Domäne für Phosphotyrosine reduziert, so dass diese kein Substrat binden kann. Die C-terminale SH2-Domäne wird hingegen nicht beeinflusst und kann mit phosphorylierten Tyrosinen interagieren. Diese Interaktion führt zu einem Konformationswechsel, bei dem das aktive Zentrum der Phosphatasedomäne frei wird.

Auch der C-terminale Schwanz besitzt einen Einfluss auf die Funktion von SHP-1, was mit verschiedenen Deletionsmutanten untersucht wurde. Werden die letzten 35 AAs deletiert, verfügt SHP-1 *in vitro* über eine höhere Phosphataseaktivität. Eine Deletion der letzten 60 AAs senkt die Aktivität hingegen wieder (Pei et al., 1994).

Der C-Terminus kann über verschiedene Mechanismen posttranskriptionell modifiziert werden, etwa über die Phosphorylierung von Tyrosinen und Serinen und über die Interaktion mit Membranlipiden (Poole and Jones, 2005). So kann SHP-1 an Tyr₅₃₆ und an Tyr₅₆₄ phosphoryliert werden (Bouchard et al., 1994; Lo-

renz et al., 1994). Die Phosphorylierung an Tyr₅₃₆ erfüllt zwei Funktionen. Zum einen können Substrate, wie etwa Grb2, rekrutiert werden (Kon-Kozlowski et al., 1996; Uchida et al., 1994; Yang et al., 1998b; Yeung et al., 1992; Yi and Ihle, 1993). Zum anderen erhöht die Phosphorylierung an Tyr₅₃₆ die Phosphataseaktivität *in vitro* und *in vivo* (Frank et al., 2004; Uchida et al., 1994). Auch die Phosphorylierung an Tyr₅₆₄ wirkt sich positiv auf die Aktivität von SHP-1 aus, wobei diese Modifikation jedoch nur einen moderaten Einfluss besitzt. Das von Zhang et al. vorgeschlagene Modell besagt, dass Phospho-Tyr₅₃₆ mit der N-terminalen SH2-Domäne interagiert, während Phospho-Tyr₅₆₄ mit der C-terminalen in Kontakt treten kann (Zhang et al., 2003b). Diese Wechselwirkungen tragen zu dem Konformationswechsel bei, durch den die N-terminale SH2-Domäne die katalytische Tasche verlässt und das Enzym aktiviert wird (vgl. Abbildung 4).

Eine Phosphorylierung an Ser₅₉₁ hingegen korreliert mit einer reduzierten Aktivität (Brumell et al., 1997). Hierbei wurde die Hypothese aufgestellt, dass SHP-1 über eine Basalaktivität verfügt, um die Phosphorylierung von Tyrosinen diverser Substrate zu revertieren. Wird die Zelle aktiviert, wird die Aktivität von SHP-1 durch die Phosphorylierung an Ser₅₉₁ herunterreguliert. So kann die Zelle transient die Tyrosin-Phosphorylierung bestimmter zellulärer Proteine erhöhen und Signalwege damit aktivieren (Jones et al., 2004).

Interagiert der C-Terminus mit verschiedenen sauren Phospholipiden, wird die Aktivität von SHP-1 gesteigert (Frank et al., 1999; Tomic et al., 1995; Zhao et al., 1994; Zhao et al., 1993). So bindet SHP-1 über 43 Aminosäuren im distalen C-Terminus Phosphatidsäure (PA) und im geringeren Ausmaß PIP₃, Phosphatidylserin und andere Phospholipiden (Frank et al., 1999).

1.3.2 Die biologischen Funktionen von SHP-1

1.3.2.1 Die Mausmodelle *motheaten* und *viable motheaten*

Spontane Mutationen in Mäusen sind ein wichtiges Werkzeug, um Funktionen von einzelnen Genen bzw. den von ihnen kodierten Proteinen bestimmen zu können. Für SHP-1 existieren zwei solcher Mausmodelle, die sogenannten *motheaten/motheaten* (*me/me*) und *viable motheaten/viable motheaten* (*me^v/me^v*) Mäuse. Sie zeigen die schwerwiegendsten Störungen in der Entwicklung des Immunsystems und der Hämatopoese, die durch die Mutation eines einzelnen Gens (*single-gen mutation*) verursacht werden (Shultz et al., 1997). Sowohl *me/me* als auch *me^v/me^v* beruhen auf defektem RNA-Spleißen. In der *me/me* Mutation ist ein Cytidin deletiert, was eine neue Spleiß-Donorstelle innerhalb der N-terminalen SH2-Domäne generiert. Durch diese Spleißstelle kommt es zu einem Wechsel im Leseraster, was ein vorzeitiges Abbrechen der mRNA zur Folge hat. Bei den *me/me* Mäusen handelt es sich daher um eine Nullmutation. Die *me^v/me^v* Mäuse verfügen hingegen noch über eine ca. 20%ige Restaktivität von SHP-1. Hier wird durch eine Thymin-zu-Adenin Transversion eine Spleiß-Donorstelle zerstört, was die Aktivierung einer kryptischen Spleißstelle zur Folge hat. So kommt es zu einer Deletion oder Insertion innerhalb der Phosphatasedomäne, wobei das Leseraster beibehalten wird (Kozlowski et al., 1993; Shultz et al., 1993).

Trotz der Restaktivität von SHP-1 in *me^v/me^v*-Mäusen ist der Phänotyp von *me/me* und *me^v/me^v* ähnlich, letztere haben lediglich eine etwas längere Lebenserwartung. Während *me/me* Mäuse bereits nach ca. drei Wochen an interstitieller Pneumonitis sterben, tritt bei *me^v/me^v* Mäusen der Tod nach etwa neun Wo-

chen ein (Shultz et al., 1984). Die wichtigsten äußeren Auffälligkeiten beinhalten ein langsames Wachstum mit einem geringeren Gewicht, entzündete Pfoten und Haarausfall. Letzteres wird durch die Einlagerung neutrophiler Zellen bedingt, die die Haarfollikeln verdrängen und so zu dem „mottenzerfressenen“ (*moth-eaten*) Fell der Tiere führen. Histologisch fallen die Tiere weiterhin durch eine erhöhte Anzahl an undifferenzierten Leukozyten und größere Ansammlungen von Makrophagen in der Lunge auf (Green and Shultz, 1975). Eine besondere Bedeutung wird SHP-1 in lymphatischen Zellen zugeschrieben. So sind in *me/me*-Mäusen die primären lymphatischen Organe in Größe und Struktur verändert. Im Knochenmark akkumulieren unreife Granulozyten und der Thymus ist stark verkleinert. Hingegen sind die sekundär-lymphatischen Organe Milz und Lymphknoten stark vergrößert und enthalten große Zahlen an myeloiden Zellen, Plasmazellen und so genannte *mothcells* (Green and Shultz, 1975). Weiterhin verschiebt sich die Zusammensetzung des B-Zell-Kompartiments. Während die typischen B-Lymphozyten dezimiert sind, findet man eine Überexpression an autoreaktiven CD5⁺-B-Zellen (Greiner et al., 1986; Sidman et al., 1986). Darüber hinaus führt die Abwesenheit von SHP-1 zu einer massiv eingeschränkten NK-Zellfunktion, zum Fehlen einer zytotoxischen T-Zell-Antwort und zu einer reduzierten Proliferation nach B- und T-Zell Mitogenen (Shultz and Sidman, 1987).

1.3.2.2 SHP-1 im Kontext von Signaltransduktion

Zunächst wurde die Phosphatase SHP-1 als ausschließlich negativer Regulator verschiedener Zellfunktionen gesehen. Dieses Bild hat sich in den letzten Jahren als zu stark vereinfachend herausgestellt, da SHP-1 eine Reihe von Signalwegen differentiell und zum Teil auch abhängig von der jeweiligen Zelllinie moduliert. Im nun folgenden Abschnitt soll ein Überblick über die Bedeutung von SHP-1 in Signalkaskaden gegeben werden, die im Zusammenhang mit EBV und im Besonderen mit LMP1 eine Rolle spielen könnten.

Dass SHP-1 im PI3K/Akt-Signalweg eine Rolle spielt, zeigen SHP-1-defiziente Mäuse, die eine erhöhte Aktivität dieses Signalwegs in Muskeln und Leber aufweisen (Dubois et al., 2006). Hierbei scheinen zwei Mechanismen von Bedeutung zu sein. Zum einen kann SHP-1 auf die Aktivität der Phosphatase PTEN Einfluss nehmen. PTEN dephosphoryliert im aktiven Zustand PIP₃, das Akt an die Membran bringt und so einer Aktivierung zugänglich macht. Wird PIP₃ aber zu PIP₂ dephosphoryliert, kann es Akt nicht mehr rekrutieren (siehe auch Kapitel 1.2.4.7). PTEN wird von Src-Kinasen phosphoryliert und damit inaktiviert. Diese Phosphorylierung kann durch SHP-1 aufgehoben werden, so dass PTEN aktiv ist und so die Akt-Aktivität verringert (Lu et al., 2003b). Zum anderen kann SHP-1 aber auch direkt auf die PI3-Kinase wirken, indem es die regulatorische Untereinheit p85 bindet und dephosphoryliert (Cuevas et al., 1999; Yu et al., 1998). Dadurch wird die PI3-Kinase inaktiviert, denn eine Phosphorylierung der regulatorischen Untereinheit p85 hebt ihre inhibitorische Wirkung auf. Wird p85 etwa von Src-Kinasen phosphoryliert, wird die katalytische Untereinheit p110 aktiviert, was zu einer Phosphorylierung von Akt führt. SHP-1 vermindert also durch die Dephosphorylierung der regulatorischen Untereinheit die Src-induzierte Aktivierung von PI3K. So weisen SHP-1 defiziente Zellen einen höheren Phosphorylierungsgrad sowohl von p85 als auch von Akt auf (Cuevas et al., 2001).

Auch der Jak/STAT-Signalweg wird durch SHP-1 beeinflusst. So bindet SHP-1 etwa den Tyrosin-phosphorylierten Erythropoietinrezeptor über seine SH2-Domäne und verhindert so die Aktivierung von Jak2 (Klingmüller et al., 1995). Ebenso terminiert SHP-1 die von Angiotensin II induzierte Jak/STAT-

Signalkaskade, indem es Jak2 dephosphoryliert (Marrero et al., 1998). SHP-1 assoziiert direkt mit Jak2 und dephosphoryliert es, so dass der Signalweg inaktiviert wird (Jiao et al., 1996). Sowohl die Bindung zwischen Jak2 und SHP-1 als auch die Dephosphorylierung von Jak2 ist unabhängig von den SH2-Domänen und weicht daher von dem für SHP-1 üblichen Mechanismus der Substratumsetzung ab (Jiao et al., 1996; Wu et al., 2000). Neben Jak2 kann SHP-1 auch die übrigen Mitglieder der Jak-Familie binden und dephosphorylieren (Jiao et al., 1996). Die Inaktivierung von Jak3 durch SHP-1 scheint im Sezary-Syndrom, einem T-Zell Lymphom der Haut, eine Rolle zu spielen (Leon et al., 2002).

Weiterhin kann SHP-1 in den JNK-Signalweg eingreifen, der auch durch LMP1 induziert wird (siehe Kapitel 1.2.4.5). In B-Zellen aus *me/me* Mäusen ist JNK konstitutiv aktiv und wird durch BCR-Ligation noch stärker induziert (Mizuno et al., 2002), was für eine negative Rolle von SHP-1 in der JNK-Aktivierung von B-Zellen spricht. Diese Daten werden durch Analysen in B-Lymphozyten gestärkt, die mit wildtyp bzw. dominant-negativem SHP-1 transfiziert wurden. Während bei wt SHP-1 die JNK-Phosphorylierung nach BCR-Stimulation gegenüber der Leerkontrolle reduziert ist, erhöht dominant-negatives SHP-1 die JNK-Phosphorylierung (Mizuno et al., 2000). Auch Untersuchungen in der T-Zelllinie Jurkat weisen in die gleiche Richtung, wo SHP-1 die H₂O₂-induzierte Phosphorylierung von JNK reduziert (Lee and Esselman, 2002). Dennoch kann SHP-1 in einigen Zellsystemen auch einen positiven Einfluss auf die JNK-Aktivität haben. So konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von SHP-1 die JNK-Aktivität und -Phosphorylierung in Mastzellen erhöht, während die Expression von dominant-negativem SHP-1 einen gegenteiligen Effekt hat (Xie et al., 2000).

Darüber hinaus ist SHP-1 ein negativer Regulator des NF- κ B-Signalwegs. Zellen aus *me^v/me^v*-Mäusen weisen eine erhöhte NF- κ B-Expression und Aktivität nach verschiedenen Stimuli auf, wie zum Beispiel Tumornekrosefaktor α , doppelsträngiger RNA und Interferon γ (Khaled et al., 1998; Massa and Wu, 1998). Der Mechanismus dieser Inhibition ist nicht bekannt. Interessant ist, dass sich das Mengenverhältnis der NF- κ B-Proteine in Zellen aus *me^v/me^v*-Mäusen verschiebt. So ist das Expressionsniveau von RelA und RelB reduziert, während das von p50 und c-Rel erhöht ist (Khaled et al., 1999).

1.3.2.3 SHP-1 Signaltransduktion des B-Zell-Rezeptors

Eine entscheidende Rolle übernimmt SHP-1 weiterhin in der Regulation des B-Zell-Rezeptors. Der B-Zell-Rezeptor (BCR) bindet über die variablen Bereiche der zwei leichten und zwei schweren Ketten das Antigen. Er verfügt jedoch über keine nennenswerte intrazelluläre Domäne, die die Signaltransduktion vermitteln könnte. Diese Funktion wird von zwei assoziierten Molekülen, Ig- α und Ig- β , übernommen, die jeweils über ein Immunrezeptor-Tyrosin-basiertes Aktivationsmotiv (ITAM) verfügen. Durch die Aktivierung des Rezeptors wird das ITAM-Motiv durch assoziierte Kinasen der Src-Familie Tyrosin-phosphoryliert. Diese Phosphorylierung rekrutiert und aktiviert PTKs wie Syk und Lck und aktiviert so verschiedene Signaltransduktionsmechanismen. Der BCR ist darüber hinaus noch mit einer Reihe anderer transmembraner Glykoproteine, den so genannten Co-Rezeptoren, assoziiert. Sie werden nach der Aggregation des Rezeptors ebenfalls tyrosinphosphoryliert und bilden dadurch Andockstellen für verschiedene Adapter- und Signalproteine. Neben den ITAMs verfügen einige dieser Glykoproteine über so genannte Immunrezeptor-Tyrosin-basierte Inhibitormotive (ITIMs), die nach Phosphorylierung BCR-Signaltransduktion negativ regulieren.

In ruhenden B-Lymphozyten interagiert SHP-1 konstitutiv mit dem BCR und dephosphoryliert die Ig- α /Ig- β -Ketten des Rezeptors, wobei der Mechanismus der Interaktion mit dem BCR wahrscheinlich unabhängig von den SH2-Domänen ist (Pani et al., 1995). SHP-1 scheint daher den BCR in einem dephosphorylierten und damit inaktiven Zustand zu halten. Für eine erfolgreiche BCR-Signaltransduktion muss daher ein Mindestgrenzwert der Signalintensität überschritten werden (Siminovitch and Neel, 1998). Wird der BCR aktiviert, dissoziiert SHP-1 von dem Komplex (Siminovitch et al., 1999). Es kann nun allerdings über seine SH2-Domänen mit den phosphorylierten Co-Rezeptoren CD22, CD72 und CD5 interagieren und so auf die Signaltransduktion des BCR Einfluss nehmen (Adachi et al., 1998; Blasioli et al., 1999; Bolland and Ravetch, 1999; Cambier, 1997; Sen et al., 1999; Thomas, 1995; Wu et al., 1998). Hierbei wird SHP-1 über seine aminoterminalen SH2-Domäne an die ITIMs rekrutiert, was in einer 10-fachen Aktivitätssteigerung der Phosphatase resultiert (Siminovitch and Neel, 1998). SHP-1 dephosphoryliert anschließend selektiv ITAM-Motive sowie die Protein-Tyrosinkinase Syk und reguliert die B-Zell-Rezeptor-vermittelte Aktivierung der MAP-Kinase und die Ca²⁺-Mobilisierung negativ (Dustin et al., 1999; Monroe, 2006).

1.3.2.4 SHP-1 und seine Bedeutung für Krebserkrankungen

Wie in Abschnitt 1.3.2.2 gezeigt, antagonisiert SHP-1 Protein-Tyrosinkinasen und damit auch deren wachstumsförderndes und onkogenes Potential, weshalb SHP-1 ein Tumorsuppressorgen darstellen könnte. Dafür spricht, dass insbesondere in Lymphomen und Leukämien SHP-1 häufig schwächer als in normalen Zellen exprimiert wird (Banville et al., 1995; Matsushita et al., 1999; Oka et al., 2001; Plutzky et al., 1992; Tsui et al., 2002; Walton and Dixon, 1993). Diese Herunterregulation kann in einigen Fällen auf Hypermethylierung von CpG-Inseln in der Promotorregion oder Mutationen im SHP-1 Gen zurückgeführt werden (Chim et al., 2004; Johan et al., 2005; Oka et al., 2002; Zhang et al., 2000). In anderen Fällen hingegen wird die mRNA normal gebildet, so dass posttranskriptionelle Mechanismen das Fehlen des Proteins bedingen (Beghini et al., 2000; Zhang et al., 2000). Einen weiteren Hinweis auf die Funktion von SHP-1 als Tumorsuppressor liefert die Beobachtung, dass sich das Wachstum von Krebszellen reduzieren lässt, wenn SHP-1 wieder in diese Zellen eingeführt wird (Bruecher-Encke et al., 2001; Zapata et al., 2002). In Untersuchungen zur Expression von SHP-1 in verschiedenen Lymphomen wiesen alle 13 untersuchten EBV-negativen Burkitt Lymphom Zelllinien nur ein Drittel der Proteinmenge von normalen B-Lymphozyten auf. In den 11 untersuchten Latenz I/II EBV-positiven Burkitt Lymphom Zelllinien (siehe Kapitel 1.1) konnte sogar nur 5 % der normalen SHP-1-Proteinmenge nachgewiesen werden. Bei den vier Latenz III EBV-positiven Burkitt Lymphom Zelllinien und in BJAB Zellen wurden dagegen normale Expressionsniveaus von SHP-1 detektiert (Delibrias et al., 1997).

Auch in T-Zelllymphomen konnte oft eine reduzierte SHP-1-Expression gefunden werden (Wu et al., 2003b). In Leukämien wird SHP-1 teilweise normal, teilweise aber auch wenig bis gar nicht exprimiert. Die Ursache der stark unterschiedlichen Expressionsniveaus ist unklar, allerdings könnte ein Zusammenhang zwischen Aggressivität und Progression der Leukämien auf der einen Seite und der Herunterregulation von SHP-1 auf der anderen Seite bestehen (Bruecher-Encke et al., 2001; Oka et al., 2001).

In einigen Karzinomen hingegen wird SHP-1 zum Teil sogar überexprimiert, z.B. in einigen Brustkrebslinien und in den meisten Ovarkarzinom-Zelllinien (Mok et al., 1995; Tsui et al., 2002). So scheint SHP-1 auch in diesem Zusammenhang in nicht-hämatopoetischen Zellen eine gesonderte Rolle einzunehmen.

Insgesamt spricht jedoch vieles für die Bedeutung von SHP-1 als Tumorsuppressorgen, insbesondere unter Berücksichtigung der Daten aus der Signaltransduktion.

1.4 Proteomics

In den späten 90er Jahren des letzten Jahrhunderts wurde mit gewaltiger Anstrengung das menschliche Genom entschlüsselt. Die Hoffnung bestand, mit diesem Wissen Krankheiten heilen und die Funktionsweise des Körpers genau verstehen zu können. Leider musste erkannt werden, dass sich die Komplexität menschlichen Lebens nicht allein durch die Information der DNA erklären lässt. Auch das Transkriptom beschreibt den Zustand eines komplexen Organismus oder auch einer einzelnen Zelle nicht ausreichend. Er muss stattdessen über das Proteom beschrieben werden, also die Gesamtheit der Proteine zu einem bestimmten Zeitpunkt, denn die Proteine sind im Gegensatz zu DNA und den meisten RNAs direkt mit der Funktion verbunden.

1.4.1 Massenspektrometrie

Im Bereich Proteomics hat die Massenspektrometrie seit Ende der 80er Jahre eine entscheidende Rolle übernommen. Durch die Entwicklung neuer, schonenderer Ionisierungsverfahren konnten erstmals größere Biomoleküle untersucht werden. Hierbei werden freie, gasförmige Ionen in einem Hochvakuum nach ihrem Masse-zu-Ladung-Verhältnis (m/z) aufgetrennt. So kann bei einer bekannten Ladung z die Masse des Ions bestimmt werden.

Ein Massenspektrometer besteht grundsätzlich aus drei Teilen: einer Ionenquelle, einem Massenanalysator und einem Detektor.

In der Protein- bzw. Peptidanalytik haben sich vor allem die Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS) und die Matrix-unterstützte Laserdesorptions/Ionisations-Massenspektrometrie (MALDI-MS) durchgesetzt (Covey et al., 1988; Fenn et al., 1989; Hillenkamp et al., 1991; Karas and Hillenkamp, 1988; Stults, 1995). Die Bedeutung dieser Methoden spiegelt sich in der Ehrung von Fenn und Tanakada mit dem Nobelpreis in Chemie 2002 wider.

In dieser Arbeit wurde die MALDI-MS verwendet, weshalb im Folgenden auf diese Technik genauer eingegangen wird. Sie zeichnet sich durch eine hohe Analysegeschwindigkeit und gute Empfindlichkeit aus, weshalb sie sich zu einer der wichtigsten Techniken der Massenbestimmung von Biomolekülen entwickelt hat (Aebersold and Mann, 2003).

Die Ionisation bei der MALDI-MS erfolgt durch gepulstes Laserlicht (siehe Abbildung 5). Dazu wird der Analyt zunächst mit einem 10^3 bis 10^4 fachen molaren Überschuss an Matrix gemischt und kokristallisiert. Im Hochvakuum wird die kristalline Probe nun einem intensiven Impuls kurzweiliger Laserstrahlung von wenigen Nanosekunden ausgesetzt. Die Matrix absorbiert die Energie aus dem Laserimpuls und überträgt sie durch Relaxation in das Gitter des Analyt/Matrixkristalls. So können die Analyt- wie Matrixmoleküle durch Desorption in die Gasphase überführt werden. Neben der Energieübertragung dient die Matrix zum Schutz vor photolytischer Zersetzung und stellt die für den Ionisierungsprozess notwendigen Protonen bereit.

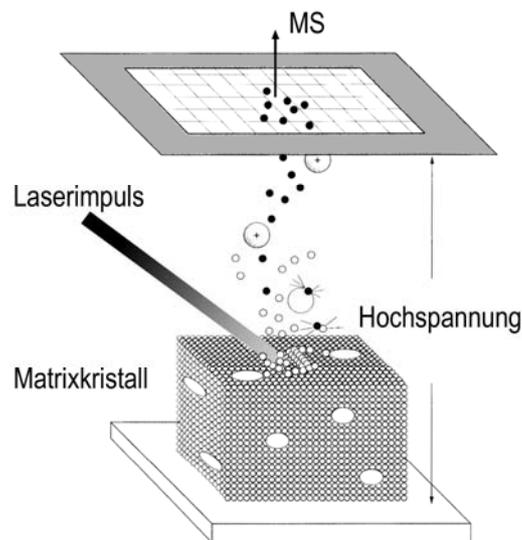


Abbildung 5: Prinzip der MALDI-Ionisierung.

Vor der massenspektrometrischen Untersuchung wird die Probe mit einer Matrixsubstanz kokristallisiert. Das Matrixmaterial zeichnet sich durch eine hohe Absorptionsfähigkeit von ultraviolettem Licht aus. Wird die Probe nun mit mehreren Impulsen einer kurzwelligigen Laserstrahlung beschossen, desorbiert die Matrix einen Teil der Laserenergie, wodurch Analyt- und Matrixmoleküle in die Gasphase überführt werden. Durch das Anlegen einer Hochspannung werden die einfach positiv geladenen Ionen im elektrostatischen Feld in die Richtung des Analysators beschleunigt (Lottspeich and Zorbas, 1998).

Die Massenanalyse erfolgt über eine äußerst empfindliche elektronische Zeitaufnahme (*time of flight*, TOF), die zwischen dem Start der Ionen aus der Quelle bis zum Auftreffen auf den Detektor gemessen wird. Dazu werden die Analytmoleküle, die durch die Übertragung der Protonen ionisiert worden sind, über ein elektrostatisches Feld in Richtung des Analysators beschleunigt. Hier durchlaufen die Ionen eine feldfreie Driftstrecke, wo sie entsprechend ihrem Masse/Ladung-Verhältnis aufgetrennt werden. Ionen gleicher Ladung verfügen nach ihrer Beschleunigung über die gleiche kinetische Energie, weshalb schwerere Teilchen eine geringere Geschwindigkeit aufweisen. Das Verhältnis von Molekülmasse und Ladung ist proportional zum Quadrat der Flugzeit, so dass sich aus der gemessenen Flugzeit die Molekülmasse sehr genau ermitteln lässt. Diese Abhängigkeit lässt sich in folgender Formel beschreiben:

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

Dabei beschreibt m die Masse des geladenen Teilchens, z die Ladung des Ions, e die Elementarladung ($1,602 \times 10^{-19} \text{ C}$), U die Beschleunigerspannung, d die Länge des Beschleunigerpfades und t die Flugzeit.

Zusätzliche Informationen kann man durch eine zweite Analyse ausgewählter Peptide mittels Tandem-Massenspektrometrie (auch MS/MS-Technik oder MS-Sequenzierungstechnik) erhalten. Hierbei wird ein bestimmtes Peptid-Ion (Vorläufer, *precursor*) nach der Ionisierung selektiert und durch die mit Luft gefüllte Kollisionszelle geführt. Das Peptid stößt mit Luftmolekülen zusammen und zerfällt dadurch in charakteristische Fragmente, die wiederum analysiert werden können. Da die Amidbindung die schwächste Bindung in einem Peptid ist, fragmentieren Peptide hier am Häufigsten. Die daraus resultierenden Bruchstücke sind am informativsten und werden nach der Nomenklatur von Roepstorff und Fohlmann als b-Ionen bezeichnet, wenn sie den N-Terminus des Vorläuferions enthalten. Enthalten sie den C-Terminus, sind es y-

Ionen (Roepstorff and Fohlman, 1984). Je nach Art der Fragmentierung treten darüber hinaus noch a-, c-, x- und z-Ionen auf (siehe Abbildung 6).

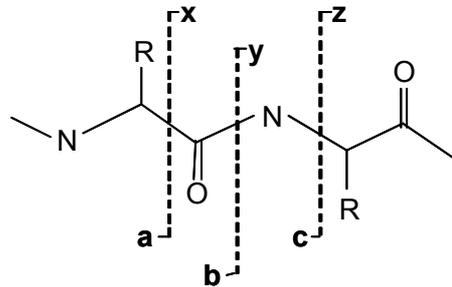


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Nomenklatur zur Fragmentierung von Peptiden.

Die häufigste Fragmentierung erfolgt durch die Spaltung der Amidbindung. Hierbei entstehen Ionen, die nach der Nomenklatur von Roepstorff und Fohlmann als y- bzw. als b-Ionen bezeichnet werden. Außerdem können a-, c-, x- und z-Ionen auftreten (Roepstorff and Fohlman, 1984).

1.5 Aufgabenstellung

Wie in Kapitel 1.2 gezeigt, stellt LMP1 das primäre Onkogen von EBV dar. Es begünstigt die Proliferation der Wirtszellen, während Seneszenz und Apoptose gezielt inhibiert werden. Um diese Funktionen zu erfüllen und die Zelle dadurch umzuprogrammieren, rekrutiert LMP1 zelluläre Faktoren, die für die Regulation von Proliferation und Überleben in B-Lymphozyten essentiell sind (vgl. Kapitel 1.2.4). Während bereits viel über die induzierten Signalkaskaden bekannt ist, ist die molekulare Zusammensetzung des LMP1-Signalkomplexes erst in Ansätzen verstanden. Ziel dieser Doktorarbeit ist daher die Identifizierung von direkten und indirekten Interaktionspartnern von LMP1, um so die Zusammensetzung des LMP1-Signalkomplexes weiter aufzuklären. Darüber hinaus soll die Funktion dieser Mediatoren in der Signaltransduktion von LMP1 untersucht werden.

Zur Identifikation der Interaktionspartner von LMP1 bietet sich besonders die Methodik der funktionalen Proteomanalyse (*functional proteomics*) an, da hierbei neue Informationen über bislang in diesem Zusammenhang unbekannte Proteine gefunden werden können. Während die bisher in unserem Labor verwendeten Systeme auf Präzipitationen mit bakteriell exprimierten GST-LMP1-Fusionsproteinen basierten, sollte in dieser Arbeit eine neue Methodik etabliert werden, die der *in vivo* Situation möglichst nahe kommt. Dazu sollte ein rekombinantes Maxi-EBV generiert werden, in dem Wildtyp-LMP1 durch eine mit einem HA-Epitop fusionierte Variante substituiert ist. Zur weiteren Verfeinerung der Methode sollte eine Schnittstelle für die TEV-Protease zwischen der LMP1-Transmembrandomäne und dem C-Terminus eingefügt werden. Das sollte einen weiteren Aufreinigungsschritt ermöglichen, da unspezifisch bindende Proteine abgetrennt werden können. Mit den erzeugten Maxi-EBV-Viruspartikeln sollten dann naive B-Lymphozyten infiziert werden und so LCLs generiert werden. Aus diesen sollte der LMP1-Signalkomplex über eine Immunpräzipitation (IP) von HA-LMP1 isoliert und massenspektrometrisch analysiert werden.

Im Rahmen der bisherigen massenspektrometrischen Analysen des Labors konnte SHP-1 als potenzieller Bindepartner von LMP1 identifiziert werden. Diese Interaktion sollte im Rahmen dieser Doktorarbeit bestätigt und genauer charakterisiert werden. Darüber hinaus sollte die Bedeutung von SHP-1 in der Signaltransduktion von LMP1 untersucht und eine eventuelle biologische Funktion ermittelt werden.

2 Material

2.1 Antikörper

2.1.1 Primärantikörper

α -BZLF1 (BZ1) IgG1	Maus, monoklonal	E. Kremmer, HMGU
α -CD48 (FL-243)	Kaninchen, polyklonal	Santa Cruz Biotech.
α -Flag (M2)	Maus, monoklonal	Stratagene
α -HA (3F10)	Ratte, monoklonal	Roche
α -HA (12CA5)	Maus, monoklonal	Roche
α -JNK1 (C-17)	Kaninchen, polyklonal	Santa Cruz Biotech.
α -LMP1 (CS1-4)	Maus, Mischung aus vier monoklonalen AK	Dako
α -LMP1 (1G6-3)	Ratte, monoklonal	E. Kremmer, HMGU
α -SHP1 (PTP1C)(C-21)	Maus, polyklonal	BD Biosciences
α -SHP1 (SH-PTP1) (C-19)	Kaninchen, polyklonal	Santa Cruz Biotech.
α -TNIK (cl. 53)	Maus, monoklonal	BD Biosciences
α -TRAF3 (H-20)	Kaninchen, monoklonal	Santa Cruz Biotech.

2.1.2 Phosphospezifische Antikörper

α -Phospho-Tyrosin (p-Tyr-100)	Maus, polyklonal	Cell Signaling (NEB)
α -Phospho-Tyrosin (PY20)	Maus, monoklonal	Santa Cruz Biotech.
α -Phospho-Tyrosin (4G10)	Maus, monoklonal	Upstate Biotech.

2.1.3 Sekundärantikörper für Western-Blot-Analysen

α -Maus IgG	Ziege, HRP-gekoppelt	Cell Signaling (NEB) (#7076)
α -Kaninchen IgG	Ziege, HRP-gekoppelt	Cell Signaling (NEB) (#7074)
α -Ratte IgG	Esel, HRP-gekoppelt	Dianova (# 112 035 003)

2.1.4 Sekundärantikörper zur Stimulation des B-Zell Rezeptors

AffiniPure α -Human IgG	Ziege, nicht-gekoppelt	Jackson Immuno Research (# 109-006-006)
--------------------------------	------------------------	---

2.1.5 Sekundärantikörper für FACS Analysen

AffiniPure α -Maus IgG	Ziege, Cy TM 5-gekoppelt	Jackson Immuno Research (# 117-176-006)
-------------------------------	-------------------------------------	---

2.2 Plasmide

pRK5	Expressionsvektor mit CMV-Promotor/Enhancer (Schall et al., 1990).
pcDNA3.1	Expressionsvektor mit SV40-Promotor/Enhancer (Invitrogen).
pCR2.1	Vektor für die TA-Subklonierung von PCR-Produkten (Invitrogen).
2275 oriP	pHEBO-Vektor mit induzierbarem cre (MERcreMER) und Hygromycin Resistenz als Leervektor zu pSV-LMP1-Konstrukten.
pEGFP-C1	Modifizierter Expressionsvektor für EGFP (<i>enhanced green fluorescence protein</i>) mit Neomycin-Phosphotransferasegen (Clontech).
pRK5-HA-JNK1	C-jun N-terminale Kinase 1 mit N-terminalem HA-Epitop in pRK5 (Kutz et al., 2008).
pCMV-HA-SHP-1 C ₄₅₃ S	SHP-1 mit HA-Epitop, in dem Cys ₄₅₃ zu Ser ausgetauscht ist, mit CMV-Promotor in pEGFP-C1-Hintergrund. Die SHP-1-Mutante stammt aus dem Vektor pEF-HA-SHP-1 C ₄₅₃ S, das von Tomas Mustelin zur Verfügung gestellt wurde (Viktoriya Nikolova und Arnd Kieser).
p1768 (3xκB-Luc)	Luziferase-Reportergenkonstrukt mit minimalem fos Promoter und drei NF-κB Bindestellen (Bill Sugden, Madison, USA).
PGK-Renilla	Renilla-Reportergenkonstrukt unter Kontrolle eines Phosphoglyceratkinasepromotors (PGK) (Wolfgang Hammerschmidt).
p2089	Wildtyp Maxi-EBV: F-Plasmid (pMBO131) mit eGFP Gen und Hygromycin-Resistenzgen in B95.8 DNA (Delecluse et al., 1998).
2167.1	LMP2A mit wt-LMP2A Promotor und Exon 1, geeignet, um LMP1 in den viralen Zusammenhang zu bringen und so ein Maxi-EBV zu generieren. Enthält eine Kanamycin-Resistenz (Wolfgang Hammerschmidt).
2234.5	N-terminale LMP1 Mutante. Übergangskonstrukt für Maxi-EBV (Wolfgang Hammerschmidt).
pRTS1	Episomal replizierender EBV-basierender Vektor, der über den Doxycyclin (dox) induzierbaren bidirektionalen Promotor Ptetbi-1 verfügt und so Doxycyclin-abhängig

	eGFP und β -Laktamase expimiert (Bornkamm et al., 2005).
pRTS1-LMP1 wt	pRTS1-Vektor, der anstelle der β -Laktamase LMP1 wt exprimiert (Arnd Kieser).
pRTS1-LMP1 A ₁₈₁ AxxAA	pRTS1-Vektor, der anstelle der β -Laktamase die LMP1 Mutante A ₁₈₁ AxxAA expimiert, in der Leu ₁₈₁ , Ile ₁₈₂ , Tyr ₁₈₅ und Tyr ₁₈₆ jeweils zu Ala mutiert sind (Arnd Kieser).
pRTS1-LMP1 A ₁₈₅ A	pRTS1-Vektor, der anstelle der β -Laktamase LMP1 Mutante A ₁₈₅ A expimiert, in der Tyr ₁₈₅ und Tyr ₁₈₆ jeweils zu Ala mutiert sind (Arnd Kieser).
pGEX-2T	bakterielles Expressionsplasmid für die Glutathion-S-Transferase (GST) mit tac-Promotor für chemische Induktion, <i>multiple cloning site</i> (Amersham Pharmacia).
Alle unten angeführten pCMV-Vektoren sind auf pHEBO basierende Expressionsvektoren.	
pCMV-HA-LMP1	LMP1 Wildtyp (As 6-386) aus dem EBV-Stamm B95.8 mit N-terminalem Hämagglutinin-Epitop (HA-Epitop) in pHEBO-Expressionsvektor; CMV-Promotor (Schneider et al., 2008).
pCMV-HA-LMP1 PQT→AAA	Mutante, bei der im PxQxT Motiv der TRAF-Interaktionsdomäne in CTAR1 die As Pro ₂₀₄ , Gln ₂₀₆ und Thr ₂₀₈ jeweils zu Ala (AxAxA) mutiert wurden; CMV-Promotor (Schneider et al., 2008).
pCMV-HA-LMP1 Δ 194-386	LMP1-Mutante, in der die gesamte zytoplasmatische Signaldomäne von LMP1 (As 194-386) deletiert ist; CMV-Promotor (Schneider et al., 2008).
pCMV-HA-LMP1 Y ₃₈₄ G	LMP1-Mutante, in der das Tyr ₃₈₄ der CTAR2-Domäne zu Gly mutiert ist; CMV-Promotor (Schneider et al., 2008).
pCMV-HA-LMP1 PQT→AAA /Y ₃₈₄ G	LMP1-Doppelmutante, die die oben beschriebenen Mutationen (PQT→AAA) und Y ₃₈₄ G trägt; CMV-Promotor (Schultheiss et al., 2001).
pCMV-HA-LMP1 Δ 371-386	LMP1 mit einer Deletion der letzten 16 Aminosäuren 371-386 der CTAR2-Domäne; CMV-Promotor (Schneider et al., 2008).
pCMV-HA-LMP1 PQT→AAA / Δ 371-386	LMP1-Doppelmutante, die die oben beschriebene Mutation (PQT→AAA) und die Deletion Δ 371 trägt; CMV-Promotor (Schneider et al., 2008).
pSV-LMP1	LMP1 Wildtyp (As 6-386) aus dem EBV-Stamm, B95.8 mit N-terminalem Hämagglutinin-Epitop in pHEBO-Expressionsvektor; SV40-Promotor (Kieser et al., 1997).

pSV-LMP1 PQT→AAA	LMP1 Mutante, bei der im PxQxT Motiv der TRAF-Interaktionsdomäne in CTAR1 die As Pro ₂₀₄ , Gln ₂₀₆ und Thr ₂₀₈ jeweils zu Ala (AxAxA) mutiert wurden; SV40-Promotor (Kieser et al., 1999).
pSV-LMP1Δ194-386	LMP1-Mutante, in der die gesamte zytoplasmatische Signaldomäne von LMP1 (As 194-386) deletiert ist; SV40-Promotor (Kieser et al., 1999).
pSV-LMP1 Y ₃₈₄ G	LMP1-Mutante, in der das Tyr ₃₈₄ der CTAR2-Domäne zu Gly mutiert ist; SV40-Promotor (Kieser et al., 1999).
pSV-LMP1 PQT→AAA/Y ₃₈₄ G	LMP1-Doppelmutante, die die oben beschriebenen Mutationen (PQT→AAA) und Y ₃₈₄ G trägt; SV40-Promotor (Kieser et al., 1999).

Die nun aufgeführten pGEX-Vektoren basieren auf pGEX-2T.

pGEX-LMP1 (181-386)	Bakterielles Expressionsplasmid für ein Fusionsprotein aus GST und LMP1 (As 181-386) (Sandberg et al., 1997).
pGEX-LMP1 (181-370)	Bakterielles Expressionsplasmid für ein Fusionsprotein aus GST und LMP1 (As 181-370), Teile von CTAR2 (As 371-386) fehlen (Cinthia Briseño).
pGEX-LMP1 (181-386) PQT→AAA	Bakterielles Expressionsplasmid für ein Fusionsprotein aus GST und LMP1 (As 181-386) mit mutiertem TRAF-Bindemotiv (PxQxT) in CTAR1; Pro ₂₀₄ , Gln ₂₀₆ und Thr ₂₀₈ mutiert zu jeweils Ala (Arnd Kieser).
pGEX-LMP1 (181-370) PQT→AAA	Bakterielles Expressionsplasmid für ein Fusionsprotein aus GST und LMP1 (As 181-370) Doppelmutante, die die oben beschriebene Mutation (PQT→AAA) und die Deletion Δ371 trägt (Arnd Kieser).
pGEX-LMP1 (181-386) Δ212-231	Bakterielles Expressionsplasmid für ein Fusionsprotein aus GST und LMP1 (As 181-386) mit einer Deletion innerhalb von CTAR1 (As 212-231) (Sandberg et al., 1997).
pGEX-LMP1 (181-386) sub1	Bakterielles Expressionsplasmid für ein Fusionsprotein aus GST und LMP1 (As 181-386) in dem die As 189-201 durch Ala ersetzt sind (Sandberg et al., 1997).
pGST-c-jun	GST fusioniert mit der Transaktivierungsdomäne von c-jun.
1645.2M	GST-Fusionsprotein mit dem C-Terminus von LMP1 (As 181 bis As 386) (Sandberg et al., 1997).

Im Folgenden sind Plasmide, die im Rahmen dieser Arbeit kloniert wurden, aufgeführt.

pGEX-LMP1 (181-230)	Bakterielles Expressionsplasmid für ein Fusionsprotein aus GST und LMP1 (As 181-230).
pGEX-LMP1 (181-220)	Bakterielles Expressionsplasmid für ein Fusionsprotein aus GST und LMP1 (As 181-220).
pGEX-LMP1 (181-210)	Bakterielles Expressionsplasmid für ein Fusionsprotein aus GST und LMP1 (As 181-210).
pGEX-LMP1 (181-200)	Bakterielles Expressionsplasmid für ein Fusionsprotein aus GST und LMP1 (As 181-200).
pGEX-LMP1 (181-200) A ₁₈₁ AxxAA	Bakterielles Expressionsplasmid für ein Fusionsprotein aus GST und LMP1 (As 181-200), in dem Leu ₁₈₁ , Ile ₁₈₂ , Tyr ₁₈₅ und Tyr ₁₈₆ jeweils zu Ala mutiert sind.
pGEX-LMP1 (181-200) A ₁₈₅ A	Bakterielles Expressionsplasmid für ein Fusionsprotein aus GST und LMP1 (As 181-200), in Tyr ₁₈₅ und Tyr ₁₈₆ jeweils zu Ala mutiert sind.
pGEX-LMP1 (181-200) Y ₁₈₅ A	Bakterielles Expressionsplasmid für ein Fusionsprotein aus GST und LMP1 (As 181-200), in dem Tyr ₁₈₅ zu Ala mutiert ist.
pGEX-LMP1 (181-200) Y ₁₈₆ A	Bakterielles Expressionsplasmid für ein Fusionsprotein aus GST und LMP1 (As 181-200), in dem Tyr ₁₈₆ zu Ala mutiert ist.
pSV-HA-LMP1-TEV-CT	LMP1 mit einem N-terminal fusionierten HA-Epitop, wobei nach den Transmembrandomänen hinter As 186 eine Schnittstelle für die TEV-Protease eingebaut ist.
pSV-HA-LMP1-1xli-TEV-CT	LMP1 mit einem N-terminal fusionierten HA-Epitop, wobei nach den Transmembrandomänen hinter As 186 eine einfache <i>linker</i> -Sequenz (AGASGG) und eine Schnittstelle für die TEV-Protease eingebaut ist; SV40-Promotor.
pSV-HA-LMP1-2xli-TEV-CT	LMP1 mit einem N-terminal fusionierten HA-Epitop, wobei nach den Transmembrandomänen hinter As 186 eine duplizierte <i>linker</i> -Sequenz und eine Schnittstelle für die TEV-Protease eingebaut ist; SV40-Promotor.
pSV-LMP1 A ₁₈₁ AxxAA	LMP1 ohne fusioniertes HA-Epitop, in dem Leu ₁₈₁ , Ile ₁₈₂ , Tyr ₁₈₅ und Tyr ₁₈₆ jeweils zu Ala mutiert sind; SV40-Promotor.
pCMV-LMP1 A ₁₈₁ AxxAA	LMP1 mit einem N-terminal fusionierten HA-Epitop, in dem Leu ₁₈₁ , Ile ₁₈₂ , Tyr ₁₈₅ und Tyr ₁₈₆ jeweils zu Ala mutiert sind; CMV-Promotor.

pCMV-LMP1 A ₁₈₅ A	LMP1 mit einem N-terminal fusionierten HA-Epitop, in dem Tyr ₁₈₅ und Tyr ₁₈₆ jeweils zu Ala mutiert sind; CMV-Promotor.
2234.5-HA-LMP1	Übergangskonstrukt zur Konstruktion eines Maxi-EBVs mit HA-LMP1 anstelle des wildtypischen LMP1.
2234.5-HA-LMP1-2xli-TEV-CT	Übergangskonstrukt zur Konstruktion eines Maxi-EBVs mit HA-LMP1-2xli-TEV-CT anstelle des wildtypischen LMP1.
2167.1-HA-LMP1	Übergangskonstrukt zur Konstruktion eines Maxi-EBVs, bei dem LMP1 in den viralen Zusammenhang gesetzt wird; im Gegensatz zum Ausgangsvektor enthält es HA-LMP1 anstelle des wildtypischen LMP1.
2167.1-HA-LMP1-2xli-TEV-CT	Übergangskonstrukt zur Konstruktion eines Maxi-EBVs, bei dem LMP1 in den viralen Zusammenhang gesetzt wird; im Gegensatz zum Ausgangsvektor enthält es HA-LMP1-2xli-TEV-CT anstelle des wildtypischen LMP1.
p2089-HA-LMP1	Maxi-EBV mit B95.8-Sequenz als F-Plasmid (pMBO131) mit eGFP Gen und Hygromycin-Resistenzgen, in dem das wildtypische LMP1 durch eine mit einem HA-Epitop fusionierte Form ersetzt wurde.
p2089-HA-LMP1-2xli-TEV-CT	Maxi-EBV mit B95.8-Sequenz als F-Plasmid (pMBO131) mit eGFP Gen und Hygromycin-Resistenzgen, in dem das wildtypische LMP1 durch eine HA-LMP1-2xli-TEV-CT ersetzt wurde.

2.3 Bakterien

<i>E. coli</i> DH5 α	F-, l a cl-, recA1, endA1, hsdR17, Δ (lacZYA-argF), U169, F80dlacZ Δ M15, supE44, thi-1, gyrA96, relA1 (Hanahan, 1985).
<i>E. coli</i> DH10B	F-, mcrA, Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC), Φ 80dlacZ Δ M15, Δ lacX74, deoR, recA1, endA1, araD139, Δ (ara, leu)7697, galU, galK, λ -, rpsL, nupG (Life Technologies).

2.4 Zelllinien

721	Lymphoblastoide Zelllinie, immortalisiert mit EBV aus B95.8.
DG75	Humane, EBV-negative Burkitt-Lymphomzelllinie.
ERE2-5	Lymphoblastoide Zelllinie, immortalisiert mit einem EBNA2 defizientem EBV Stamm (P3HR1); EBNA2 wird auf einem separaten episomalen Plasmid mit Östrogen-induzierbaren Promotor exprimiert (Kempkes et al., 1995).
HEK293	Humane, embryonale Nierenepithel Zelllinie, die durch Expression der E1a und E1b Gene des Adenovirus Typ5 transformiert ist (Graham et al., 1977).

TR-2/293	HEK293-Verpackungszelllinien, in die das Maxi-EBV-Plasmid p2114 stabil transfiziert wurde. Sie produziert nach Induktion und Transfektion eines TR+ Genvektors rekombinantes EBV (Delecluse et al., 1999).
WI38	humane Fibroblasten-Zelllinie.
DT40 wt	Hühner-pre-B-Zelllinie, die viral transformiert ist.
DT40 SHP-1 -/-	Hühner-pre-B-Zelllinie, bei der das SHP-1 Gen deletiert ist (Maeda et al., 1998; Ono et al., 1997).

Im Rahmen dieser Arbeit hergestellte Zelllinien

LCL3	Lymphoblastoide Zelllinie, immortalisiert mit rekombinantem EBV (p2089-HA-LMP1).
TEV5	Zelllinie, immortalisiert mit rekombinantem EBV (p2089-HA-LMP1-2xli-TEV-CT).

2.5 Oligonukleotide

AK136	CCAGATGGTGGCACCAAGTC
AK141	TTCCAGAAGTAGTGAGGAG
AK193	ATGACGTTCTGACTATG
AK200	GGGGGGCCTGCAGGATCGATACCATGGAATATCCTTATGACGTTCTGAC TATGCCATGGAACACGACCTTGAGAGG
AK201	CGTTGTCCATGCTTAAGTCCCTGAAAATACAGGTTTTCGTAATACATCCAGAT TAAAATCGCC
AK202	GAAAACCTGTATTTTCAGGGACTTAAGCATGGACAACGACACAGTGATGAAC
AK212	CCCCCGCTTAGCCGTTGTCCATGCTTAAGTCCCTGAAAATACAGGTTTTCG TAATACATCCAGATTAAAATCGCC
AK225	GTGAGGATGGAACACGACCTGAG
AK226	GGGGGGGCTTAAGCATCGCTCCCTGAAAATACAGGTTTTCACCTCCGGCTG
AK23	CTTCTCAACTGCC
AK233	CTTAGCAAGCTACCTGAAATGCTG
AK234	CCCCCCCCGAATTCTAGGCTCCACTCACGAGCAGGTGGTG
AK235	CCCCCCCCGAATTCTACTCGTTGGAGTTAGAGTCAGATTC
AK236	CCCCCCCCGAATTCTAAGAATCATCGGTAGCTTGTTGAGG
AK237	GATCCTTAATCTGGATGTATTACCATGGACAACGACACAGTGATGAACAC CACCACGATGACTCCTAG
AK238	AATTCTAGGAGTCATCGTGGTGGTTCATCACTGTGTCGTTGTCCATGG TAATACATCCAGATTAAG
AK24	TTGGAATTGTGCTGTTTCATCTTCG
AK252	GACTGCACGGTGCACCAATGCTTCTG
AK253	GGGGGGGCAATTGAATTCCTAGGTCATTAGGATCCACGCGGAACCAGATCCG

AK264	GGGGGGTGGCTGTACATCGTTATGAGTGAC
AK265	CCCCCCTTGTCCATGGGCCGCCATCCATGCAGCAATCGCCAGA
AK278	GATCCTTAATCTGGATGGCTGCCCATGGACAACGACACAGTGATGAACAC CACCACGATGACTCCTAG
AK279	AATTCTAGGAGTCATCGTGGTGGTGTTCATCACTGTGTCGTTGTCCATGGG CAGCCATCCAGATTAAG
AK280	CCCCCCTTGTCCATGGGCCGCCATCCAGATTAATATCGCCAGAAACAGGAG GAGCCAAAGGAGATC
AK30	TCATTATTGCTCTCTATCTACAAC
GAPDH 3'	GTC TGA GTG TGG CAG GGA CTC
GAPDH 5'	GCA CCA CCA ACT GCT TAG CAC C
JG11	GATCCGCAGCCTGGATGGCTGCCCATGGACAACGACACAGTGATGAACAC CACCACGATGACTCCTAG
JG12	AATTCTAGGAGTCATCGTGGTGGTGTTCATCACTGTGTCGTTGTCCATGGG CAGCCATCCAGGCTGCG
JG13	GATCCTTAATCTGGATGGCTTACCATGGACAACGACACAGTGATGAACAC CACCACGATGACTCCTAG
JG14	AATTCTAGGAGTCATCGTGGTGGTGTTCATCACTGTGTCGTTGTCCATGG TAAGCCATCCAGATTAAG
JG15	GATCCTTAATCTGGATGTATGCCCATGGACAACGACACAGTGATGAACAC CACCACGATGACTCCTAG
JG16	AATTCTAGGAGTCATCGTGGTGGTGTTCATCACTGTGTCGTTGTCCATGGG CATAACATCCAGATTAAG
M13for	TGTAAAACGACGGCCAG
M13rev	CAGGAAACAGCTATGAC
pGEX 3'	GAGCTGCATGTGTCAGAGG
pGEX 5'	GGCAAGCCACGTTTGGTG
SGS_HPRT_for	TATTGTTGGAAGTGAAGGACAATG
SGS_HPRT_rev	ACTCACTGCTGTATATATTCATCAG
T7	TAATACGACTCACTATAGG

2.6 Geräte, Chemikalien, Reagenzien und Enzyme

Alle verwendeten Chemikalien und Reagenzien stammten, wenn nicht gesondert aufgeführt, von der Firma Sigma Chemie (München) oder Merck-Eurolab GmbH.

Amaxa:

Nucleofector™, Nucleofector™ Kit V.

Applied Biosystems, Forster City, USA:

Proteomanalyser 4700, GPS-Explorer 3.5.

AppliChem, Darmstadt:

Magermilchpulver.

Beckman, Palo Alto, USA:

J25 Zentrifuge mit JA-10 und JA-25.50 Rotor, Coulter Counter® Z1™ Series (Partikelzähler).

Becton Dickinson GmbH, Heidelberg:

Plastik-Reagenzgefäße (Falcon) 15 ml und 50 ml, Zellkulturflaschen, 96-Loch-, 48-Loch-, 24-Loch-, 6-Loch-Platten, Zellschaber, FACSCalibur.

BioRad, München:

Genepulser II, Elektroporationsküvetten, SDS-Proteinmarker: Prestained SDS-Page Standards Low Range, Biospin-Säulen.

Branson, USA:

Digitaler Sonifikator (Model 250-D).

Biozym:

Low-bind Reaktionsgefäße.

Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA:

Bacto-Agar, Hefeextrakt, Trypton.

Dionex, Sunnyway, USA:

Ultimate HPLC.

Eppendorf Gerätebau, Hamburg:

Kühlzentrifuge 5415R, 1,5 ml und 2 ml Plastikreaktionsgefäße, BioPhotometer, Heizblock, Thermomixer compact.

Fuji PhotoFilm Co., Ltd. Japan:

Phosphoimager Fujix Bioimaging Analyser System (BAS-1000).

GE healthcare, München:

ECL-Westernblotting Reagenzien, Hybond-C-Nitrozellulosemembran für Western Blot, γ 32P-ATP(3000Ci/mmol), Protein A Sepharose™ CL-4B, GammaBind™Plus Sepharose CL-6B, Glutathion-Sepharose™4B, Monolaurat (Tween-20), Röntgenfilme Hybond Hyperfilm für ECL und Autoradiographie.

Genomed, Bad Oeynhausen:

Maxi-Präparationskit für Plasmidpräparationen (Jetstar).

Gibco BLR, Life Technologies, Eggenstein:

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

Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, USA:

Mighty Small II Gel Elektrophorese Einheit, Western Blot Transfer-Kammer.

Invitrogen Life Technologies, Paisley, UK:

SilverQuest Silver Staining Kit, 1kb DNA Standard, TEV-Protease, Superscript III Rnase H-Reverse Transcriptase.

Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold:

Heraeus Zentrifuge, Multifuge 3 L-R.

Leica Microsystems GmbH, Wetzlar:

Mikroskopiereinheit DM IRB.

Macherey-Nagel, Düren:

Nucleobond AX500.

Nunc GmbH, Wiesbaden:

Cryotubes 3 ml, Impfösen, Plastikpetrischalen, Zellkulturflaschen, Zellkulturschalen.

New-England-Biolabs, Schwalbach:

Restriktionsenzyme.

Oxoid GmbH, Wesel:

Schafserythrozyten.

Progen Biotechnik GmbH, Heidelberg:

OptiPrep™.

Promega GmbH, Mannheim:

Trypsin Gold, Dual-Luciferase Reporter Assay System.

Proteom Research Inc., Portland, USA:

Scaffold 2.0.

Qiagen, Hilden:

PolyFect®, DNA-Gelextraktions Kit, PCR-Reinigungskit.

Roche Diagnostics GmbH, Mannheim:

Adenosin-5'-triphosphat (ATP), desoxy-Nucleotidtriphosphat-Mix (dNTPS) PCR Grade, alkalische Schrimpphosphatase, alkalische Kälberphosphatase, Complete EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail, 1-0-n-Octyl-β-D-glucoopyranosid (n-Octylglucosid, OTG).

Roth, Karlsruhe:

Roti-Block®.

Stratagene, Heidelberg:

Robocycler Gradient 96, Stratalinker, UV Bestrahlungsgerät.

Thermo Fisher Scientific, Dreieich:

Dimethylpimelimidat · 2HCl (DMP), ECL-Entwicklungsreagenz.

Tree Star, Ashland, USA:

FLOWJO-Software, Version 8.6.

VWR International, Ismaning:

Objektträger SuperFrost®Plus, Deckgläschen, Färbegestelle.

Vector Laboratories, Burlingame, USA:

Vectashield® Mounting Medium mit DAPI.

Zeiss, Oberkochen:

Axiovert 200 Fluoreszenzmikroskop mit hochauflösender Digital-Videokamera (Hamamats).

3 Methoden

3.1 Bakterienkultur

3.1.1 Vermehrung und Aufbewahrung von Bakterienkulturen

E. coli Bakterien wurden über Nacht als Suspensionskultur in LB-Medium oder auf LB-Agar-Platten kultiviert, wobei bei Antibiotika-resistenten Klonen das entsprechende Antibiotikum zugegeben wurde. Ampicillinresistente Klone wurden mit 100 µg/ml Ampicillin und kanamycinresistente Klone mit 30 µg/ml Kanamycin selektioniert. Zur Lagerung von Bakterien über längere Zeiträume wurde den über Nacht gewachsenen Kulturen 15 % Glycerin zugesetzt und die Kultur bei -80 °C eingefroren.

LB-Medium:

1 % Trypton; 0,5 % Hefeextrakt; 0,5 % (w/v) NaCl.

LB-Agar-Platten:

15 g Bacto-Agar ad 1 l LB-Medium.

3.1.2 Herstellung und Transformation chemisch kompetenter *E.coli* Bakterien

Die Herstellung transformationskompetenter *E.coli* Stämme DH5α erfolgte nach dem Protokoll von Hanahan (Hanahan, 1983). Zu einem Aliquot (200 µl) dieser Bakterien wurden ganze Ligationsansätze bzw. ca. 10 pg Plasmid-DNA und 7 µl DMSO pipettiert und für zwei Minuten bei 42 °C in einem Thermoheizblock inkubiert. Die transformierten Ligationsansätze wurden daraufhin in 5 ml SOC-Medium für 30 min bei 37 °C kultiviert. Nach Sedimentation wurden die Bakterien in ca. 200 µl verbleibendem SOC-Medium resuspendiert. Diese Suspension wurde auf LB-Agar-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37 °C kultiviert.

TFB-Puffer:

10 mM K-Mes (pH 6,2); 50 mM CaCl₂; 45 mM MnCl₂; 100 mM RbCl.

SOB-Medium:

2 % (w/v) Bacto-Trypton; 0,5 % (w/v) Bacto-Hefeextrakt; 2,5 mM KCl; 10 mM NaCl; 10 mM MgCl₂; 10 mM MgSO₄.

SOC-Medium:

SOB-Medium mit 0,2 % (w/v) Glucose.

3.1.3 Elektroporation von elektrochemisch kompetenten Bakterien

Die Herstellung elektrokompetenter DH10B Bakterien erfolgte nach einem Protokoll von Sheng et al. (Sheng et al., 1995). Um lineare DNA Fragmente zur homologen Rekombination in Bakterien einzubringen, wurden DH10B *E. coli* mit einem Gene-Pulser (Bio-Rad) elektroporiert. Dieser *E. coli* Stamm trägt bereits ein Maxi-EBV und p2650. 50 µl kompetente Bakterien wurden mit bis zu 3 µg DNA 5 min lang auf Eis inkubiert und anschließend in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (0,2 cm Elektrodenabstand) überführt. Die Elektroporation erfolgte bei 1,8 kV, 200 Ω und 25 µF mit einer Zeitkonstante von 2 sec. Die Bakterien wurden sofort in SOC-Medium überführt und zwei Stunden zur phänotypischen Expression und homologen Rekombination bei 30 °C inkubiert, da das Rekombinationssystem temperatursensitiv ist. Anschließend wurden die Bakterien auf Agarplatten mit den entsprechenden Antibiotika ausplattiert und über Nacht bei 42 °C inkubiert.

3.2 Zellkultur

3.2.1 Zellkulturbedingungen

Alle humanen Zelllinien wurden in einem Inkubator bei 37 °C und einer 5 %igen CO₂ Atmosphäre kultiviert. Das Kulturmedium RPMI 1640 wurden mit 10 % fötales Kälberserum (FKS), 1 mM L-Glutamin, 100 µg/ml Streptomycin und 100 IE/ml Penicillin versetzt (RPMI-Vollmedium). Bei EREB2-5-Zellen wurde dem RPMI-Vollmedium noch 1 µM β-Östrogen zugesetzt (EREB-Vollmedium).

Die Hühner B-Zelllinie DT40 wurde bei 41 °C und 5 % CO₂ Atmosphäre kultiviert. Zu dem Kulturmedium RPMI 1640 wurden mit 10 % fötales Kälberserum (FKS), 1 mM L-Glutamin, 100 µg/ml Streptomycin, 100 IE/ml Penicillin, sowie 1 % Hühnerserum (Sigma), 1 mM Natriumpyruvat und 100 nM β-Mercaptoethanol hinzugefügt. (DT40-Vollmedium).

3.2.1.1 Adhärent wachsende Zelllinien

Die humane embryonale Nierenepithel-Zelllinie HEK293 wurde in RPMI Vollmedium kultiviert. Alle zwei bis drei Tage wurden die Zellen mit Trypsin-EDTA (1x) von der Zellkulturschale abgelöst, 1:2 bis 1:10 verdünnt und in neuen Kulturgefäßen ausgesät.

3.2.1.2 Suspensionszelllinien

Die Zelllinien 721, LCL3, TEV5, DG75 und EREB2-5 wurden in RPMI-Vollmedium bzw. EREB-Vollmedium kultiviert. Alle zwei bis drei Tage wurden die Zellen zwischen 1:2 und 1:10 in frischem Kulturmedium verdünnt.

Die DT40-Zelllinien wurden in DT40-Vollmedium kultiviert und alle zwei bis drei Tage zwischen 1:3 und 1:200 in frischem Kulturmedium verdünnt.

3.2.1.3 Bestimmung der Zellzahl in Kultur

Zur Bestimmung der Zellzahl im Kulturmedium, wurde ein Partikelzähler (Coulter Counter® Z1™) verwendet. Dazu wurden jeweils 100 µl der Zellsuspension in 10 ml isotonischen „CoulterCounter“ Puffer gegeben und gut gemischt. DG75 und HEK293 Zellen wurden bei einem Ausschlussdurchmesser von 10 nm, alle übrigen Zelllinien bei einem Ausschlussdurchmesser von 6 nm gezählt. Das Messgerät gibt bei Einstellung des Faktors 100 die Zellzahl pro Milliliter an.

3.2.2 Aufbewahrung von Zellen über längere Zeiträume

Um Zellen über längere Zeiträume aufzubewahren, wurden 1-2x 10⁷ Zellen in 1 ml Einfriermedium (Kulturmedium der entsprechenden Zelllinie mit 25 % FKS und 7,5 % DMSO) bei -80 °C eingefroren. Um eine langsame Abkühlung zu gewährleisten, wurden die Zellsuspensionen in 2 ml Cryotubes (Nunc-Cryotube®) transferiert und in einem speziellen Einfriercontainer (Nalgene®Cryo 1°C Freezing Container) bei -80 °C eingefroren. Der Einfriercontainer enthält Isopropanol und gewährleistet so eine Abkühlgeschwindigkeit von -1 °C pro Minute. Zellen, die zur Langzeitlagerung bestimmt waren, wurden spätestens nach 1 bis 2 Wochen von -80 °C in flüssigen Stickstoff überführt.

Um eingefrorene Zellen wieder in Kultur zu nehmen, wurden die Cryotubes im Wasserbad auf 37 °C erwärmt, die Zellen anschließend in 5 ml des jeweiligen Kulturmediums gewaschen und in 5-10 ml Kulturmedium kultiviert.

3.2.3 Elektroporation humaner Zelllinien

Die humane Burkitt-Lymphom Zelllinie DG75 sowie die Hühner B-Zelllinie DT40 wurden mittels Elektroporation transfiziert. Dazu wurden die Zellen (5x 10⁶ bis 1x 10⁷ Zellen) in 250 µl RPMI ohne Zusätze mit 15 bis 20 µg Plasmid-DNA in einem 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß gemischt und für ca. 10 min inkubiert. Daraufhin wurde der Mix aus Zellen und Plasmid-DNA mit einer 1.000 µl Pipette vorsichtig und ohne Schaumbildung gemischt und anschließend in eine 4 mm Elektroporationsküvette (Biorad) überführt. Bei Transfektionen zur Etablierung stabiler Zelllinien wurden sterile Elektroporationsküvetten verwendet, um eine Kontamination der Kulturen mit Bakterien oder Pilzen zu verhindern. DG75 Zellen wurden bei 240 V und 975 µF, DT40 Zellen bei 250 V und 975 µF im Biorad Genepulser II elektroporiert. Nach der elektrischen Entladung wurden sofort 500 µl FKS in die Elektroporationsküvette pipettiert und der gesamte Ansatz in 5 ml Vollmedium in eine 10 ml Zellkulturflasche überführt und im jeweiligen Inkubator kultiviert.

3.2.4 Nukleofektion von LCLs

Da LCLs wie die Zelllinie EREB2-5 eine sehr geringe Transfektionseffizienz mit der oben beschriebenen Elektroporationsmethode (Kapitel 3.2.3) aufweisen, wurden sie mit dem Amaxa Nucleofector™ transfiziert. Dazu wurde das Nucleofector™ Kit V mit dem Programm T-16 verwendet. Pro Ansatz wurden 7,5x 10⁶ Zellen mit 5 µg DNA in 100 µl Nucleofector™ Lösung transfiziert. Hierbei ist für das Überleben der Zellen nach der Transfektion eine hohe Reinheit und Konzentration (>2 µg/µl) der DNA notwendig, da sonst die Nucleofector™ Lösung zu stark verdünnt wird. Nach der Transfektion wurden die Zellen mit ca. 200 µl

Medium mit den Amaxa Plastikpipetten aus der Küvette in 5 ml EREB-Medium überführt und bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

3.2.5 Transfektion von HEK293 Zellen

Zur Transfektion von HEK293 Zellen wurden die Zellen mindestens 24 h vor der Transfektion auf die gewünschte Schalengröße ausgesät, so dass die Zellen bei der Transfektion eine Konfluenz von ca. 80 % aufwiesen. Am Tag der Transfektion wurden die Zellen zunächst mit RPMI-Medium ohne Zusätze gewaschen. Die Transfektion erfolgte mit 2 µl PolyFect-Lösung je µg DNA, wobei in 6-Lochplatten insgesamt 2-3 µg DNA verwendet wurde, in 10 cm-Schalen 10 µg DNA und in 15 cm-Schalen 20 µg DNA. Zunächst wurde die DNA in 100 bzw. 200 µl serumfreiem RPMI ohne Antibiotika in Polystyrol-Röhrchen verdünnt und durch Schütteln gemischt. Zu dieser Lösung wurde das gleiche Volumen serumfreies RPMI ohne Antibiotika mit der entsprechenden Menge PolyFect gegeben. Beide Ansätze wurden durch Schütteln gemischt und 10-15 min inkubiert. Nach der Inkubation wurde mit serumfreiem RPMI ohne Antibiotika auf ein Gesamtvolumen von 1 ml für 6-Lochplatten aufgefüllt. Bei 10 cm-Schalen wurde auf 5 ml, bei 15 cm-Schalen auf 10 ml aufgefüllt. Die DNA-PolyFect-Mischung wurde dann auf die Zellen gegeben und mindestens 4 h oder über Nacht auf den Zellen belassen.

3.2.6 Transfektion von TR-2/293 Zellen und Maxi-EBV Virusproduktion

Zur Virusproduktion wurden TR-2/293 Zellen mit Maxi-EBV Plasmiden aus *E. coli* und die Expressionsplasmide für BZLF1 (p509) und BALF4 (p2670) mittels Polyethylenimin (PEI) transfiziert. Die Expression von BZLF1 und BALF1 diente der Induktion des lytischen Zyklus von EBV. Die Zellen wurden am Vortag mit $2,5 \times 10^6$ Zellen pro 6-Loch Platte ausgesät und am Tag der Transfektion mit 1ml OPTI-MEM gewaschen. Pro Transfektionsansatz wurde 1 µg des Maxi-EBV-Plasmids in 500 µl OPTI-MEM vorgelegt und mit 4-5 µl PEI in 500 µl gemischt. In einem separaten Ansatz wurden je 0,5 µg p509 und p2670 in 100 µl OPTI-MEM aufgenommen und mit 6 µl PEI in ebenfalls 100 µl OPTI-MEM gemischt. Nach 15 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Ansätze vereinigt und auf die Zellen gegeben. Nach 4-5 h bei 37 °C im Inkubator wurde mit 2 ml RPMI aufgefüllt. Nach 2-3 Tagen wurde der Überstand geerntet und zunächst 10 min bei 1.200 Upm, gefolgt von weiteren 10 min bei 5.000 Upm zentrifugiert. Letzte Reste von Zelltrümmern wurden mit einem 1,2 µm Filter aus dem Überstand entfernt. Der Überstand wurde bei 4 °C gelagert.

3.2.7 Präparation primärer B-Zellen

Humane primäre B-Zellen wurden aus Adenoiden gewonnen. Aus einem Adenoiden wurde durch mechanisches Zerkleinern und Filtrieren durch ein Zellsieb mit einer Porengröße von 100 µm eine Einzelzellsuspension hergestellt. Diese Zellsuspension wurde mit PBS auf ein Volumen von 35 ml aufgefüllt. Durch Zugabe von 0,5 ml Schaferferythrozyten (Oxoid GmbH) wurden T-Lymphozyten für 15 min bei Raumtemperatur rosettiert. Dabei lagern sich die T-Zellen an die Schaferferythrozyten an und bilden so größere Aggregate, die pelletierten und so entfernt werden konnten. Die B-Lymphozyten wurden anschließend über einen 30 %-igen Ficoll-Gradienten (Ficoll-Dichte: 1,077) aufgereinigt. Dafür wurden je 15 ml Ficoll mit 35 ml Zellsuspension überschichtet bei 1850 Upm (750 g) für 45 min bei 10 °C zentrifugiert. Die Interphase des Gradienten, die neben Monozyten fast ausschließlich B-Lymphozyten enthält, wurde abgenom-

men. Die verbleibenden Ficollreste und restliche Thrombozyten wurden durch dreimaliges fraktioniertes Waschen der Zellen in PBS mit Zentrifugationsschritten von jeweils 7 min bei 10 °C mit 1.700 Upm, 1.500 Upm, 1200 Upm entfernt. Anschließend wurden die primären B-Zellen in Kulturmedium suspendiert und direkt mit EBV-Virusüberstand infiziert.

3.2.8 Infektion von primären B-Zellen mit Maxi-EBVs

Die aufgereinigten primären humanen B-Lymphozyten aus Adenoiden (siehe Kapitel 3.2.7) wurden mit verschiedenen Verdünnungen Virusüberstände infiziert. Dazu wurden sie mit Medium und Virusüberstand gemischt und mit einer Dichte von 1×10^5 Zellen in einem Volumen von 200 μ l pro Loch in 96-Loch-Platten auf γ -bestrahlten WI38-Zellen als „feeder-layer“ ausplattiert. Einmal wöchentlich wurde ein Teil des Kulturmediums durch frisches ersetzt. Nach 4-6 Wochen wurde der prozentuale Anteil der Kulturgefäße mit proliferierenden B-Lymphozyten bestimmt und einzelne Klone weiter expandiert.

3.2.9 Induktion des lytischen Zyklus in EREB2-5 Zellen

Der lytische Zyklus kann in LCLs durch die Aktivierung des B-Zell Rezeptors induziert werden. Dazu wurden 1×10^6 Zellen nach einmaligem Waschen in RPMI-Vollmedium in eine Vertiefung einer 12-Lochplatte ausplattiert und ggf. 1 μ g/ml Doxycyclin (dox) und 1 μ M β -Östrogen zugesetzt. Der lytische Zyklus wurde am Folgetag durch Kreuzvernetzen des BCR mittels 20 μ g/ml α -human IgG/IgM (Jackson Immuno Research) induziert. Nach einem weiteren Tag wurden die Zellen für die Durchflusszytometrie vorbereitet (siehe Kapitel 3.2.10).

3.2.10 Durchflusszytometrie (FACS-Analysen)

In der Durchflusszytometrie können Einzelzellen analysiert werden, bei denen z.B. das relative Expressionsniveau von Proteinen mit Hilfe von fluoreszierenden Antikörpern gegen die Proteine bestimmt wird. Während Oberflächenproteine direkt auf der Membran von den Antikörpern erkannt werden, müssen bei zytoplasmatischen oder nuklearen Antigenen die Zellen vor der Färbung permeabilisiert werden.

Zur Detektion des nuklearen Proteins BZLF1 wurden 1×10^6 Zellen zunächst in 1 ml PBS gewaschen und das Zellpellet in 150 μ l PBS resuspendiert. Die Fixierung der Zellen erfolgte durch Zugabe von 150 μ l vorgewärmten Fixierpuffer für 10 min bei 37 °C. Nach einem Zentrifugationsschritt (6 min, 300 g, RT) wurde der Überstand abgenommen und die Zellen in den im Gefäß verbliebenen 50 μ l resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen in 1 ml 100 % Methanol (4°C) für 30 min auf Eis permeabilisiert. Nach zwei Waschschritten in je 1 ml FACS-Puffer wurde der Überstand bis auf 50 μ l abgesaugt und die Zellen in dem Restvolumen resuspendiert. Anschließend wurden 50 μ l α -BZLF1 Antikörper (E. Kremmer; Kulturüberstand) zugegeben und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der CyTM5-konjugierte Sekundärantikörper wurde nach zwei weiteren Waschschritten in einer 1/150-Verdünnung in 50 μ l Zellsuspension eingesetzt und 20 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Vor der FACS-Analyse im FACSCalibur (Becton Dickinson) wurden die Zellen ein weiteres Mal mit 1 ml FACS-Puffer gewaschen und die Zellen in 200 μ l FACS-Puffer resuspendiert. Die Auswertung der Daten erfolgte mit der FLOWJO-Software (Tree Star)

Fixierpuffer

4 % Formaldehyd in PBS.

FACS-Puffer

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

3.3 DNA-Arbeitstechniken

3.3.1 Plasmid-Schnellaufreinigung

Die Plasmidpräparation erfolgte nach einer modifizierten „Boiling Method“ von Holmes (Holmes and Quigley, 1981). 1,5 ml einer Bakterien-Übernachtskultur wurden in einem 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß sedimentiert (30 sec, 13.000 g, RT). Die Überstände wurden abdekantiert und das Zellsediment in 250 µl M-Sted Lysepuffer mit 7 µl Lysozymlösung (10 mg/ml) resuspendiert. Nach 5 min Inkubation bei RT wurden zur Denaturierung der bakteriellen, genomischen DNA die Reaktionsgefäße für 2 min in einem Sandbad auf 100 °C erhitzt. Danach wurden die Ansätze für 5 min auf Eis abgekühlt und für 15 min bei 13.000 g abzentrifugiert. Die Überstände enthielten die gewünschte Plasmid-DNA, die zunächst Ethanolgefällt wurde und nach dem Lösen in Wasser für den Restriktionsverdau verwendet werden konnte.

M-Sted Lysepuffer:

0,5 % Triton X-100; 50 mM Tris-HCl (pH 8,0); 5 % (w/v) Sucrose; 25 mM EDTA (pH 8,0).

3.3.2 Präparative Plasmidaufreinigung

Die präparative Plasmidaufreinigung im Maxi-Maßstab erfolgte mit Hilfe von DNA Adsorptionssäulen entsprechend den Angaben des Herstellers (Genomed und Qiagen). Sehr große Plasmide, wie etwa Maxi-EBV-Plasmide, wurden mit Nucleobond AX500 Säulen der Firma Macherey-Nagel, Düren, nach Angaben des Herstellers gewonnen.

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

Für die homologe Rekombination wurde zunächst die zu ersetzende DNA über Restriktionsverdau aus dem entsprechenden Plasmid geschnitten und das Fragment isoliert. *E.coli* des Stamms DH10B wurden mit dem in TBE gelösten DNA Fragmenten durch Elektroporation (siehe Kapitel 3.1.3) transformiert. Dieser recA-negative *E. coli* Stamm enthält zusätzlich zu dem Maxi-EBV Plasmid p2089 das Plasmid p2650, das unter Kontrolle eines temperatursensitiven Replikationsursprungs das Gen der Rekombinase RecA und das des Exonukleaseinhibitors Redy kodiert. Nach Transformation des linearen DNA-Fragments und einer zweistündigen phänotypischen Expression bei 30 °C wurden doppelresistente Klone (Chloramphenicolresistenz durch das Maxi-EBV vermittelt, Kanamycinresistenz durch das rekombinierte Fragment) bei 42 °C stabil propagiert. Dabei ging das temperatursensitive und Ampizillinresistenz vermittelnde Plasmid p2650 verloren, was leicht an der Sensitivität der gewachsenen Kolonien gegen Ampicillin nachzuprüfen war (Altmann and Hammerschmidt, 2005).

3.3.4 Agarose-Gelelektrophorese

DNA-Fragmente wurden nach ihrer Größe durch Agarosegelelektrophoretisch aufgetrennt. Dazu wurden 0,8-1,5 % Agarose in 1x TBE Puffer (Tris-Borat-EDTA) aufgekocht und vor der Zugabe von 1 µg/ml Ethidiumbromid auf ca. 50 °C abgekühlt. Als Laufpuffer wurde ebenfalls 1x TBE verwendet. Die DNA-Proben wurden mit DNA-Auftragspuffer versetzt und bei 5-7 V/cm aufgetrennt. Ethidiumbromid interkaliert mit der DNA und emittiert nach der Anregung mit UV-Strahlen sichtbares Licht, so dass die DNA im Gel dargestellt werden kann. Um die Größe der DNA ermitteln zu können, wurden Größenmarker bekannter Länge parallel aufgetrennt.

Für die Auftrennung von großen DNAs, wie etwa verdaute Maxi-EBV-DNA wurde anstelle von TBE TAE (Tris-Acetat-EDTA) verwendet.

TBE-Puffer:

89 mM TRIS; 89 mM Borsäure; 2 mM EDTA.

TAE-Puffer:

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

6x DNA-Auftragspuffer:

30 % Glycerin; 0,25 % Bromphenolblau.

3.3.5 DNA-Fragmentisolierung aus dem Agarosegel

Um nach einem Restriktionsverdau das gewünschte DNA-Fragment aufzureinigen, wurde der gesamte Restriktionsansatz auf einem Agarosegel aufgetragen und bei einer niedrigen Spannung von 20 bis 80 V mehrere Stunden bis über Nacht aufgetrennt. Die Bande wurden aus dem Gel ausgeschnitten und mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) gemäß dem Herstellerprotokoll aufgereinigt.

3.3.6 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Um die PCR-Produkte für Klonierungen weiterverwenden zu können, wurde die Vent-Polymerase (nach Angaben des Herstellers) verwendet, da diese aufgrund ihrer 3'-5' Exonukleaseaktivität eine geringe Fehlerrate von ca. $2,8 \times 10^{-6}$ Fehlern/bp erzeugt.

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

Tabelle 2: PCR Bedingung zur Amplifikation von DNA für Klonierungen

1x	Initiale Denaturierung	95 °C	10 min
30-35x	Denaturierung	95 °C	1 min
	Primerhybridisierung	Spez. Temperatur	1 min

	Elongation	72 °C	30 sec-2 min
1x	Schlussextension	72 °C	10 min

3.3.7 DNA-Spaltung mit Restriktionsenzymen

Für analytische Spaltungen wurden 100-500 ng doppelsträngiger DNA mit 1-5 U Enzym geschnitten. Als Restriktionspuffer wurde standardmäßig das Puffersystem von NEB eingesetzt. Wurden bei einem Doppelverdau zwei Enzyme eingesetzt, die unterschiedliche Salzkonzentrationen benötigen, musste zwischen den Restriktionen eine Umpufferung vorgenommen werden, welche mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) erfolgte. In der Regel wurden Restriktionen bei 37 °C und einer Inkubationszeit von 2,5 Stunden durchgeführt.

Für präparative Spaltungen wurden üblicherweise 10 µg Plasmid-DNA eingesetzt und die Enzymkonzentration erhöht.

3.3.8 Ligation

Um die Konzentration der einzelnen DNA-Fragmente abzuschätzen, wurden die Fragmente auf ein Agarsegel aufgetragen und optisch verglichen. Die Vektor-DNA und die im 3fach molaren Überschuss eingesetzte *insert*-DNA wurden dann nach Zugabe von 0,3-1,0 µl T4-DNA-Ligase in dem vom Hersteller mitgelieferten Ligase-Puffer bei 15 °C über Nacht ligiert.

Bei der anschließenden Transformation wurde der gesamte Ansatz von 15 µl in 200 µl CaCl₂-kompetenter DH5α verwendet.

3.3.9 Hybridisierung von Oligonukleotiden

Um kurze DNA-Fragmente zu generieren, wurden einzelsträngige Oligonukleotide hybridisiert. Dazu wurden diese in equimolaren Mengen in einem 1x Puffer für Restriktionsenzyme von NEB angesetzt und in einem Wasserbad auf der Heizplatte auf 100 °C erhitzt. Das Abkühlen erfolgte über Nacht im Wasserbad.

3.3.10 Sonstige DNA-Arbeitstechniken

Die Anwendung gängiger DNA-Arbeitstechniken, wie z.B. Phenolextraktion, Ethanolpräzipitation, Konzentrationsbestimmung im Spektralphotometer, Dephosphorylierung und Phosphorylierung von DNA-Enden mit alkalischer Phosphatase, etc. erfolgte in enger Anlehnung an Standardprotokolle (Sambrook et al., 1989).

3.3.11 Klonierungen

Für alle aufgeführten Klonierungen wurden Bakterien des *E. coli* Stamms DH5α verwendet.

3.3.11.1 pGEX-LMP1 Δ 231, pGEX-LMP1 Δ 221, pGEX-LMP1 Δ 211

Um diese Vektoren zu generieren, wurde jeweils ein Teil des C-Terminus von LMP1 aus dem Vektor 1645 mittels PCR amplifiziert. Hierzu wurden folgende Primer verwendet:

pGEX-LMP1 Δ 231:	AK233 und AK234
pGEX-LMP1 Δ 221:	AK233 und AK235
pGEX-LMP1 Δ 211:	AK233 und AK236

Der 5' Primer AK233 führt eine BamHI Restriktionsschnittstelle ein, während die 3' Primer jeweils eine EcoRI Schnittstelle enthalten. Daher wurden die entsprechenden PCR-Produkte mittels EcoRI und BamHI Restriktion in den Vektor pGEX-LMP1 eingefügt. Die resultierenden Vektoren wurde mit den Primern pGEX 5' bzw. pGEX3' sequenziert.

3.3.11.2 pGEX-LMP1 Δ 201, pGEX-LMP1 Δ 201 A₁₈₁AxxAA, pGEX-LMP1 Δ 201 Y₁₈₅A, pGEX-LMP1 Δ 201 Y₁₈₆A, pGEX-LMP1 Δ 201 A₁₈₅A

Alle diese Vektoren wurden mittels Oligonukleotid-Hybridisierung generiert. Hierzu wurden folgende Oligonukleotide verwendet:

pGEX-LMP1 Δ 201:	AK237 und AK283
pGEX-LMP1 Δ 201 A ₁₈₁ AxxAA:	JG11 und JG12
pGEX-LMP1 Δ 201 Y ₁₈₅ A:	JG13 und JG14
pGEX-LMP1 Δ 201 Y ₁₈₆ A:	JG15 und JG16
pGEX-LMP1 Δ 201 A ₁₈₅ A:	AK278 und AK279

Diese Oligonukleotide generieren nach ihrer Hybridisierung am 5' Ende einen BamHI Überhang und am 3' Ende einen EcoRI Überhang. So konnten die kurzen DNA-Doppelstränge in den Vektor pGEX-LMP1 Δ 231 eingesetzt werden, der zuvor durch die Restriktionsenzyme BamHI und EcoRI geöffnet worden war. Die resultierenden Vektoren wurden mit dem Primer pGEX 3' sequenziert.

3.3.11.3 pGEX-stop

Um diese Vektoren zu generieren, wurde jeweils ein Teil des C-Terminus von GST aus dem Vektor 13.17 mittels PCR amplifiziert, wodurch über die verwendeten Primer (AK252 und AK253) eine zusätzliche *linker*-Sequenz eingeführt wurde. Das PCR-Produkt wurde mittels EcoRI und BstBI Restriktion in den Vektor pGEX-LMP1 Δ 231 eingefügt. Der resultierenden Vektor wurde mit dem Primer pGEX 5' sequenziert.

3.3.11.4 Klonierung von pSV-HA-LMP1-TEV-CT

Um ein LMP1 mit einem fusionierten HA-Epitop sowie einer TEV-Schnittstelle zwischen Transmembrandomänen und C-Terminus zu generieren, waren einige Zwischenstufen nötig. Zunächst wurden zwei Übergangsvektoren kloniert, wobei PCR-Fragmente in den kommerziellen Vektor pCR2.1 (Invitrogen) ligiert wurden. Als Matrize diente der Vektor pSV-LMP1, als Primer AK200 und AK212 (TA-LMP-TEV-CT) bzw.

AK201 und AK202 (pCR2.1-LMP-CT(AK201/AK202)). Diese Übergangsfragmente wurden mit Hilfe von M13for und M13rev sequenziert.

Im nächsten Schritt wurde LMP1 aus TA-LMP-TEV-CT mittels SbfI und BlnI Restriktion in den Vektor pSV-LMP1 eingesetzt und mit AK24 und AK141 sequenziert. Der resultierende Vektor wurde nun mittels AflII und BlnI geöffnet und der C-Terminus von LMP1 aus pCR2.1-LMP-CT(AK201/AK202) über die gleichen Restriktionsenzyme eingesetzt. Der resultierende Vektor pSV-HA-LMP1-TEV-CT wurde mittels AK24, AK30 und AK141 sequenziert.

3.3.11.5 Klonierung von pSV-HA-LMP1-1xli-TEV-CT

Zur Herstellung dieses Vektors wurde über den Primer AK226 eine *linker*-Sequenz zwischen die TEV-Schnittstelle und den C-Terminus von LMP1 eingefügt. Dazu wurde der relevante Bereich aus dem Vektor pSV-LMP1 mit den Primern AK225 und AK226 amplifiziert und über BsrGI und AflII Restriktion in den Vektor pSV-HA-LMP1-TEV-CT eingesetzt. Der resultierende Vektor wurde mit AK24, AK30 und AK141 sequenziert.

3.3.11.6 Klonierung von pSV-HA-LMP1-2xli-TEV-CT

Dieser Vektor entspricht dem vorherigen (siehe Kapitel 3.3.11.7), mit dem einzigen Unterschied, dass er zwei *linker*-Sequenzen zwischen der TEV-Schnittstelle und dem C-Terminus von LMP1 trägt. Es wurde das gleiche Vorgehen wie bei pSV-HA-LMP1-1xli-TEV-CT gewählt, nur wurde anstelle des Primers AK226 der Primer AK227 verwendet.

3.3.11.7 Klonierung eines Maxi-EBV-Genoms mit HA-LMP1

Um ein Maxi-EBV-Genom zu generieren, das anstelle des LMP1 eine HA-getaggte Variante unter dem gleichen Promotor trägt, waren zwei Zwischenstufen nötig. Zunächst wurde die Sequenz des getaggten N-Terminus von LMP1 aus pSV-HA-LMP1-TEV-CT mit SbfI geschnitten und der Überhang durch die T4-DNA-Polymerase entfernt. Anschließend wurde mit BglII nachgeschnitten und das resultierende Fragment über HpaI und BglII in den Zwischenvektor 2234.5 eingesetzt. Nach dessen Sequenzierung mittels AK30 und AK193 wurde LMP1 aus diesem Vektor durch NheI und Sall Restriktion in den Vektor 2167.1 eingesetzt, so dass sich das HA-LMP1 im Kontext des viralen Genoms befindet. Die Sequenzierung erfolgte über AK136 und AK193. Aus dem so entstandenen Vektor wurde ein 2,66 kbp Fragment mit SacI und Sall herausgeschnitten, über die *Phenol-freeze*-Methode isoliert und in Bakterien des Stammes DH10B (siehe Abschnitt 3.1.3) elektroporiert, so dass durch homologe Rekombination das rekombinante Maxi-EBV-Genom entstand.

3.3.11.8 Klonierung eines Maxi-EBV-Genoms mit HA-LMP1-2xli-TEV-CT

Um diesen Vektor zu erhalten, wurde ähnlich wie bei dem Maxi-EBV mit HA-LMP1 vorgegangen. Die Handhabung unterscheidet sich lediglich im ersten Zwischenkonstrukt. Hier wurde LMP1 aus pSV-HA-LMP1-2xli-TEV-CT über XhoI und BlnI Restriktion in den 2234.5 eingesetzt. Die weitere Klonierung erfolgte analog zu Abschnitt 3.3.11.7.

3.3.11.9 Klonierung von pCMV-HA-LMP1 A₁₈₁AxxAA und pCMV-HA-LMP1 A₁₈₅A

Zur Herstellung des Plasmids pSV-HA-LMP1 A₁₈₁AxxAA wurde der C-terminale Bereich von LMP1 mittels PCR aus dem Vektor pSV-LMP1 amplifiziert. Als Primer wurden AK264 und AK265 benutzt. In einer Trippligation wurden das geschnittene PCR-Produkt sowie ein NcoI/MfeI Restriktionsfragment von 406 bp aus dem Vektor pCR2.1 LMP1 (wt) del Sfil und ein BsrGI/MfeI Restriktionsfragment von 4.347 bp aus dem selben Vektor zusammengefügt und anschließend mit T7 und M13rev sequenziert. Die LMP1-Mutante wurde durch eine Bst1107I und BstEII Restriktion aus dem Vektor ausgeschnitten und in pCMV-HA-LMP1 (wt) eingesetzt. Dieser Vektor pCMV-HA-LMP1 A₁₈₁AxxAA wurde mit AK23 und AK30 sequenziert.

Zur Herstellung des Plasmids pCMV-HA-LMP1 A₁₈₅A wurde analog vorgegangen, nur wurde im ersten Schritt anstelle des Primers AK265 der Primer AK280 verwendet.

3.3.11.10 Klonierung von pSV-HA-LMP1 A₁₈₁AxxAA und pSV-HA-LMP1 A₁₈₅A

Um den Vektor pSV-HA-LMP1 A₁₈₁AxxAA zu klonieren, wurde pCMV-HA-LMP1 A₁₈₁AxxAA mittels BplI und BsrGI Restriktion in das Plasmid pSV-LMP1 kloniert. Der resultierende Vektor wurde mittels Sequenzierung über den Primer AK24 überprüft.

Zur Herstellung des Plasmids pSV-HA-LMP1 A₁₈₅A wurde pCMV-HA-LMP1 A₁₈₅A mittels BplI und BsrGI Restriktion in das Plasmid pSV-LMP1 kloniert. Die Klonierung wurde analog zu der vorherigen überprüft.

3.4 RNA-Arbeitstechniken

3.4.1 Isolierung gesamtzellulärer RNA

Die Isolierung von RNA aus Zellkulturzellen erfolgte mit dem RNeasy Mini Kit der Firma Qiagen und wurde nach Anleitung des Herstellers durchgeführt.

3.4.2 Reverse Transkription zellulärer mRNA

Von der isolierten gesamtzellulären RNA (siehe Abschnitt 3.4.1) wurde 1 µg für die reverse Transkription (RT-Reaktion) in komplementäre DNA (cDNA) verwendet. Die RT-Reaktion wurde mit der Superscript III Rnase H-Reverse Transcriptase (Invitrogen) nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Anschließend wurden 2 µl cDNA aus der reversen Transkription in eine PCR mit den entsprechenden spezifischen Primern (siehe Abschnitt 2.5) eingesetzt. Folgendes PCR Programm wurde angewendet:

Tabelle 3: PCR Bedingung zur Amplifikation von cDNA

1x	Initiale Denaturierung	95 °C	10 min
30-35x	Denaturierung	95 °C	1 min
	Primerhybridisierung	55 °C	1 min

	Elongation	72 °C	1 min
1x	Schlussextension	72 °C	10 min

3.5 Proteinbiochemische Methoden

3.5.1 Herstellung von Zelllysaten

Je nach experimentellem Ansatz wurden ca. 1×10^6 bis 1×10^7 Zellen in entsprechenden Mengen Lysepuffer für 10-30 min auf Eis lysiert. Die unlöslichen Zellbestandteile wurden durch Zentrifugation (10 min, 16.000 g, 4 °C) abgetrennt. Die lösliche Fraktion wurde in ein frisches 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Zur Denaturierung der Proteine wurden die Lysate im Verhältnis 1:6 mit 6x Laemmli-Puffer versetzt und für 5 min bei 95 °C erhitzt.

Lysepuffer:

150 mM NaCl; 0,1% NP-40; 50 mM HEPES; 5 mM EDTA pH 7,5.

unmittelbar vor Verwendung Zugabe von Complete Proteinase Inhibitor, 0,5 mM Natriumorthovanadat, 0,5mM Natriumfluorid, 0,5mM Natriummolybdat.

6x Laemmli Puffer:

6% SDS; 30% Glycerin; 6 mM DTT; 150 mM Tris/HCl (pH 6,8); 1 Spatelspitze Bromphenolblau.

3.5.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Der Bradford-Nachweis ist einer der einfachsten Proteinbestimmungstests und zeichnet sich durch eine hohe Sensitivität sowie einer Unempfindlichkeit gegenüber Ionen und Reduktionsmitteln aus. Im sauren Milieu bindet Coomassie-Brilliantblau an positive Aminosäuren der Proteine, so dass die protonierte braunrote kationische Form des Reagens in die unprotonierte blaue anionische Form übergeht. Das Absorptionsmaximum verschiebt sich dabei von 465 nm auf 595 nm (Bradford, 1976).

Für den Nachweis wurden in einer Küvette 3-10 µl der Probe mit 200 µl Bradford-Lösung (Bio-Rad) und 800 µl Wasser gemischt und die Extinktion gegen einen entsprechenden Leerwert bei 595 nm gemessen.

Zur Berechnung der Proteinkonzentration war es notwendig eine Eichkurve mit verschiedenen Mengen von Rinder-Serumalbumin zu erstellen.

3.5.3 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) dient der Auftrennung von Proteinen nach ihrem scheinbaren Molekulargewicht. Das anionische Detergenz SDS im Probenpuffer denaturiert und entfaltet die Proteine, wobei es sich an die Proteinkette proportional zu ihrer Länge anlagert. Die Höhe der Ladung des Protein-Detergenz-Komplexes ist demnach abhängig von der Anzahl der Aminosäuren, deren Eigenladung nun vernachlässigt werden kann. Wird eine Spannung angelegt, wandern die Protein-SDS Kom-

plexe zunächst durch das grobporige Sammelgel, an dessen Grenze sie fokussieren. Das feinporige Trenngel dient der Auftrennung der Proteine (Laemmli, 1970).

Standardmäßig wurden 12,5 %ige Trenngele und 5 %ige Sammelgele aus einer 30 % (w/v) Acrylamidlösung nach Sambrook et al. (Sambrook and Gething, 1989) gegossen. In der Regel wurden 16,7 µl der proteinhaltigen Probe 3,3 µl 6x Laemmli-Puffer versetzt und nach 5minütigem Kochen bei 95 °C auf das Gel geladen. Waren Sepharose-*beads* in den Proben, wurden in der Regel 50 µl Probe mit 20 µl 6x Laemmli-Puffer versetzt und der Überstand nach Zentrifugation (3 min, 500 g, RT) ebenfalls nach 5minütigem Kochen bei 95 °C auf das Gel geladen.

Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 35 mA pro Gelkammer für ca. 90 min. Das Gel wurde anschließend entweder auf eine Nitrozellulose-Membran geblottet oder mit Coomassie gefärbt oder einer Silberfärbung unterzogen.

Sammelgel-Mix (400 ml):

307 ml H₂O; 60 ml 30 % Acrylamid; 25 ml 2 M Tris-HCl (pH 6,8); 4 ml 10 % (w/v) SDS; 4 ml 0,5 M EDTA.

pro Gel: 2 ml Sammelgel-Mix; 30 µl APS; 8 µl TEMED.

12,5 % SDS-Trenngel (100 ml):

41 ml H₂O; 41,6 ml 30 % Polyacrylamid; 16,6 ml 2 M Tris-HCl (pH 8,9); 666 µl 0,5 M EDTA; 530 µl APS; 50 µl TEMED.

Einlegelösung für SDS-Gele:

83,3 ml 2 M Tris-HCl (pH 8,9); 3,3 ml 0,5 M EDTA; 413,4 ml H₂O.

SDS-Laufpuffer (1x):

30 g Tris; 144 g Glyzin; 100 ml SDS (10 %); ad 1 l H₂O.

3.5.4 Western-Blot Analyse

Für die Western-Blot Analyse (auch Immunoblot genannt) wurden Zelllysate (siehe Abschnitt 3.5.1) oder andere proteinhaltige Proben mittels Gelelektrophorese auf 12,5 % Polyacrylamid-Gelen bei 35 mA je Kammer und maximal 250 V aufgetrennt (vgl. Kapitel 3.5.3). Um die aufgetrennten Proteine aus dem SDS-Gel immunochemisch nachweisen zu können, wurden sie von dem Polyacrylamidgel im Nassverfahren auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen. Die anionischen SDS-Protein-Komplexe werden hier durch das Anlegen von einer Spannung auf die Membran am Pluspol transferiert (Towbin et al., 1979).

Der elektrophoretische Transfer erfolgte bei Raumtemperatur durch Anlegen einer Stromstärke von 500 mA innerhalb von 40 min bei einer Begrenzung auf 100 V. Zur Kontrolle des Transfers sowie zur Färbung der Proteine auf der Membran wurde die Membran mit Ponceau-Lösung gefärbt. Um unspezifische Bindungen des Antikörpers zu verhindern, wurde die Membran nach dem Blotten mit 5 % Magermilchpulver in TBS-T (Blocklösung) für eine Stunde inkubiert. Für einen Phosphoprotein-Nachweis wurde die Blocklösung durch 1x Rotiblock (Roth) ersetzt, da die große Mengen an Phosphoproteinen in der Milch zu einem starken Hintergrundsignal führen würden. Anschließend wurde der Primärantikörper in der jewei-

ligen Blocklösung über Nacht bei 4 °C auf dem Blot unter Schwenken inkubiert. Anschließend wurde drei Mal mit TBS-T gewaschen und der Blot mindestens eine Stunde mit HRP-gekoppeltem Zweitantikörper in Blocklösung inkubiert. Überschüssige Antikörper wurden durch viermaliges Waschen der Membran mit TBS-T entfernt und der Blot mit ECL (Thermo) 1 min inkubiert. Für den Nachweis von schwachen Signalen wurde 5 min mit ECL+ (GE healthcare) oder Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore) inkubiert.

Anschließend wurden Röntgenfilme mit der Membran exponiert. Nach der Entwicklung wurden die Molekulargewichtsstandards auf den Film übertragen, um eine Größenzuweisung zu ermöglichen.

Transferpuffer (10x):

30 g Tris-base; 95 g Glyzin; ad 1 l H₂O.

Ponceau-Lösung:

0,5% (w/v) Ponceau S; 1% (v/v) Eisessig.

Waschlösung:

20 mM Tris-HCl (pH 7,5); 150 mM NaCl; 0,1 % Tween-20.

Blocklösung:

20 mM Tris-HCl (pH 7,5); 150 mM NaCl; 5 % (w/v) Magermilchpulver.

3.5.5 Coomassie-Färbung zur Darstellung von Proteinen im SDS-Gel

Um größere Proteinmengen in Gelen anzufärben, wurde Coomassie verwendet. Dazu wurden die Gele direkt in die Coomassie-Lösung gegeben und bei Raumtemperatur für 15-45 min inkubiert. Die tiefblauen Gele wurden anschließend in mehreren Schritten mit Entfärbelösung gewaschen, bis die Banden gut sichtbar und der Hintergrund farblos waren. Sollten die Gele der Massenspektrometrie zugeführt werden, wurde ein schonenderes Entfärbeverfahren gewählt, indem die Gele in bidestilliertem Wasser bei 4 °C geschwenkt wurden.

Coomassie-Lösung:

40% Ethanol; 10% Essigsäure; 0,2% Coomassie Brilliant Blue R250

Entfärbelösung:

40% Ethanol; 10% Essigsäure.

3.5.6 Silberfärbung zur Darstellung von Proteinen im SDS-Gel

Diese Färbung nutzt aus, dass Silbernitrat in Gegenwart von Formaldehyd und Ammoniak mit basischen und schwefelhaltigen Aminosäuren zu elementarem Silber reagiert. Sie weist eine deutlich höhere Sensitivität als die Coomassie-Färbung auf.

Für eine schnelle Färbung wurde das SilverQuest™ Silver Staining Kit (Invitrogen) nach Angaben des Herstellers verwendet. Um Proteine mittels Massenspektrometrie zu untersuchen, wurde das unten aufgeführte Protokoll verwendet.

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

Die Gele wurden zweimal 15 min in der Fixierlösung fixiert, wobei der erste Fixierschritt auch über Nacht ausgedehnt werden konnte. Danach wurden die Gele zuerst für 30 min in Sensibilisierlösung inkubiert und anschließend sechsmal 5 min in bidest. Wasser gewaschen. Für die darauf folgende Färbung wurden die Gele für 20 min in Färbelösung gegeben. Anschließend wurden die Gele in der Entwicklerlösung bis zum Sichtbarwerden der Banden unter Schütteln inkubiert und die Reaktion durch mindestens 10minütiges Schütteln in Stop-Lösung gestoppt.

Fixierlösung:

10% (v/v) Eisessig; 40%(v/v) Ethanol.

Sensibilisierlösung:

30% Ethanol; 0,02% Natriumthiosulfat; 6,8% (w/v) Natruimacetat.

Färbelösung:

0,2% (w/v) Silbernitrat.

Entwicklerlösung:

2,5% (w/v) Natriumcarbonat; 0,04% (v/v) Formaldehyd.

Stop-Lösung:

0,5% (w/v) Glycerin.

3.5.7 Expression von GST-Fusionsproteinen in *E. coli*

Am Vortag der Proteinpräparation wurde eine 30 ml Vorkultur (LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin) der Bakterien angesetzt und über Nacht bei 37 °C unter Schwenken inkubiert. Am folgenden Tag wurden 400 ml LB-Medium mit 25 ml der Vorkultur angeimpft und bis zu einer optischen Dichte bei 600 nm von ca. 0,6 bis 0,8 bei 37 °C geschüttelt. Bei Erreichen der richtigen Bakteriendichte wurde die Proteinexpression mit 400 µl 200 mM IPTG induziert, und die Bakterien bei 30 °C für vier bis fünf Stunden geschüttelt. Daraufhin wurde die Bakterienkultur zentrifugiert (3.000 Upm, 10 min, 4 °C) und das Zellsediment in 10 ml PBS-T-Lysepuffer mit einer Spatelspitze Lysozym aufgenommen. Das Zelllysate wurde für 5 min auf Eis gestellt und daraufhin dreimal für 10 sec mit 50 sec Pause bei einer Intensität von 50 % sonifiziert. Nach einem Zentrifugationsschritt (16.000 Upm, 10 min, 4 °C) wurde der Überstand abgenommen. Diese Lysate wurden direkt in GST-Kopräzipitationsversuche eingesetzt oder mit 10 % Glycerin versetzt und bei -80 °C gelagert.

PBS-T-Lysepuffer:

1 % Triton-X100; 10 mM DTT; 0,2% PMSF in PBS.

3.5.8 GST-Kopräzipitationsversuche

Um interagierende Proteine des C-Terminus von LMP1 nachzuweisen, wurden Kopräzipitationen mit Glutathion-S-Transferase (GST)-LMP1-Fusionsproteinen durchgeführt. Das GST-LMP1 Fusionsprotein, eine Fusion zwischen der zytoplasmatischen Signaldomäne von LMP1 und GST, wurde wie in Abschnitt 3.5.7. beschrieben in *E. coli* exprimiert und lysiert. Um in dem GST-Kopräzipitationsversuch vergleichbare Mengen der GST-LMP1-Fusionsproteine einzusetzen, wurde zunächst eine Testkopplung durchgeführt. Dazu wurden 200 µl des Lysats mit 400 µl PBS-T-Lysepuffer und 10 µl Glutathion-Sepharose 4B *beads* (GE Healthcare), die zuvor dreimal mit PBS und 5 mM DTT gewaschen und dadurch reduziert worden waren, für 1 h auf dem Überkopfschüttler bei 4 °C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS-T-Lysepuffer wurde der Überstand bis auf 50 µl abgenommen, mit 6x Laemmli-puffer versetzt und aufgeköcht. Anschließend wurden 3 µl auf einem SDS-Gel aufgetrennt und das Gel Coomassie-gefärbt, so dass die Menge des gebundenen Fusionsproteins abgeschätzt werden konnte. Anhand dieser Abschätzung wurde Lysat für die eigentliche Kopplung eingesetzt und über Nacht an 10 µl Glutathion-Sepharose 4B *beads* gebunden. Die so immobilisierten GST- Fusionsproteine wurden drei Mal in 800 µl PBS-T-Lysepuffer gewaschen, um bakterielle Proteine zu entfernen.

Pro Ansatz wurden ca. $2,5 \times 10^8$ DG75 Zellen verwendet, die ein Mal in PBS gewaschen wurden und dann in Pulldown-Lysepuffer (2×10^7 Zellen pro ml Lysepuffer) für 30-60 min auf Eis lysiert wurden. Nach einem Zentrifugationsschritt von 20 min bei 4 °C und 16.000 g wurde der Überstand über Nacht auf Eis inkubiert. Am folgenden Tag wurde ein weiteres Mal unter gleichen Bedingungen zentrifugiert, der Überstand durch eine Biospin-Säule (Bio-Rad) von eventuellen Schwebepartikeln befreit und auf den vorbereiteten immobilisierten GST- Fusionsproteinen verteilt.

Zur Kopräzipitation wurden die Ansätze über Nacht auf einem Überkopfschüttler bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die *beads* sedimentiert (20 min, 500 g, 4 °C) und je drei Mal in Pulldown-Lysepuffer gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Kopräzipitationskomplexe erneut sedimentiert, auf ein Gesamtvolumen von ca. 40 µl in Pulldown-Lysepuffer eingestellt und mit 15 µl 6x Laemmli-puffer für 5 min auf 95 °C erhitzt. Die assoziierten Proteine wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt, woraufhin eine Immunoblot-Analyse mit SHP-1- und TRAF3-spezifischen Antikörpern durchgeführt wurde (siehe Abschnitt 4.6.1.).

Pulldown-Lysepuffer:

1 % (w/v) n-Octylglycosid; 1 mM MgCl₂ in PBS.

unmittelbar vor Verwendung Zugabe von Complete Proteinase Inhibitor, 0,5 mM Natriumorthovanadat, 0,5 mM Natriumfluorid, 0,5 mM Natriummolybdat.

3.5.9 Immunkomplex-Kinaseversuch

Die Methode wurde adaptiert nach Kieser (Kieser, 2001) und wie im Folgenden beschrieben durchgeführt.

Zunächst war es erforderlich, den Antikörper 3F10 (Roche) gegen das HA Epitop an Protein G-Sepharose *beads* zu koppeln. Dazu wurden 80 µl der *beads* (GammaBind, GE Healthcare) drei Mal in TBS gewaschen, um das Ethanol der Aufbewahrungslösung zu entfernen. 200 µg des α-HA Antikörpers wurden während dessen in 500 µl PBS mit 4 % (w/v) Saccharose und 0,02 % (w/v) Natriumazid gelöst. Der gelö-

te Antikörper wurde durch zweistündiges Rollen bei 4 °C an Protein G-Sepharose *beads* gebunden. Anschließend wurden die *beads* präzipitiert (1 min, 4 °C, 13.000 g), drei Mal mit TBST-Lysepuffer gewaschen und in 1,2 ml PBS mit 4 % (w/v) Saccharose und 0,02 % (w/v) Natriumazid aufgenommen. Die so immobilisierten Antikörper können für mehrere Monate bei 4 °C gelagert werden.

Für Immunkomplex-Kinaseversuche wurden je Ansatz 1×10^7 Zellen transient mittels Elektroporation transfiziert (siehe Abschnitt 3.2.3). Nach ca. 20 h Inkubation wurden die Zellen in 400 µl TBS-T-Puffer lysiert und klare Zellysate durch Zentrifugation (20 min, 13.000 g, 4°C) hergestellt. Zur Immunpräzipitation der HA- bzw. Flag-fusionierten Kinasen wurden die klaren Zellysate über Nacht bei 4°C mit 20 µl α-HA 3F10 Antikörper gekoppelten Protein G-Sepharose *beads* (siehe oben) inkubiert. Die Immunpräzipitate wurden je zwei Mal mit TBS-T-Lysepuffer und Kinasereaktionspuffer gewaschen und auf ein Volumen von ca. 40 µl in Kinasereaktionspuffer eingestellt.

Die Bestimmung der Kinaseaktivität erfolgte anschließend *in vitro* mittels einer Immunkomplex-Kinasereaktion, in der Gegenwart von radioaktivem γ -³²P-ATP. In dieser Reaktion wird das radioaktiv markierte γ -³²Phosphat aus dem vorliegenden γ -³²P-ATP durch die Enzymaktivität der Kinase auf ein spezifisches Substrat übertragen. Für die JNK1-Kinasereaktionen diente die an Glutathion-S-Transferase (GST) fusionierte Transaktivierungsdomäne von c-Jun (GST-c-Jun) als Substrat, welche in *E. coli* exprimiert wurde (siehe Abschnitt 3.4.4).

Der Start der Kinasereaktion erfolgte durch Zugabe eines Reaktionsgemisches zu der immunpräzipitierten Kinase. Das Gemisch bestand aus 10 µl Kinasereaktionspuffer versetzt mit 5 µCi γ -³²P-ATP (3.000 Ci/mmol) und ca. 2 µg GST-c-jun. Die Reaktion erfolgte für 20 min bei einer Temperatur von 27 °C und wurde durch Zugabe von 10 µl 6x Laemmli-Puffer und sofortiges Erhitzen für 5 min bei 95 °C gestoppt. Die Proben wurden auf ein 12,5 %iges SDS-Gel aufgetragen und auf eine Hybond-ECL-Membran transferiert. Die Übertragungsrate des radioaktiven γ -³²Phosphats an das Substrat ließ sich durch Autoradiographie der radioaktiven Membran bestimmen und mit Hilfe eines Fuji BAS 1.000 Phosphoimagers quantifizieren.

TBS-T:

20 mM Tris-HCl (pH 7,4); 150 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1 % Triton X-100.

Protease- und Phosphataseinhibitoren wurden unmittelbar vor Verwendung zugegeben:

1 mM PMSF; 0,5 mM β-Glycerophosphat; 0,5 mM Natriumorthovanadat; 0,5 mM Natriumfluorid; 0,5 mM Natriummolybdat.

Kinasereaktionspuffer:

20 mM Tris-HCl (pH 7,5); 10 mM MgCl₂; 20 mM NaCl; 1 µM DTT; 2 µM ATP.

3.5.10 Luziferase-Reportergen Versuche

Um eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB nachzuweisen, wurden DG75 Zellen sowie DT40 Zellen mit Expressionsvektoren für LMP1 wt und LMP1-Mutanten zusammen mit einem Luziferase-Reportergenkonstrukt (3xκB-Luc) und einem Renilla-Reportergenkonstrukt (PGK-Renilla) transfiziert. In dem Plasmid 3xκB-Luc steht das Luziferasegen (Glühwürmchenluziferase) unter Kontrolle eines minimalen c-fos-Promoters und drei NF-κB Bindestellen. Das Renilla-Gen Luziferase aus der Seefeder, einer

Weichkoralle, steht unter Kontrolle eines Phosphoglyzeratkinase (PGK) Promotors, der nicht durch NF- κ B-Signale beeinflusst wird und somit als Transfektionskontrolle zur Standardisierung verwendet werden konnte. Vierundzwanzig Stunden nach Transfektion wurden die Zellen geerntet, ein Mal in kaltem PBS gewaschen, in 150 μ l Lysepuffer (Promega) resuspendiert und 15 min lysiert. Die Suspensionen wurden umgehend bei -20 °C für mindestens 2 h tiefgefroren. Nach dem Auftauen wurden durch einen Zentrifugationsschritt (10 min, 16.000 g, 4 °C) unlösliche Zellbestandteile abgetrennt.

Der Nachweis der Luziferaseaktivität sowie der Renillaaktivität erfolgte mit dem Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) nach Angaben des Herstellers mit 50 μ l des jeweiligen Testpuffers unter Verwendung eines Injektions-Luminometers (Microlumat LB96P).

3.5.11 Immunpräzipitation (IP)

Die Immunpräzipitation (IP) dient der selektiven Anreicherung eines Antigens aus einer komplexen Mischung, z.B. einem Zelllysate. Dazu wird ein spezifischer Antikörper gegen das Protein verwendet, der über den F_c-Teil an immobilisiertes Protein A oder G bindet. Das Protein wird so aus der Lösung angereichert (Firestone and Winguth, 1990).

Soweit nicht anders angegeben, wurden 1×10^7 Zellen pro Immunpräzipitationsansatz (IP-Ansatz) verwendet. Die Zellen wurden in PBS gewaschen und anschließend in 500 μ l Lysepuffer gründlich resuspendiert. Nach einer Inkubation von 10 min bis 1 h auf Eis, wurde das Lysat für 10 min bei 16.000 g und 4 °C zentrifugiert, um nichtlösliche Bestandteile zu entfernen. Der Überstand wurde mit 4 μ g gereinigtem Antikörper und 20 μ l einer 50 %igen Protein A Sepharose Suspension versetzt und über Nacht bei 4 °C im Überkopfschüttler inkubiert.

Alternativ wurden die Antikörper vor der Immunpräzipitation kovalent an die Protein A- oder Protein G-Sepharose *beads* gekoppelt, um eine Solubilisierung der schweren Kette des Antikörpers bei der Aufbereitung der Proben in SDS-Probenpuffer zu verhindern. Hierzu wurden 2 mg des Antikörpers mit 1 ml in PBS äquilibrierten *beads* für ein bis zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach zweimaligem Waschen in 10 ml 0,2 M Natriumborat (pH 9,0) wurden die *beads* in 10 ml Natriumborat aufgenommen und für die Dauer von 30 min bei Raumtemperatur mit 20 mM Dimethylpimelimidat (DMP) inkubiert. Diese Reaktion wurde mittels Waschen in 0,2 M Ethanolamin (pH 8,0) und durch anschließende zweistündige Inkubation in Ethanolamin-Lösung bei Raumtemperatur gestoppt. Die so immobilisierten Antikörper waren nach Waschen und Aufnehmen in 1 ml PBS mit 0,02 % Natriumazid bei 4 °C für längere Zeit haltbar. Von diesen immobilisierten Antikörpern wurden standardmäßig 20 μ l pro Immunpräzipitation eingesetzt und über Nacht bei 4 °C im Überkopfschüttler inkubiert.

Nach der Bindung des Antigens an den Antikörper wurden die Immunkomplexe bei 500 g abzentrifugiert und dreimal mit je 800 μ l Lysepuffer gewaschen. Anschließend wurde der Überstand auf 45-50 μ l abgesaugt und mit 15-20 μ l 6-fach Laemmli Puffer versetzt und 5 min auf 95 °C erhitzt.

Lysepuffer:

150 mM NaCl; 0,1 % NP-40; 50 mM HEPES; 5 mM EDTA pH 7,5.

unmittelbar vor Verwendung Zugabe von Complete Proteinase Inhibitor, 0,5 mM Natriumorthovanadat, 0,5 mM Natriumfluorid, 0,5 mM Natriummolybdat.

3.5.12 TEV-Verdau von immobilisiertem HA-LMP1-2xli-TEV-CT Konstrukten

Um den C-Terminus von LMP1 einschließlich der assoziierten Proteine von den *beads* und unspezifisch an die *beads* bindende Proteinen zu isolieren, wurden HA-LMP1-TEV-CT Konstrukte nach der Immunpräzipitation (siehe Abschnitt 3.5.11) mit der TEV-Protease geschnitten. Die TEV-Protease ist ein 27 kDa Protein aus dem Tabak Etch Virus (TEV) und zeichnet sich durch eine hohe Spezifität für ihr Substrat (Glu-Asn-Leu-Tyr-Phe-Gln-Gly) aus. Sie schneidet in dieser Sequenz zwischen Gln und Gly.

Für den TEV-Verdau wurden die *beads* nach der Immunpräzipitation drei Mal mit je 800 µl IP-Lysepuffer gewaschen. 20 µl *beads* wurden in 150 µl TEV-Puffer aufgenommen. Die TEV-Spaltung erfolgte nach Zugabe von 30 U TEV-Protease für 4 Stunden bei 16 °C unter Rollen. Anschließend wurde der Ansatz 5 min bei 4 °C und 500 g sedimentiert. Im Überstand befand sich nun der abgeschnittene C-Terminus von LMP1 sowie die daran assoziierten Proteine. Dieser Überstand wurde 6x Laemmli versetzt und 5 min bei 95 °C aufgeköcht. Das Sediment wurde dreimal mit IP-Lysepuffer gewaschen, mit 6x Laemmli Puffer versetzt und ebenfalls 5 min bei 95 °C aufgeköcht.

1x TEV-Puffer:

50 mM Tris-HCl (pH 8.0); 0,5 mM EDTA, 1 mM DTT; 0,1% NP-40.

3.6 Massenspektrometrische Methoden

3.6.1 Trypsin-Verdau

Nach dem TEV-Verdau (bei TEV5 Zellen) bzw. der Immunpräzipitation (bei LCL3 Zellen) wurden die Proben auf ein 12,5 %iges SDS-Gel aufgetragen, wobei darauf geachtet wurde, dass sich zwischen den einzelnen Proben mindestens eine freie Spur befand. Die Proben wurden nur 1 cm weit aufgetrennt und die Proteine mit Coomassie gefärbt (siehe Abschnitt 3.5.5). Anschließend wurde jede Spur in drei Bereiche mit vergleichbarer Probenkomplexität aufgeteilt, unter der Umluft-Sterilbank ausgeschnitten und in 1 mm³ große Würfel geschnitten. Die Gel-Kuben wurden dann in 100 -400 µl ABC-Puffer aufgenommen, 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und zwei weitere Male für jeweils 5 min bei 37 °C in 100 -400 µl dieses Puffer gewaschen. Nach einem 15-minütigen Reduktionsschritt mit 200 µl DTT-Lösung bei 55 °C wurden die Proteine in den Gelquadern mit 200 µl Iodacetamid-Lösung 20 min bei Raumtemperatur im Dunkeln alkyliert. Es folgten drei Waschschrte mit ABC-Puffer. Anschließend wurden den Gelstücken das Wasser entzogen, indem sie zwei Mal in 200 µl 100 % Acetonitril (ACN) für jeweils 15 min inkubiert wurden. Um restliches ACN abzdampfen, wurden die Gelstücke offen bei 37 °C für 15 min inkubiert.

Für die enzymatische Spaltung wurden je nach Materialmenge 5-20 µl Trypsinlösung direkt auf die Gelstücke gegeben und 5 min inkubiert. Anschließend wurde gerade soviel Spaltpuffer zugegeben, bis alle Gelstücke vollständig mit Puffer bedeckt waren. Der Verdau erfolgte über Nacht bei 37 °C.

Nach der enzymatischen Spaltung lagen die in der Gelmatrix eingebetteten Proteine als wesentlich kleinere Peptide vor, die aus der Gelmatrix isoliert werden konnten. Dazu wurde der Überstand abzentrifugiert (1 min, 13.000 g, RT) und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Danach wurden die Gelstücke mit 10-50 µl Elutionspuffer bedeckt und 5 min im Wasserbad sonifiziert. Der Überstand wurde mit dem des Ver-

daus vereinigt und die Gelstückchen erneut mit Elutionspuffer überschichtet. Dieser Vorgang der Elution wurde 3-5 Mal wiederholt, bis die Gelstücke weiß und zusammengeschrumpft waren. Die vereinigten Eluate wurden in der Speed Vac eingeengt und die trockenen Peptide bei -20 °C aufbewahrt. Um den Peptidverlust in den Reaktionsgefäßen möglichst gering zu halten, wurden für alle Schritte silikonisierte bzw. so genannte „low bind“ Reaktionsgefäße (Biozym) verwendet.

Für die anschließende Auftrennung mittels HPLC wurden die Proben in 13 µl einer wässrigen Lösung (3 % ACN; 0,5 % TFA) aufgenommen.

ABC-Puffer:

50 mM Ammoniumcarbonat; 30 % Acetonitril (ACN).

Spaltpuffer:

10 mM Ammoniumcarbonat.

DTT-Lösung:

45,38 mM DTT.

Iodacetamid-Lösung:

18,6 mg in 1 ml bidest. Wasser (lichtempfindlich).

Trypsinlösung:

0,03 µg/µl Trypsin gelöst in Spaltpuffer.

Elutionspuffer :

80 % Acetonitril; 1 % Trifluoressigsäure.

3.6.2 Nano Hochleistungs- Flüssigkeits- Chromatographie (nano HPLC)

Zur Auftrennung des nach dem tryptischen Verdau erhaltenen Peptidgemisches wurde die Ultimate HPLC der Firma LC-Packings verwendet. Die Auftrennung erfolgte über eine Umkehrphase- oder Reverse-Phase Chromatographie. Die stationäre Phase stellt hierbei eine Säule aus porösen, mit 18-Alkylketten beschichteten Silicapartikeln dar, dem so genannten C18 Material. An dieses C18 Material können Peptide entsprechend ihrer Hydrophobizität unterschiedlich stark binden und mit einem ansteigenden Acetonitril-Gradienten eluiert werden.

Hierzu wurde die Probe zunächst über eine kurze Vorsäule (5x 0,3mm) aus C18 Material entsalzt, wobei als Puffer 0,1 % Trifluoressigsäure (TFA) in Wasser mit einem Fluss von 20 µl/min diente. Zur analytischen Auftrennung wurde die Probe anschließend über die Trennsäule geleitet. In dieser Arbeit wurde die 15 cm lange PepMap C18-Säule (LC-Packings) mit einem Innendurchmesser von 75 µm bei einer Flussgeschwindigkeit von konstant 200 nl/min verwendet. Der Gradient zur Auftrennung der Peptide nach ihrer Hydrophobizität wurde durch zwei HPLC-Puffer erzeugt (Puffer A: 5 % ACN, 0,1 % TFA in Wasser; Puffer B: 80 % ACN, 0,08 % TFA in Wasser). Es wurde zunächst 5 min 5% Puffer B verwendet. Über die nächsten 50 min wurde die Konzentration von Puffer B mit einem linearen Gradienten von 5 bis 50 % erhöht, dem dann ein weiterer linearer Gradient von 50 bis 100 % Puffer B über 15 min folgte. Anschließend wur-

de ein 10minütiger Elutionsschritt mit 100 % Puffer B durchgeführt, dem ein 6minütiger linearer Gradient von 100% Puffer B auf 5% Puffer B folgte. Abschließend wurde 28 min mit 5% Puffer B eluiert. Nach der Trennung wurde die Absorption der Peptide in einem UV-Detektor bei einer Wellenlänge von 214 nm und 280 nm gemessen. Von der UV-Zelle aus wurden die getrennten Peptide über eine Fused-Silica Kapillare zu einem Pipettier-Roboter (Probot, LC Packings) geleitet. Dort wurde die Peptidlösung mit der Matrixlösung in einem Verhältnis von 1:4 gemischt und pro LC-Lauf in 275 Fraktionen á 26 sec automatisch auf ein MALDI-Stahltarget gespottet.

Matrixlösung:

2,5 µg/µl α-Cyano-4-hydroxymethylsäure (CHCA); 70 % (v/v) ACN; 0,1 % (v/v) TFA.

3.6.3 Massenspektrometrische Analyse und Auswertung

In dieser Arbeit wurde das MALDI-TOF/TOF Instrument Proteomanalyser 4700 (Applied Biosystems) verwendet und Massen zwischen 900 bis 5500 Da massenspektrometrisch analysiert. Das Gerät verfügt über einen N₂/YAG Laser, der mit einer Frequenz von 200 Hz bei einer Wellenlänge von 355 nm betrieben wurde. Die Laserintensitäten wurden für die Realprobe optimiert. Zum Erreichen einer hohen Massengenauigkeit wurde jede Platte mit Hilfe von Standardpeptiden (Bruker Daltonik, Bremen) kalibriert. Für ein MS-Spektrum wurden 2500 Laserschüsse durchgeführt und aufaddiert. Bei den folgenden MS/MS-Spektren, bei denen jeweils ein bestimmtes Ion aus dem MS-Lauf als Vorläuferion (*precursor*) diente (siehe Abschnitt 1.1), wurde die Anzahl der Laserschüsse auf 4.000 und die Laserenergie gegenüber der MS-Messung um 1.000 Einheiten erhöht. Da sich auf einem *spot* nur eine begrenzte Menge an Probe befand und durch den Laserbeschuss bei jeder Messung Probenmaterial abgetragen wurde, wurde die maximale Anzahl der Vorläuferionen auf 10 beschränkt. Darüber hinaus mussten die Vorläuferionen ein Signal-zu-Rauschverhältnis (S/N) von mindestens 20 aufweisen, ihre Intensität die des Hintergrunds also deutlich übersteigen. Aufgrund dieser Parameter wurden pro *spot* unterschiedlich viele Vorläuferionen ausgewählt. Als Kollisionsgas für die Fragmentierung der Peptide diente Luft.

Zur Datenbanksuche wurden die gewonnenen MS/MS-Spektren in den GPS-Explorer (Version 3.5, Applied Biosystems) geladen und dort mit Hilfe des integrierten Mascot-Programms (Perkins et al., 1999) ausgewertet. Bei Mascot handelt es sich um eine Wahrscheinlichkeits-basierte Molekulargewichtssuche, deren Wahrscheinlichkeitsmodell nicht detailliert veröffentlicht ist, sich aber an den Mowse Algorithmus anlehnt. Hierbei wurde die öffentlich zugängliche Proteindatenbank SwissProt verwendet, die sich durch eine minimale Redundanz, ausführliche Querverweise und Literaturzitate auszeichnet. Folgende Suchparameter wurden verwendet: Da die Proben aus humanen B-Lymphozyten stammten, wurde das Taxon auf *Homo sapiens* eingegrenzt. Auf eine Suche in viralen Proteinen zur Identifikation des Inputs (LMP1) wurde verzichtet, da dieses Protein durch Trypsin nur in Peptide gespalten wird, die außerhalb des berücksichtigten Massenbereichs lagen. Als verwendetes Enzym zur Spaltung wurde Trypsin gewählt. Carbamidmethylierung wurde als feste Modifikation angenommen, während die Oxidation von Methionin als variable Modifikation festgesetzt wurde. Es wurde mit einer Fehlsplaltung („miss cleavage“) von 2 und zunächst mit einer Massentoleranz von 65 ppm gesucht. Zum Teil wurde eine weitere Analyse mit einer höheren Massentoleranz durchgeführt. Für die MS/MS-Analyse wurde eine Abweichung von 0,50 Da toleriert. Bei der Suche wurden nur Treffer berücksichtigt, die mindestens einen *peptiderank* von 3 aufwiesen. Dieser *pep-*

tiderank gibt die Peptidübereinstimmung in Werten von 1 bis 10 an, wobei 1 die beste Übereinstimmung widerspiegelt.

Die GPS Explorer Software liefert den *Total Ion Score* und den *Best Ion Score* als Konfidenzintervall in Prozent. Der *Best Ion Score* gibt die prozentuale Wahrscheinlichkeit an, mit der das beste Peptid eines Proteins identifiziert worden ist. Der *Total Ion Score* in Prozent berechnet sich aus allen einzelnen scores (*Best Ion Score*) der gefundenen Peptide.

Bei der Proteinidentifizierung mit der GPS-Explorer-Software wurde der Konfidenzintervall auf $\geq 95\%$ gesetzt. Bei Proteinen, die einen *Total Ion Score* $< 95\%$ aufwiesen, jedoch einen *Best Ion Score* $\geq 80\%$ besaßen, wurden die MS/MS-Spektren manuell näher auf möglichst durchgehende y- und/oder b-Ionen Serien analysiert.

Um die Datensätze aus mehreren Experimenten besser vergleichen zu können, wurde darüber hinaus die Scaffold Software (Version 2.0, Proteome Software Inc.) verwendet. Die Ergebnisse der Mascot-Analyse wurden in die Scaffold-Software eingegeben. Darüber hinaus kann das Programm eine zusätzliche Analyse mit X! Tandem (www.thegpm.org; Version 2007.01.01) durchführen. Hierbei wurde, ebenso wie für die Mascot-Analyse, die SwissProt Datenbank (human, Version 070531, 16.703 Sequenzen) verwendet. In beiden Analysen wurden Massentoleranzen von 65 ppm im MS und 0,50 Da im MS/MS verwendet. Iodacetamid-Derivate von Cystein wurden in Mascot als feste, in X! Tandem als variable Modifikation spezifiziert. Die Oxidation von Methioninen wurde in beiden Analysen als variable Modifikation angenommen.

Scaffold nutzt den Peptide Prophet Algorithmus, um identifizierte Peptide und Proteine zu validieren. Dieses Verfahren ermöglicht es, die Wahrscheinlichkeit einer korrekten oder falschen Zuordnung mittels einer statistischen Wahrscheinlichkeitsverteilung (Bayes Statistik) zu berechnen. Dieses Verfahren reicht über eine reine Festlegung eines Grenzwertes hinaus und führt zu Ergebnissen mit einer geringen Rate an falsch-positiv identifizierten Proteinen (Nesvizhskii et al., 2003).

In dieser Analyse wurden Peptide akzeptiert, wenn sie eine Wahrscheinlichkeit von über 80 % mit dem Peptide Prophet Algorithmus aufwiesen (Keller et al., 2002). Proteine wurden ab einer Wahrscheinlichkeit größer 90 % akzeptiert (Nesvizhskii et al., 2003).

4 Ergebnisse

Die Zielsetzung dieser Doktorarbeit bestand in der Identifizierung und Charakterisierung von Proteinen, die direkt oder indirekt mit LMP1 interagieren. Dazu werden zwei große Hauptteile behandelt.

Der erste Teil beschäftigt sich mit der Identifizierung von neuen Interaktionspartnern von LMP1. Dazu musste zunächst ein geeignetes zelluläres System etabliert werden, aus dem der LMP1-Signalkomplex mittels Immunpräzipitationen aufgereinigt werden konnte. Diese Aufreinigungsmethode wurde durch einen weiteren Aufreinigungsschritt verfeinert und der so generierte Proteinkomplex mittels LC-MS/MS analysiert. Einige der potenziellen Interaktionspartner konnten mit weiteren Methoden verifiziert werden.

Im zweiten Teil wurde SHP-1 als potentieller Interaktionspartner von LMP1 verifiziert und charakterisiert. Die Phosphatase SHP-1 wurde in der Arbeitsgruppe über GST-LMP1-Fusionsproteine aus Tonsillenlysaten präzipitiert. Sie beeinflusst eine Reihe von Signalwegen, die auch von LMP1 aktiviert werden. Die Rolle von SHP-1 in der Signaltransduktion von LMP1 ist Thema des zweiten Teils der Arbeit.

4.1 Identifizierung neuer Interaktionspartner von LMP1

4.1.1 Generierung eines geeigneten Zellsystems

Wie bereits erwähnt, bestand ein primäres Ziel dieser Doktorarbeit darin, mittels funktioneller Proteomanalyse neue Interaktionspartner von LMP1 zu ermitteln. Zuvor wurden für derartige Untersuchungen in der Arbeitsgruppe lediglich Präzipitationen mit bakteriell erzeugten GST-Fusionsproteinen verwendet. In diesem eher artifiziellen Verfahren wird ein GST-LMP1 Fusionsprotein aus Bakterien aufgereinigt und als Köder in Zell- oder Gewebelysaten verwendet. Der Signalkomplex muss sich daher *in vitro* an dem GST-Fusionsprotein bilden, so dass eventuell nicht alle in der Zelle beteiligten Komponenten binden. Das gilt im Besonderen, wenn posttranskriptionelle Modifikationen am Köderprotein eine Rolle spielen, da diese Modifikationen in den Bakterien nicht erfolgen. Daher sollte in dieser Arbeit ein System verwendet werden, in dem der Signalkomplex direkt aus seinem nativen Kontext, d.h. aus den Zellen mittels Immunpräzipitation (IP) isoliert werden konnte. Die zurzeit verfügbaren LMP1-spezifischen Antikörper richten sich alle gegen den C-Terminus des Proteins, wo sie mit den Interaktionspartnern um die Bindung konkurrieren können. Daher ist ein Protein vorzuziehen, an das N-terminal ein Hämagglutinin-Epitop fusioniert ist (HA-LMP1), so dass der Signalkomplex am C-Terminus von LMP1 nicht von dem Antikörper obstruiert wird.

EBV infiziert humane Epithel- und B-Zellen, weshalb sich diese Zelltypen für Untersuchungen des LMP1-Multiproteinkomplexes im Besonderen eignen. In der Proteomanalyse werden, wenn nicht hochabundante Proteine betrachtet werden, große Materialmengen benötigt. Daher war es essenziell, über Zellen zu verfügen, die sich in großem Maßstab kultivieren lassen. Ein transienter Ansatz schied somit aus. Da LMP1 bei Überexpression toxisch wirkt (Hammerschmidt et al., 1989), sind stabile Zelllinien, die ein LMP1 über ein Expressionskonstrukt mit Resistenzgen besitzen, in humanen Zellen schwierig zu etablieren. Im viralen Kontext ist LMP1 sehr gut reguliert (Lo et al., 2007), so dass es das Überleben der Zellen fördert.

Daher sollte ein rekombinantes EBV generiert werden, in dem das endogene LMP1 durch ein HA-LMP1 substituiert ist. Mit diesen Viruspartikeln sollten dann primäre B-Zellen *in vitro* infiziert werden. Die infizierten Zellen sollten so transformiert werden und zu LCLs auswachsen.

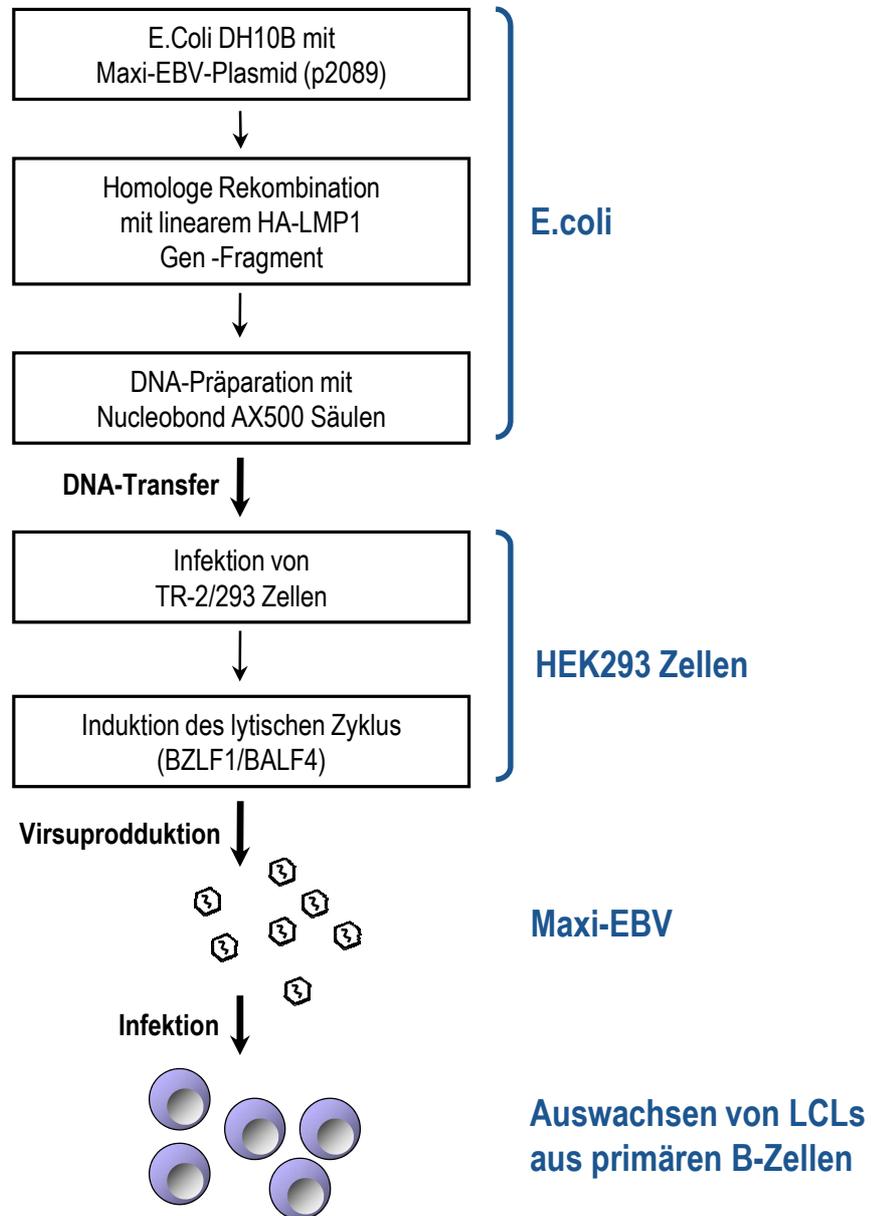


Abbildung 7: Schritte zur Herstellung von LCLs mit rekombinanten Epstein-Barr Viren.

Dargestellt ist eine schematische Übersicht zur Herstellung rekombinanter Maxi-EBVs, von der homologen Rekombination in *E. coli* über die Erzeugung von Viruspartikeln mit Hilfe der Verpackungszelllinie TR-2/293 bis zur Infektion von primären B-Zellen und dem Auswachsen von LCLs.

LCLs verfügen über ein Latenz III Programm (vgl. Kapitel 1.1.2) und stellen ein zelluläres *in vitro* Modell für die EBV-Transformation dar. HA-LMP1 wird von seinem endogenen Promotor organisiert, so dass die Zellen über endogene Proteinkonzentrationen von HA-LMP1 verfügen. Als gut proliferierende Zelllinie eignen sich LCLs sehr gut für die Untersuchungen des LMP1-Signalkomplexes mittels Massenspektrometrie.

Im Folgenden werden die Klonierung des rekombinanten EBVs und die Herstellung der LCLs genauer beschrieben. Eine schematische Übersicht des Vorgehens ist in Abbildung 7 dargestellt.

4.1.1.1 Klonierung von Maxi-EBV-HA-LMP1

Um ein HA-fusioniertes LMP1 in ein Maxi-EBV-Genom einzubringen, waren mehrere Zwischenschritte notwendig, wie es in Abschnitt 3.3.11.7 ausführlicher beschrieben ist. Zunächst wurde die Sequenz des N-Terminus von HA-LMP1 in den Übergangsvektor 2234.5 eingesetzt. Aus diesem Zwischenkonstrukt wurde das HA-LMP1-Gen sowie ein Kanamycin-Resistenz-Gen (*kana^r*) in den Vektor 2167.1 umgesetzt, so dass sich der offene Leserahmen (*open reading frame*, ORF) von HA-LMP1 unter Kontrolle seines viralen Promotors im Kontext des EBV-Genoms befand. Aus diesem Vektor wurde ein 2,66 kBp großes Fragment mit der Information für HA-LMP1 sowie einer Kanamycin-Resistenz ausgeschnitten und über Elektroporation in chemisch kompetente DH10B gemäß Abschnitt 3.1.3 eingeführt. Die verwendeten Bakterien verfügten über ein EBV-Genom des Stammes B95.8, in das ein bakterielles F-Faktor Plasmid integriert war (Delecluse et al., 1998). Dieses Maxi-EBV Plasmid, das p2089 genannt wird, persistiert daher wie ein gewöhnliches Plasmid in den Bakterien. Ferner enthält p2089 das Gen der Chloramphenicol-Acetyltransferase (*cam^r*) zur Selektion in Prokaryoten. Um eukaryotische Zellen auf p2089 zu selektionieren, trägt das Konstrukt das Gen der Hygromycinphosphotransferase (*hyg^r*). Damit p2089-positive eukaryotische Zellen einfach identifiziert werden können, enthält das Plasmid darüber hinaus einen ORF für das grüne Fluoreszenzprotein (GFP) unter Kontrolle eines CMV-Promotors.

Um die homologe Rekombination zwischen dem Maxi-EBV-Plasmid p2089 und der eingebrachten linearen DNA zu ermöglichen, besitzen die Bakterien das temperatursensitive (*ts*) Expressionsplasmid p2650, das eine Ampicillin-Resistenz (*amp^r*) sowie die Expression von RecA und *redy* vermittelt (Muyrers et al., 2000). Bei RecA handelt es sich um eine Rekombinase, bei *Redy* um einen Inhibitor der Exonuklease V, welche aus dem trimeren Komplex RecB, RecC und RecD besteht. Da der Stamm DH10B *recA* defizient und *recBCD* positiv ist, würden lineare DNA-Fragmente ohne *redy* schnell durch die Exonuclease V degradiert werden. Die Expression von *redy* schützt die freien Enden des HA-LMP1-Fragments, während RecA die homologe Rekombination begünstigt. Dieser Vorgang ist schematisch in Abbildung 8 dargestellt.

RecA ist zwar für einen effizienten Einbau des HA-LMP1-Fragments essentiell, doch erhöht eine dauerhafte Expression die Rate der nicht-homologen Rekombinationen, so dass das Maxi-EBV Genom nicht stabil propagiert würde. Hier schafft das temperatursensitive Rekombinationssystem Abhilfe (Neuhierl and Delecluse, 2005). Nach der Elektroporation des linearen Fragments werden die Bakterien zunächst bei einer permissiven Temperatur von 30°C inkubiert, bei der die homologe Rekombination sowie die phänotypische Expression der Kanamycin- und Chloramphenicol-Resistenz erfolgen kann. Anschließend werden die Bakterien bei 42°C mit Chloramphenicol (Resistenz des Maxi-EBV Plasmids) und Kanamycin (Resistenz des eingebrachten linearen DNA-Fragments) inkubiert. Durch den temperatursensitiven Replikationsursprung von p2650 geht das Plasmid unter den nicht-permissiven Bedingungen verloren. Dieser Phänotyp lässt sich durch eine Replikatlattierung der ausgewachsenen Kolonien leicht überprüfen, da die Bakterien durch den Verlust von p2650 Ampicillin-sensitiv sind. Das Maxi-EBV Genom vermittelt eine Chloramphenicol-Resistenz, die eingeführte DNA eine Kanamycin-Resistenz.

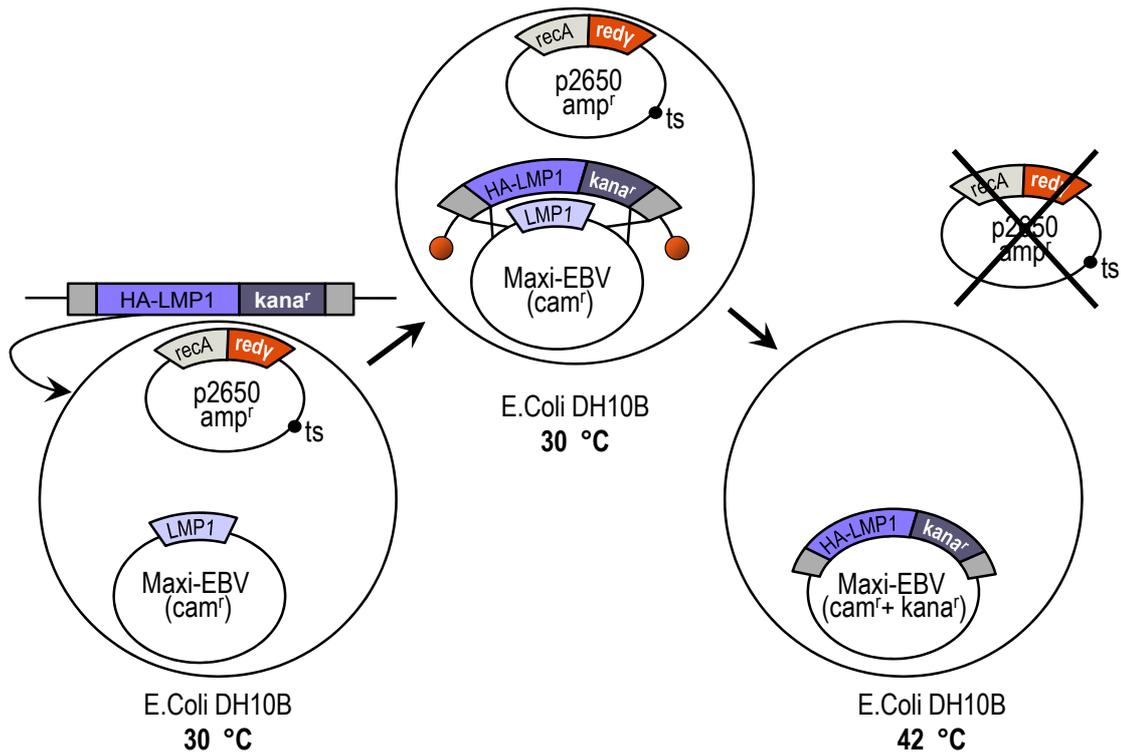


Abbildung 8: Mutagenese des Maxi-EBV Genoms durch homologe Rekombination in *E. coli* DH10B.

Die Abbildung zeigt eine schematische Darstellung des Maxi-EBV Plasmids p2089 und des temperatursensitiven Plasmids p2650 im *E. coli* Stamm DH10B. p2089 vermittelt eine Chloramphenicol-Resistenz (*cam^r*) und besitzt ein LMP1-Gen ohne HA-Epitop. Das Plasmid p2650 kodiert für eine Ampicillin-Resistenz (*amp^r*), das *E. coli* Protein *recA* und das λ -Phagen Protein *redy*. *Redy* hemmt die Exonuklease V, so dass lineare DNA-Fragmente eine längere Halbwertszeit besitzen (dargestellt in rot). *RecA* vermittelt eine effiziente homologe Rekombination in dem *recA*-defizienten Stamm DH10B. Durch den temperatursensitiven (*ts*) Replikationsursprung repliziert p2650 nur bei einer niedrigen Temperatur (30 °C).

Zur homologen Rekombination wurde ein lineares DNA-Fragment aus einem kleineren Plasmid mittels Restriktionsverdau generiert, das dann über Elektroporation in die Bakterien eingebracht wurde. Das Fragment trug die Sequenz von HA-LMP1, eine Kanamycin-Resistenz (*kana^r*) und beidseitig davon ca. 200 Bp lange Sequenzen, die homolog zu der DNA ober- und unterhalb von LMP1 ist (dargestellt als graue Balken). Nach zwei Stunden phänotypischer Expression bei 30 °C und Kultivierung über Nacht bei 42 °C in Anwesenheit von Kanamycin und Chloramphenicol wuchsen nur Kolonien, in denen eine Rekombination zwischen dem linearen DNA-Fragment und dem Maxi-EBV Plasmid stattgefunden hatte. Das Plasmid p2650 ging verloren, da es bei 42 °C nicht mehr replikationsfähig ist. In Abwesenheit der Rekombinase wurde das neue Maxi-EBV Plasmid genetisch stabil propagiert.

Um zu überprüfen, ob die generierten Maxi-EBV Genome wirklich das HA-LMP1-Fragment integriert hatten und das übrige Genom intakt war, wurde von einigen der Klone die Plasmid-DNA durch alkalische Lyse gewonnen. Die DNA wurde mit *Bam*HI restriktionsverdaut und in einem Agarosegel auf ein korrektes Bandenmuster untersucht. Der in Abbildung 9 dargestellte Klon zeigt das erwartete Fragmentmuster.

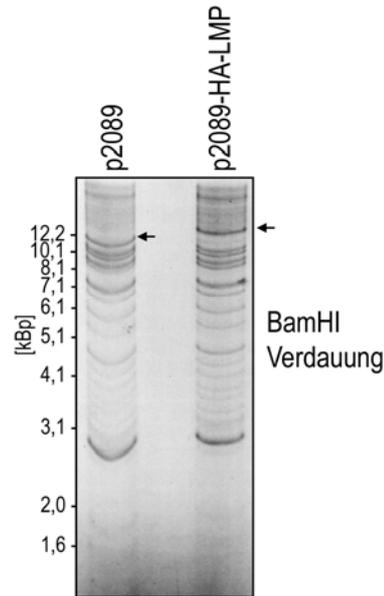


Abbildung 9: p2089-HA-LMP1 weist nach BamHI-Verdau das erwartete Fragmentmuster auf.

Die Maxi-EBV-Plasmide p2089 und p2089-HA-LMP1 wurden mit BamHI restriktionsverdaut und auf einem analytischen Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegel aufgetrennt. Die Bandenmuster entsprachen den erwarteten Fragmentgrößen, die im Anhang B vollständig aufgeführt sind. Die erkennbaren Abweichungen zwischen den beiden Konstrukten sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Durch die Insertion der Kanamycinresistenz sowie die Änderungen im LMP1-Locus entsteht für p2089-HA-LMP1 eine 13,4 kBp Bande im Gegensatz zu dem 11,8 kBp großen Fragment im Ausgangsvektor.

4.1.1.2 Erzeugung von Maxi-EBV-HA-LMP1 Viruspartikeln und Herstellung von lymphoblastoiden Zelllinien

Im nächsten Schritt musste das Maxi-EBV-HA-LMP1 Genom verpackt werden, damit vollständige, infektiöse Viruspartikel entstehen. Hierzu wurde die Verpackungszelllinie TR-2/293 verwendet (Delecluse et al., 1999). Diese Zellen tragen stabil ein episomales Maxi-EBV Genom p2114, dem die terminalen Wiederholungssequenzen (TR, *terminal repeats*) fehlen. Diese TRs befinden sich normalerweise an beiden Enden der linearisierten DNA und sind für die Verpackung der viralen DNA essentiell. Die DNA von p2114 kann daher nicht in Kapside verpackt werden. Sie stellt jedoch alle für den Viruspartikel benötigte Faktoren in *trans* bereit, so dass sich die Rate der erzeugten Viruspartikel nach Induktion des lytischen Zyklus gegenüber der Verwendung von HEK293 Zellen deutlich erhöht (Delecluse et al., 1999).

Transfiziert man TR-2/293 Zellen mit einem Maxi-EBV Plasmid, so wird ein Zustand ähnlich einer latenten EBV-Infektion etabliert. In dieser latenten Phase werden keine Viruspartikel produziert, so dass der lytische Zyklus erst induziert werden muss. Dazu kann der virale Transaktivator BZLF1 transient exprimiert werden (Hammerschmidt and Sugden, 1988), wobei die Menge der produzierten infektiösen Partikel durch Kotransfektion des viralen Glykoproteins BALF4 deutlich gesteigert werden kann (Neuhierl et al., 2002). Daher wurden hier zusammen mit p2089-HA-LMP1 Expressionsplasmide für BALF1 und BZLF1 gemäß Abschnitt 3.2.6 kotransfiziert. Die in den Kulturüberständen enthaltenen Viruspartikel wurden nach drei Tagen geerntet. Mit ihnen wurden, wie in Abschnitt 3.2.8 genauer beschrieben, primäre B-Lymphozyten infiziert, die frisch aus humanen Nasenpolypen präpariert worden waren (siehe Abschnitt 3.2.7). Dazu wurden verschiedene Verdünnungen der Virusüberstände eingesetzt, um sicherzustellen, dass es sich bei den erzeugten Linien tatsächlich um Einzelklone handelte. Um die statistische Voraussetzung einer *one*

hit-Kinetik zu erfüllen, dürfen nur maximal 63 % der Ansätze auswachsen, da sonst wahrscheinlich mehrere erfolgreiche Infektionen in einer Vertiefung einer 96-Loch-Platte stattgefunden haben (Frisan et al., 2001). Um ein Auswachsen der LCLs zu verbessern, wurden die infizierten Zellen auf humanen embryonalen Fibroblasten (WI38) kultiviert, die zuvor mit einer subletalen Dosis an letal γ -Strahlen bestrahlt worden waren. Welche Faktoren für das verbesserte Auswachsen verantwortlich sind, ist unklar (Sugden and Mark, 1977).

Nach der Etablierung der Zellklone ließen sich die Zellen auch ohne Fibroblasten weiter expandieren. In diesem Experiment waren aus 23 % der Ansätze LCLs ausgewachsen, so dass die statistische Voraussetzung für Einzelzellklone erfüllt war. In Abbildung 10 ist die Linie HA-LCL3 als Durchlicht- und Fluoreszenzaufnahme dargestellt. Hierbei sind erfahrungsgemäß nicht alle Zellen eines Klons gleich intensiv grün, obwohl alle die viralen Gene exprimieren (persönliche Mitteilung von Wolfgang Hammerschmidt).

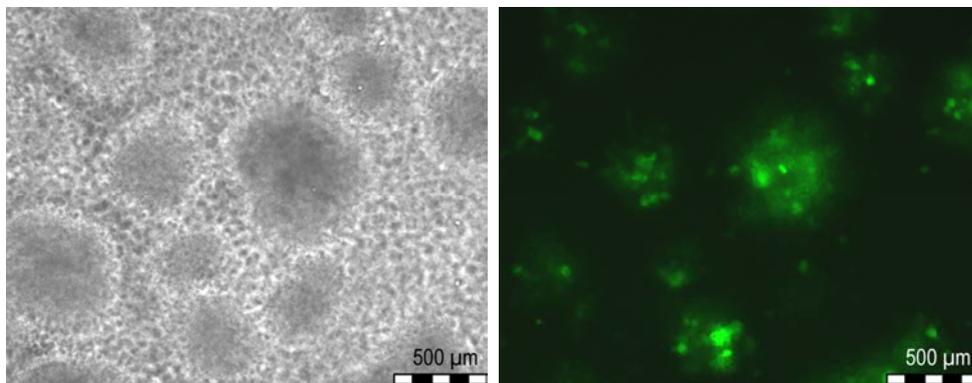


Abbildung 10: Nach der Infektion von primären B-Zellen mit Maxi-EBV p2089-HA-LMP1 wachsen HA-LCLs aus, die GFP exprimieren.

Primäre B-Zellen wurden mit dem rekombinanten Maxi-EBV p2089-HA-LMP1 infiziert. Dargestellt sind eine Durchlicht- und eine Fluoreszenzaufnahme (eGFP) von dem Klon HA-LCL3 bei 100-facher Vergrößerung.

Die Expression von HA-LMP1 wurde in Lysaten der entstandenen Zelllinien durch eine Western-Blot-Analyse mit einem LMP1-spezifischen Antikörper nachgewiesen. Dass das exprimierte Protein tatsächlich über das gewünschte HA-Epitop verfügte, verdeutlicht die Zunahme des Molekulargewichts in Abbildung 11. Wie erwartet war das Expressionsniveau von HA-LMP1 mit dem der Kontrollzelllinie 721 vergleichbar.

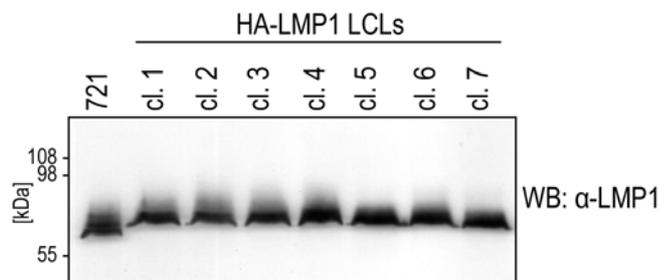


Abbildung 11: Die HA-LCLs exprimieren HA-LMP1 auf dem gleichen Niveau wie die Kontrolllinie 721 LMP1 exprimiert.

1×10^6 Zellen der in der Abbildung angegebenen Klone der HA-LCLs sowie der Kontrolllinie 721 wurden in IP-Lysepuffer lysiert. Äquivalente Proteinmengen wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und eine Western-Blot-Analyse mit einem LMP1-spezifischen Antikörper CS1-4 (Dako) durchgeführt.

Damit existierten jetzt LCLs, die HA-LMP1 in endogenen Konzentrationen und im viralen Kontext exprimierten. Diese Zellen (HA-LCLs) sollten im nächsten Schritt für Koimmunpräzitationen (CoIPs) verwendet werden.

4.1.2 Optimierung der Immunpräzitationsbedingungen für die Massenspektrometrie

Im nächsten Schritt sollte der HA-LMP1 Signalkomplex aus den HA-LCLs, die im vorangegangenen Kapitel etabliert worden waren, aufgereinigt und massenspektrometrisch analysiert werden. Zunächst wurde untersucht, ob bekannte Interaktionspartner von LMP1 in HA-LMP1-Immunpräzitationen nachgewiesen werden konnten. Hierzu wurden 1×10^8 Zellen des Klons 3 (HA-LCL3) in IP-Lysepuffer gemäß Abschnitt 3.5.1 lysiert und der Komplex über Protein A-Sepharose-beads mit kovalent gekoppeltem α -HA (12CA5)-Antikörper (E. Kremmer) präzipitiert (siehe Abschnitt 3.5.11). Als Kontrolle wurde parallel eine Immunpräzitation in 721 Zellen durchgeführt. Diese LCLs exprimieren LMP1, das nicht mit einem HA-Epitop fusioniert ist, so dass es nicht mit einem HA-spezifischen Antikörper präzipitiert wird. Dieses Verfahren hat gegenüber der Isotypkontrolle den Vorteil, dass derselbe Antikörper wie in der Realprobe verwendet werden kann. Da es sich bei beiden Zelllinien um LCLs handelt und diese sich lediglich durch das HA-Epitop am N-Terminus von LMP1 unterscheiden, ist zu erwarten, dass unspezifische Proteine in beiden Ansätzen im gleichen Maße an die beads bzw. den Antikörper binden. Hingegen sollten Unterschiede nur auf die Präzipitation von HA-LMP1 zurückzuführen sein, was einen subtraktiven Ansatz ermöglichte.

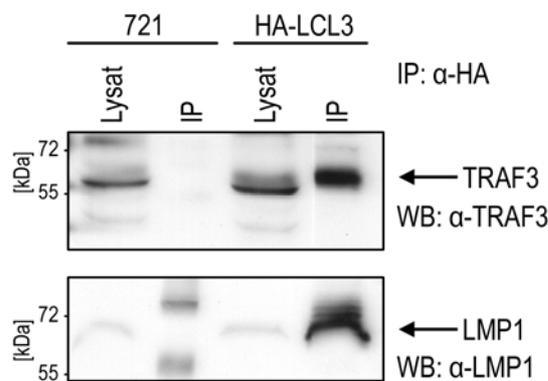


Abbildung 12: Endogenes TRAF3 lässt sich spezifisch mit HA-LMP1 aus HA-LCL3 Zellen kopräzipitieren.

1×10^8 Zellen der Linien 721 und LCL3 wurden in IP-Lysepuffer lysiert und eine Immunpräzitation mit α -HA-Antikörper (12CA5) durchgeführt. Es wurden Western-Blot-Analysen mit einem TRAF3-spezifischen Antikörper (H-20) (Santa Cruz Biotechnology) sowie mit dem LMP1-spezifischen Antikörper (CS1-4) (Dako) durchgeführt.

Abbildung 12 zeigt eine Western-Blot-Analyse mit LMP1-spezifischem Antikörper, die eine ca. 100-fache Anreicherung in der IP aus HA-LCL3 Zellen darstellt (Abschätzung aus Western-Blot-Analysen), während in der Kontrolle aus 721 Zellen kein LMP1 zu detektieren ist. Um zu testen, ob auch die Kopräzipitation von Interaktionspartnern von LMP1 gelang, wurde im Western Blot auf TRAF3 getestet. In der IP aus HA-LCL3 Lysaten ist ein deutliches TRAF3-Signal zu erkennen. Diese Bande fehlt in der 721-Kontrolle, so dass es sich in der IP aus HA-LCL3 um eine spezifische Kopräzipitation von TRAF3 mit HA-LMP1 handelt. Es konnte also exemplarisch anhand von TRAF3 gezeigt werden, dass LMP1-bindende Proteine über die CoIP aufgereinigt werden können.

In der Silberfärbung des SDS-Gels, auf dem die IPs aufgetrennt worden waren, wurde deutlich, dass sich auch in der Kontroll-IP eine Vielzahl verschiedener Proteine befinden. Dieser Hintergrund ließ sich nicht durch die Verwendung anderer Detergenzien minimieren. Waschschritte mit höherer Salzkonzentration reduzierten zwar ab 400 mM NaCl₂ die unspezifische Bindung, führten aber auch zu einer geringeren Bindung von TRAF3 an HA-LMP1 (Daten nicht gezeigt). Daher wurde auf eine Erhöhung der Salzkonzentration verzichtet. Die Immunpräzipitationen wurden schließlich bei 150 mM NaCl₂ durchgeführt (siehe Abschnitt 3.5.11).

Einen großen Hintergrund in der IP verursacht das Ausfallen von Substanzen während der IP. Um möglichst viel Protein zu präzipitieren, wurde das Lysat über Nacht mit dem Antikörper inkubiert. Obwohl die Lysate für 20 min bei 16.000 g zentrifugiert worden waren und die klaren Lysate zusätzlich durch Filtration von eventuellen Schwebeteilchen befreit worden waren, bildeten sich über Nacht Aggregate, die nach erneuter Zentrifugation mit gleichen Bedingungen ein deutliches Pellet bildeten. In der massenspektrometrischen Analyse dieses Pellets bildete Aktin den Hauptbestandteil der Probe. Wie in Abbildung 13 gezeigt, konnte die prominente Bande bei 45 kDa durch die Inkubation der Lysate über Nacht auf Eis deutlich reduziert werden, auch wenn sie noch immer deutlich sichtbar war. Aktin hat ein Molekulargewicht von 45 kDa, was die These stützt, dass es sich bei den ausfallenden Aggregaten um Bestandteile des Zytoskeletts handelte. Die Inkubation der Lysate über Nacht vermindert also das Aufreinigen von unspezifischen Aggregaten mit den Immunpräzipitationen.

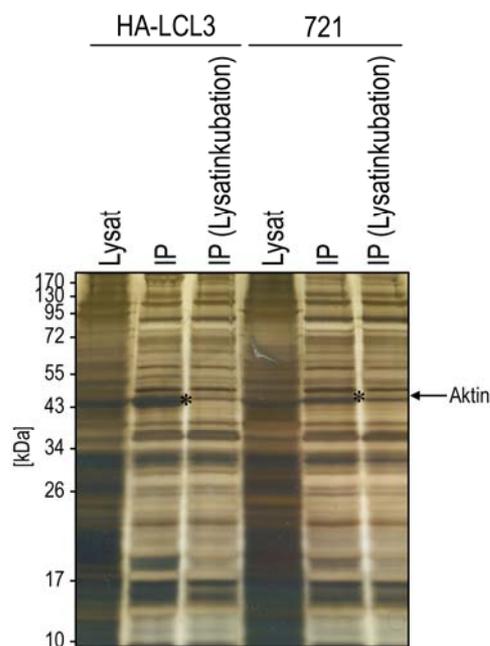


Abbildung 13: Durch die Inkubation der Lysate über Nacht lässt sich der Hintergrund der IP reduzieren.

1x 10⁸ Zellen der Linien 721 und LCL3 wurden in IP-Lysepuffer lysiert. Mit einer Hälfte des Lysats wurde direkt eine IP mit α -HA-Antikörper (12CA5) (Roche) durchgeführt. Die andere Hälfte des Lysats wurde über Nacht auf Eis inkubiert und vor der IP mit α -HA-Antikörper erneut zentrifugiert. Beide Ansätze wurden auf einem SDS-Gel aufgetrennt und eine Silberfärbung durchgeführt.

Auf eine weitere Reduktion des Hintergrundes durch stringentes Waschen wurde bewusst verzichtet, um schwach bindende Interaktionspartner von LMP1 nicht zu verlieren. Im folgenden Abschnitt soll nun die

massenspektrometrische Analyse der IP dargestellt werden. Da es sich hierbei um einen differentiellen Ansatz handelt, ist eine hohe Spezifität zu Lasten der Sensitivität nicht angezeigt. Die niedrige Stringenz in der einzelnen Immunpräzipitation konnte in Kauf genommen werden, da die Präzipitation aus HA-LMP1-LCL-Lysaten mit der mitgeführten Kontrollpräzipitation aus 721-Lysaten verglichen wurde. Nur wenn ein Protein ausschließlich in dem Ansatz aus HA-LMP1-LCLs auftrat, konnte es sich um eine spezifische Interaktion handeln. Trat ein Protein auch in der Kontrolle auf, handelte es sich um eine unspezifische Bindung an die *beads* oder den Antikörper.

4.1.3 Massenspektrometrische Analyse potentieller LMP1-bindender Proteine aus IPs

Im nächsten Schritt sollte die Zusammensetzung des LMP1-Signalkomplexes genauer mittels Massenspektrometrie untersucht werden. Hierzu wurden zunächst α -HA (12CA5)-Antikörper kovalent an ProteinA-Sepharose *beads* gekoppelt. Diese immobilisierten Antikörper wurden dann in IPs aus Lysaten von jeweils 1×10^9 Zellen der Linien HA-LCL3 sowie 721 eingesetzt (siehe Abschnitt 3.5.11). Da lediglich die Zellen der Linie HA-LCL3 über ein HA-Epitop an LMP1 verfügen, stellte die Präzipitation aus 721-Zellen die Negativkontrolle dar. In jedem Experiment wurde eine erfolgreiche Präzipitation von LMP1 bzw. der ColP von TRAF3 mittels einer Western-Blot-Analyse geprüft (vgl. Abschnitt 4.1.2), ehe die Probe für die massenspektrometrische Untersuchung vorbereitet wurde.

Je nach Komplexität der Probe stehen verschiedene Vorgehensweisen zur Verfügung, die enthaltenen Proteine zu analysieren. Enthält eine Probe, wie etwa bei den *spots* in einem 2D-Gel, nur ein bis maximal zwei Proteine, können die Peptide nach dem Trypsin-Verdau direkt auf einen Probenträger aufgetragen und mittels MALDI-TOF untersucht werden. Hierbei erhält man einen Peptidmassen Fingerabdruck (*peptide mass fingerprint*, PMS), also ein Spektrum, das aus den einzelnen spezifischen Peptidgrößen des verdauten Proteins besteht (Cottrell, 1994; Pappin, 1997). Dieses Verfahren stößt jedoch schon oft bei der Analyse von Banden aus einem 1D-Gel an seine Grenzen, da hier in einer Probe bereits mehrere Proteine bzw. deren Fragmente enthalten sein können. In solchen Fällen werden über die weitere Auftrennung der Peptide, z.B. mittels einer HPLC, oft bessere Erfolge erzielt. Wie in Abbildung 13 zu sehen, wies die vorliegende IP ein dichtes Bandenmuster auf. Außerdem war es schwer, einzelne Banden im Silbergel auszumachen, die in der Kontrolle nicht vorhanden waren. Um die Proben dennoch auf Unterschiede untersuchen zu können, wurden die Proben zunächst auf ein 12,5% SDS-Gel geladen und über eine Strecke von 1-1,5 cm aufgetrennt. Nach einer Coomassie-Färbung wurden die Spuren der Kontrolle sowie der Realprobe in jeweils drei Bereiche getrennt, um die Komplexität der Proben zu verringern. Die in den Gelstücken enthaltenen Proteine wurden jeweils im Gel tryptisch verdaut und die daraus resultierenden Peptidgemische separat über die nano HPLC Ultimate (LC-Packings) aufgetrennt. Die Auftrennung der Probe wurde über einen UV-Detektor über die Messung der Absorption bei 214 nm und 280 nm verfolgt.

In Abbildung 14 sind solche Spektren exemplarisch gezeigt. Das Spektrum der IP aus HA-LCL3 Zellen ist schwarz dargestellt, während die analoge Probe aus der Kontroll-IP aus 721 Zellen in blau aufgetragen ist. Vergleicht man beide Spuren, fallen Unterschiede auf, die in der massenspektrometrischen Analyse genauer untersucht werden sollten. Dazu wurden die aufgetrennten Peptide mit Matrixlösung versetzt und automatisch auf einen Probenträger aufgebracht.

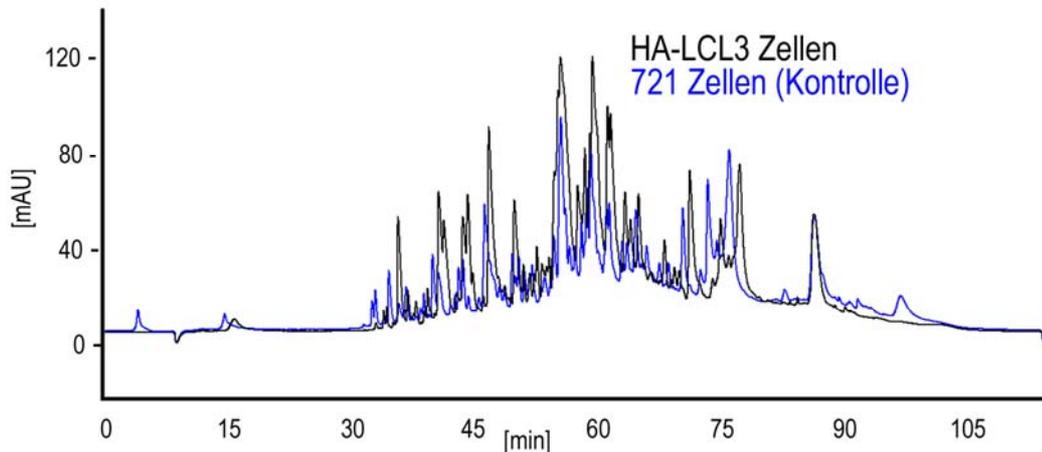


Abbildung 14: Spektrum eines nano HPLC-Experiments von IPs aus HA-LCL3 und 721 Zellen.

Die Peptide aus dem tryptischen Verdau wurden nach ihrer Hydrophobizität durch den in Abschnitt 3.6.2 beschriebenen Gradienten aufgetrennt (5 min 5 % Acetonitril, 50 min 5-40 % Acetonitril, 15 min 40-80 % Acetonitril, 10 min 80 % Acetonitril, 6 min 100-5 % Acetonitril, 28 min 5 % Acetonitril). Anschließend wurden die Peptide in einem UV-Detektor bei 214 nm detektiert. Die UV-Intensitäten aus HA-LCL3 sind in schwarz, die aus 721 in blau dargestellt.

Nach einem LC-Lauf befinden sich die einzelnen Peptide eines Proteins nicht mehr in einem Spektrum, sondern sie können sich über den gesamten Lauf verteilen. PMFs haben für dieses Vorgehen also nur noch eine geringe Aussagekraft. Aus dieser Menge der Peptidmassen können auch zufällig die spezifischen Massen eines Proteins auftreten. Stattdessen bietet sich die MS-Sequenzierungs-Technik (MS/MS) an (Steen and Mann, 2004), die es ermöglicht, die Aminosäuresequenz einzelner Peptide anhand charakteristischer Peptidfragmente zu bestimmen (vgl. Kapitel 1.4.1). So kann aus einem einzelnen Peptid ein deutlich höherer Informationsgehalt gezogen werden als lediglich ein einzelner Massenwert, wie es im PMF der Fall ist. Die Peptide wurden daher nach ihrer Auftrennung mittels HPLC mit MALDI-TOF/TOF, einer Kombination aus PMF- und MS/MS-Technik, gemäß Kapitel 3.6 analysiert.

Die Analyse der gewonnenen MS/MS-Daten erfolgte über zwei verschiedene Verfahren. Für eine Analyse der einzelnen Läufe wurde die Software GPS-Explorer (Version 3.5, Applied Biosystems) verwendet und die Daten mit Hilfe des integrierten MASCOT-Suchprogramms ausgewertet. Dabei wurde eine Datenbanksuche gegen die SwissProt-Proteindatenbank durchgeführt. Um mehrere Läufe miteinander zu vergleichen und so zu einer Gesamtauswertung zu gelangen, wurde Scaffold (Version 2.0, Proteome Software Inc.) verwendet. Hier kann zusätzlich zu dem MASCOT-Algorithmus noch das Suchprogramm X!-Tandem verwendet werden und die Ergebnisse beider Anfragen automatisch miteinander kombiniert werden. Dieses Verfahren bietet dadurch eine höhere Zuverlässigkeit. Darüber hinaus weist es die Peptidmassen mit einer bestimmten Wahrscheinlichkeit einem potentiellen Protein zu. So kann die gleiche Masse nicht für mehrere Proteine verwendet werden. Dieses Suchverfahren ist daher deutlich restriktiver als eine Auswertung mittels GPS-Explorer. Im Mittel werden geringere Wahrscheinlichkeiten errechnet, die Ergebnisse sind dafür aber glaubhafter, weshalb bereits Wahrscheinlichkeiten ab 80% als signifikant angesehen werden können.

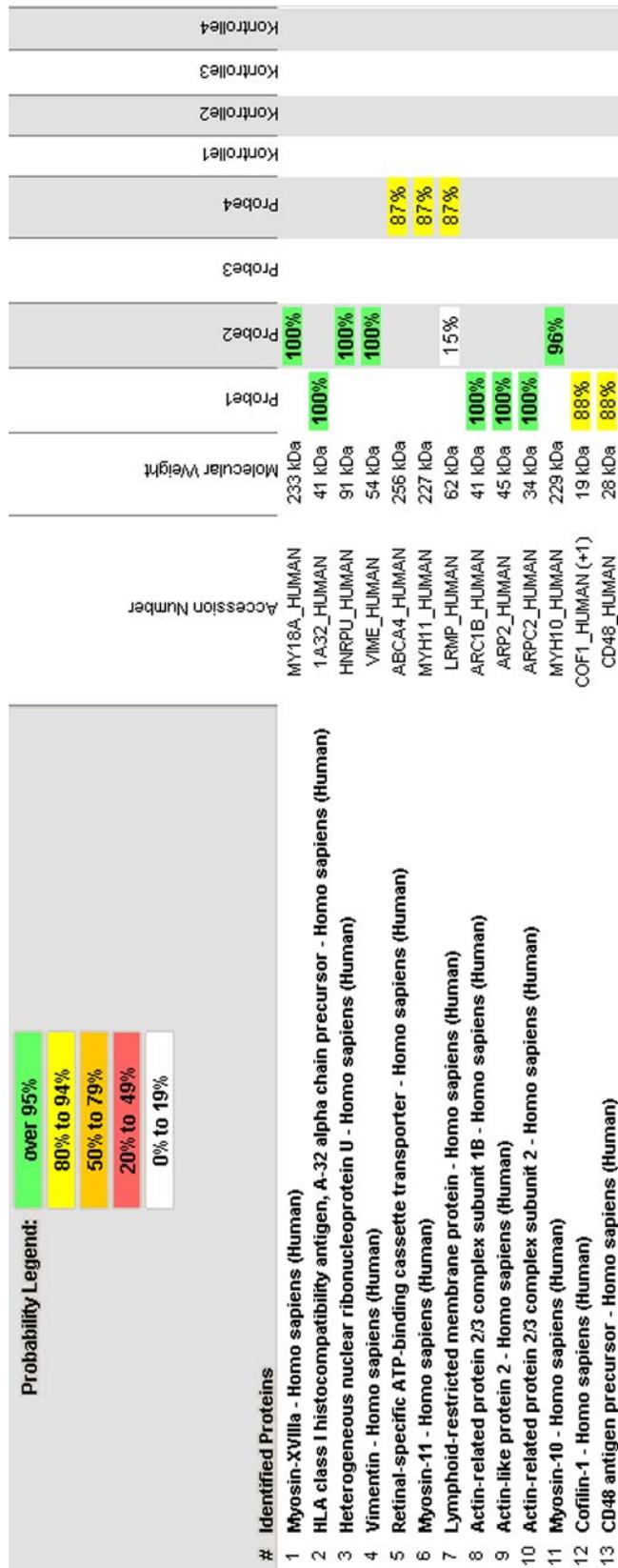


Abbildung 15: Potenzielle Interaktionspartner von LMP1 aus der MALDI-Analyse von IPs aus HA-LCL3 Zellen.

Vier unabhängige LC-Läufe mit nachfolgender MALDI-Analyse wurden mit Hilfe der Software Scaffold ausgewertet. Proteine, die auch in der Kontrolle vorhanden waren, wurden als Kontamination angenommen und entfernt. Dargestellt sind identifizierte Proteine mit ihrer *Accession Number* in Swissprot, der Wahrscheinlichkeit der Identifikation und ihrer Funktion.

In Abbildung 15 sind die mit Scaffold gefundenen Proteine aus vier unabhängigen Experimenten dargestellt. Jedes Experiment stellt dabei einen unabhängigen LC-MS/MS-Lauf aus zwei Präzipitationen dar, bei dem die Kontrolle und die Probe hintereinander über die HPLC aufgetrennt, auf den gleichen Proben-träger aufgespottet und in der MALDI analysiert wurden. Hierbei fällt auf, dass insbesondere Bestandteile

des Zytoskeletts gefunden wurden. Diese Proteine sind in der Zelle oft hochabundant und können das Auffinden von interessanten aber nur in geringer Menge in der Zelle auftretenden Proteinen in der LC-MALDI-TOF/TOF-Analyse unterdrücken. Daher war es notwendig, eine Aufreinigungsstrategie zu entwickeln, in der große Teile des Zytoskeletts aus den Ansätzen entfernt werden können. Hiermit befasst sich das folgende Kapitel dieser Arbeit.

Proteine, die im Zusammenhang mit LMP1 von Interesse sein könnten, sind CD48 sowie das auf lymphoide Zellen beschränkte Membranprotein LRMP/Jaw1. Auf CD48 wird in Kapitel 4.1.6 und Kapitel 5.2 genauer eingegangen, während sich Abschnitt 5.1.3.4 mit LRMP/Jaw1 beschäftigt.

4.1.4 Etablierung eines weiteren Aufreinigungsschrittes: HA-LMP1-TEV-CT

Wie in Kapitel 4.1.4 gezeigt, werden in der massenspektrometrischen Analyse des LMP1 Signaltransduktionskomplexes im Besonderen Komponenten des Zytoskeletts mit ausreichender Signifikanz gefunden. Hierbei reicht das Problem über einen reinen Hintergrund der IP hinaus, denn die Komponenten wurden spezifisch in der IP aus HA-LCL3 gefunden. In der Kontrolle aus 721 waren sie hingegen nicht vertreten. Dass LMP1 mit dem Zytoskelett interagiert, ist in der Literatur mehrfach beschrieben worden (Coffin et al., 2001; Higuchi et al., 2001; Izumi et al., 1994; Puls et al., 1999). Eine reine Optimierung der Präzipitationsbedingungen bzw. der Waschschriffe nach der IP erschien daher nicht zielführend. Mit dieser Strategie war zu erwarten, dass andere spezifische LMP1-Interaktoren ebenfalls entfernt würden. Um zu einer Lösung zu gelangen, kann ausgenutzt werden, dass LMP1 wahrscheinlich über den N-Terminus mit dem Zytoskelett interagiert (Coffin et al., 2001; Izumi et al., 1994; Puls et al., 1999), während die in dieser Arbeit interessanten Signalmoleküle an den C-Terminus binden. Eine Strategie besteht darin, nur den C-Terminus für die Suche nach neuen Interaktionspartnern zu verwenden. Damit LMP1 Signaltransduktionswege aktivieren kann, muss es allerdings ähnlich einem aktivierten Rezeptor Oligomere in der Membran bilden. Es ist daher zu erwarten, dass sich bei der Expression ausschließlich des C-Terminus von LMP1 kein Signalkomplex bildet. Es musste somit ein Weg gefunden werden, LMP1 als Gesamtprotein zu präzipitieren, dann aber den C-Terminus des Proteins zu isolieren. Dazu sollte eine Schnittstelle für die TEV-Protease zwischen dem C-Terminus und den Transmembrandomänen eingesetzt werden (vgl. Abbildung 16). Die TEV-Protease zeichnet sich durch eine Reihe von Eigenschaften aus, die im Bereich der Molekularbiologie besonders erstrebenswert sind. Zum einen ist sie sehr spezifisch, so dass sie kaum außerhalb ihrer Schnittstelle (Glu-Asn-Leu-Tyr-Phe-Gln-Gly) schneidet. Zum anderen kommt die Sequenz der Schnittstelle in eukaryotischen Proteinen sehr selten vor, so dass mit Ausnahme des Zielproteins (hier LMP1) kaum Proteine verdaut werden. Weiterhin ist die Protease kommerziell erhältlich und ist über einen großen Temperaturbereich stabil und aktiv. Mit diesem System konnte die normale Funktion des N-Terminus für die Lokalisation und die der Transmembrandomänen für die Aktivierung von LMP1 bewahrt werden. Dennoch konnte nach der IP der C-Terminus mit den interagierenden Proteinen vom Rest von LMP1 abgetrennt werden und eine weitere Reinigung erreicht werden. So sollten Proteine, die mit den Transmembrandomänen, den ProteinA-Sepharose *beads* oder dem verwendeten Antikörper interagieren, nach dem TEV-Verdau weiterhin an den *beads* gebunden sein, während sich der C-Terminus von LMP1 sowie die assoziierten Proteine im Überstand bzw. im TEV-Eluat befinden sollen. Mit diesem zusätzlichen Aufreinigungsschritt sollte daher nicht nur das Zytoskelett sondern darüber hinaus der gesamte Hintergrund deutlich reduziert werden.

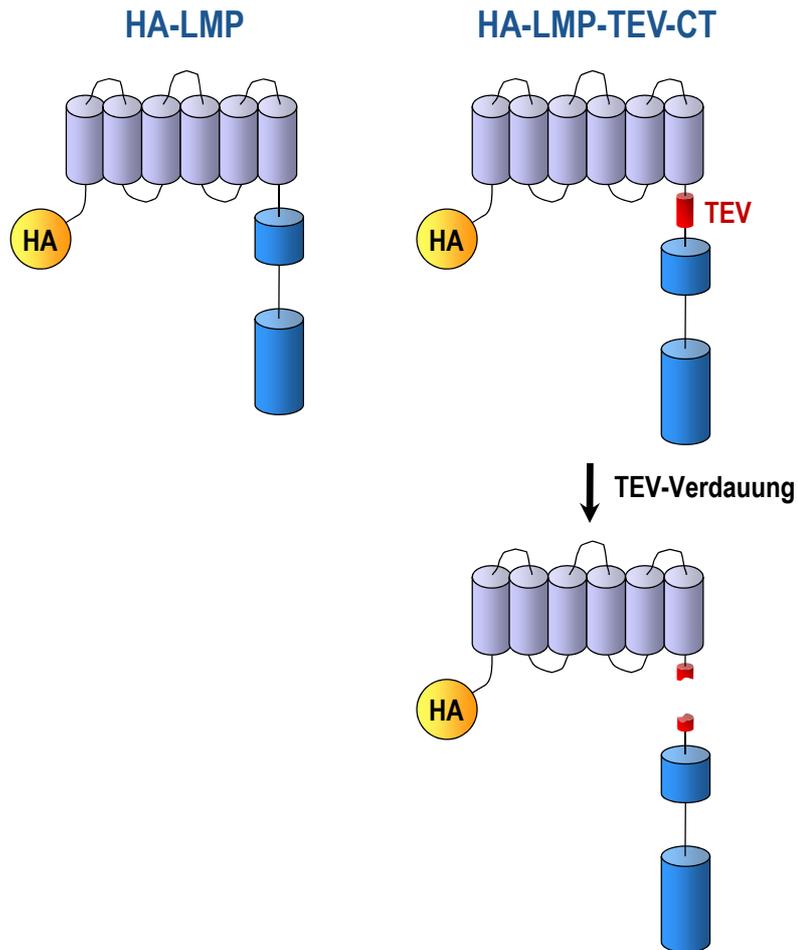


Abbildung 16: Strategie zur optimierten Aufreinigung.

Um eine höhere Reinheit an relevanten Signalmediatoren von LMP1 zu erreichen, sollte eine TEV-Schnittstelle zwischen den Transmembrandomänen von LMP1 und dem C-Terminus eingefügt werden. Nach der Präzipitation kann der für die Signaltransduktion relevante C-Terminus nun von dem restlichen immobilisierten Protein getrennt und mitsamt der rekrutierten Proteine aufgereinigt werden.

4.1.4.1 Klonierung eines HA-LMP1-TEV-CT-Konstruktes

Um das im vorangegangenen Abschnitt beschriebene Konstrukt vor der Klonierung in Maxi-EBV testen zu können, wurde es zunächst in den Expressionsvektor pHEBO kloniert. Wie in Abschnitt 3.3.11.4 im Detail beschrieben, wurden dazu einerseits der C-Terminus und andererseits die Transmembrandomänen mit dem N-Terminus über PCR amplifiziert und die PCR-Konstrukte mittels TA-Klonierung in pCR2.1 (Invitrogen) ligiert. Über die verwendeten Primer wurde am N-Terminus die Sequenz für ein HA-Epitop eingefügt, bzw. vor dem C-Terminus die Information für eine TEV-Schnittstelle. Diese Fragmente wurden in zwei Schritten in den pHEBO-Vektorhintergrund zum vollständigen Konstrukt pSV-HA-LMP1-TEV-CT zusammengesetzt.

4.1.4.2 Testen der Schneidbarkeit von HA-LMP1-TEV-CT mit Hilfe von TEV-Protease

Im nächsten Schritt musste getestet werden, ob das in Abschnitt 4.1.4.1 generierte LMP1-Konstrukt mit der TEV-Protease schneidbar war. Hierzu wurde es transient in HEK293 Zellen exprimiert, die Zellen 20 h

nach Transfektion lysiert und das HA-LMP1-TEV-CT über an Protein A-Sepharose *beads* gekoppelten α -HA (12CA5) Antikörper (E. Kremmer) präzipitiert. Nach dem Waschen wurde das präzipitierte Konstrukt 4 h bei Raumtemperatur mit TEV-Protease inkubiert. Als Positivkontrolle für den TEV-Verdau wurde ein GST-Fusionsprotein verwendet, in dem GST über eine TEV-Schnittstelle an den C-Terminus von LMP1 fusioniert war (GST-rTEV-LMP1). Dieses Konstrukt wurde in *E. coli* exprimiert, aus dem bakteriellen Lysat mit Glutathion-Sepharose *beads* aufgereinigt und parallel mit der IP von HA-LMP1-TEV-CT verdaut. Wie in Abbildung 17 dargestellt, wurde GST-rTEV-LMP1 gut durch die Protease geschnitten, so dass sich im Eluat der abgetrennte C-Terminus von LMP1 deutlich nachweisen ließ. HA-LMP1-TEV-CT hingegen ließ sich nicht schneiden, da weder im Eluat der C-Terminus nachweisbar war noch die Menge an ungeschnittenem Protein in der Fraktion der *beads* nach dem TEV-Verdau (*beads* nach TEV) abgenommen hatte. Dass diese Abnahme auch in der Positivkontrolle nicht erkennbar war, ist zum einen mit der großen Menge an bakteriellem GST-rTEV-LMP1 zu erklären, so dass die Spaltung nicht vollständig verlief. Zum anderen verursachte die große Proteinmenge auch eine Überexposition auf dem Film, so dass Unterschiede schwer zu erkennen sind.

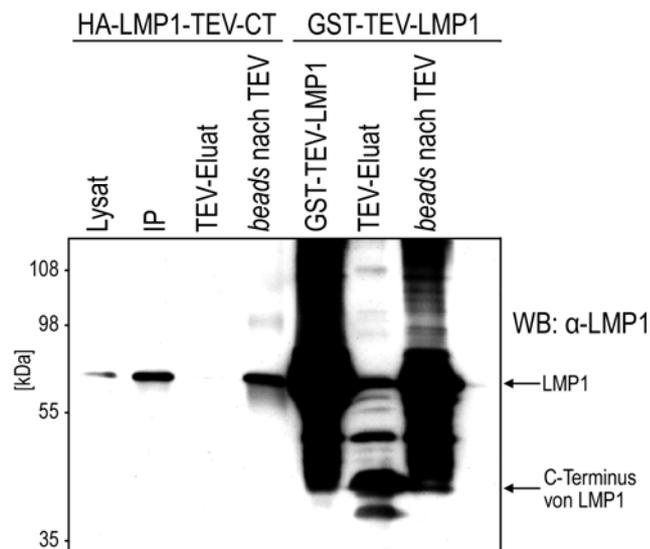


Abbildung 17: HA-LMP1-TEV-CT kann nicht durch die TEV-Protease geschnitten werden.

6x 10⁶ HEK293 Zellen wurden mit 6 μ g pSV-HA-LMP1-TEV-CT in 10 cm Schalen transfiziert. Nach 20 h wurden die Zellen in IP-Lysepuffer lysiert und eine Immunpräzipitation mit α -HA-Antikörper 12CA5 (Roche) durchgeführt. Die Hälfte der IP wurde für einen TEV-Verdau eingesetzt. Als Positivkontrolle diente bakterielles exprimiertes und gereinigtes GST-TEV-LMP1, das parallel zu HA-LMP1-TEV-CT verdaut wurde. Nach dem Verdau wurde der Überstand abgenommen (TEV-Eluat) und die verbleibenden *beads* gewaschen. Die Proben wurden auf einem SDS-Gel aufgetrennt und eine Western-Blot-Analyse mit dem LMP1-spezifischen Antikörper CS1-4 (Dako) durchgeführt.

Dass HA-LMP1-TEV-CT trotz TEV-Schnittstelle und aktiver TEV-Protease nicht geschnitten werden konnte, könnte an der räumlichen Konformation des Konstrukts liegen. Die TEV-Schnittstelle befindet sich in unmittelbarer Nachbarschaft zu den Transmembrandomänen. Diese könnten den Zugang der Protease zu der Schnittstelle behindern, so dass die Protease nicht angreifen kann.

4.1.4.3 Klonierung von HA-LMP1-TEV-CT Konstrukten mit Übergangssequenzen

Die These, dass die räumliche Nähe von TEV-Schnittstelle und Transmembrandomänen die Schneidbarkeit des Konstrukts verhindert, sollte im nächsten Schritt überprüft werden. Bei Fisher et al. konnte eine schlechte Effizienz des TEV-Verdaus durch das Einfügen der Übergangssequenz (*linker*) AGASGG zwischen einem Teil der Liganden-Bindungsdomäne des LDL-Rezeptors und der TEV-Schnittstelle verbessert werden (Fisher et al., 2004). Analog sollte diese Sequenz auch zwischen Transmembrandomänen und TEV-Schnittstelle in das HA-LMP1-TEV-CT Konstrukt eingefügt werden (siehe Abbildung 18). Um zu gewährleisten, dass der Abstand ausreichte, wurden zwei Konstrukte kloniert: eines mit einer einfachen (pSV-HA-LMP1-1xli-TEV-CT) und ein weiteres mit der doppelten Übergangssequenz (pSV-HA-LMP1-2xli-TEV-CT). Die Übergangssequenzen wurden, wie in den Kapiteln 3.3.11.5 und 3.3.11.6 detailliert beschrieben, mittels PCR mit überhängenden Primern an das LMP1-Fragment angehängt. Die resultierenden PCR-Fragmente wurden über Restriktionsverdau und Ligation in pSV-HA-LMP1-TEV-CT eingefügt.

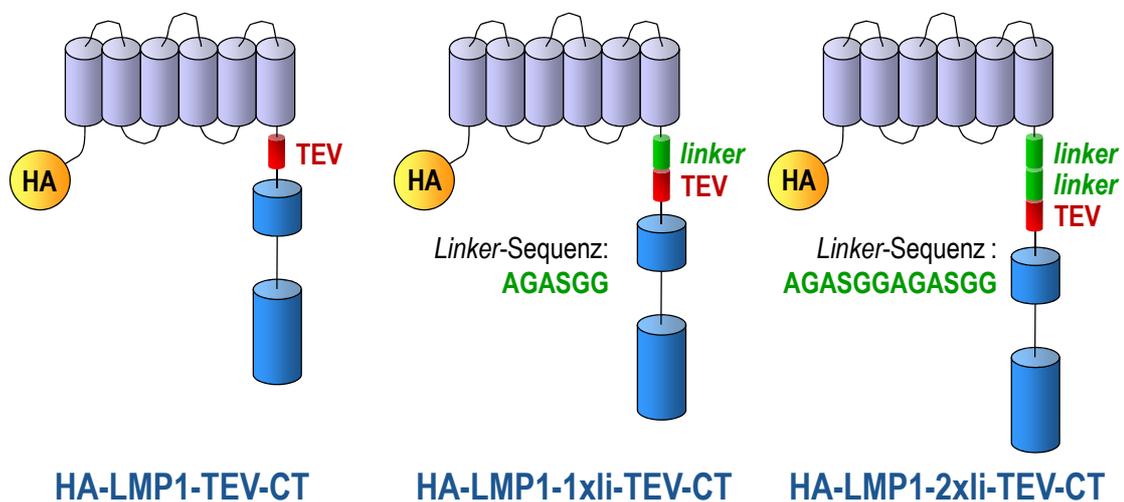


Abbildung 18: Modell der Modifizierung von HA-LMP1-TEV-CT zur Verbesserung der Effizienz des TEV-Verdaus.

Um einen ausreichenden Abstand zwischen den Transmembrandomänen und der TEV-Schnittstelle zu gewährleisten, wurde eine Übergangssequenz eingefügt. Durch den vergrößerten Abstand sollte die TEV-Protease besser an die Schnittstelle angreifen können.

4.1.4.4 Testen der Schneidbarkeit der modifizierten HA-LMP1-TEV-CT-Konstrukte

Jetzt sollte getestet werden, ob der vergrößerte Abstand zwischen TEV-Schnittstelle und Transmembrandomäne die TEV-Spaltung ermöglichte.

Dazu wurden folgende Konstrukte in HEK293 Zellen transient exprimiert: HA-LMP1-1xli-TEV-CT, HA-LMP1-2xli-TEV-CT, sowie als Kontrollen das ursprüngliche HA-LMP1-TEV-CT und HA-LMP1, das über keine TEV-Schnittstelle verfügt. Die Zellen wurden 20 h nach der Transfektion lysiert und die jeweiligen LMP1-Konstrukte mit einem an ProteinA-Sepharose *beads* gekoppelten α -HA (12CA5) Antikörper präzipitiert. Analog zu 4.1.4.2 wurden die präzipitierten Konstrukte nach dem Waschen 4 h bei Raumtemperatur mit TEV-Protease inkubiert.

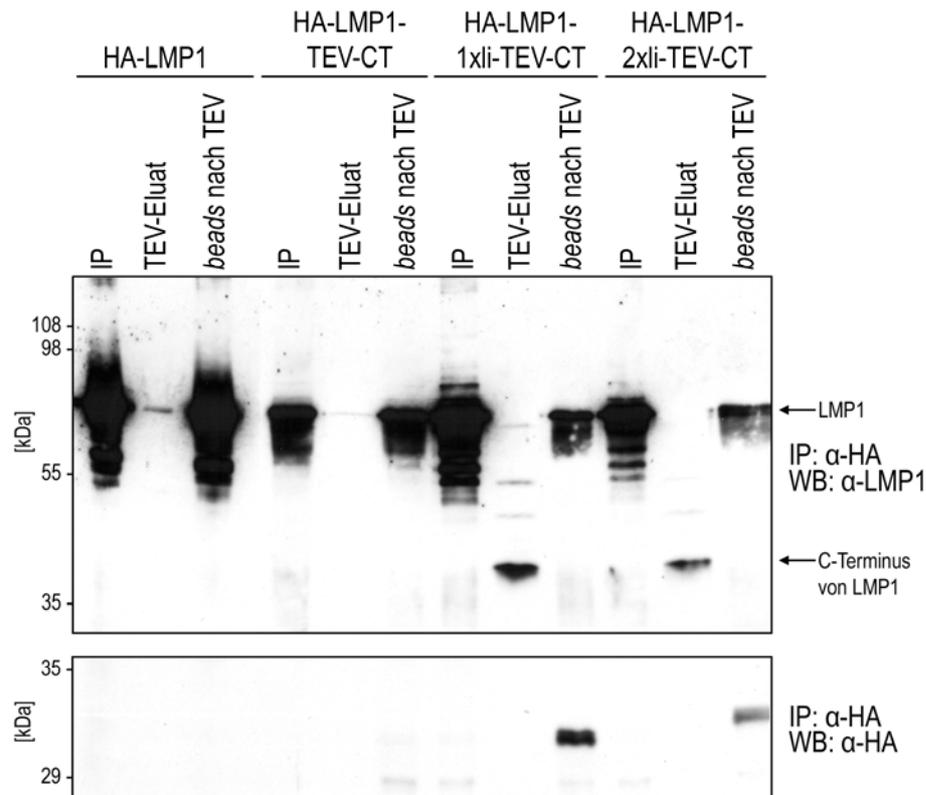


Abbildung 19: HA-LMP1-1xli-TEV-CT und HA-LMP1-2xli-TEV-CT lassen sich mit der TEV-Protease schneiden. 6×10^6 HEK293 Zellen wurden mit jeweils $6 \mu\text{g}$ pSV-HA-LMP1-TEV-CT, pSV-HA-LMP1-1xli-TEV-CT und pSV-HA-LMP1-2xli-TEV-CT bzw. $0,5 \mu\text{g}$ pCMV-HA-LMP1 transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen in IP-Lysepuffer lysiert und eine Immunpräzipitation mit α -HA-Antikörper (12CA5) (Roche) durchgeführt. Die Hälfte der IP wurde mit der TEV-Protease verdaut. Anschließend wurde der Überstand abgenommen (TEV-Eluat) und die verbleibenden *beads* gewaschen. Im Western Blot wurden LMP1 mit dem spezifischen Antikörper CS1-4 (Dako) sowie das HA-Epitop am N-Terminus von LMP1 mit dem spezifischen Antikörper 12CA5 (Roche) nachgewiesen.

Wie in Abbildung 19 dargestellt, lassen sich beide Konstrukte, die *linker*-Sequenzen zwischen den Transmembrandomänen und der TEV-Schnittstelle besitzen (HA-LMP1-1xli-TEV-CT und HA-LMP1-2xli-TEV-CT), mit der TEV-Protease schneiden. In den TEV-Eluaten ist deutlich eine Bande bei ca. 40 kDa zu sehen, die vom LMP1-spezifischen Antikörper erkannt wird. Diese Bande fehlt in den beiden Negativkontrollen. Auffällig ist, dass diese Bande bei einem höheren scheinbaren Molekulargewicht läuft, als sich rechnerisch ergäbe (ca. 20 kDa). Dieses Verhalten ist für LMP1 bekannt, die Ursache hierfür ist jedoch unklar. Bei dem Gesamtprotein von LMP1 ergibt sich aufgrund seiner Primärstruktur ein rechnerisches Molekulargewicht von ca. 42 kDa. In SDS-Gelen es läuft jedoch auf einer Höhe von ca. 68 kDa. Es scheint also, dass dieses Verhalten auch durch den C-Terminus des Proteins bestimmt wird. Das übrige Protein nimmt ein scheinbares Molekulargewicht von unter 30 kDa ein, wie aus dem unteren Teil der Abbildung hervorgeht. Hier wurde ein HA-spezifischer Antikörper verwendet, der ausschließlich in der Fraktion der *beads* nach dem TEV-Verdau für HA-LMP1-1xli-TEV-CT und HA-LMP1-2xli-TEV-CT eine Bande auf dieser Höhe erzeugt. Dass der N-Terminus von HA-LMP1-2xli-TEV-CT etwas höher zu laufen scheint, lässt sich durch den *smile*-Effekt von SDS-Gelen erklären.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass sowohl HA-LMP1-1xli-TEV-CT als auch HA-LMP1-2xli-TEV-CT exprimiert und geschnitten werden können. Im nächsten Schritt sollte die Funktionalität der Proteine überprüft werden.

4.1.4.5 Untersuchung HA-LMP1-li-TEV-CT auf Funktionalität

Da die Konstrukte HA-LMP1-1xli-TEV-CT und HA-LMP1-2xli-TEV-CT gegenüber Wildtyp LMP1 deutlich verändert worden waren, galt es nun, die Funktion dieser LMP1-Varianten zu testen, da ein funktionelles LMP1 für das Auswachsen von LCLs und die Untersuchungen mittels funktioneller Proteomanalyse benötigt wird. Wie in Abschnitt 1.2.4.5 beschrieben, aktiviert LMP1 AP1 über JNK1. Daher sollte exemplarisch für die aktivierten Signalwege betrachtet werden, ob die beiden Konstrukte mit der TEV-Schnittstelle JNK1 im gleichen Maße wie LMP1 wt aktivieren.

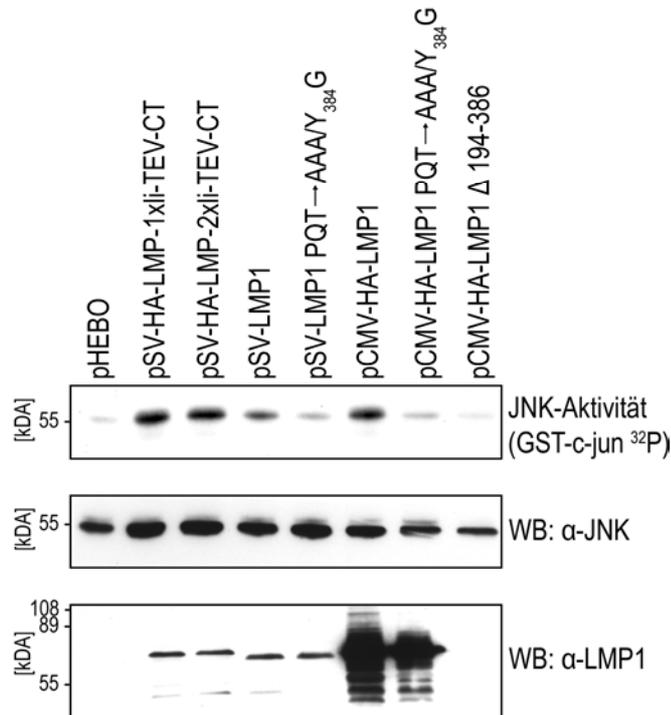


Abbildung 20: HA-LMP1-1xli-TEV-CT und HA-LMP1-2xli-TEV-CT aktivieren JNK1.

HEK293 Zellen wurden mit 2 µg der angegebenen pSV-Expressionsplasmide bzw. 0,75 µg der angegebenen pCMV-Expressionsplasmide sowie 1 µg pRK5-HA-JNK1 kotransfiziert. 20 h nach der Transfektion wurde ein *in vitro* HA JNK1 Kinaseversuch durchgeführt. *In vitro* phosphoryliertes GST-c-Jun wurde durch Autoradiographie nachgewiesen. Als Transfektions- und Ladekontrolle wurde auf derselben Membran das präzipitierte HA-JNK1 mit dem JNK1-spezifischen Antikörper C-17 (Santa Cruz Biotechnology) nachgewiesen. Als Expressionsnachweis der LMP1-Konstrukte wurde eine Western-Blot-Analyse der Lysate mit dem LMP1-spezifischen Antikörper CS1-4 (Dako) durchgeführt.

Um diese Frage zu beantworten, wurden in HEK293 Zellen transiente JNK1-Immunkomplex-Kinaseexperimente durchgeführt. Dafür wurden die Zellen mit einem Expressionsplasmid für ein HA-fusioniertes JNK1 (HA-JNK1) und verschiedenen LMP1-Expressionsplasmiden transfiziert. Als Kontrolle zur Bestimmung der basalen JNK1-Aktivität wurden der Leervektor pHEBO sowie Expressionsvektoren für die LMP1 Mutante LMP1 PQT→AAA/Y₃₈₄G verwendet. Diese LMP1-Mutante ist sowohl in CTAR1 als auch in CTAR2 mutiert und kann den JNK1-Signalweg nicht mehr aktivieren (Kieser et al., 1999). Außerdem wurde LMP1 wt und die beiden zu testenden Konstrukte HA-LMP1-1xli-TEV-CT und HA-LMP1-2xli-TEV-CT transfiziert. Als weitere Kontrolle diente ein HA-LMP1 ohne *linker*-Sequenz und TEV-Schnittstelle. Dieses Konstrukt befand sich in einem anderen Vektorhintergrund mit einem CMV-Promotor, während die Konstrukte HA-

LMP1-1xli-TEV-CT und HA-LMP1-2xli-TEV-CT über einem SV40-Promotor verfügt. Daher wurden weitere Negativkontrollen mit CMV-Promotor benötigt. Hierfür wurden HA-LMP1 PQT→AAA/Y₃₈₄G und HA-LMP1 Δ194-386 verwendet. In dem letztgenannten Konstrukt ist der gesamte C-Terminus von LMP1 deletiert, so dass es, ebenso wie HA-LMP1 PQT→AAA/Y₃₈₄G, JNK1 nicht aktiviert.

20 h nach Transfektion wurden die Zellen lysiert und der HA-JNK1 Immunkomplex-Kinaseversuch durchgeführt. Dazu wurde HA-JNK1 mit dem HA-spezifischen Antikörper 3F10 (Roche) immunpräzipitiert und *in vitro* eine GST-c-Jun Phosphorylierungsreaktion durchgeführt. Diese Phosphorylierung ist ein direktes Maß für die Aktivität in den jeweiligen Ansätzen.

Wie in Abbildung 20 gezeigt, wurde GST-c-Jun in den Ansätzen mit dem Leervektor, HA-LMP1 Δ194-386 und beiden LMP1 PQT→AAA/Y₃₈₄G Mutanten nur in sehr geringem Ausmaß phosphoryliert, was der Basalaktivität von HA-JNK1 entspricht. HA-LMP1-1xli-TEV-CT und HA-LMP1-2xli-TEV-CT hingegen aktivierten JNK1 etwas besser als LMP1 Wildtyp. Es konnte also gezeigt werden, dass die Konstrukte Signaltransduktion aktivieren können. Da sich beide Konstrukte identisch verhielten, wurde im Weiteren mit HA-LMP1-2xli-TEV-CT gearbeitet.

4.1.4.6 Klonierung von Maxi-EBV-HA-LMP1-2xli-TEV-CT und Generierung von TEV-LCLs

Zunächst musste HA-LMP1-2xli-TEV-CT anstelle des LMP1 Wildtyp Gens in das Maxi-EBV-Genom eingebracht werden. Analog zu Abschnitt 4.1.1 wurde auch hier die Sequenzinformation von HA-LMP1-2xli-TEV-CT über ein Zwischenkonstrukt unter Kontrolle des viralen Promotors im Kontext des EBV-Genoms in den Vektor kloniert (siehe Abschnitt 3.3.11.8). Aus diesem wurde ein 2,66 kBp großes Fragment mit dem Gen für HA-LMP1-2xli-TEV-CT sowie einer Kanamycin-Resistenz (*kana^r*) ausgeschnitten und über Elektroporation in chemisch kompetente DH10B gemäß Abschnitt 3.1.3 eingebracht. Nach der homologen Rekombination wurde die DNA verschiedener Klone aufgereinigt und mit BamHI kontrollverdaut. In Abbildung 21 sind die daraus resultierenden DNA-Fragmente dreier verschiedener Klone sowie der Ausgangs-DNA p2089 dargestellt. Das Fragmentmuster von cl. 25 und cl. 33 entsprach den Erwartungen. Bei cl. 30 fiel jedoch auf, dass die Bande bei 3 kBp, die den BamW-Wiederholungen entspricht, deutlich weniger ausgeprägt ist als in der Kontrolle. Es ist daher anzunehmen, dass in diesem Klon unerwünschte Rekombinationen innerhalb dieser Region stattgefunden haben, weshalb die DNA dieses Klons nicht weiter verwendet wurde.

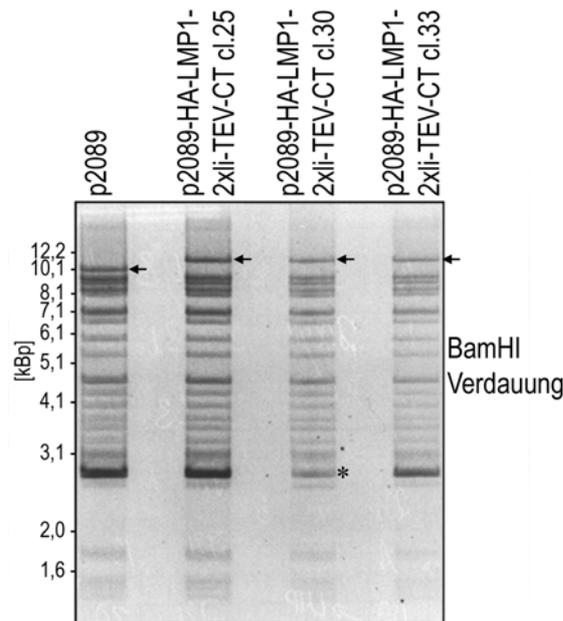


Abbildung 21: Die Klone cl. 25 und cl. 33 zeigten nach BamHI-Verdau das erwartete Fragmentmuster.

Die Maxi-EBV-Plasmide p2089 und verschiedene Klone von p2089-HA-LMP1-2xli-TEV-CT wurden mit BamHI restriktionsverdaut und auf einem analytischen, mit Ethidiumbromid gefärbten Agarosegel aufgetrennt. Die Bandenmuster von cl. 25 und cl. 33 entsprachen den erwarteten Fragmentgrößen, die im Anhang B vollständig aufgeführt sind. Die Abweichungen zwischen den Konstrukten und dem Ausgangsplasmid p2089 sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Durch die Insertion der Kanamycinresistenz und die Änderungen im LMP1-Lokus entsteht für p2089-HA-LMP1-2xli-TEV-CT eine 13,4 kBp Bande im Gegensatz zu dem 11,8 kBp großen Fragment im Ausgangsvektor. In cl. 30 war die Bande bei 3 kBp wesentlich schwächer als in p2089, was auf eine Deletion innerhalb der BamW-Wiederholungen hinweist.

Die DNA der Klone 25 und 33 wurden wie in Abschnitt 4.1.1.2 mit Hilfe der Verpackungszelllinie TR-2/293 in EBV-Partikel verpackt. Mit den so gewonnenen Virusüberständen wurden primäre B-Lymphozyten aus humanen Adenoiden infiziert. In diesem Experiment war aus 35 % der Vertiefungen in den 96-Loch-Platten LCLs ausgewachsen, so dass die Annahme, dass es sich um Einzelzellklone handelt statistisch gesichert ist (Frisan et al., 2001) (vgl. Abschnitt 4.1.1.2). Abbildung 22 zeigt die so ausgewachsenen grünen TEV-LCLs des Klones 5 (TEV-LCL5), der aus der DNA von p2089-HA-LMP1-2xli-TEV-CT Klon 25 ausgewachsen war.

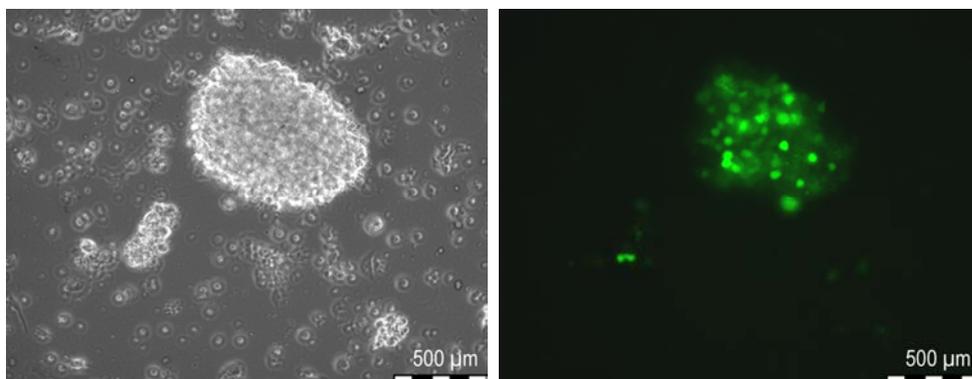


Abbildung 22: Nach der Infektion von primären B-Zellen wachsen grüne TEV-LCLs aus.

Primäre B-Zellen wurden mit dem rekombinanten Maxi-EBV p2089-HA-LMP1-2xli-TEV-CT infiziert. Von dem Klon TEV-LCL5 sind eine Durchlicht- und eine Fluoreszenzaufnahme (eGFP) bei 100-facher Vergrößerung dargestellt. Die grün fluoreszierenden Zellen wurden in der Abbildung nachträglich eingefärbt.

Um sicherzustellen, dass die TEV-LCL5 Zellen tatsächlich sowohl über das HA-Epitop am N-Terminus von LMP1 als auch über die TEV-Schnittstelle mit der Übergangssequenz innerhalb des Proteins verfügten, wurde die RNA aus den Zellen isoliert und die mRNA in cDNA umgeschrieben. Diese cDNA wurde als Matrize in PCRs mit LMP1-spezifischen Primern verwendet. Als Negativkontrolle diente cDNA aus 721 Zellen, als Positivkontrolle der Vektor 2167.1-HA-LMP1-2xli-TEV-CT. In Abbildung 23 wird deutlich, dass die Größen der PCR-Fragmente, in denen TEV-LCL5 cDNA als Template diente, identisch waren mit denen der Positivkontrolle. Die mRNA von LMP1 enthielt daher sowohl die TEV-Schnittstelle als auch das HA-Epitop, so dass die homologe Rekombination stromaufwärts und stromabwärts des LMP1-ORF und nicht innerhalb der Sequenz stattgefunden haben musste.

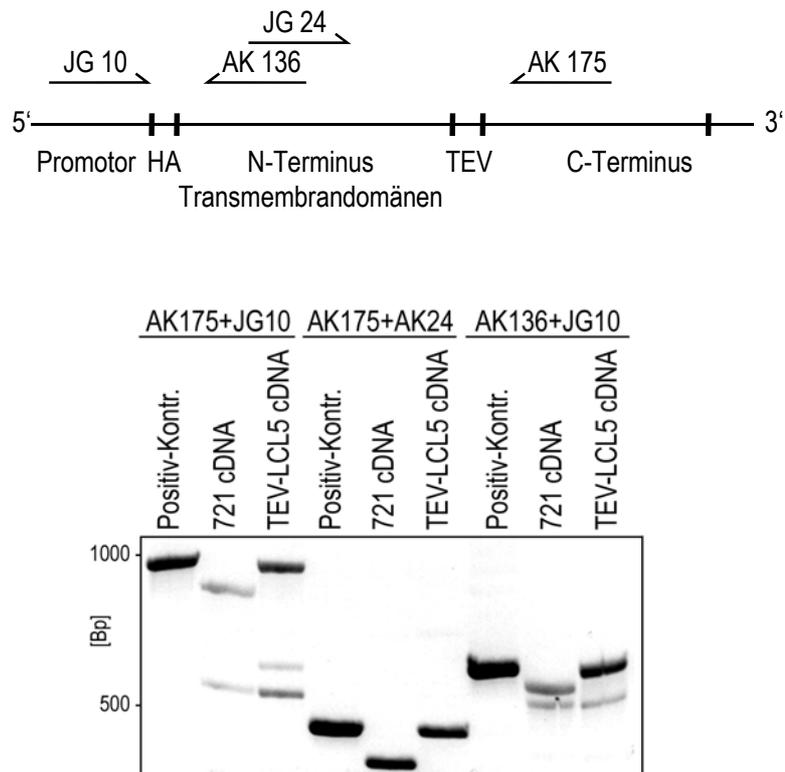


Abbildung 23: Die Zelllinie TEV-LCL5 besitzt ein LMP1 mit fusioniertem HA-Epitop und TEV-Schnittstelle.

Aus TEV-LCL5 und 721 Zellen wurde RNA isoliert und cDNA generiert. Diese cDNA diente in PCRs mit LMP1-spezifischen Primern als Template. Als Positivkontrolle wurde 2167.1-HA-LMP1-2xli-TEV-CT DNA verwendet. Das Primerpaar AK175+JG10 amplifiziert ein Fragment aus dem LMP1-Promotor bis in den C-Terminus von LMP1. Hierbei entsteht ein 985 bp großes Fragment für HA-LMP1-2xli-TEV-CT, während mit LMP1 ein 883 bp großes Fragment entsteht. AK175+AK24 vervielfältigt ein Fragment, das die TEV-Schnittstelle einschließt und das bei HA-LMP1-2xli-TEV-CT eine Größe von 499 bp und bei LMP1 von 430 bp besitzt. AK136+JG10 amplifiziert eine Region aus dem LMP1-Promotor bis über das HA-Epitop hinaus, das für HA-LMP1-2xli-TEV-CT 653 bp und für LMP1 620 bp besitzt. Die PCRs wurden auf einem analytischen, Ethidiumbromid gefärbten Agarosegel aufgetrennt.

Das Auswachsen dieser LCLs ist zugleich der Nachweis, dass das HA-LMP-2xli-TEV-CT funktionell LMP1 substituieren kann, da ein aktives LMP1 für die effiziente Immortalisierung von B-Zellen *in vitro* essentiell ist (Dirmeier et al., 2005). Es ist daher davon auszugehen, dass ein funktioneller LMP1-Signalkomplex in den TEV-LCLs gebildet wird.

4.1.4.7 Präzipitation und TEV-Spaltung des HA-LMP1-2xli-TEV-CT Signalkomplexes

Nachdem im letzten Abschnitt grüne LCLs ausgewachsen waren, existierte nun das zelluläre System, aus dem der LMP1-Signalkomplex aufgereinigt werden sollte. Jetzt galt es zu testen, ob mit dem C-Terminus von LMP1 nach IP und TEV-Verdau auch LMP1-interagierende Proteine isoliert werden können und dieser zweite Aufreinigungsschritt den Hintergrund reduziert.

Dazu wurden 1×10^8 Zellen der Linien 721, HA-LCL3 und TEV-LCL5 lysiert und nach Proteinemengenabgleich der Lysate eine Präzipitation mit α -HA (12CA5) Antikörper durchgeführt (IP). Anschließend wurden die Immunpräzipitationen mit TEV-Protease verdaut, das TEV-Eluat abgenommen (TEV-Eluat) und die verbleibenden *beads* nochmals gewaschen (*beads nach TEV*).

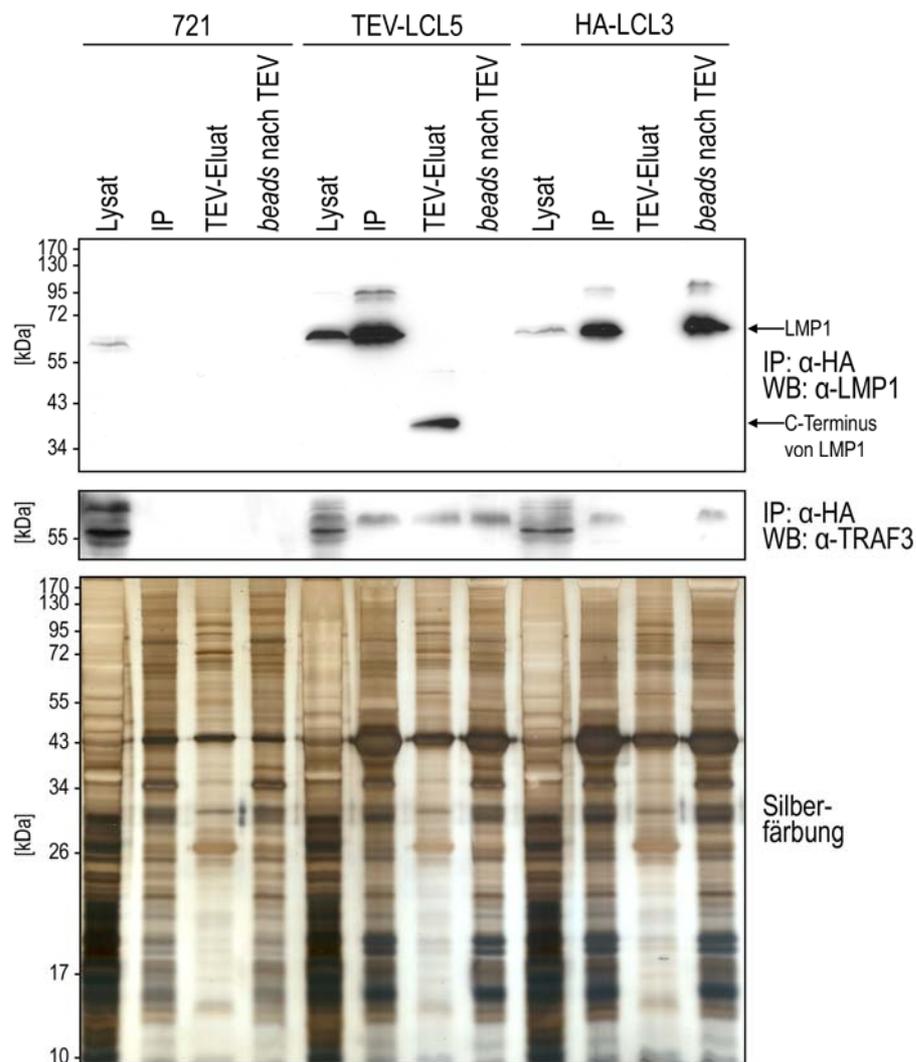


Abbildung 24: TRAF3 bindet an den TEV-geschnittenen C-Terminus von LMP1.

Jeweils 1×10^8 Zellen der Linien 721, TEV-LCL5 und HA-LCL3 wurden in IP-Lysepuffer lysiert. Nach einem Proteinemengenabgleich wurde mit dem α -HA-Antikörper 12CA5 (Roche) präzipitiert und die Hälfte des Ansatzes mit TEV-Protease verdaut. Es wurden SDS-PAGE-Gele angefertigt, auf denen die Lysate, die IPs, die TEV-Verdaue sowie die gewaschenen *beads* nach dem Verdau aufgetragen wurden. Hierbei wurden, mit Ausnahme der Lysate, Volumenäquivalente aufgetragen. Mit zwei Gelen wurde eine Immunoblot-Analyse mit dem LMP1-spezifischen Antikörper CS1-4 (Dako) bzw. mit einem TRAF3-spezifischen Antikörper (H-20) (Santa Cruz Biotechnology) durchgeführt, während das übrige Gel einer Silberfärbung unterzogen wurde.

In der Western-Blot-Analyse mit LMP1-spezifischem Antikörper in Abbildung 24 ist gut zu erkennen, dass durch die IP aus TEV-LCL5 und aus HA-LCL3 eine deutliche Anreicherung durch die Präzipitation erreicht werden konnte. Wie erwartet, wurde LMP1 aus den 721-Lysaten nicht präzipitiert, da es nicht über ein HA-Epitop verfügte und daher von dem HA-spezifischen Antikörper nicht erkannt wurde. Für HA-LCL3 hat das LMP1-Signal in der Fraktion der *beads* nach TEV-Verdau die gleiche Intensität wie in der IP-Fraktion. Durch die Prozedur der TEV-Spaltung schien also kein Material verloren zu gehen. Wie erwartet wurden HA-LMP1 aus HA-LCL3 Zellen jedoch nicht durch die TEV-Protease geschnitten. Im Gegensatz dazu war für TEV-LCL5 in der Fraktion der *beads* nach TEV kein LMP1-Signal mehr sichtbar, während in der IP-Fraktion eine starke Bande erschien. Zusammen mit dem Signal des C-Terminus von LMP1 im TEV-Eluat von TEV-LCL5 lässt sich aussagen, dass die TEV-Protease HA-LMP1-2xli-TEV-CT sehr effizient umgesetzt hat.

Weiterhin sollte exemplarisch anhand der Bindung von TRAF3 an die LMP1 Signaldomäne untersucht werden, ob zusammen mit dem abgeschnittenen C-Terminus auch LMP1-interagierende Proteine isoliert werden können. Dazu wurde eine Western-Blot-Analyse mit TRAF3-spezifischem Antikörper durchgeführt, die in Abbildung 24 dargestellt ist. Wie zu erwarten, war TRAF3 in der Negativkontrolle aus 721 Zellen nur im Lysat zu detektieren. Für HA-LCL3 konnte TRAF3 außer im Lysat in der IP und in den *beads* nach TEV nachgewiesen werden, nicht aber im TEV-Eluat. Dies zeigt, dass hier eine Kopräzipitation stattgefunden hat, TRAF3 sich aber nicht während dem TEV-Verdau von LMP1 löst. Anders verhielt es sich für TEV-LCL5, denn hier war TRAF3 auch im TEV-Eluat deutlich sichtbar, auch wenn es in den *beads* nach dem TEV-Verdau noch deutlich nachweisbar war. Da die Spaltung von HA-LMP1-2xli-TEV-CT durch die TEV-Protease effizient war, musste davon ausgegangen werden, dass TRAF3 auch an den *beads* haftet. Dann müsste TRAF3 jedoch auch in der Negativkontrolle aus 721 Zellen nachweisbar sein. Weiterhin könnte es mit der Transmembrandomäne von LMP1 interagieren, wofür es aber keinerlei Hinweise gibt. Das Auftreten von TRAF3 in der Fraktion der *beads* nach TEV konnte daher nicht abschließend erklärt werden. Da jedoch nur das TEV-Eluat aus TEV-LCL5 mit dem aus 721 (in dem erwartungsgemäß nicht TRAF3 nachgewiesen werden konnte) in der massenspektrometrischen Analyse untersucht werden sollte, musste lediglich sichergestellt werden, dass ausreichend viel Ausgangsmaterial eingesetzt wurde. Es gelang also, zumindest einen Anteil der LMP1-interagierenden Proteine durch den TEV-Verdau zu eluieren. Dass nicht das gesamte TRAF3 nach der TEV-Spaltung in der Eluat-Fraktion vereint werden kann, stellt das Prinzip der Aufreinigung nicht in Frage, da in der massenspektrometrischen Analyse nicht das TEV-Eluat aus TEV-LCL5 mit den *beads* nach TEV sondern mit dem TEV-Eluat aus 721 verglichen werden sollte. Es bedeutet lediglich, dass entsprechend mehr Material eingesetzt werden musste. Wieso die Summe der Signalstärke aus TEV-Eluat und *beads* nach TEV aus TEV-LCL5 höher schien als die Signalstärke in der IP, ist unklar.

Betrachtet man die Silberfärbung in Abbildung 24, lässt sich erkennen, dass die Komplexität der Probe durch die TEV-Spaltung deutlich gegenüber der IP reduziert wurde. Dennoch ähnelte sich das Bandenmuster der TEV-Verdaue aus 721 und aus TEV-LCL5, was durch die milden Lysebedingungen und die niedrigen Stringenz beim Waschen begründet ist. Dass dennoch Unterschiede existierten, wird in Abbildung 25 besser deutlich. Da die massenspektrometrische Analyse mit einem differentiellen Ansatz erfolgen sollte, war es nicht notwendig, den Hintergrund vollständig zu entfernen. Unspezifische Proteine sollten auch in der Kontrolle identifiziert werden und konnten so im Nachhinein aus der Analyse ausge-

geschlossen werden. Da bei einer höheren Reinheit oft auch spezifische aber schwache Interaktoren entfernt werden, wurde auf ein stringenteres Waschen bewusst verzichtet.

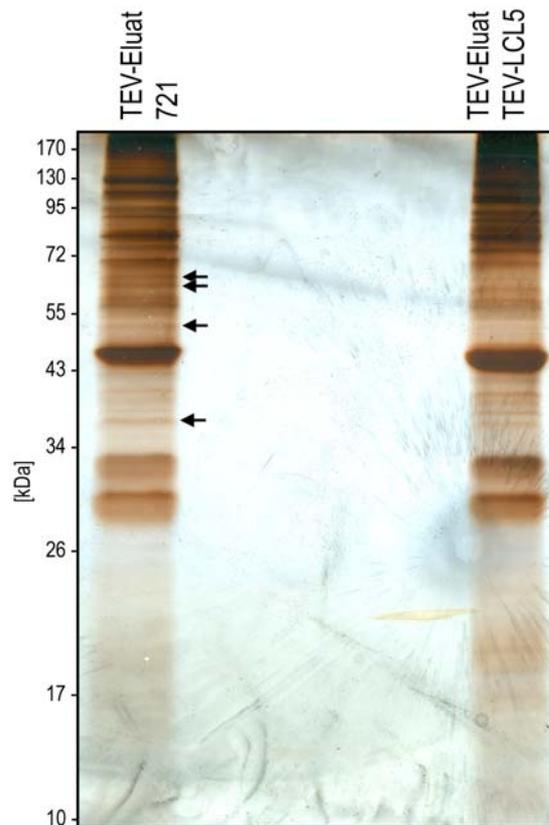


Abbildung 25: Bei genauer Betrachtung der TEV-Eluate aus 721 und TEV-LCL5 existieren Unterschiede. TEV-Eluate aus TEV-LCL5 und 721 Zellen wurden auf einem 12,5% SDS-Gel aufgetrennt und einer Silberfärbung unterzogen.

4.1.5 Massenspektrometrische Analyse potentieller HA-LMP1-2xli-TEV-CT-interagierender Proteine aus TEV-Eluaten

Nachdem im vorangegangenen Abschnitt gezeigt werden konnte, dass Bestandteile des LMP1-Signalkomplexes im TEV-Eluat aus TEV-LCL5 Zellen enthalten waren, sollten die in Eluat enthaltenen Proteine massenspektrometrisch untersucht werden. Hierzu wurden IPs aus jeweils ca. 1×10^9 Zellen der Linie TEV-LCL5 mittels kovalent an ProteinA-Sepharose beads gekoppelten α -HA (12CA5)-Antikörper durchgeführt. Als Negativkontrolle für den subtraktiven Ansatz diente eine IP aus 721 Zellen, wobei gleiche Proteinmengen wie für die IP aus TEV-LCL5 Zellen eingesetzt wurden. Mit beiden IPs wurde anschließend ein TEV-Verdau durchgeführt und die TEV-Eluate von den *beads* abgetrennt. Um zu testen, ob die Aufreinigung erfolgreich war, wurden die Fraktionen analog zu der Analyse in Abschnitt 4.1.4.7 geprüft. Nur wenn die TEV-Spaltung erfolgreich war und TRAF3 im TEV-Eluat aus TEV-LCLs nachgewiesen werden konnte, wurde die Probe für die Massenspektrometrie vorbereitet. Hierbei wurde analog zu Abschnitt 4.1.3 vorgegangen. Die TEV-Eluate wurden auf einer Strecke von 1-1,5 cm auf einem 12,5% SDS-Gel aufgetrennt und in drei Fraktionen nach scheinbarem Molekulargewicht unterteilt. Diese wurden dann im Gel tryptisch verdaut und die resultierenden Peptide auf der nano HPLC Ultimate (LC-Packings) aufge-

trennt. Um möglichst gleiche Bedingungen für die Probe und die Kontrolle zu gewährleisten, wurden die zusammengehörigen Läufe (Probe aus TEV-LCL5 und Kontrolle aus 721), von Leergradienten unterbrochen, hintereinander aufgetrennt. Beispielhaft ist ein Spektrum für die Peptide aus TEV-LCL5 (schwarz) und 721 (blau) in Abbildung 26 dargestellt.

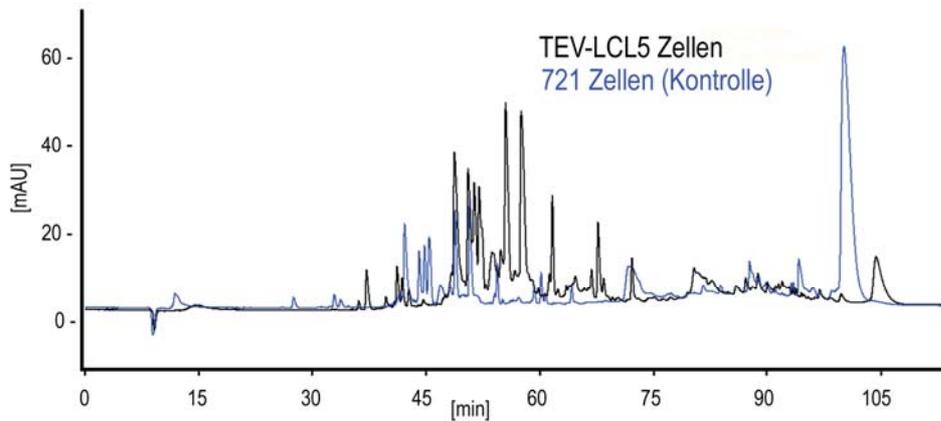


Abbildung 26: Spektrum eines nanoHPLC-Experiments von IPs aus TEV-LCL5 und 721 Zellen.

Die Peptide aus dem tryptischen Verdau wurden nach ihrer Hydrophobizität durch den in Abschnitt 3.6.2 beschriebenen Gradienten aufgetrennt (5 min 5 % Acetonitril, 50 min 5-40 % Acetonitril, 15 min 40-80 % Acetonitril, 10 min 80 % Acetonitril, 6 min 100-5 % Acetonitril, 28 min 5 % Acetonitril). Anschließend wurden die Peptide in einem UV-Detektor bei 214 nm detektiert. Die UV-Intensität aus TEV-LCL5 ist schwarz, die aus 721 blau dargestellt.

Nach der Auftrennung der Peptide wurden diese automatisch mit Matrix gemischt und auf einen Stahlträger gespottet. Anschließend wurden die Proben mit dem Proteomanalyzer 4700 (Applied Biosystems) massenspektrometrisch untersucht und zunächst mit der Software GPS-Explorer 3.5 (Applied Biosystems) ausgewertet. Um verschiedene Läufe miteinander vergleichen zu können, wurde Scaffold (Proteome Software Inc.) verwendet. Hierzu wurden die einzelnen drei Fraktionen aus der SDS-Gel-Spur zusammengefasst. Dadurch konnte gewährleistet werden, dass Unterschiede, die durch ungenaues Aufteilen der Gelspur vor dem tryptischen Verdau entstanden waren, nicht ins Gewicht fielen. Die Ergebnisse der Auswertung von vier unabhängigen Experimenten sind in Abbildung 27 dargestellt. Ein Experiment setzt sich dabei aus sechs HPLC-MS/MS-Analysen zusammen, nämlich den drei Fraktionen (aus der SDS-Gel-Spur nach Molekulargewicht getrennt) der TEV-Eluat aus TEV-LCL5 und den drei Fraktionen den TEV-Eluaten aus 721.

#	Identified Proteins	Accession Number	Molecular Weight	Probability Legend:				
				over 95%	80% to 94%	50% to 79%	20% to 49%	0% to 19%
1	Myosin light polypeptide 6 - Homo sapiens (Human)	MYL6_HUMAN	17 kDa	91%	100%	100%	100%	100%
2	Myosin-10 - Homo sapiens (Human)	MYH10_HUMAN	229 kDa	100%	100%	100%	100%	100%
3	14-3-3 protein beta/alpha - Homo sapiens (Human)	1433B_HUMAN	28 kDa	100%	100%	100%	100%	100%
4	Guanine nucleotide-binding protein G(i), alpha-2 subunit - Homo sapiens (Human)	GNAI2_HUMAN	40 kDa	89%	100%	100%	100%	100%
5	Twinfilin-2 - Homo sapiens (Human)	TWF2_HUMAN	40 kDa	100%	100%	100%	100%	100%
6	Spectrin beta chain, brain 1 - Homo sapiens (Human)	SPTB2_HUMAN	275 kDa	100%	100%	100%	100%	100%
7	Coronin-1C - Homo sapiens (Human)	COR1C_HUMAN	53 kDa	99%	99%	99%	99%	99%
8	Spectrin alpha chain, brain - Homo sapiens (Human)	SPTA2_HUMAN	285 kDa	99%	99%	99%	99%	99%
9	F-actin capping protein subunit alpha-1 - Homo sapiens (Human)	CAZA1_HUMAN	33 kDa	99%	99%	99%	99%	99%
10	Cytochrome b5 type B precursor - Homo sapiens (Human)	CYB5B_HUMAN	16 kDa	98%	98%	98%	98%	98%
11	Serine/threonine-protein phosphatase PP1-alpha catalytic subunit - Homo sapiens (Human)	PP1A_HUMAN	38 kDa	87%	87%	87%	87%	87%
12	Polyrimidine tract-binding protein 1 - Homo sapiens (Human)	PTEP1_HUMAN	57 kDa	84%	84%	84%	84%	84%
13	Tropomodulin-3 - Homo sapiens (Human)	TMOD3_HUMAN	40 kDa	84%	84%	84%	84%	84%
14	EF-hand domain-containing protein 2 - Homo sapiens (Human)	EFHD2_HUMAN	27 kDa	100%	100%	100%	100%	100%
15	ATPase family AAA domain-containing protein 2B - Homo sapiens (Human)	ATD2B_HUMAN	165 kDa	100%	100%	100%	100%	100%
16	Elongation factor 1-alpha 2 - Homo sapiens (Human)	EF1A2_HUMAN	50 kDa	100%	100%	100%	100%	100%
17	Interleukin-16 precursor - Homo sapiens (Human)	IL16_HUMAN	67 kDa	100%	100%	100%	100%	100%
18	Beta-2-microglobulin precursor [Contains: Beta-2-microglobulin variant pl 5.3] - Homo sapiens (Human)	B2MG_HUMAN	14 kDa	91%	91%	91%	91%	91%
19	Protein disulfide-isomerase A3 precursor - Homo sapiens (Human)	PDIA3_HUMAN	57 kDa	84%	84%	84%	84%	84%
20	Staphylococcal nuclease domain-containing protein 1 - Homo sapiens (Human)	SND1_HUMAN	102 kDa	84%	84%	84%	84%	84%
21	Histone H4 - Homo sapiens (Human)	H4_HUMAN	11 kDa	72%	72%	72%	72%	72%
22	Actin-like protein 2 - Homo sapiens (Human)	ARP2_HUMAN	45 kDa	87%	87%	87%	87%	87%
23	CD48 antigen precursor - Homo sapiens (Human)	CD48_HUMAN	28 kDa	87%	87%	87%	87%	87%
24	Glycerinaldehyde-3-phosphate dehydrogenase - Homo sapiens (Human)	G3P_HUMAN	36 kDa	87%	87%	87%	87%	87%

Abbildung 27: Potentielle Interaktionspartner von LMP1 aus der MALDI-Analyse von TEV-Eluaten aus TEV-LCL5 Zellen

Dargestellt sind vier unabhängige Experimente mit Probe (TEV-Eluat aus TEV-LCL5) und zugehöriger Kontrolle (TEV-Eluat aus 721), jeweils bestehend aus je drei HPLC-Läufen mit nachfolgender MALDI-Analyse. Die Daten wurden mit Hilfe der Software Scaffold ausgewertet. Proteine, die auch in der Kontrolle vorhanden waren, wurden als Kontamination entfernt. Dargestellt sind identifizierte Proteine mit ihrer *Accession Number* in Swissprot, ihrem Molekulargewicht und der Wahrscheinlichkeit ihrer Identifikation. Der Schwellenwert für eine glaubwürdige Identifizierung wurde auf 90 % gesetzt.

#	Identified Proteins	Accession Number	Molecular Weight	Probet1	Probet2	Probet3	Probet4
25	Mitochondrial carrier homolog 2 - Homo sapiens (Human)	MTCH2_HUMAN	33 kDa		87%	74%	
26	Hemoglobin subunit alpha - Homo sapiens (Human)	HBA_HUMAN	15 kDa			100%	
27	Triosephosphate isomerase - Homo sapiens (Human)	TPIS_HUMAN	27 kDa			100%	
28	Alpha-actinin-4 - Homo sapiens (Human)	ACTN4_HUMAN	105 kDa	99%			
29	Vasodilator-stimulated phosphoprotein - Homo sapiens (Human)	VASP_HUMAN	40 kDa	99%			
30	Non-POU domain-containing octamer-binding protein - Homo sapiens (Human)	NONO_HUMAN	54 kDa		99%		
31	Ryanodine receptor 3 - Homo sapiens (Human)	RYR3_HUMAN	552 kDa		99%		
32	Protein C14orf166 - Homo sapiens (Human)	CN166_HUMAN	28 kDa	98%			
33	Prohibitin-2 - Homo sapiens (Human)	PHE2_HUMAN	33 kDa		97%		
34	Lymphocyte-specific protein 1 - Homo sapiens (Human)	LSP1_HUMAN	37 kDa		87%		
35	14-3-3 protein zeta/delta - Homo sapiens (Human)	1433Z_HUMAN	28 kDa				93%
36	14-3-3 protein epsilon - Homo sapiens (Human)	1433E_HUMAN	29 kDa				93%
37	ATP synthase B chain, mitochondrial precursor - Homo sapiens (Human)	AT5F1_HUMAN	29 kDa				93%
38	Uncharacterized protein C1orf77 - Homo sapiens (Human)	CA077_HUMAN	26 kDa				93%
39	Cellular nucleic acid-binding protein - Homo sapiens (Human)	CNEP_HUMAN	19 kDa				93%
40	Histone-lysine N-methyltransferase, H3 lysine-79 specific - Homo sapiens (Human)	DOT1L_HUMAN	185 kDa				93%
41	Growth factor receptor-bound protein 2 - Homo sapiens (Human)	GRB2_HUMAN	25 kDa				93%
42	Glutathione S-transferase P - Homo sapiens (Human)	GSTP1_HUMAN	23 kDa				93%
43	Integrin alpha-E precursor - Homo sapiens (Human)	ITAE_HUMAN	130 kDa				93%
44	Jumonji/ARID domain-containing protein 1C - Homo sapiens (Human)	JAD1C_HUMAN	176 kDa				93%
45	Nucleoside diphosphate kinase A - Homo sapiens (Human)	NDKA_HUMAN	17 kDa				93%
46	Proteasome subunit alpha type 1 - Homo sapiens (Human)	PSA1_HUMAN	30 kDa				93%
47	Proteasome subunit beta type 1 precursor - Homo sapiens (Human)	PSB1_HUMAN	26 kDa				93%
48	Ras-related protein Rab-24 - Homo sapiens (Human)	RAB24_HUMAN	23 kDa				93%

Abbildung 27 (Fortsetzung): Potentielle Interaktionspartner von LMP1 aus der MALDI-Analyse von TEV-Eluaten aus TEV-LCL5 Zellen

Dargestellt sind vier unabhängige Experimente mit Probe (TEV-Eluat aus TEV-LCL5) und zugehöriger Kontrolle (TEV-Eluat aus 721), jeweils bestehend aus je drei HPLC-Läufen mit nachfolgender MALDI-Analyse. Die Daten wurden mit Hilfe der Software Scaffold ausgewertet. Proteine, die auch in der Kontrolle vorhanden waren, wurden als Kontamination entfernt. Dargestellt sind identifizierte Proteine mit ihrer *Accession Number* in Swissprot, ihrem Molekulargewicht und der Wahrscheinlichkeit ihrer Identifikation. Der Schwellenwert für eine glaubwürdige Identifizierung wurde auf 90 % gesetzt.

#	Identified Proteins	Accession Number	Molecular Weight	Probet1	Probet2	Probet3	Probet4
49	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H ¹ - Homo sapiens (Human)	HNRH2_HUMAN	49 kDa				92%
50	Caspase recruitment domain-containing protein 11 - Homo sapiens (Human)	CAR11_HUMAN	133 kDa	91%			
51	Cysteine and glycine-rich protein 1 - Homo sapiens (Human)	CSPRP1_HUMAN	21 kDa	91%			
52	Homeobox protein cut-like 2 - Homo sapiens (Human)	CUTL2_HUMAN	154 kDa	91%			
53	Interferon-induced transmembrane protein 1 - Homo sapiens (Human)	IFM1_HUMAN	14 kDa	91%			
54	RNA-binding protein MEX3A - Homo sapiens (Human)	MEX3A_HUMAN	54 kDa	91%			
55	Protocadherin gamma A8 precursor - Homo sapiens (Human)	PCDG8_HUMAN	101 kDa	91%			
56	Ras-related protein Rab-8B - Homo sapiens (Human)	RAB8B_HUMAN	24 kDa	91%			
57	Usherin precursor - Homo sapiens (Human)	USH2A_HUMAN	576 kDa	91%			
58	Myosin-11 - Homo sapiens (Human)	MYH11_HUMAN	227 kDa		90%		
59	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial precursor - Homo sapiens (Human)	ATPA_HUMAN	60 kDa		90%		
60	DnaJ homolog subfamily C member 8 - Homo sapiens (Human)	DNAJ8_HUMAN	30 kDa		90%		
61	GRP1-associated protein 1 - Homo sapiens (Human)	GRAP1_HUMAN	96 kDa		90%		
62	Kelch-like protein 20 - Homo sapiens (Human)	KLH20_HUMAN	68 kDa		90%		
63	Microsomal triglyceride transfer protein large subunit precursor - Homo sapiens (Human)	MTP_HUMAN	99 kDa		90%		
64	Probable E3 ubiquitin-protein ligase MYCBP2 - Homo sapiens (Human)	MYCB2_HUMAN	510 kDa		90%		
65	Protein phosphatase 1 regulatory subunit 12A - Homo sapiens (Human)	MYPT1_HUMAN	115 kDa		90%		
66	Transferrin receptor protein 1 - Homo sapiens (Human)	TFR1_HUMAN	85 kDa		90%		
67	Interferon-induced 17 kDa protein precursor [Contains: Ubiquitin cross-reactive protein - Homo sapiens (Human)]	UCRP_HUMAN	18 kDa		90%		
68	Voltage-dependent L-type calcium channel subunit alpha-1S - Homo sapiens (Human)	CAC1S_HUMAN	212 kDa		90%		
69	Cytochrome c oxidase subunit 4 isoform 1, mitochondrial precursor - Homo sapiens (Human)	COX4I_HUMAN	20 kDa		90%		
70	Interleukin-28A precursor - Homo sapiens (Human)	IL28A_HUMAN	22 kDa		90%		
71	Prohibitin - Homo sapiens (Human)	PHB_HUMAN	30 kDa		90%		
72	Protein SXX5 - Homo sapiens (Human)	SSX5_HUMAN	22 kDa		90%		

Abbildung 27 (Fortsetzung): Potentielle Interaktionspartner von LMP1 aus der MALDI-Analyse von TEV-Eluaten aus TEV-LCL5 Zellen

Dargestellt sind vier unabhängige Experimente mit Probe (TEV-Eluat aus TEV-LCL5) und zugehöriger Kontrolle (TEV-Eluat aus 721), jeweils bestehend aus je drei HPLC-Läufen mit nachfolgender MALDI-Analyse. Die Daten wurden mit Hilfe der Software Scaffold ausgewertet. Proteine, die auch in der Kontrolle vorhanden waren, wurden als Kontamination entfernt. Dargestellt sind identifizierte Proteine mit ihrer *Accession Number* in Swissprot, ihrem Molekulargewicht und der Wahrscheinlichkeit ihrer Identifikation. Der Schwellenwert für eine glaubwürdige Identifizierung wurde auf 90 % gesetzt.

Auffällig an den in Abbildung 27 gelisteten potentiellen LMP1-Interaktionspartnern ist, dass keine bereits beschriebenen Interaktionspartner enthalten sind. Tatsächlich konnte TRAF5 in einer Reinigung mit einem Total Ion Score von 52% gefunden werden, erfüllte damit jedoch nicht die im Methodenteil unter Abschnitt 3.6.3 beschriebenen Kriterien. Obwohl TRAF3 in allen Western-Blot-Analysen nachgewiesen werden konnte, wurde es in der LC-MS/MS-Analyse nicht identifiziert. Eine mögliche Ursache für das Nichtauftreten dieser bekannten Interaktionspartner könnte eine ungünstige Größenverteilung der Peptide nach tryptischem Verdau darstellen. Eine andere Möglichkeit liegt in dem Ionisierungsverhalten der generierten Peptide. TRAF-Proteine lassen sich mit Trypsin in Fragmente geeigneter Größe spalten. Experimente mit aufgereinigtem bakteriell exprimierten TRAF2 zeigten jedoch, dass es sich erst bei sehr großen Proteinmengen (80 µM) mittels MALDI/MS/MS nachweisen lässt (Daten nicht gezeigt). Dieses Verhalten spricht für eine schlechte Ionisierung und könnte erklären, wieso die unter endogenen Bedingungen aufgereinigten TRAF-Proteine in diesem Ansatz nicht detektiert werden konnten.

Trotz des zusätzlichen Reinigungsschrittes durch den TEV-Verdau wurden noch immer Bestandteile des Zytoskeletts in den Proben identifiziert. Im Gegensatz zu der IP von HA-LMP1 ohne TEV-Verdau (vgl. Abschnitt 4.1.3) werden jetzt auch Proteine anderer Gruppen gefunden. Sie sind in Tabelle 4 aufgeführt.

Am interessantesten sind Proteine aus dem Bereich der Signaltransduktion. Hierzu gehören zum Beispiel die Serin/Threonin Proteinphosphatase 1 (PP1), 14-3-3 oder Interleukin-16 (IL-16).

Faktoren des Ubiquitin-Proteasom-Systems konnten ebenfalls im LMP1-Komplex nachgewiesen werden, etwa eine vermutliche E3 Ubiquitin-Ligase und Proteasom-Untereinheiten. LMP1 wird in hohem Maße durch Degradation reguliert, so dass es nicht verwundert, solche Proteine zu detektieren. Darüber hinaus können auch Signaltransduktionswege durch Ubiquitinierung reguliert und aktiviert werden. So wird etwa RIP durch die Interaktion mit LMP1 ubiquitiniert und damit aktiviert (Huye et al., 2007).

Auch einige Proteine, die eine Funktion im Nukleus einnehmen, wie das Histon H4 oder das heterogene nukleare Ribonukloprotein H', wurden gefunden. Bei diesen Gruppen ist der Bezug zu LMP1 weniger klar. Die zum Teil hohe Expression der Proteine legt nahe, dass es sich um Artefakte handeln könnte.

Die Gruppe der Proteine, deren Zusammenhang mit LMP1 nicht erkennbar war oder über deren Funktion noch wenig bekannt ist, wurde unter „Andere“ zusammengefasst.

Eindeutige Kontaminationen wie z.B. IgG oder Trypsin, die aus der Aufreinigung oder dem Trypsin-Verdau resultieren, wurden aus der Liste im Vorfeld entfernt.

Tabelle 4: Potenzielle Interaktionspartner von LMP1 geordnet nach ihrer Funktion.

Signaltransduktion	Serin/Threonin-Proteinphosphatase 1α katalytische Untereinheit Serin/Threonin-Proteinphosphatase 1 regulatorische Untereinheit 12A CD48 Antigen Vorläufer 14-3-3 Protein β/α 14-3-3 Protein ζ/δ Interleukin-16 Vorläufer
---------------------------	---

	<p>Protein C14orf166 Guanin Nukleotid-bindendes Protein G(I) α-2 Untereinheit Wachstumsfaktor-Rezeptor-gebundenes Protein 2 Ras-verwandtes Rab-Protein-24 Ras-verwandtes Rab-Protein-8B Caspase-rekrutierende Domäne enthaltendes Protein 11 Interferon-induziertes Transmembranprotein Interleukin-28A Vorläufer Prohibitin Prohibitin 2</p>
Zytoskelett und Adhäsion	<p>Myosin leichtes Polypeptid 6 F-Aktin <i>capping</i> Protein Untereinheit α-1 Tropomodulin 3 Myosin 10 Myosin 11 Twinstrobin 2 Spektrin α-Kette des Gehirns Spektrin β-Kette des Gehirns 1 Coronin 1C α-Aktinin 4 Vasodilatator-stimuliertes Phosphoprotein Integrin α-E Vorläufer Protocadherin γ A8 Vorläufer Usherin Vorläufer</p>
Proteasom und Ubiquitinierung	<p>Proteasom-Untereinheit α Typ 1' Proteasom-Untereinheit β Typ 1 Vorläufer Kelch-ähnliches Protein 20 Vermutliche E3 Ubiquitin Proteinligase MYCBP2 Interferon-induzierter 17 kDa Proteinvorläufer, der ein Ubiquitin kreuzreaktives Protein enthält</p>
Nukleare Proteine	<p>Histon H4 Nicht-POU-Domäne-enthaltendes Oktamer-Bindeprotein Jumonji/ARID-Domäne enthaltendes Protein 1C Heterogenes nukleares Ribonukleoprotein H' Histon-Lysin N-Methyltransferase, H3-Lysin 79 spezifisch</p>
Andere und unbekannte Proteine	<p>EF-Hand-Domäne enthaltendes Protein 2 Hämoglobin Untereinheit β β-2-Mikroglobulin Vorläufer Cytochrom b5 Typ B Vorläufer Polypyrimidin-Trakt-bindendes Protein 1</p>

<p>Elongationsfaktor 1-α 2 Proteindisulfidisomerase A3 Vorläufer Staphylococcus-Nuklease-Domäne-enthaltendes Protein 1 Triosephosphatisomerase Ryanodin-Rezeptor 3 ATP-Synthase B-Kette, mitochondrialer Vorläufer ATP-Synthase α-Untereinheit, mitochondrialer Vorläufer Uncharakterisiertes Protein C1orf77 Zelluläres-Nukleinsäure-bindendes Protein Glutathion S-Transferase P Nukleosiddiphosphase Kinase A Cystein- und Glyzin-reiches Protein 1 Homeobox-Protein <i>Cut-like 2</i> RNA-bindendes Protein MEX3A DnaJ-Homolog Unterfamilie C Mitglied 8 GRIP1-assoziiertes Protein 1 Mikrosomales Triglycerid-Transportprotein, Vorläufer der großen Untereinheit Transferrin-Rezeptorprotein 1 Spannungsabhängiger L-Typ Kalziumkanal Untereinheit α-1S Cytochrom C-Oxidase Untereinheit 4 Isoform 1, mitochondrialer Vorläufer Protein SSX5</p>
--

4.1.6 Bestätigung der Interaktion von CD48 mit LMP1

Ein potentieller Interaktionspartner von LMP1, der sowohl in der massenspektrometrischen Analyse aus IPs (vgl. Abbildung 15) als auch aus den TEV-Verdauen (vgl. Abbildung 27) identifiziert werden konnte, ist CD48. Während das Protein in dem ersten Ansatz nur in einer Analyse mit einer Wahrscheinlichkeit von 88 % gefunden wurde, erreicht es in der optimierten Analyse eine hohe Signifikanz. Auch wenn die einzelnen Wahrscheinlichkeiten mit 87 % und 74 % unterhalb des geforderten Schwellenwerts lagen, wird es durch die doppelte Identifikation mit hoher Wahrscheinlichkeit identifiziert. Bei der Auswertung der Einzeläufe mit Hilfe der GPS-Explorer-Software wurde es sogar in drei Läufen mit 99,8 %, 99,9 % und 91 % detektiert. In Abbildung 28 ist ein MS/MS-Spektrum eines Peptides von CD48 exemplarisch dargestellt. Hierbei fällt auf, dass in dem Spektrum beinahe vollständige y- und b-Reihen gefunden werden konnten. Das Spektrum stützt damit die Identifizierung.

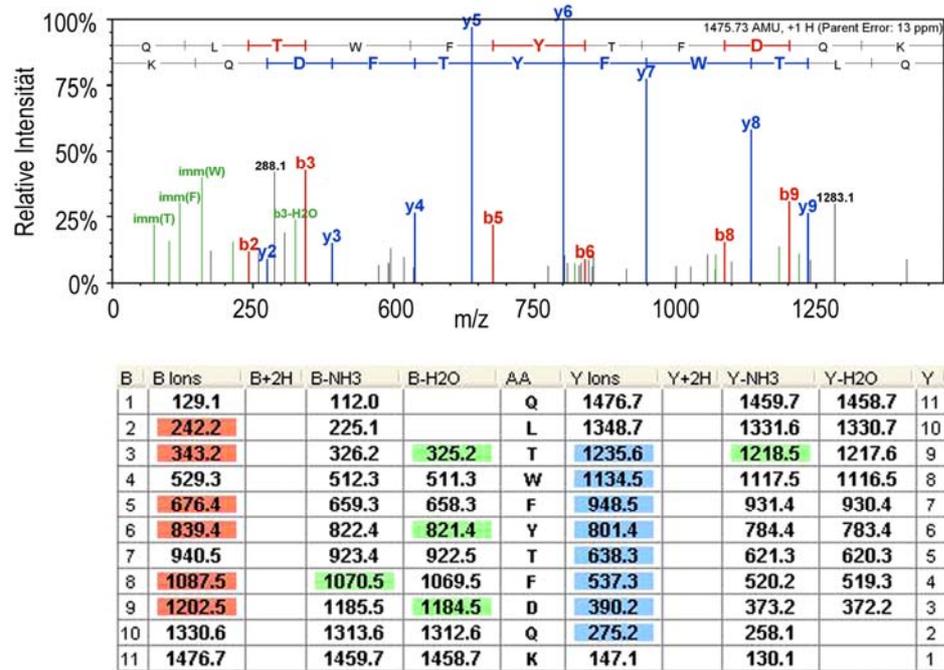


Abbildung 28: MS/MS-Spektrum eines CD48-Peptids.

Gezeigt ist das MS/MS-Spektrum eines Peptids mit einer Masse von 1476,7 Da und den dazugehörigen charakteristischen Fragmenten der y- und b-Ionen Reihen. Die einzelnen y- und b-Ionen sind in tabellarischer Form aufgeführt. Die vorhandenen y-Ionen sind blau, die vorhandenen b-Ionen rot hervorgehoben.

Die Interaktion zwischen LMP1 und CD48 sollte jetzt unabhängig von massenspektrometrischen Verfahren überprüft werden. Dazu wurde aus 1×10^8 Zellen der Linien 721, TEV-LCL5 und HA-LCL3 eine IP mit α -HA-Antikörper (12CA5) und anschließender Western-Blot-Analyse durchgeführt.

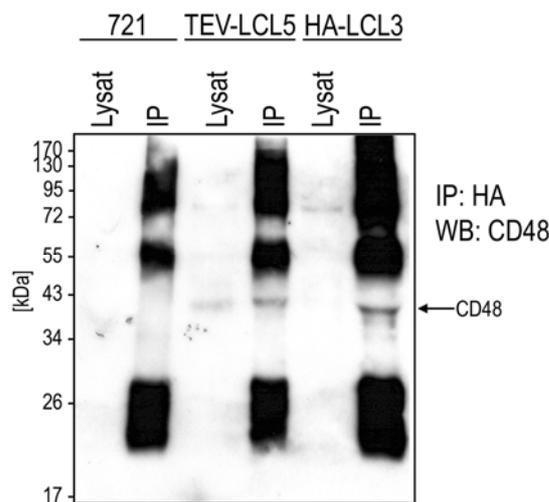


Abbildung 29: Endogenes CD48 kopräzipitiert spezifisch mit LMP1.

1×10^8 Zellen der Linien 721, TEV5 und LCL3 wurden in IP-Lysepuffer lysiert. Anschließend wurde eine Immunpräzipitation mit α -HA-Antikörper (12CA5) (Roche) durchgeführt. In der Western-Blot-Analyse wurde CD48 mit dem spezifischen Antikörper FL-243 (Santa Cruz Biotechnology) durchgeführt.

Wie in Abbildung 29 gezeigt, erkennt der CD48-spezifische Antikörper in den IPs aus HA-LCL3 und TEV-LCL5 eine Bande bei einem scheinbaren Molekulargewicht von 43 kDa, also der erwarteten Größe von

CD48 (Fukushima et al., 2005). In der Negativkontrolle, der IP aus 721, ist diese Bande nicht zu erkennen, so dass gezeigt werden konnte, dass sich CD48 mit LMP1 spezifisch kopräzipitieren lässt. Da die verwendeten Lysate eine geringe Proteinkonzentration aufwiesen, lag CD48 hier am Rande (TEV-LCL5) bzw. unterhalb (HA-LCL3 und 721) der Nachweisgrenze.

4.1.7 Bestätigung der Interaktion von TNIK mit LMP1

Ein weiteres interessantes Protein, das in der Auswertung mit der GPS-Explorer Software mit einem *Total Ion Score* von über 98% identifiziert wurde, ist die *TRAF2 and Nck interacting kinase* (TNIK). Hierbei konnten zwei Peptide gefunden werden. Ein MS/MS-Spektrum eines der identifizierten Peptide von TNIK ist in Abbildung 30 dargestellt. Dieses Protein wird in der Analyse mit Scaffold nicht identifiziert, was mit der höheren Stringenz des verwendeten Algorithmus zu erklären ist.

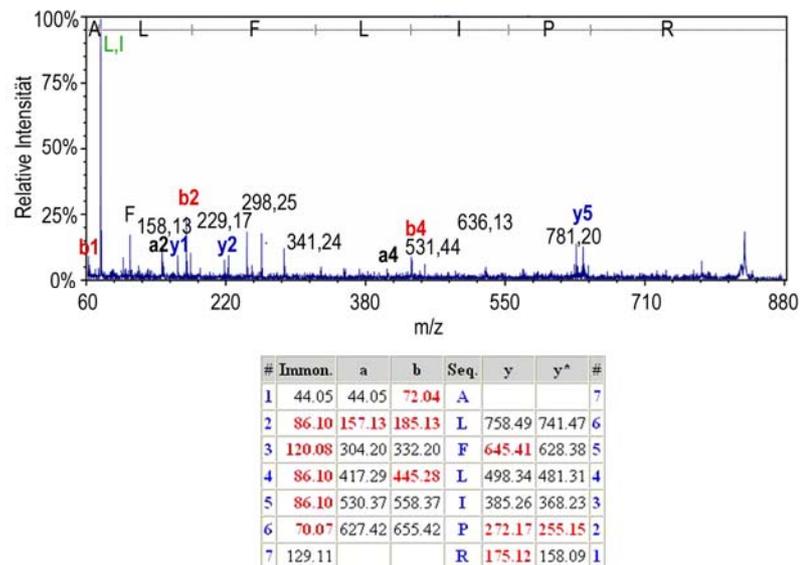


Abbildung 30: MS/MS-Spektrum eines TNIK-Peptids.

Gezeigt ist das MS/MS-Spektrum eines 1476,7 Da großen Peptids. Die einzelnen Fragmente sind in tabellarischer Form aufgeführt. Die vorhandenen y-Ionen sind blau, die b-Ionen rot im Spektrum hervorgehoben. In der Tabelle sind identifizierte Peptide rot dargestellt.

Die Interaktion zwischen TNIK und LMP1 in LCLs sollte mit einem anderen, unabhängigen Verfahren bestätigt werden. Dazu wurden ca. 1×10^8 721 Zellen in IP-Lysepuffer lysiert und TNIK mit einem spezifischen Antikörper präzipitiert. Wie in Abbildung 31 dargestellt, wird TNIK durch die Präzipitation deutlich angereichert. Die Western-Blot-Analyse mit LMP1-spezifischem Antikörper zeigt, dass LMP1 spezifisch mit TNIK kopräzipitiert. In der Isotypkontrolle ist LMP1 nicht detektierbar, hier weist der Antikörper lediglich eine deutlich höhere laufende, unspezifische Bande nach. Dieses Experiment wurde in Zusammenarbeit mit Anna Skoda durchgeführt.

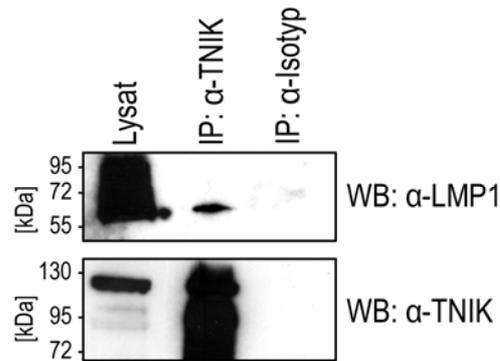


Abbildung 31: TNIK und LMP1 interagieren in LCLs.

Um LMP1 mit TNIK zu präzipitieren, wurden 1×10^8 721 Zellen in IP-Lysepuffer lysiert. Pro Ansatz wurden $4 \mu\text{g}$ TNIK-spezifischer Antikörper (BD Biosciences) bzw. einer Isotypkontrolle kovalent an $40 \mu\text{l}$ ProteinA Sepharose *beads* gekoppelt und anschließend über Nacht mit den Lysaten inkubiert. Dargestellt sind Western-Blot-Analysen mit TNIK-spezifischem Antikörper (BD Biosciences) und mit dem LMP1-spezifischen Antikörper 1G6-3 (E. Kremmer).

Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, welche LMP1-Domäne die Bindung von TNIK an LMP1 vermittelt. In Zusammenarbeit mit Anna Skoda wurden HEK293 Zellen mit HA-LMP1 wt und verschiedenen Mutanten transfiziert und wiederum eine TNIK-Präzipitation durchgeführt. In der Mutante HA-LMP1 $\Delta 371-386$ sind die letzten 16 Aminosäuren deletiert, so dass diese Mutante kein TRADD oder RIP mehr binden kann und die CTAR2-abhängigen Signalwege nicht mehr aktiviert werden können. In HA-LMP1 PQT \rightarrow AAA ist die TRAF-Bindestelle innerhalb von CTAR1 mutiert, was zu einem Verlust der Aktivierung des nicht-kanonischen NF- κ B Signalweges durch LMP1 führt. In der Doppelmutante HA-LMP1 PQT \rightarrow AAA $\Delta 371-386$ sind sowohl CTAR1 als auch CTAR2 zerstört. Mit Hilfe dieser Mutanten sollte aufgeklärt werden, ob die Bindung zwischen TNIK und LMP1 von CTAR1 oder CTAR2 vermittelt wird.

Obwohl alle LMP1-Konstrukte gleich exprimiert wurden und TNIK in allen Ansätzen in gleichen Mengen präzipitiert wurde, konnte HA-LMP1 nur dann in der IP detektiert werden, wenn es über ein funktionsfähiges CTAR2-Motiv verfügte (siehe Abbildung 32). TNIK bindet demnach über CTAR2 an LMP1. Die Frage, ob diese Bindung direkt oder indirekt ist und über welche Faktoren diese Bindung ggf. vermittelt wird, kann zum jetzigen Zeitpunkt nicht beantwortet werden (vgl. Kapitel 5.1.5).

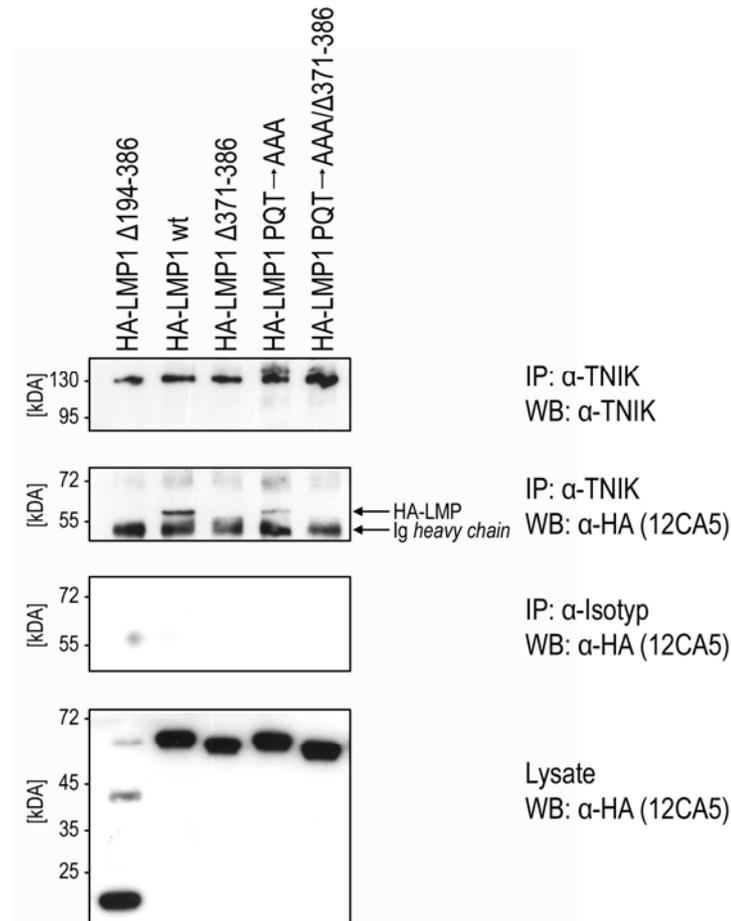


Abbildung 32: TNIK interagiert mit LMP1 über CTAR2.

HEK293 Zellen wurden in 15 cm-Schalen ausgesät und bei einer Konfluenz von ca. 80 % mit 20 μ g DNA folgender Expressionsplasmide transfiziert: HA-LMP1 Δ 194-386, HA-LMP1 wt, HA-LMP1 Δ 371-386, HA-LMP1 PQT \rightarrow AAA, HA-LMP1 PQT \rightarrow AAA/ Δ 371-386. 20 h nach Transfektion wurden die Zellen in IP-Lysepuffer lysiert. Pro Ansatz wurden 4 μ g TNIK-spezifischer Antikörper (BD Biosciences) bzw. eine Isotypkontrolle kovalent an 40 μ l ProteinA Sepharose *beads* gekoppelt und anschließend mit den Lysaten über Nacht inkubiert. Dabei wurden pro Ansatz jeweils 1,5 mg Gesamtprotein eingesetzt. Dargestellt sind Western-Blot-Analysen der IPs mit einem TNIK-spezifischen Antikörper (BD Biosciences) und mit dem LMP1-spezifischen Antikörper 1G6-3 (E. Kremmer). Um die Expression der LMP1-Konstrukte zu überprüfen, wurde eine Western-Blot-Analyse mit dem HA-spezifischen Antikörper 12CA5 (Roche) von den Lysaten durchgeführt.

4.2 Verifizierung und Charakterisierung von SHP-1 als LMP1-bindendes Protein

Nachdem sich der erste Teil der Arbeit mit der Identifizierung von neuen potenziellen Interaktionspartnern von LMP1 beschäftigt hat, sollte im zweiten Teil ein Kandidat genauer untersucht werden. Die Phosphatase SHP-1 wurde in einem GST-Kopräzipitationsansatz in unserer Arbeitsgruppe durch Thomas Knöfel identifiziert. Der von ihm verwendete Versuchsaufbau ist in Abbildung 33 beschrieben.

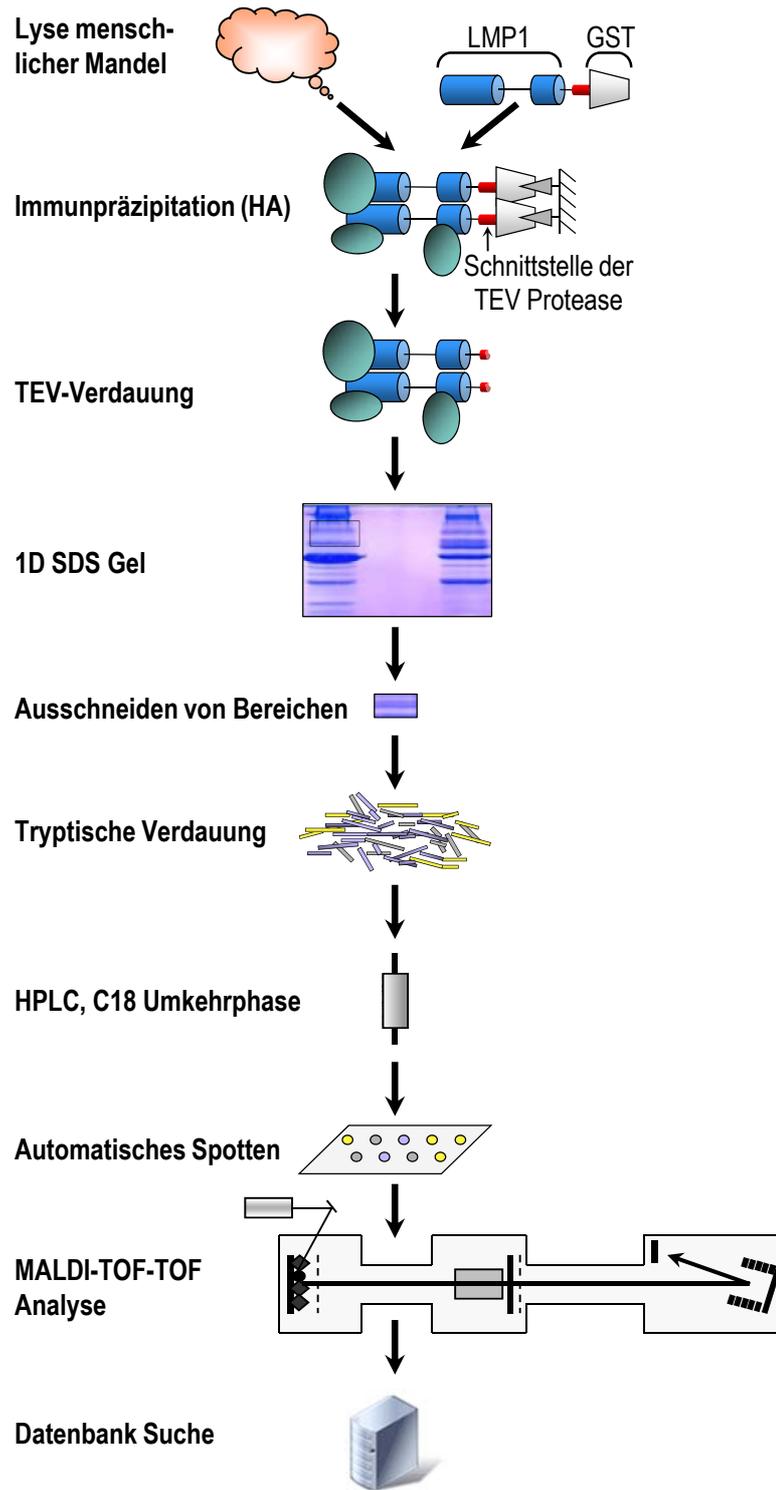


Abbildung 33: Prozessschritte zur Identifikation von LMP1-interagierenden Proteinen aus Tonsillen-Lysaten. Dargestellt ist eine schematische Übersicht zur massenspektrometrischen Analyse von LMP1-Bindeproteinen durch Kopräzipitationsexperimente mit GST-LMP1 Fusionsproteinen aus Tonsillen-Lysaten. Für nähere Erläuterungen des Vorgehens siehe Text.

Hierzu wurden menschliche Mandeln (Tonsillen) zerkleinert und lysiert. Die Lysate wurden dann über Nacht mit aufgereinigtem GST-TEV-LMP1 (vgl. Abschnitt 4.1.4.2) inkubiert, das mit Glutathion-Sepharose *beads* immobilisiert worden war. Als Kontrolle diente mit Glutathion-Sepharose *beads* immobilisiertes GST. Nach der Präzipitation wurde der C-Terminus von LMP1 von dem immobilisierten GST mit der TEV-

Protease geschnitten und das TEV-Eluat tryptisch verdaut. Die Peptide wurden über eine HPLC fraktioniert und massenspektrometrisch analysiert. Hierbei wurde SHP-1 mit einem Mascot *Ion Score* von 49 (Rank 1) identifiziert, was einer statistisch signifikanten Identifikation entspricht. Mit den in dieser Arbeit verwendeten massenspektrometrischen Verfahren konnte SHP-1 nicht als LMP1-interagierendes Protein identifiziert werden. Warum das so ist, wird Gegenstand eines späteren Abschnitts dieser Arbeit sein (vgl. Kapitel 5.2.1).

4.2.1 Verifikation von SHP-1 als LMP1-interagierendes Protein

Um zu zeigen, dass SHP-1 tatsächlich auch unter endogenen Bedingungen an LMP1 bindet, sollte die Interaktion mit einem unabhängigen Verfahren alternativ zur Massenspektrometrie gezeigt werden. Hierzu wurden IPs aus 1×10^8 HA-LCL3 Zellen sowie als Kontrolle aus 1×10^8 721 Zellen mit dem α -HA-Antikörper 12CA5 (Roche) durchgeführt und eine Western-Blot-Analyse mit LMP1- und SHP-1-spezifischem Antikörper durchgeführt.

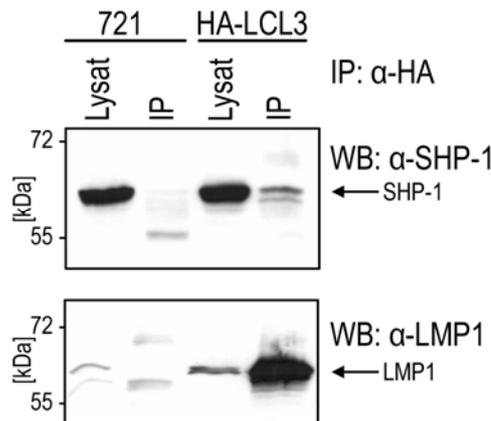


Abbildung 34: Endogenes SHP-1 kopräzipitiert spezifisch mit LMP1.

1×10^8 Zellen der Linien 721 und LCL3 wurden in IP-Lysepuffer lysiert und eine Immunpräzipitation mit dem α -HA-Antikörper 12CA5 (Roche) durchgeführt. Es wurden Western Blot-Analysen mit einem SHP1-spezifischen Antikörper (BD Biosciences) sowie mit dem LMP1-spezifischen Antikörper CS1-4 (Dako) vorgenommen.

Abbildung 34 zeigt, dass in der LMP1 Immunpräzipitation aus HA-LCL3 Zellen auch SHP-1 nachgewiesen werden kann. In der Kontroll-IP aus 721 Zellen ist keine SHP-1 spezifische Bande erkennbar, obwohl SHP-1 auch in diesen Zellen im Lysat in hohem Maße exprimiert wird. So konnte die Interaktion zwischen endogenem SHP-1 und LMP1 in LCLs bestätigt werden.

4.2.2 Kartierung der SHP-1 Bindestelle von LMP1

Nachdem gezeigt werden konnte, dass SHP-1 tatsächlich mit LMP1 interagiert, sollte im nächsten Schritt die Bindestelle von SHP-1 an LMP1 genauer untersucht werden. Hierzu wurden GST-Koprazipitationen aus DG75-Lysaten durchgeführt. Bei der Zelllinie DG75 handelt es sich um eine EBV-negative Burkitt-Lymphom Linie, so dass GST-LMP1-Köderproteine nicht mit endogenem LMP1 aus der Zelle um die Bindung von SHP-1 konkurrieren. Die Köderproteine wurden in Bakterien exprimiert und über Glutathion-Sepharose immobilisiert (vgl. die Abschnitte 3.5.7 und 3.5.8). Die so aufgereinigten Fusionsproteine wur-

den über Nacht mit dem Lysat aus $3,5 \times 10^8$ Zellen inkubiert und anschließend analysiert, ob sie SHP-1 gebunden hatten. Als Negativkontrolle diente GST, während die Positivkontrolle GST-LMP1 (181-386) darstellte, ein Fusionsprotein aus GST und dem C-Terminus von LMP1 (As 181-386). Darüber hinaus wurden mehrere andere Mutanten verwendet. GST-LMP1 (181-386) PQT→AAA besitzt eine Mutation in CTAR1. Der Austausch des PxQxT-Motivs zu AxAxA resultiert in einem Verlust der TRAF-Bindung an CTAR1. GST-LMP1 (181-370) enthält nur die As 181-370. Diese Deletion in CTAR2 verhindert die Interaktion mit TRADD und RIP. GST-LMP1 (181-370) PQT→AAA vereint die beiden zuvor beschriebenen Mutationen auf ein Molekül, so dass weder CTAR1 noch CTAR2 funktionell ist. GST-LMP1 (181-230) enthält nur die As 181-230, während in GST-LMP1 (181-386) $\Delta 212-231$ die As 212-231 aus dem C-Terminus von LMP1 deletiert sind. In der Mutante GST-LMP1 (181-386) sub1 sind die As 189-201 durch Alanine substituiert (Sandberg et al., 1997).

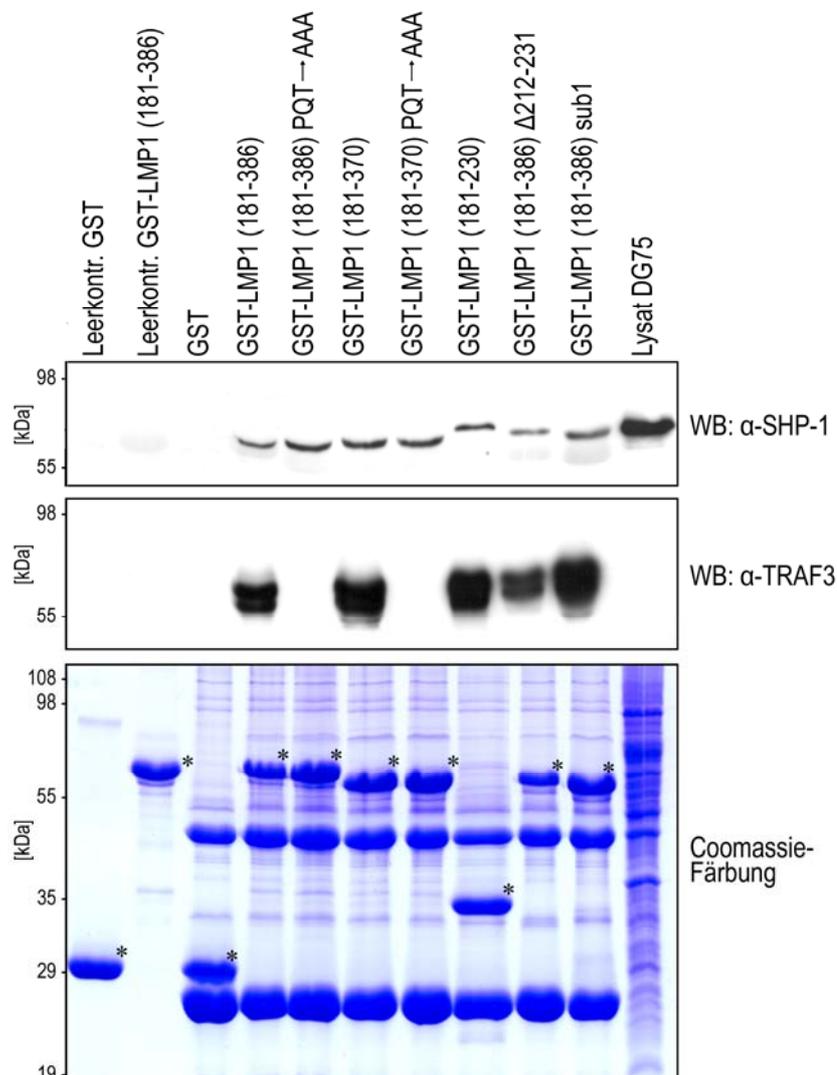


Abbildung 35: LMP1 bindet SHP-1 über den C-Terminus, die bekannten Bindemotive sind nicht involviert.

Klare Zellysate aus je $3,5 \times 10^8$ DG75 Zellen pro Ansatz wurden über Nacht mit an Glutathion-Sepharose *beads* immobilisiertem GST bzw. GST-LMP1-Fusionen bei 4°C inkubiert. Als Leerkontrolle dienten Glutathion-Sepharose *beads* immobilisiertem GST bzw. GST-LMP1, die mit Lysepuffer anstelle von Zellysaten inkubiert wurden. Am folgenden Tag wurden die *beads* gewaschen und die präzipitierten Proteine mit Hilfe von SDS-PAGE aufgetrennt. Eines der Gele wurde mit Coomassie gefärbt, mit zwei anderen wurden Western-Analysen mit SHP1- (C-21; BD Biosciences) und TRAF3- (H-20; Santa Cruz Biotechnology) spezifischen Antikörpern durchgeführt. In der Coomassie-Färbung sind die GST-Fusionsproteine durch * gekennzeichnet.

Interessanterweise konnten alle verwendeten Mutanten mit Ausnahme der Negativkontrolle SHP-1 noch binden, wie in Abbildung 35 in der Western-Blot-Analyse mit SHP-1-spezifischem Antikörper zu erkennen ist. TRAF3 wies das erwartete Muster auf, in dem die Bindung an LMP1 von dem PxQxT-Motiv abhängt. War dies mutiert, band TRAF3 nicht mehr. Mutationen in der Nähe des Motivs, wie bei GST-LMP1 (181-386) Δ 212-231, führten zu einer verminderten TRAF3-Bindung.

Es fällt auf, dass sich die SHP-1-spezifischen Banden nicht auf exakt gleicher Höhe befanden. Diese Abweichungen lassen sich dadurch erklären, dass GST-LMP1 und SHP-1 über ein sehr ähnliches Molekulargewicht verfügen. Dadurch, dass das bakterielle GST-LMP1 in sehr großen Mengen in den Proben vorhanden war (siehe Coomassiefärbung in der gleichen Abb.), verdrängt es das etwa gleich große SHP1 und drückt es an den unteren Rand der GST-LMP1 Banden. Dieses Phänomen tritt bei der Deletionsmutante GST-LMP1 (181-230) nicht auf, da es deutlich kleiner als SHP-1 ist.

Es ließ sich daher feststellen, dass die Interaktion von SHP-1 mit LMP1 unabhängig von TRAF war, da LMP1-Mutanten, die über keine funktionelle TRAF-Bindestelle mehr verfügten, mit SHP-1 interagieren konnten. Darüber hinaus scheint SHP-1 nicht über eines der bekannten Bindemotive für Signalproteine von LMP1 rekrutiert zu werden. Stattdessen musste ein neuer Bereich aus den As 181-230 für die Bindung verantwortlich sein.

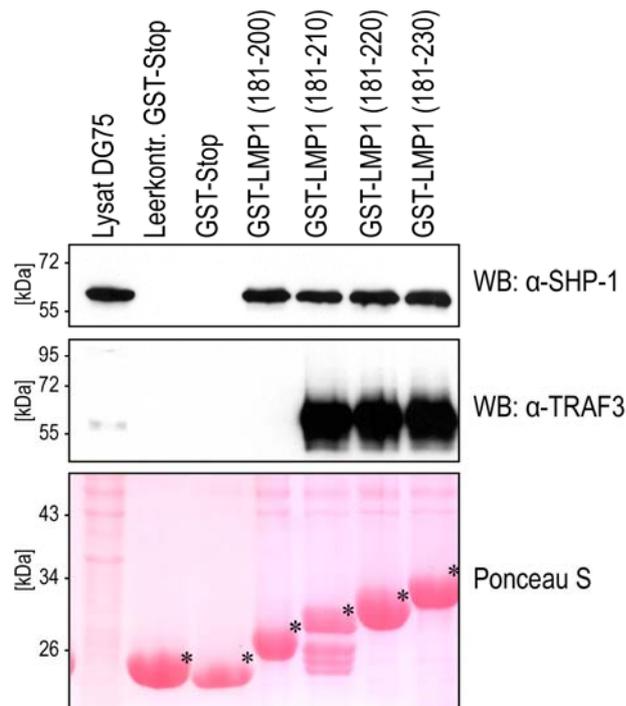


Abbildung 36: Für die Bindung an SHP-1 sind die Aminosäuren 191 bis 201 von LMP1 verantwortlich.

Klare Zelllysate aus je $4,8 \times 10^8$ DG75 Zellen pro Ansatz wurden über Nacht mit an Glutathion-Sepharose *beads* immobilisiertem GST bzw. GST-LMP1-Fusionen bei 4°C inkubiert. Am folgenden Tag wurden die *beads* gewaschen und die präzipitierten Proteine nach ihrem Molekulargewicht mit Hilfe von SDS-PAGE aufgetrennt. Es wurden Western-Blot-Analysen mit SHP-1- (C-21; BD Biosciences) und TRAF3- (H-20; Santa Cruz Biotech) spezifischen Antikörpern durchgeführt. In der Ponceau S-Färbung im unteren Teil der Abbildung sind die GST-Fusionsproteine durch * gekennzeichnet.

Um den Bereich, der für die Rekrutierung von SHP-1 verantwortlich ist, genauer zu analysieren, wurden weitere LMP1-Mutanten als GST-Fusionsproteine kloniert. Dass GST-LMP1 (181-230) noch SHP-1 binden konnte, schließt aus, dass die Bindestelle außerhalb von As 181-230 liegt. Um systematisch vorzugehen, wurden daher schrittweise jeweils weitere 10 As deletiert, so dass die Konstrukte GST-LMP1 (181-220), GST-LMP1 (181-210) und GST-LMP1 (181-200) entstanden (zur genauen Beschreibung der Klonierung siehe Abschnitte 3.3.11.1 und 3.3.11.2). Um sicherzustellen, dass SHP-1 nicht über die kurze Übergangssequenz zwischen GST und dem C-Terminus von LMP1 band, wurde eine neue Negativkontrolle kloniert. Diese verfügte nach dem GST noch über die besagte Übergangssequenz und wurde GST-stop genannt (siehe Abschnitt 3.3.11.3).

Analog zu dem vorangegangenen Experiment wurde mit diesen Konstrukten ein GST-Kopräzipitationsexperiment durchgeführt. Hierbei konnte ausgeschlossen werden, dass die Übergangssequenz für die Bindung von SHP-1 verantwortlich war (Abbildung 36). Die übrigen Konstrukte konnten jedoch alle SHP-1 binden.

Fasst man die Ergebnisse aus beiden Experimenten zusammen, bleibt nur noch ein sehr kleiner Bereich von acht As (${}_{181}\text{LIWMYYHG}_{188}$) übrig, der für die SHP-1 Bindung an LMP1 verantwortlich sein kann. Er ist schematisch in Abbildung 37 dargestellt. LMP1 enthält kein klassisches SHP-1-Bindemotiv. Betrachtet man allerdings die acht verbleibenden As, fällt eine gewisse Ähnlichkeit mit dem (atypischen) Bindemotiv von SHP-1 an die TNFR-Familie auf. Dieses Motiv wurde 2002 von Daigle et al. als YxxL beschrieben (Daigle et al., 2002), während die relevante Region in LMP1 ein „LlxxYY-Motiv“ (As 181-186) enthält. Die Zusammensetzung der As ist ähnlich, jedoch in umgekehrter Reihenfolge. Aufgrund dieser Annahme einer Ähnlichkeit wurden weitere Mutanten generiert, die auf dem Konstrukt GST-LMP1 (181-200) basierten. So wurde jeweils eines der beiden Tyrosine bzw. beide Tyrosine, das Leucin und das Isoleucin in Alanin konvertiert (GST-LMP1 (181-200) Y₁₈₅A, GST-LMP1 (181-200) Y₁₈₆A und GST-LMP1 (181-200) A₁₈₁AxxAA). Die Klonierungen sind in Abschnitt 3.3.11.2 genauer beschrieben.

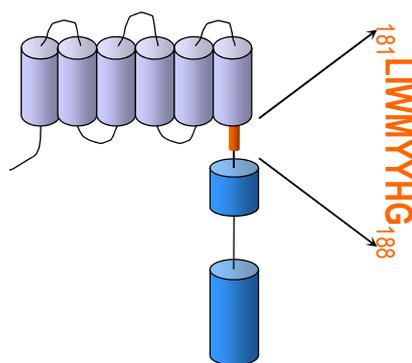


Abbildung 37: Schematische Darstellung der Aminosäuren, die die Bindung von SHP-1 an LMP1 vermitteln könnten.

Nach den Ergebnissen der Kopräzipitationsexperimente musste die Interaktion zwischen SHP-1 und LMP1 durch die As 181 bis As 188 von LMP1 vermittelt werden. Dieser Bereich einschließlich der Aminosäuresequenz in der Einbuchstaben-Annotation ist orange hervorgehoben.

Ob SHP-1 diese Mutanten noch binden konnte, wurde wiederum in einem Kopräzipitationsexperiment untersucht, das in Abbildung 38 dargestellt ist. Hierbei wurde GST-LMP1 (181-230) als Positivkontrolle

verwendet. Dieses Konstrukt hat gegenüber GST-LMP1 (181-200) den Vorteil, dass diese Mutante noch in der Lage ist TRAF3 zu binden, was eine weitere Kontrolle der Kopräzipitation darstellt. Während GST-LMP1 (181-200) SHP-1 deutlich rekrutierte, war die Bindung deutlich schwächer, wenn eines der beiden Tyrosine ausgetauscht war. In dem Konstrukt GST-LMP1 (181-200) A₁₈₁AxxAA war keine Interaktion mit SHP-1 mehr zu erkennen. Anhand dieser Ergebnisse ließ sich jedoch nicht endgültig klären, ob die beiden Tyrosine für die Interaktion mit SHP-1 verantwortlich waren oder ob das gesamte „LxxYY-Motiv“ benötigt wurde. Daher wurde das Konstrukt GST-LMP1 (181-200) A₁₈₅A kloniert (siehe Abschnitt 3.3.11.2), in dem beide Tyrosine nicht aber das Leucin und das Isoleucin zu Alanin mutiert sind. Das Kopräzipitationsexperiment mit dieser Mutante ist in Abbildung 39 dargestellt. Es wird deutlich, dass sowohl mit GST-LMP1 (181-200) A₁₈₁AxxAA als auch mit GST-LMP1 (181-200) A₁₈₅A kein SHP-1 präzipitiert wurde. Damit konnte gezeigt werden, dass für die Bindung von SHP-1 an LMP1 die beiden Tyrosine Y₁₈₅ und Y₁₈₆ essenziell sind. Das Bindemotiv weicht damit von der von Daigle et al. beschriebenen Sequenz ab. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass neben Y₁₈₅ und Y₁₈₆ weitere Aminosäuren innerhalb von LMP1 an der Bindung beteiligt sind.

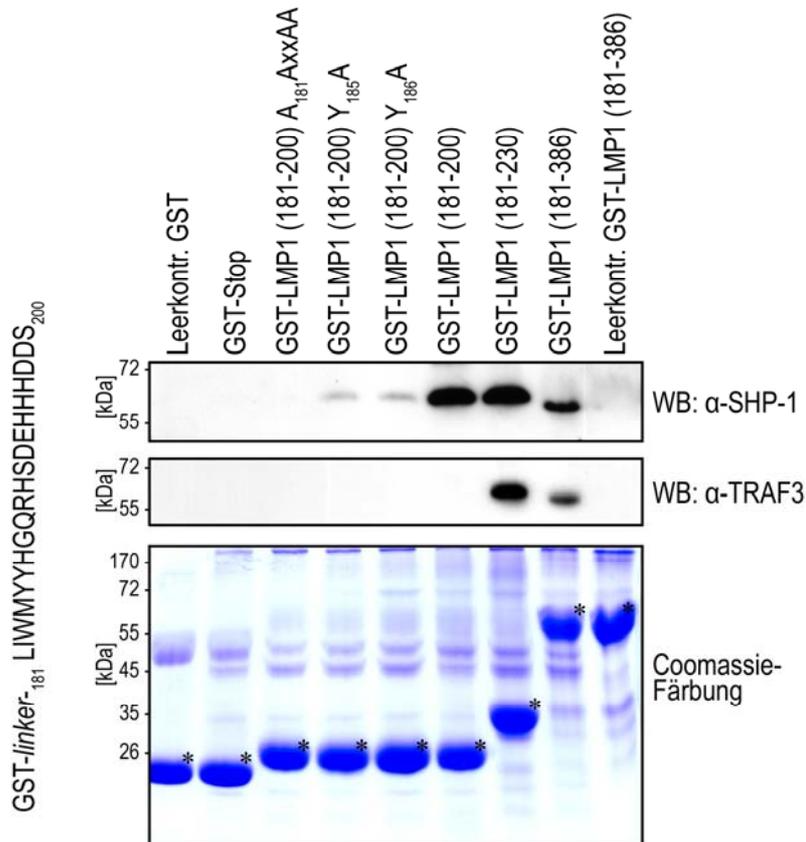


Abbildung 38: Die Tyrosine Tyr₁₈₅ und Tyr₁₈₆ in LMP1 sind für die SHP1-Bindung essentiell.

Klare Zellysate aus je $2,8 \times 10^8$ DG75 Zellen pro Ansatz wurden über Nacht mit an Glutathion-Sepharose *beads* immobilisiertem GST bzw. GST-LMP1-Fusionen bei 4°C inkubiert. Am folgenden Tag wurden die *beads* gewaschen und die präzipitierten Proteine nach ihrem Molekulargewicht mit Hilfe von SDS-PAGE aufgetrennt. Es wurden eine Coomassie-Färbung eines Gels sowie Western-Blot-Analysen mit SHP-1-spezifischen (C-21; BD Biosciences) und TRAF3-spezifischen (H-20; Santa Cruz Biotech) Antikörpern durchgeführt. In der Coomassie-Färbung sind die GST-Fusionsproteine durch * gekennzeichnet.

Die bisher bekannten Bindestellen von SHP-1 zeichnen sich durch die Anwesenheit von phosphorylierten Tyrosinen aus (Songyang et al., 1994). Die Frage, ob diese Phosphorylierung auch bei den Tyrosinen von LMP1 notwendig ist, kann zu diesem Zeitpunkt nicht mit absoluter Sicherheit beantwortet werden. Trotz ausführlicher Analysen der Phosphorylierungsstellen an LMP1 gibt es in der Literatur keinen Hinweis auf eine Tyrosin-Phosphorylierung. Weiterhin ist zu berücksichtigen, dass die Kopräzitationen mit bakteriell exprimierten GST-LMP1-Fusionen durchgeführt wurden, sie also ursprünglich nicht phosphoryliert waren. Es ist nicht auszuschließen, jedoch sehr unwahrscheinlich, dass die Tyrosine von GST-LMP1 erst im Lysat phosphoryliert werden, bevor SHP-1 binden kann.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die identifizierte Interaktionsstelle sowohl für LMP1 als auch für SHP-1 ein bisher unbekanntes Bindemotiv darstellt. Damit verfügt LMP1 neben CTAR1 und CTAR2 noch über eine weitere Region im C-Terminus des Proteins, die Interaktionspartner rekrutieren kann. Sie befindet sich N-terminal von CTAR1 direkt unter der Transmembrandomäne.

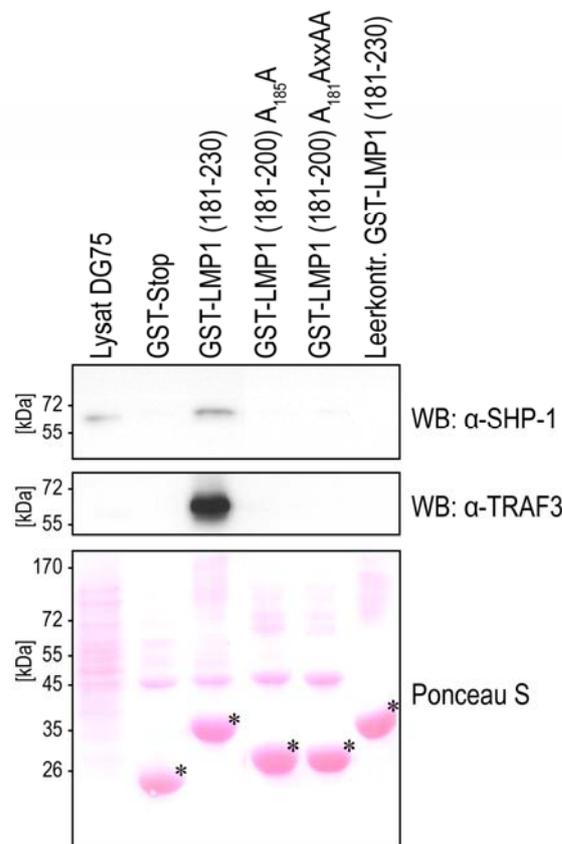


Abbildung 39: Leucin₁₈₁ und Isoleucin₁₈₆ sind keine zentralen Bestandteile des SHP-1-Bindemotivs an LMP1.

Klare Zelllysate aus je $4,8 \times 10^8$ DG75 Zellen pro Ansatz wurden über Nacht mit an Glutathion-Sepharose *beads* immobilisiertem GST bzw. GST-LMP1-Fusionen bei 4°C inkubiert. Am folgenden Tag wurden die *beads* gewaschen und präzipitiert. Anschließend wurden die Proteine nach ihrem Molekulargewicht mit Hilfe von SDS-PAGE aufgetrennt und Immunoblot-Analysen mit SHP1- spezifischen (C-21; BD Biosciences) und TRAF3- spezifischen (H-20; Santa Cruz Biotechnology) Antikörpern durchgeführt. In der Ponceau S-Färbung sind die GST-Fusionsproteine durch * gekennzeichnet.

Die Frage, ob es sich bei der Interaktion zwischen SHP-1 und LMP1 um eine direkte oder indirekte Bindung handelt, lässt sich mit den hier durchgeführten Experimenten nicht abschließend beantworten. So

könnten auch andere Faktoren, die sich mit SHP-1 im Zellysate befinden, die Bindung vermitteln. Da es sich aber um eine relativ starke, gut nachweisbare Interaktion handelt, ist es wahrscheinlicher, dass SHP-1 direkt mit LMP1 interagiert (vgl. auch hierzu auch Abschnitt 5.2.1).

4.2.3 Verifikation des SHP-1 Bindemotivs von LMP1 in humanen B-Zellen

Nachdem in GST-Kopräzipitationen die beiden Tyrosine Y₁₈₅ und Y₁₈₆ als SHP-1 Bindemotiv identifiziert werden konnten, sollte dieses Motiv im nächsten Schritt mit einem anderen experimentellen Verfahren überprüft werden. Koimmunpräzipitationen haben gegenüber den Kopräzipitationen mit bakteriell exprimierten GST-Fusionsproteinen aus Abschnitt 4.2.2 den Vorteil, dass sich der Komplex innerhalb der Zelle bilden kann. Daher sollte die Abhängigkeit der Interaktion von SHP-1 und LMP1 von Y₁₈₅ und Y₁₈₆ durch Koimmunpräzipitation aus humanen B-Zellen verifiziert werden.

Hierzu musste zunächst ein geeignetes System generiert werden. Da für Koimmunpräzipitationen mit endogenen Proteinen oft sehr große Zellmengen benötigt werden, ist ein transientes System nicht ideal. Stabile B-Zellen zu generieren, die dauerhaft exogen LMP1 exprimieren, ist aufgrund der Toxizität von größeren Mengen an LMP1 wenig erfolgversprechend (vgl. Abschnitt 4.1.1). Daher wurde das EREB2-5 Zellsystem verwendet (Kempkes et al., 1995; Kempkes et al., 1996). Bei diesen Zellen handelt es sich um LCLs, die auf dem EBV-Episom kein EBNA2-Gen enthalten. Stattdessen besitzen sie ein weiteres episomales Plasmid, das für eine Fusion der Hormonbindestelle des Östrogenrezeptors mit EBNA2 kodiert (EBNA2-ER). Durch die Fusion wird EBNA2 östrogeninduzierbar, so dass EREB2-5 Zellen ohne die Zugabe von Östrogen kein EBNA2 exprimieren. Da der virale LMP1-Promotor von dem Transkriptionsfaktor EBNA2-abhängig ist, kann in der Abwesenheit von Östrogen auch kein LMP1 gebildet werden. LCLs benötigen jedoch LMP1 für die Transformation, so dass EREB2-5 Zellen in Abwesenheit von Östrogen nicht überleben können. Dieser Effekt kann durch exogenes LMP1 teilweise revertiert werden. Da EBNA2 neben der Induktion von LMP1 noch andere essenzielle Aufgaben übernimmt, kann die Expression von exogenem LMP1 das Absterben von LMP1 nicht verhindern, sondern nur hinauszögern (Zimber-Strobl et al., 1996).

EREB2-5 Zellen haben jedoch den Vorteil, dass man durch den Entzug von Östrogen das endogene LMP1 abschalten und ggf. durch ein exogenes LMP1 ersetzen kann (vgl. Abbildung 40). Dieser neuartige Ansatz schafft damit ein induzierbares System, in dem das endogene LMP1 durch exogene LMP1 Mutanten ersetzt werden kann. Die Zellen wurden daher mit verschiedenen pRTS1-Konstrukten transfiziert. Hierbei handelt es sich um ein Vektorsystem, das episomal in den Zellen persistiert und über einen Doxycyclin-induzierbaren bidirektionalen Promotor verfügt (Bornkamm et al., 2005). Der Ausgangsvektor pRTS1 exprimiert eGFP und β -Laktamase. Von ihm leiten sich folgende LMP1-Konstrukte ab, bei denen die β -Laktamase durch LMP1 bzw. eine Mutante substituiert ist: pRTS1-LMP1 wt, pRTS1-LMP1 A₁₈₁AxxAA und pRTS1-LMP1 A₁₈₅A.

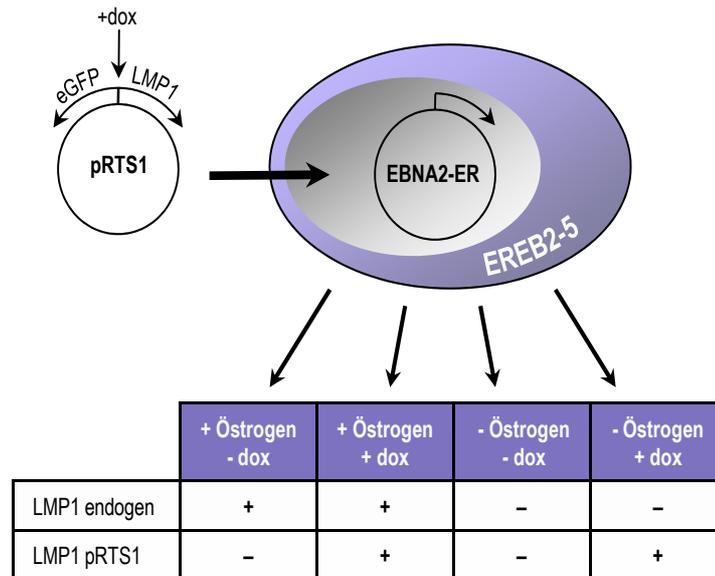


Abbildung 40: Schematische Darstellung des EREB-pRTS1-Systems.

Durch den Östrogen-induzierbaren Promotor kann EBNA2 in EREB2-5 Zellen nur in Anwesenheit von Östrogen exprimiert werden. Der virale LMP1-Promotor ist von EBNA2 abhängig. Wird in diese Zellen ein Doxycyclin-induzierbares LMP1-Expressionsplasmid (pRTS1) eingebracht, kann das endogene LMP1 durch das exogene ersetzt werden, wenn den Zellen kein Östrogen aber Doxycyclin zugesetzt wird.

Nach der Transfektion mit den oben erwähnten pRTS1-Konstrukten wurden die Zellen zunächst in Medium mit Östrogen expandiert. Da die Transfektionseffizienz mit 3-4 % sehr gering war, war es nötig, die transfizierten Zellen anzureichern. Obwohl die verwendeten Konstrukte über eine Puromycin-Resistenz verfügten, blieben Selektionen mit unterschiedlichen Puromycin-Konzentrationen erfolglos. Die Ursache hierfür bleibt unklar, da einige Zellen nachweislich das Konstrukt trugen. Daher wurden die transfizierten Zellen stattdessen durch FACS-Sortierung angereichert. Dazu wurden die GFP-Expression durch 1 µg/ml Doxycyclin induziert und die Zellen nach zwei Tagen in Kollaboration mit Herrn J.W. Ellward (Zellsortierservice des Helmholtz Zentrums München) im FACS sortiert. Die resultierenden Zelllinien wurden EREB-pRTS1, EREB-pRTS1-LMP1 wt, EREB-LMP1 A₁₈₁AxxAA und EREB-LMP1 A₁₈₅A genannt. Während die Zellen direkt nach dem Sortieren zu über 95 % GFP exprimierten, reduzierte sich die Anzahl der GFP-positiv Zellen nach der Expansion auf ca. 50 %. Dieser Anteil ließ sich auch wiederholtes Sortieren nicht deutlich erhöhen, was darauf hinweisen könnte, dass der Promotor der pRTS1-Konstrukte methyliert und damit inaktiviert wurde. Denkbar wäre auch, dass die Zellen, die GFP nicht exprimierten über einen Wachstumsvorteil verfügten. Da die Zellen aber in Abwesenheit von Doxycyclin (dox) kultiviert wurden, so dass die Gene der pRTS-Konstrukte nicht exprimiert wurden, ist diese Erklärung sehr unwahrscheinlich.

Um zu überprüfen, ob in den Zellen tatsächlich das endogene LMP1 durch exogenes LMP1 ersetzt werden konnte, wurden 5x 10⁵ Zellen zwei Tage das Östrogen entzogen und 1 µg/ml Doxycyclin zugesetzt. Nach der Lyse wurde die Expression von LMP1 in einer Western-Blot-Analyse mit LMP1-spezifischen Antikörpern untersucht. In EREB-pRTS1 Zellen ließ sich nach zwei Tagen ohne Östrogen kein LMP1 mehr nachweisen, während die Zellen mit Östrogen LMP1 exprimieren (siehe Abbildung 41). Auch in den übrigen Zelllinien ist nach zwei Tagen ohne Östrogen kein endogenes LMP1 mehr nachweisbar. Durch die Zugabe von Doxycyclin kann das exogene LMP1 induziert werden, es übersteigt sogar die endogene Expression.



Abbildung 41: In den EREB-pRTS1-Zelllinien lässt sich endogenes und exogenes LMP1 durch Östrogen bzw. Doxycyclin regulieren.

1x 10⁶ Zellen der Linien EREB-pRTS1, EREB-pRTS1-LMP1 wt und EREB-pRTS1-LMP1 A₁₈₅A wurden in Abwesenheit von Östrogen mit und ohne 1 µg/ml Doxycyclin kultiviert. Als Kontrolle dienten 1x 10⁶ Zellen der Linie EREB-pRTS1, die mit 1 µM Östrogen inkubiert wurden. Die LMP1-Expression dieser Zellen entspricht der endogenen Expression (linke Spur). Nach zwei Tagen wurden die Zellen lysiert und Proteinmengenäquivalente im Western Blot auf LMP1-Expression mit dem spezifischen Antikörper CS1-4 (Dako) untersucht.

Ob LMP1 A₁₈₅A, bei dem Y185 und Y186 jeweils zu Alanin mutiert wurden, in der Lage ist, SHP-1 zu binden, sollte eine IP von LMP1 aus den Zelllinien EREB-pRTS1, EREB-pRTS1-LMP1 wt und EREB-LMP1 A₁₈₅A klären. Dazu wurde zunächst das Östrogen ausgewaschen. Danach wurden die Zellen in RPMI-Vollmedium ohne Östrogen in Gegenwart von 1 µg/ml Doxycyclin für zwei Tage inkubiert. In dieser Zeit konnte das endogene LMP1 herunterreguliert werden, während die pRTS1-Konstrukte exprimiert wurden. Anschließend wurden die Zellen lysiert, LMP1 präzipitiert und die Proben mittels eines Western Blots auf die Bindung von SHP-1 hin analysiert. Da mit den sonst in dieser Arbeit verwendeten Lysepuffer in diesen Zellen keine Interaktion zwischen LMP1 und SHP-1 gezeigt werden konnte, wurde die Zellen stattdessen in 0, 25 % Brij-96 V in PBS mit dem Proteaseinhibitor Complete (Roche) lysiert.

Die Ergebnisse dieses Experiments sind in Abbildung 42 dargestellt. Wie erwartet, ließ sich LMP1 aus EREB-pRTS1-LMP1 wt und EREB-LMP1 A₁₈₅A Zellen gut präzipitieren, während in der Negativkontrolle (EREB-pRTS1) kein LMP1 präzipitiert wurde. Der Entzug von Östrogen über die Dauer von zwei Tagen führte demnach zu einem vollständigen Abbau des endogenen LMP1. Die exogenen Proteine wurden gut und auf vergleichbarem Expressionsniveau exprimiert. Während alle Zelllinien über große Mengen von endogenem SHP-1 im Lysat verfügten, konnte das Protein nur aus den EREB-pRTS1-LMP1 wt Zellen mit LMP1 kopräzipitiert werden. Auch wenn das SHP-1 Signal schwach ist, bestätigt das Experiment die Bedeutung der Tyrosine Y₁₈₅ und Y₁₈₆ als Bindestelle von SHP-1 an LMP1.

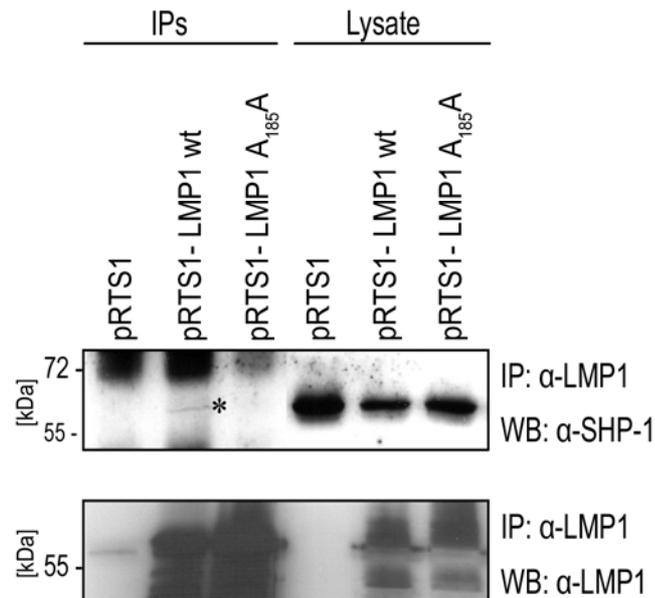


Abbildung 42: In IPs aus humanen B-Zellen präzipitiert nur LMP1 wt, nicht aber LMP1 A₁₈₅A SHP-1.

5x 10⁸ Zellen der Linien EREB-pRTS1, EREB-pRTS1-LMP1 wt, EREB-pRTS1-LMP1 A₁₈₅A wurden in RPMI-Vollmedium ohne Östrogen gewaschen und in RPMI-Vollmedium ohne Östrogen mit 1 µg/ml Doxycyclin für zwei Tage inkubiert. Nach der Lyse der Zellen in 0,25 % Brij-96 V in PBS mit dem Proteaseinhibitor Complete (Roche) wurde LMP1 mit dem LMP1-spezifischen Antikörper 1G6-3 (E. Kremmer) für 2 h bei 4 °C präzipitiert. Nach dreimaligem Waschen mit 0,05 % Brij-96 V in PBS wurden die Proben im Western Blot mit dem SHP-1-spezifischen Antikörper C-19 (Santa Cruz Biotechnology) bzw. mit dem LMP1-spezifischen Antikörper CS1-4 (Dako) analysiert. Die SHP-1-spezifische Bande in der IP aus EREB-pRTS1-LMP1 wt ist mit * markiert.

4.2.4 SHP-1 reguliert die LMP1-induzierte NF-κB-Aktivierung

Nachdem SHP-1 als LMP1-bindendes Protein bestätigt und die Bindestelle kartiert worden war, sollte eine mögliche Rolle von SHP-1 in der Signaltransduktion von LMP1 untersucht werden. SHP-1 kann eine Reihe zellulärer Signalwege beeinflussen, wobei es oft als negativer Regulator wirkt (vgl. Abschnitt 1.3.2.2). Zu den von SHP-1 regulierten Transkriptionsfaktoren gehört auch NF-κB, der von LMP1 über zwei verschiedene Signalwege aktiviert wird (vgl. Abschnitt 1.2.4.4). Daher sollte untersucht werden, ob SHP-1 in die NF-κB-Induktion von LMP1 eingreift.

Um dieser Frage nachgehen zu können, sollte ein System verwendet werden, in dem die Induktion von NF-κB in An- oder Abwesenheit von SHP-1 betrachtet werden konnte. Ein zuverlässiges System stellt ein SHP-1-defizientes Zellsystem mit der dazugehörigen Kontrolllinie dar. Ein solches System existiert in DT40 Zellen (Maeda et al., 1998; Ono et al., 1997) und ist kommerziell erhältlich. Bei DT40 Zellen handelt es sich um Hühner-B-Lymphozyten, die sich durch eine ausgesprochen hohe Rate an homologer Rekombination auszeichnen, so dass somatische *knockouts* von Genen vergleichsweise einfach zu generieren sind (Winding and Berchtold, 2001). DT40 SHP-1 ^{-/-} Zellen wurden uns von Tomohiro Kurosaki (RIKEN Institute, Japan) zur Verfügung gestellt.

Leider existieren kaum Antikörper, die gegen Hühnerproteine gerichtet sind, so auch keiner, der spezifisch für SHP-1 wäre. Um sicherzustellen, dass die DT40 SHP-1 ^{-/-} Zellen tatsächlich SHP-1 defizient waren, wurde die RNA aus DT40 wt (SHP-1 ^{+/+}) und DT40 SHP-1 ^{-/-} Zellen isoliert und cDNA generiert. Anschließend wurde eine PCR mit SHP-1 spezifischen Primern durchgeführt. Als Kontrolle diente eine PCR

mit Primern für das Haushaltsgen Thioredoxin1. Wie in Abbildung 43 dargestellt, konnte in beiden Zelllinien Thioredoxin1 amplifiziert werden, ein PCR-Produkt von SHP-1 war jedoch nur in den DT40 wt Zellen nachweisbar. Die DT40 SHP-1 $-/-$ Zellen waren also wirklich SHP-1 defizient.

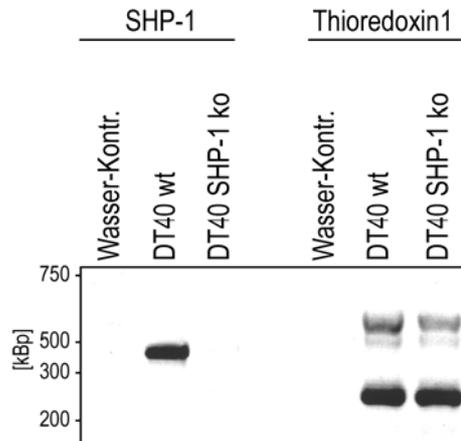


Abbildung 43: Die Zelllinie DT40 SHP-1 $-/-$ ist tatsächlich SHP-1-defizient.

Die Genexpression von SHP-1 in DT40 wt und DT40 SHP-1 $-/-$ Zellen wurde auf mRNA Ebene untersucht. Dazu wurde RNA isoliert und mit reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben. SHP-1-mRNA wurde durch PCR mit spezifischen Primern nachgewiesen (erwartete Produktgröße: 436 bp). Als Kontrolle dienten spezifische Primer für den Nachweis von Thioredoxin 1-mRNA (erwartete Produktgröße: 273 bp).

Nachdem die Zellen kontrolliert worden waren, wurden Luziferase-Reportergen-Versuche in DT40 wt und DT40 SHP-1 $-/-$ Zellen durchgeführt. Dazu wurden beide Linien mit Expressionskonstrukten für HA-LMP1 wt und HA-LMP1 Δ 194-386 sowie mit HA-LMP1 PQT \rightarrow AAA/Y₃₈₄G zur Bestimmung der Basiswerte transfiziert. In allen Ansätzen wurden außerdem das NF- κ B-Luziferase-Reporterkonstrukt 3x κ B-Luc und ein PGK-Renilla-Reportergenkonstrukt transfiziert. Das PGK-Renilla-Reportergenkonstrukt ist unabhängig von der Expression von LMP1 und wird nicht von NF- κ B beeinflusst. Es diente der Normierung der Ansätze im Bezug auf die Transfektionseffizienz.

Wie in Abbildung 44 dargestellt, wurde der Transkriptionsfaktor NF- κ B durch LMP1 in SHP-1 defizienten DT40 Zellen signifikant stärker aktiviert. Während LMP1 in DT40 wt Zellen zu einer 7,1 fachen Induktion führte, wurde in DT40 SHP-1 $-/-$ eine 14,2 fache Induktion erreicht. Die Abwesenheit der Phosphatase führte zu einer Verdopplung der Induktion. SHP-1 scheint daher einen negativen Effekt auf die Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs durch LMP1 zu besitzen.

Da die Transfektionseffizienz durch Elektroporation in DT40 Zellen mit 2-3 % sehr gering ausfiel, war eine Kontrolle der Expression von den LMP1-Konstrukten mittels Western-Blot-Analyse nicht möglich. Im nächsten Schritt sollte daher sichergestellt werden, dass es sich bei den Unterschieden in der NF- κ B-Aktivität nicht um einen Divergenzen in der Expression der Konstrukte handelte. Dazu wurde untersucht, ob sich der beobachtete Effekt durch die exogene Expression von SHP-1 in den DT40 SHP-1 $-/-$ Zellen revertieren ließ (*rescue* Experiment).

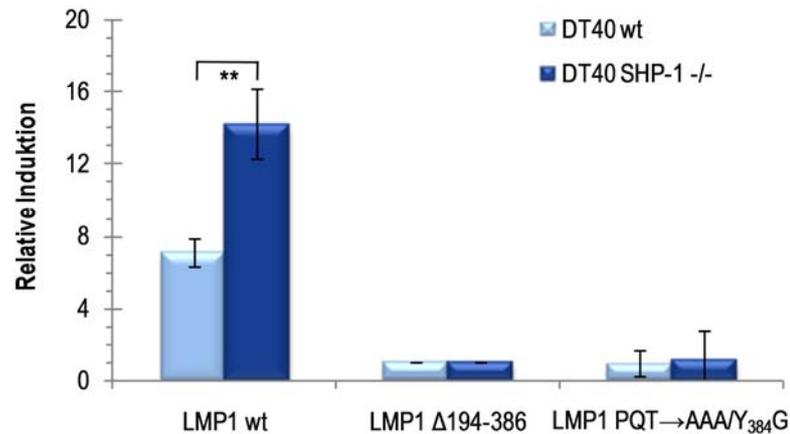


Abbildung 44: Die NF-κB-Aktivierung durch LMP1 ist in SHP-1-defizienten DT40 Zellen erhöht.

Jeweils 1×10^7 DT40 wt und DT40 SHP-1 -/- Zellen wurden mit je 2 μ g der Expressionsplasmide für HA-LMP1 bzw. HA-LMP1-Mutanten, 5 μ g 3xkB-Luc und 2,5 μ g PGK-Renilla transfiziert. 20 h nach der Elektroporation wurde die Luziferaseaktivität bestimmt und auf die Renilla-Expression in den Zellen normalisiert (siehe Abschnitt 3.5.10). Die Werte stellen Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten dar. Hierbei war die LMP1-vermittelte Induktion von NF-κB in DT40 SHP-1 -/- Zellen deutlich gegenüber der in DT40 wt Zellen erhöht (Student's T-Test: ** $p < 0,026$).

Für dieses Experiment wurden DT40 SHP-1 -/- Zellen wie im vorangegangenen Experiment transfiziert, wobei zusätzlich zu den LMP1- und den Reporterkonstrukten noch 5 μ g eines SHP-1 Expressionsvektors bzw. eines dazugehörigen Leervektors in die Zellen eingebracht wurden. Als weitere Kontrolle diente die Expression von p65, einem Mitglied der NF-κB-Familie. Hier sollte verifiziert werden, dass der beobachtete Effekt tatsächlich für LMP1 spezifisch ist und es sich nicht um einen allgemeinen Effekt von SHP-1 auf den NF-κB-Signalweg handelte.

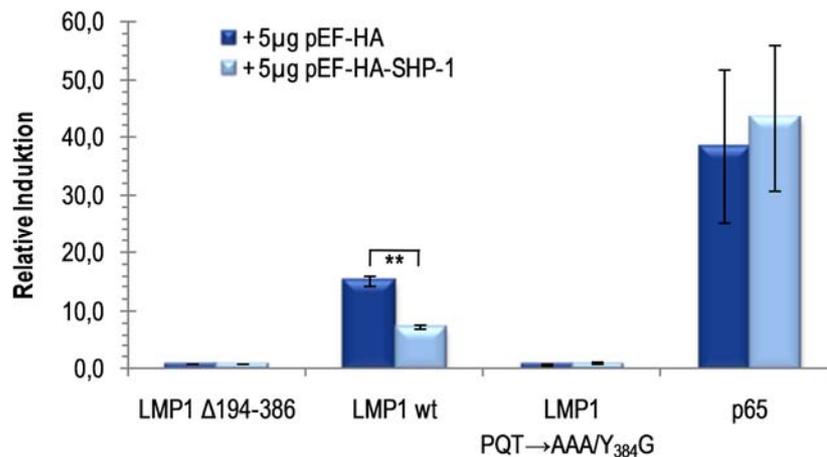


Abbildung 45: Die Expression von SHP-1 revertiert die erhöhte NF-κB-Aktivierung durch LMP1 in DT40 SHP-1 -/- Zellen.

Jeweils 1×10^7 DT40 SHP-1 -/- Zellen wurden entweder mit 5 μ g pEF-HA-SHP-1 oder mit der gleichen Menge des Leervektors pEF-HA sowie mit je 2 μ g der Expressionsplasmide für p65, HA-LMP1 oder HA-LMP1-Mutanten eingebracht. Darüber hinaus wurden in allen Ansätzen 5 μ g 3xkB-Luc und 2,5 μ g PGK-Renilla transfiziert. 20 h nach der Elektroporation wurde die Luziferaseaktivität bestimmt und auf die Renilla-Expression in den Zellen normalisiert (siehe Abschnitt 3.5.10). Die Werte stellen Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten dar. Es zeigte sich, dass die Expression von SHP-1 zu einer signifikant reduzierten Aktivierung von NF-κB durch LMP1 wt führte (Student's T-Test: ** $p < 0,004$).

Durch die Expression von SHP-1 in DT40 SHP-1 $-/-$ Zellen wurde die NF- κ B-Aktivierung durch LMP1 von einer 15,3 fachen Induktion auf eine 7,4 fache Induktion reduziert (siehe Abbildung 45). Damit wurde eine Induktion vergleichbar zu der in DT40 wt Zellen erreicht. Da die Expression von SHP-1 auf die Induktion von p65 keinen Einfluss hatte, trat der Effekt oberhalb von NF- κ B auf und war LMP1-spezifisch.

Im nächsten Schritt sollte betrachtet werden, ob LMP1-Mutanten, die SHP-1 nicht mehr rekrutieren können, eine höhere NF- κ B-Aktivierung erreichen als LMP1 wt. Dazu wurden Expressionsvektoren für HA-LMP1 A₁₈₅A und für HA-LMP1 A₁₈₁AxxAA kloniert (siehe Abschnitt 3.3.11.9). Mit diesen Konstrukten, sowie mit Expressionsvektoren für HA-LMP1 wt und HA-LMP1 PQT \rightarrow AAA/Y₃₈₄G wurden Luziferase-NF- κ B-Reporter-Experimente analog zu Abbildung 45 durchgeführt. Während in DT40 SHP-1 $-/-$ Zellen die SHP-1 bindungsdefizienten HA-LMP1-Konstrukte NF- κ B in gleichem Maße wie HA-LMP1 wt aktivieren (100 % für HA-LMP1 wt, 96 % für HA-LMP1 A₁₈₅A und 95 % für HA-LMP1 A₁₈₁AxxAA), wiesen die beiden SHP-1-bindungsdefizienten LMP1-Mutanten in DT40 wt Zellen eine signifikant höhere Induktion von NF- κ B-abhängigen Genen auf (100 % für HA-LMP1 wt, 143 % für HA-LMP1 A₁₈₅A und 139 % für HA-LMP1 A₁₈₁AxxAA) (siehe Abbildung 46). Dieses Ergebnis stützt damit die Resultate der beiden vorherigen Experimente und belegt die Bedeutung der beiden Tyrosine Y₁₈₅ und Y₁₈₆ für die SHP-1-Bindung. Die beiden Mutanten HA-LMP1 A₁₈₅A und HA-LMP1 A₁₈₁AxxAA verhalten sich identisch, was die Ergebnisse aus den Bindestudien (vgl. Abschnitt 4.2.2) bestätigt.

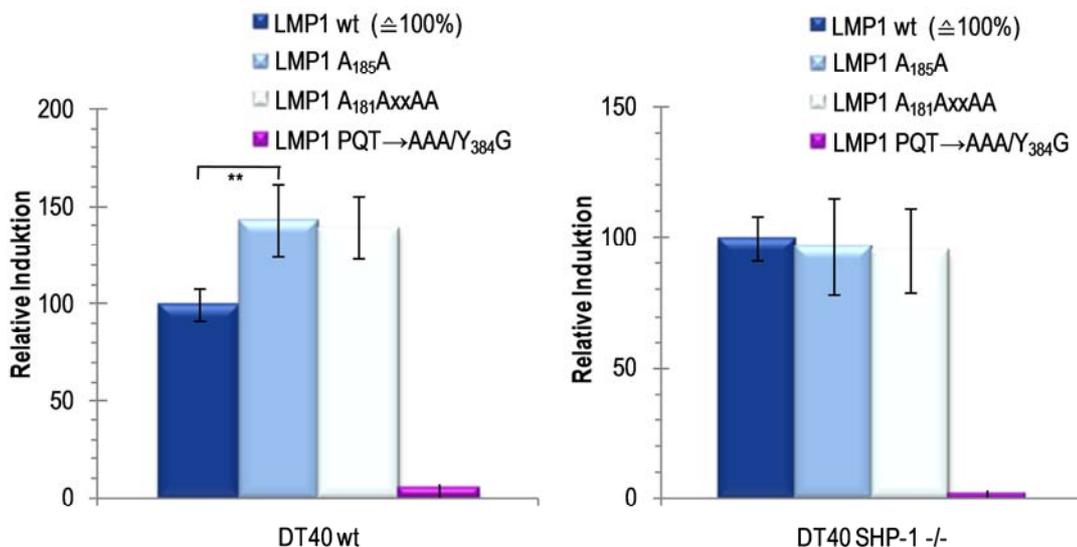


Abbildung 46: SHP-1 bindungsdefiziente LMP1-Mutanten weisen eine erhöhte NF- κ B-Aktivierung in DT40 wt Zellen auf.

Jeweils 1×10^7 DT40 wt und DT40 SHP-1 $-/-$ Zellen wurden mit je 2 μ g der Expressionsplasmide für HA-LMP1 bzw. der angegebenen HA-LMP1-Mutanten, 5 μ g 3 \times κ B-Luc und 2,5 μ g PGK-Renilla transfiziert. 20 h nach der Elektroporation wurde die Luziferaseaktivität bestimmt und auf die Renilla-Expression in den Zellen normalisiert (siehe Abschnitt 3.5.10). Die Aktivierung durch LMP1 wt wurde auf 100 % gesetzt. Die Werte stellen Mittelwerte aus sechs unabhängigen Experimenten dar. In DT40 wt Zellen induzierten LMP1 A₁₈₅A und LMP1 A₁₈₁AxxAA NF- κ B signifikant stärker als LMP1 wt (Student's T-Test: ** $p < 0,007$), während sich in DT40 SHP-1 $-/-$ Zellen keine signifikanten Unterschiede zwischen LMP1 A₁₈₅A und LMP1 A₁₈₁AxxAA auf der einen und LMP1 wt auf der anderen Seite ergaben.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass SHP-1 die NF- κ B-Aktivierung durch LMP1 in DT40 Zellen negativ reguliert und für diesen Effekt die Interaktion von SHP-1 und LMP1 notwendig ist, sollte überprüft werden,

ob die Effekte auch in humanen B-Lymphozyten auftreten. Hierfür wurden NF- κ B-Luziferase-Reporter-Gen-Experimente in DG75 Zellen durchgeführt. Im Gegensatz zu den Experimenten in DT40 Zellen wurden hier nicht die LMP1-Expressionskonstrukte mit N-terminal fusioniertem HA-Epitop verwendet, da diese über einen CMV-Promotor verfügen. Das durch diese Vektoren in DG75 Zellen erreichte LMP1-Expressionsniveau ist so hoch, dass sich toxische Effekte einstellen (Daten nicht gezeigt). Daher wurden LMP1-Expressionskonstrukte mit dem schwächeren SV40-Promotor verwendet. Leider besaß der Vektor pSV-LMP1 A₁₈₅A einen Fehler im Vektorhintergrund, der sich in einer deutlich verringerten Expression gegenüber den anderen LMP1-Expressionsplasmiden manifestierte. Dieser Fehler konnte in der Zeit, die für die Erstellung dieser Arbeit zur Verfügung stand, nicht mehr behoben werden. Daher wurden die Experimente nur mit der LMP1 A₁₈₁AxxAA Mutante durchgeführt, die sich in DT40 Zellen jedoch genauso wie LMP1 A₁₈₅A verhalten hatte (siehe Abbildung 46) und über die gleichen Bindeeigenschaften wie LMP1 A₁₈₁AxxAA verfügt (siehe Abschnitt 4.2.2).

Um den Effekt von SHP-1 auf die NF- κ B-Aktivierung von LMP1 in DG75 Zellen genauer zu untersuchen, sollte SHP-1 aus den Zellen entfernt werden. Da das Expressionsniveau von SHP-1 in hämatopoetischen Zellen sehr hoch ist, waren Ansätze mit RNA-Interferenz erfolglos (Daten nicht gezeigt). Stattdessen wurde ein Expressionsplasmid für SHP-1 C₄₅₃S bzw. Lachsspermien-DNA als Leerkontrolle verwendet. Durch den Austausch des Cysteins₅₄₃ mit Serin wird SHP-1 katalytisch inaktiv, so dass eine dominant negative Mutante entsteht (Plas et al., 1999). Darüber hinaus wurden neben einem Leervektor zur Bestimmung der Basalaktivität Expressionskonstrukte für LMP1 wt, LMP1 A₁₈₁AxxAA und LMP1 PQT→AAA/Y₃₈₄G transfiziert. In allen Ansätzen wurden außerdem das NF- κ B-Luziferase-Reporterkonstrukt 3x κ B-Luc und ein PGK-Renilla-Reportergenkonstrukt transfiziert.

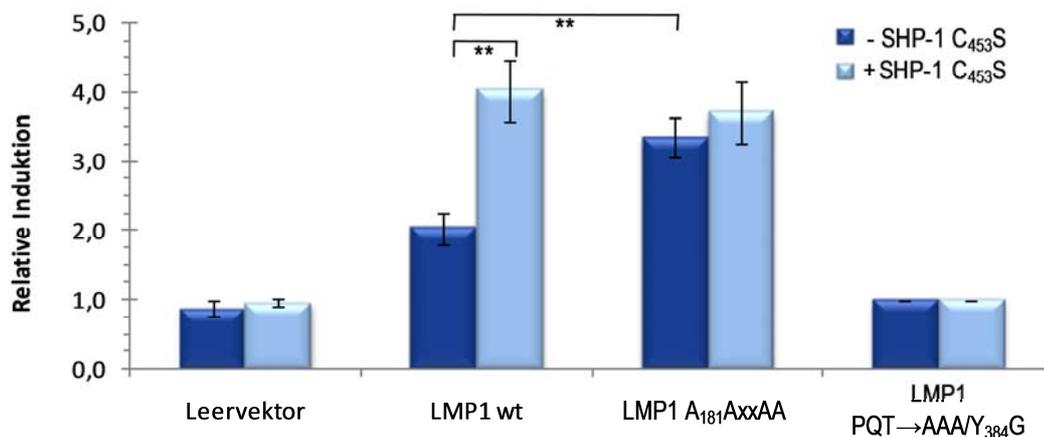


Abbildung 47: Die NF- κ B-Aktivierung durch LMP1 wird in humanen B-Zellen durch Expression von dominant negativem SHP-1 erhöht.

Jeweils 1×10^7 DG75 Zellen wurden entweder mit $8 \mu\text{g}$ pCMV-HA-SHP-1 C₄₅₃S oder mit der gleichen Menge Lachsspermien-DNA sowie mit je $2 \mu\text{g}$ Leervektor oder Expressionsplasmide für LMP1 bzw. LMP1-Mutanten, $4 \mu\text{g}$ 3x κ B-Luc und $2 \mu\text{g}$ PGK-Renilla transfiziert. 20 h nach der Elektroporation wurde die Luziferaseaktivität bestimmt und auf die Renilla-Expression in den Zellen normalisiert (siehe Abschnitt 3.5.10). Die Werte stellen Mittelwerte aus sechs unabhängigen Experimenten dar. Es zeigte sich, dass LMP1 wt in Abwesenheit von SHP-1 C₄₅₃S NF- κ B signifikant weniger induzierte als LMP1 wt in Anwesenheit von SHP-1 C₄₅₃S oder LMP1 A₁₈₁AxxAA in An- oder Abwesenheit von SHP-1 C₄₅₃S (Student's T-Test: ** $p < 0,00001$).

Wie in Abbildung 47 zu erkennen ist, wurde durch die Expression von SHP-1 C₄₅₃S die Induktion NF- κ B-abhängiger Gene durch LMP1 wt von 2,0 auf 4,0 erhöht. Dagegen beeinflusste SHP-1 C₄₅₃S die NF- κ B-Aktivität durch LMP1 A₁₈₁AxxAA nicht. Mit der SHP-1 bindungsdefizienten Mutante LMP1 A₁₈₁AxxAA konnte eine 3,3 fache Induktion in Abwesenheit von SHP-1 C₄₅₃S erreicht werden, während bei einer Expression von SHP-1 C₄₅₃S ein unwesentlich höherer Wert von 3,7 ergab. Damit wurde bestätigt, dass die Bindung von SHP-1 an LMP1 notwendig für die negative Regulation der NF- κ B Aktivierung durch LMP1 ist. Abbildung 48 stellt eine exemplarische Expressionskontrolle der LMP1-Konstrukte aus den NF- κ B-Luziferase-Reporter-Experimenten dar. LMP1 wt und LMP1 A₁₈₁AxxAA wurden vergleichbar exprimiert, weshalb die Unterschiede in der Aktivität nicht auf eine abweichende Expression der LMP1-Konstrukte zurückgeführt werden konnten. Damit konnte die Aussage, dass SHP-1 die LMP1-induzierte NF- κ B Aktivität negativ reguliert, in humanen B-Zellen bestätigt werden, wofür auch in diesem System die Interaktion von SHP-1 und LMP1 notwendig ist.

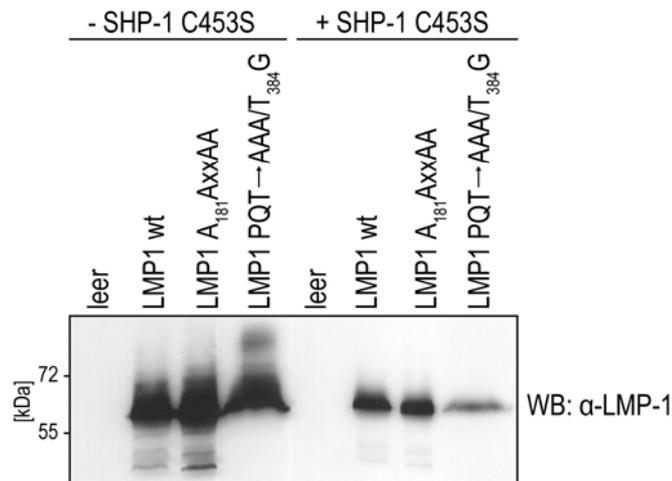


Abbildung 48: LMP1 wt und LMP1 A₁₈₁AxxAA werden in DG75 Zellen in vergleichbaren Mengen exprimiert.

Jeweils 1×10^7 DG75 Zellen wurden entweder mit 8 μ g pCMV-HA-SHP-1 C₄₅₃S oder mit der gleichen Menge Lachsspermien-DNA sowie mit je 2 μ g Leervektor oder Expressionsplasmiden für LMP1 bzw. die angegebenen LMP1-Mutanten, 4 μ g 3 \times kB-Luc und 2 μ g PGK-Renilla transfiziert. 20 h nach der Elektroporation wurden die Zellen lysiert. Aus den Lysaten der NF- κ B-Luziferase-Reporter-Experimenten aus Abbildung 47 wurden Aliquote für eine Western-Blot-Analyse abgenommen. Die Proteinmengen der Lysate wurden angeglichen. LMP1 wurde mit dem spezifischen Antikörper CS1-4 (Dako) nachgewiesen.

4.2.5 SHP-1 reguliert die LMP1-induzierte Phosphorylierung von Jak3

Ein weiterer Signalweg, in dem sowohl LMP1 als auch SHP-1 eine Rolle spielen, ist der Jak/STAT Signalweg (siehe Abschnitte 1.2.4.7 und 1.3.2.2). LMP1 induziert die Phosphorylierung von Jak3 (Dirmeier et al., 2005; Gires et al., 1999), während SHP-1 die Phosphorylierung von Proteinen der Jak-Familie nach verschiedenen Stimuli negativ regulieren kann (Forget et al., 2006; Jiao et al., 1996; Klingmüller et al., 1995; Marrero et al., 1998). Daher stellte sich die Frage, ob SHP-1 die Jak3-Phosphorylierung durch LMP1 beeinflusst. Dazu wurden HEK293 Zellen mit den folgenden Konstrukten transfiziert: Lachsspermien-DNA zur Bestimmung des Basalwerts sowie Expressionsvektoren für Jak3, HA-LMP1 wt, HA-LMP1 A₁₈₅A, Jak3 mit HA-LMP1 wt und schließlich Jak3 mit HA-LMP1 A₁₈₅A. 20 h nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert und Western-Blot-Analysen nach Proteinmengenabgleich durchgeführt. Im Nachweis mit

Phospho-Tyrosin-spezifischem Antikörper ist in Abbildung 49 eine leichte Bande auf der Höhe von Jak3 in HEK293 zu erkennen. Durch die Koexpression von Jak3 und LMP1 konnte eine deutliche Zunahme dieser Phosphorylierung erreicht werden. Diese Bande trat nur auf, wenn in den Ansätzen Jak3 koexprimiert wurde. Daher kann davon ausgegangen werden, dass es sich hier um Jak3 handelt, auch wenn trotz Überexpression von Jak3 das Protein mit Jak3-spezifischen Antikörpern nicht nachgewiesen werden konnte.

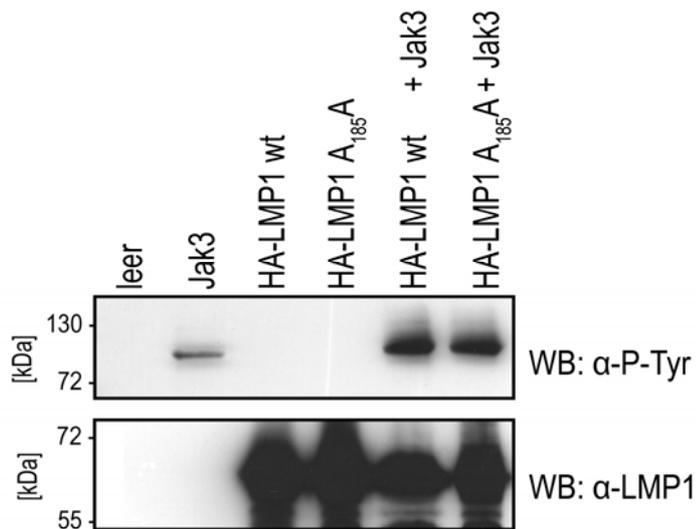


Abbildung 49: In HEK293 Zellen beeinflusst SHP-1 die LMP1-induzierte Phosphorylierung von Jak3 nicht.

HEK293 Zellen wurden in 6-Lochplatten mit Lachsspermien-DNA bzw. je 1 µg der Expressionsplasmide von Jak3, HA-LMP1 wt und HA-LMP1 A₁₈₅A wie in der Abbildung angegeben transfiziert. 20 h später wurden die Zellen lysiert und Western-Blot-Analysen von Proteinmengenäquivalenten mit einer Mischung aus den Phospho-Tyrosin-spezifischen Antikörpern PY20 (Santa Cruz Biotech.) und 4G10 (Upstate Biotech.) sowie mit dem LMP1-spezifischen Antikörper CS1-4 (Dako) durchgeführt.

Wie bei Gires et al. (Gires et al., 1999) gezeigt, resultierte die Expression von LMP1 in einer Phosphorylierung von Jak3, was die Kinase aktiviert. HA-LMP1 wt und die SHP-1-bindungsdefiziente Mutante HA-LMP1 A₁₈₅A führten zu dem gleichen Anstieg der Phosphorylierung, so dass SHP-1 in diesem Experiment auf die Phosphorylierung von Jak3 keinen Einfluss zu haben schien. Hierbei muss berücksichtigt werden, dass HEK293 Zellen nur über sehr geringe Mengen von endogenem SHP-1 verfügen (Daten nicht gezeigt).

Um auszuschließen, dass lediglich die Expressionsniveaus von SHP-1 zu gering waren, wurde das Experiment in DG75 Zellen wiederholt. Diese (hämatopoetischen) Zellen besitzen deutlich mehr SHP-1 als HEK293, was zu einem anderen Ergebnis führte (siehe Abbildung 50). Hier verursachte die Koexpression von HA-LMP1 A₁₈₅A mit Jak3 ein deutlich höheres Phosphorylierungssignal auf Höhe von Jak3 als die Koexpression von HA-LMP1 wt mit Jak3. Damit konnte gezeigt werden, dass die Interaktion von LMP1 mit SHP-1 nicht nur die Aktivierung des NF-κB Signalwegs sondern auch die des Jak/STAT Signalwegs negativ reguliert.

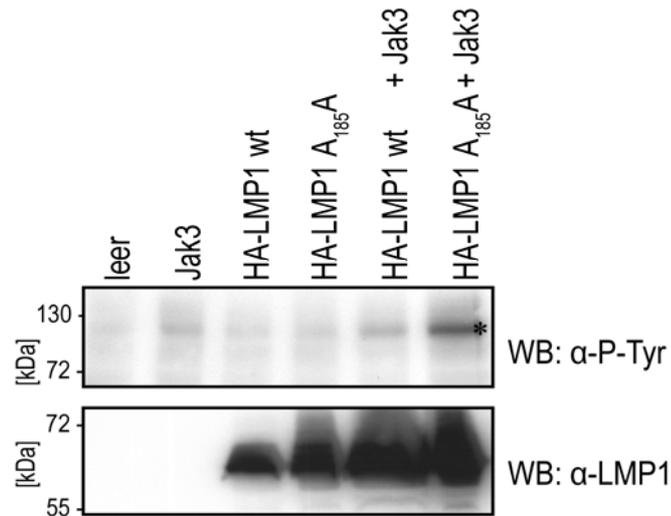


Abbildung 50: Die LMP1 vermittelte Jak3-Phosphorylierung durch LMP1 wird in DG75 Zellen von SHP-1 inhibiert.

In 1×10^7 DG75 Zellen wurden Lachsspermien-DNA bzw. je $1 \mu\text{g}$ der Expressionsplasmide von Jak3, HA-LMP1 wt und HA-LMP1 A₁₈₅A, wie in der Abbildung angegeben, elektroporiert. 20 h später wurden die Zellen lysiert. Gleiche Proteinmengen wurden in Western-Blot-Analysen mit einer Mischung aus den Phospho-Tyrosin-spezifischen Antikörpern PY20 (Santa Cruz Biotech.) und 4G10 (Upstate Biotech.) sowie mit dem LMP1-spezifischen Antikörper CS1-4 (Dako) untersucht. Die Phospho-Tyrosin-spezifische Bande auf der Höhe von Jak3 aus dem Ansatz mit Jak3 und HA-LMP1 A₁₈₅A ist mit * markiert.

Um sicherzustellen, dass die Unterschiede zwischen HA-LMP1 wt und HA-LMP1 A₁₈₅A tatsächlich darauf beruhen, dass HA-LMP1 A₁₈₅A SHP-1 nicht mehr rekrutierte, wurde das Experiment in Anwesenheit von dominant negativem SHP-1 (SHP-1 C₄₅₃S) wiederholt. In Anwesenheit von SHP-1 C₄₅₃S sollte mit HA-LMP1 wt das gleiche Phosphorylierungssignal erreicht werden wie mit HA-LMP1 A₁₈₅A. Diese These wurde durch das in Abbildung 51 dargestellte Experiment bestätigt. Damit konnte gezeigt werden, dass SHP-1 die Phosphorylierung von Jak3 durch LMP1 negativ beeinflusst und für diesen Effekt eine Bindung von SHP-1 an LMP1 notwendig ist.

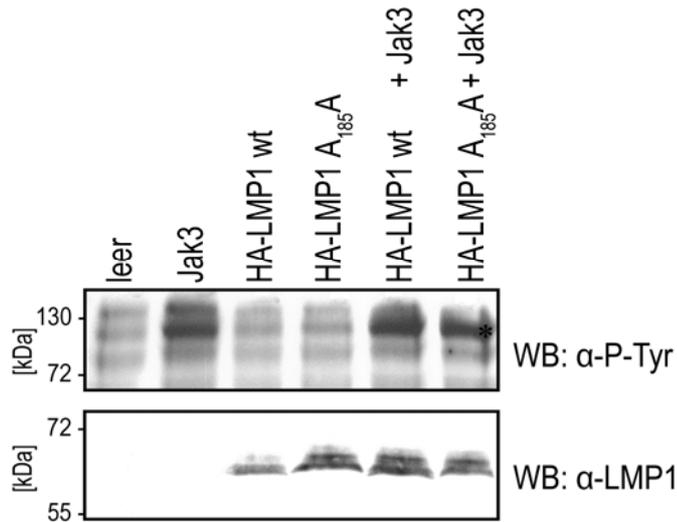


Abbildung 51: Dominant negatives SHP-1 revertiert die Unterschiede in der Jak3-Phosphorylierung zwischen LMP1 wt und LMP1 A₁₈₅A.

In 1×10^7 DG75-Zellen wurden Lachsspermien-DNA bzw. je $1 \mu\text{g}$ der Expressionsplasmide von Jak3, HA-LMP1 wt und HA-LMP1 A₁₈₅A, wie in der Abbildung angegeben, elektroporiert. Zusätzlich wurden $13 \mu\text{g}$ SHP-1 C₄₅₃S in die Zellen eingebracht. 20 h später wurden die Zellen lysiert. Gleiche Proteinmengen wurden in Western-Blot-Analysen mit einer Mischung aus den Phospho-Tyrosin-spezifischen Antikörpern PY20 (Santa Cruz Biotech.) und 4G10 (Upstate Biotech.) sowie mit dem LMP1-spezifischen Antikörper (CS1-4) (Dako) untersucht. Die Phospho-Tyrosin-spezifische Bande auf der Höhe von Jak3 aus dem Ansatz mit Jak3 und HA-LMP1 A₁₈₅A ist mit * markiert.

4.2.6 SHP-1 beeinflusst die Inhibition des lytischen Zyklus durch LMP1 nicht.

Während in den vorangegangenen Abschnitten die molekularen Effekte der SHP-1-Bindung auf die von LMP1 induzierten Signalwege untersucht worden waren, sollte im diesem Kapitel die potenzielle biologische Funktion von SHP-1 im Zusammenhang mit LMP1 untersucht werden.

Die Reaktivierung von EBV ist sehr stark reguliert. In gesunden EBV-Trägern ist die Virusreplikation nicht nachweisbar (Decker et al., 1996), während Personen mit geschwächtem Immunsystem eine erhöhte Anzahl an EBV-positiven B-Zellen im peripheren Blut und eine nachweisbare Virusreplikation aufweisen (Decker et al., 1996; Lam et al., 1991). Auch wenn EBV-immortalisierte Zellen *in vitro* gut proliferieren, werden kaum Viruspartikel produziert. Das Virus befindet sich in seiner latenten Phase. Durch eine Reihe verschiedener Stimuli kann die lytische Phase induziert werden, etwa durch Phorbol ester, Kalziumionophore oder die Aktivierung des BCR mit spezifischen Antikörpern (Faggioni et al., 1986; Tovey et al., 1978). LMP1 wirkt der Induktion des lytischen Zyklus unter anderem durch die BCR-Aktivierung entgegen (Adler et al., 2002).

Auch SHP-1 steht in engem Zusammenhang mit der BCR-Signaltransduktion. Es ist einer der bedeutendsten Faktoren, die den BCR negativ regulieren (vgl. Abschnitt 1.3.2.2). LMP1 inhibiert die Aktivierung von BZLF1 und damit die Aktivierung des lytischen Zyklus durch den BCR (Adler et al., 2002). Deshalb könnte die Rekrutierung von SHP-1 an LMP1 eine direkte Verbindung von LMP1 zur Inhibition des lytischen Zyklus darstellen.

Um diese These zu überprüfen, wurde das EREB-Zellsystem aus Abschnitt 4.2.3 mit den vier Zelllinien EREB-pRTS1, EREB-pRTS1-LMP1 wt, EREB-pRTS1-LMP1 A₁₈₁AxxAA und EREB-pRTS1-LMP1 A₁₈₅A

verwendet. In diesen Zellen sollte untersucht werden, ob die SHP-1-bindungsdefizienten LMP1-Mutanten den lytischen Zyklus zu einem höheren Anteil aktivieren als LMP1 wt.

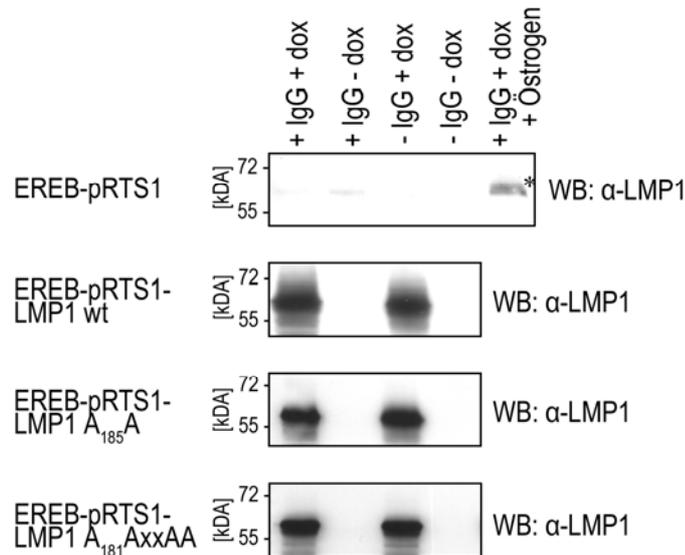


Abbildung 52: Die in der FACS-Analyse verwendeten Zellen exprimieren die pRTS-LMP1-Konstrukte abhängig von Doxycyclin. In Abwesenheit von Östrogen wird kein endogenes LMP1 exprimiert.

Zur Kontrolle der LMP1-Expression der verschiedenen Zellen in den verschiedenen Zuständen wurden 1×10^6 Zellen lysiert und eine Western-Blot-Analyse mit dem LMP1-spezifischen Antikörper CS1-4 (Dako) durchgeführt. Hierbei wurden die Proteinmengen auf den Anteil der GFP-positiven Zellen normiert.

Um die Auswirkung der LMP1-Mutanten untersuchen zu können, wurde das endogene LMP1 durch Östrogenentzug in den Zellen zunächst ausgeschaltet. Jede der vier Zelllinien wurde in vier Zuständen betrachtet: mit und ohne Doxycyclin sowie mit und ohne IgG/IgM. Indem den Zellen Doxycyclin zugesetzt wurde, wurde die Expression des pRTS1-Konstrukts aktiviert, so dass die Linien EREB-pRTS1-LMP1 wt, EREB-pRTS1-LMP1 A₁₈₅A und EREB-pRTS1-LMP1 A₁₈₁AxxAA das exogene LMP1 exprimierten. Bei der Kultivierung der Zellen ohne Doxycyclin (und auch ohne Östrogen) exprimierten die Zellen kein LMP1. EREB-pRTS1 Zellen besaßen auch mit Doxycyclin kein LMP1 und diente daher als Negativkontrolle (vgl. Abbildung 40). IgG/IgM bewirkt ein Kreuzvernetzen der BCR und aktiviert die BCR-Signaltransduktion und damit den lytischen Zyklus. Um den Anteil der Zellen, die in die lytische Phase übergegangen waren, zu quantifizieren, wurde im FACS die Anzahl der BZLF1-positiven Zellen bestimmt. Die Expression von BZLF1 wird durch BCR-Signaltransduktion aktiviert, wobei BZLF1 neben BRLF1 das erste Gen ist, das bei der Aktivierung des lytischen Zyklus exprimiert wird (Flemington et al., 1991; Takada and Ono, 1989). Es aktiviert frühe virale Gene und leitet so die virale Replikation ein (Tsurumi et al., 2005). Da die Expression von BZLF1 allein ausreichend ist, den lytischen Zyklus zu induzieren (Countryman et al., 1987; Miller et al., 1984), korreliert die Expression des Proteins gut mit der Aktivierung des lytischen Zyklus.

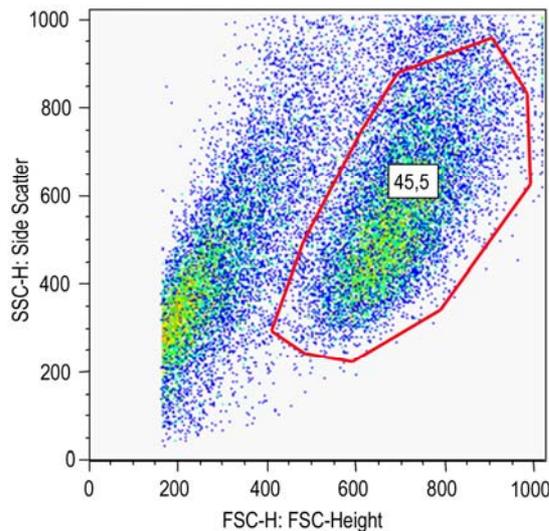


Abbildung 53: Exemplarische Gatesetzung für die Analyse von EREB-pRST1 Zellen.

Dargestellt ist ein exemplarisches FACS-Profil, in dem SSC gegen FSC aufgetragen wurde. Die dort markierten Zellen stellen die Population der überlebenden B-Zellen dar, die für die Analyse in Abbildung 54 verwendet wurden.

Um zunächst sicherzustellen, dass die Zellen nach zwei Tagen ohne Östrogen kein endogenes LMP1 exprimieren und durch die Zugabe von Doxycyclin das exogene LMP1 induziert werden konnte, wurden Lysate der Zellen in einer Western-Blot-Analyse auf LMP1-Expression untersucht (Abbildung 52). Dabei wurden die aufgetragenen Proteinmengen auf den Anteil der eGFP-positiven Zellen normiert, um eine Aussage über das Expressionsniveau in den im FACS analysierten Zellen zu treffen. Während sich in EREB-pRST1 Zellen ohne Östrogen erwartungsgemäß kein LMP1 mehr nachweisen ließ, war in den übrigen Linien bei Zugabe von Doxycyclin ein deutliches LMP1-Signal zu erkennen. Auch in diesen Zellen war in Abwesenheit von Doxycyclin kein LMP1 mehr nachweisbar, so dass die Zellen nicht mehr über endogenes LMP1 verfügten. Die Expression des exogenen LMP1 überstieg die des endogenen LMP1 bei Kultivierung der Zellen mit Östrogen.

Um BZLF1 und damit die Induktion des lytischen Zyklus nachzuweisen, wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert. Anschließend wurde BZLF1 mit dem spezifischen Antikörper BZ1 (E. Kremmer) und einem CyTM5-gekoppelten Sekundärantikörper (Jackson ImmunoResearch) detektiert. In der Durchflusszytometrie wurden zunächst auf die lebenden B-Lymphozyten gated (Abbildung 53) und die Zellen anschließend auf CyTM5 und eGFP analysiert. EGFP wird zusammen mit dem exogenen LMP1 (bzw. für EREB-pRST1 die Kontrolle β -Laktamase) von dem bidirektionalen Promotor der pRST1-Konstrukte nach Doxycyclin-Induktion exprimiert. Daher sollten eGFP-positive Zellen auch über das exogene LMP1 (bzw. β -Laktamase für EREB-pRST1) verfügen.

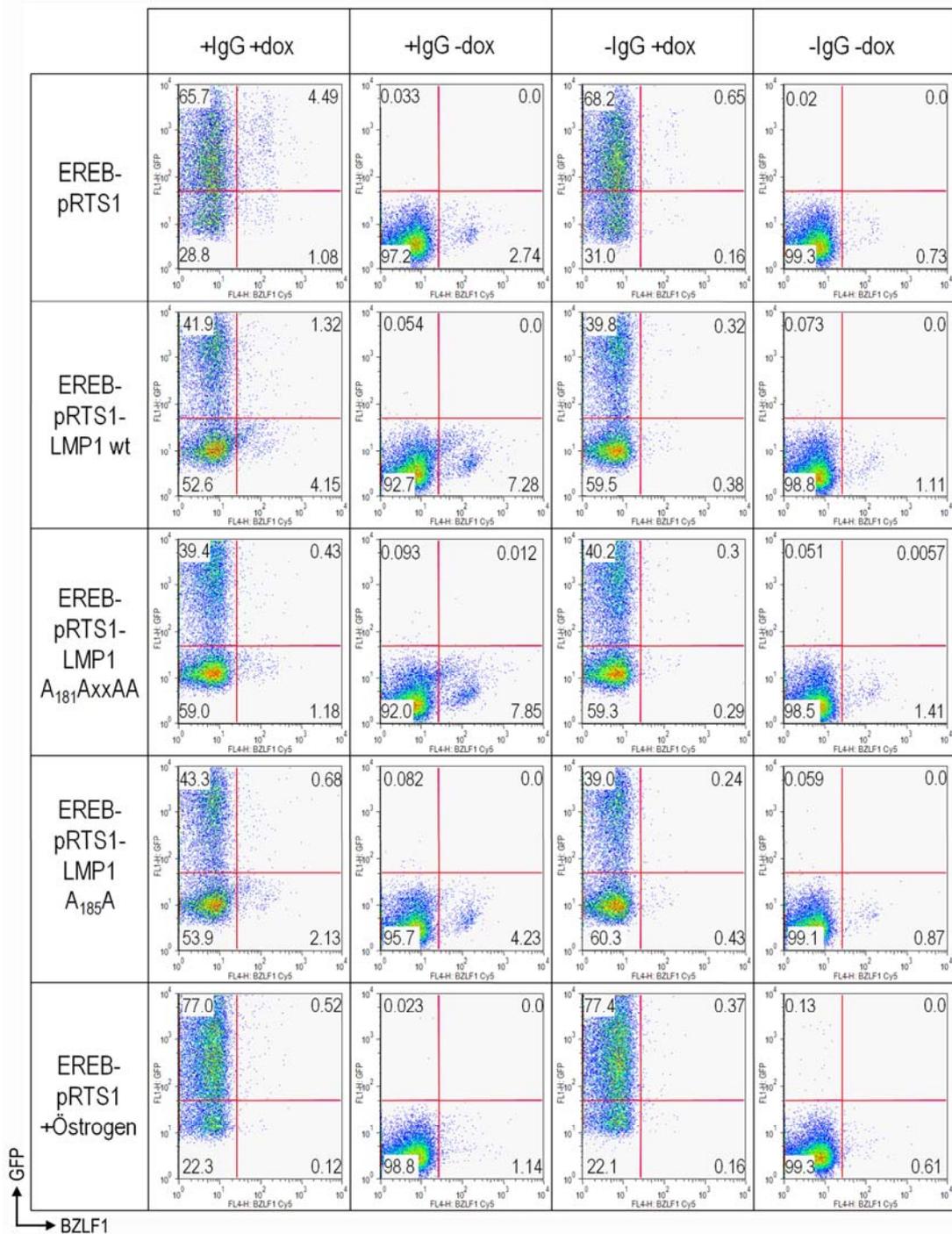


Abbildung 54 Die Mutation der SHP-1-Bindungsstelle in LMP1 hat keinen Einfluss auf die Inhibition des lytischen Zyklus durch LMP1.

1x 10⁶ Zellen der Linien EREB-pRTS1, EREB-pRTS1-LMP1 wt, EREB-pRTS1-LMP1 A₁₈₁AxxAA und EREB-pRTS1-LMP1 A₁₈₅A wurden zwei Tage vor der FACS-Analyse das Östrogen entzogen. Als Kontrolle wurden EREB-pRTS1 Zellen mit Östrogen mitgeführt. Von jeder Linie wurden vier Ansätze hergestellt, wobei jeweils zwei Ansätze 1 µg/ml Doxycyclin zugesetzt wurde. Am folgenden Tag wurde bei der Hälfte der Ansätze die Induktion des lytischen Zyklus durch 25 µg/ml α-human IgG/IgM-Antikörper (Jackson Immuno Research) induziert. So entstanden pro Zelllinie vier verschiedene Zustände: +IgG/IgM +dox; +IgG/IgM -dox, -IgG/IgM +dox, und -IgG/IgM -dox. Am folgenden Tag wurden die Zellen, wie in Abschnitt 3.2.10 beschrieben, gefärbt. Als Primärantikörper wurde der α-BZLF1-Antikörper BZ1 (E. Kremmer, Helmholtz Zentrum München), als Sekundärantikörper ein CyTM5-konjugierter α-Maus-Antikörper (Jackson Immuno Research) verwendet. Dargestellt ist die Auftragung von eGFP gegen CyTM5 (BZLF1) der lebenden B-Zellen.

Abbildung 54 zeigt exemplarische FACS-Analysen der Experimente. Hierbei wird deutlich, dass in Anwesenheit von Doxycyclin ca. 50 % der Zellen eGFP-positiv waren, also über das erwünschte Expressionsprofil verfügten. Auffällig ist, dass Doxycyclin die Signale im GFP-Kanal beeinflusste. So erschien der Schwerpunkt des Signals der Population der eGFP⁺ Zellen in den Ansätzen ohne Doxycyclin weiter unten als in den Ansätzen mit Doxycyclin. Da es sich hierbei um eine klar abgrenzbare Population handelte und die obere Grenze der Population sich nicht nennenswert verschob, hatte dieser Effekt von Doxycyclin keinen Einfluss auf die Bewertung der Experimente. Vergleicht man den Anteil der eGFP⁺ CyTM5⁺ Zellen in Anwesenheit von Doxycyclin und nach IgG/IgM-Stimulierung zwischen den verschiedenen Zelllinien, so fällt auf, dass die EREB-pRTS1 Zellen in Abwesenheit von Östrogen zu einem deutlich höheren Prozentsatz den lytischen Zyklus induzieren. In Anwesenheit von Östrogen ist das endogene LMP1 in den Zellen aktiv, was, wie in der Literatur beschrieben, zu einer Inhibition des lytischen Zyklus führt. Die exogene Expression von LMP1 führt sogar zu einer stärkeren Inhibition. Diese Tatsache kann durch das höhere Expressionsniveau erklärt werden (vgl. Abbildung 52). Hierbei verhalten sich LMP1 wt, LMP1 A₁₈₁AxxAA und LMP1 A₁₈₅A ähnlich.

Damit konnte gezeigt werden, dass SHP-1 entgegen der zuvor aufgestellten Hypothese nicht die direkte Verbindung zwischen LMP1 und dem BCR ist. Die Bindung von SHP-1 an LMP1 ist damit nicht notwendig für eine Inhibition des lytischen Zyklus von EBV durch LMP1. Das ist in Abbildung 55 als Übersicht aus drei unabhängigen Experimenten noch einmal dargestellt, denn auch hier unterscheidet sich die Induktion des lytischen Zyklus nicht zwischen Zellen die SHP-1 bindungsdefizienten LMP1-Mutanten oder LMP1 wt exprimieren.

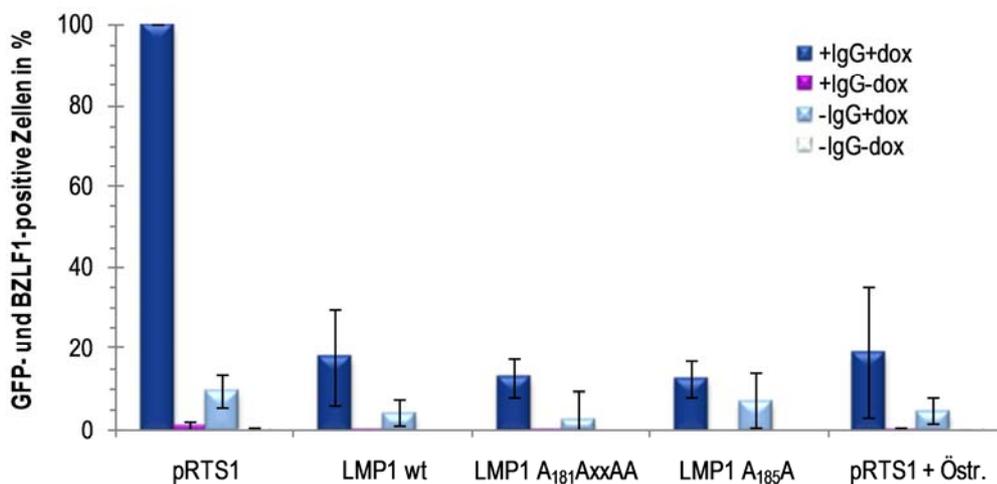


Abbildung 55: Die Mutation der SHP-1 Bindungsstelle von LMP1 hat keinen Einfluss auf die Inhibition des lytischen Zyklus durch LMP1.

Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten, wie sie in Abbildung 54 beschrieben wurde. Der Anteil der GFP- und BZLF1-positiven Zellen wurde für die Linie EREB-pRTS1 ohne Östrogen auf 100% gesetzt.

5 Diskussion

5.1 Identifikation von assoziierten Proteinen des LMP1-Multiproteinkomplexes

5.1.1 Aufreinigung des LMP1-Signalkomplexes

Im Bereich der funktionellen Proteinanalyse sind in den letzten Jahren große Fortschritte gemacht worden. Dazu hat nicht nur die verbesserte Technik der Massenspektrometrie beigetragen sondern auch die Art der Probenvorbereitung. Durch die Kombination mit biochemischen Aufreinigungen wurde es möglich, die Komplexität der zu analysierenden Probe zu reduzieren, so dass sich die Massenspektrometrie nicht mehr nur auf hochabundante Proteine beschränkt. Der klassische Ansatz besteht in der Aufreinigung von interagierenden Proteinen mit Hilfe spezifischer Antikörper gegen das Zielprotein. Diese Methode hat den Vorteil, dass sie sehr nahe an der physiologischen Situation befindet. Der endogene Komplex wird direkt gereinigt, ohne dass eine ektopische Expression des Proteins nötig ist. Nachteilig ist, dass durch eine Kreuzreaktivität der Antikörper auch falsch-positive Proteine aufgereinigt werden. Hier sind genaue Kontrollen notwendig.

In dieser Arbeit sollte eine Situation geschaffen werden, in der mit endogenen Mengen an LMP1 gearbeitet werden konnte und gleichzeitig ein subtraktiver Ansatz verwendet werden. Dazu wurde eine LCL mit Hilfe eines rekombinanten EBVs generiert, die über ein LMP1 mit einem N-terminal fusionierten HA-Epitop verfügte. Dieses Verfahren bietet eine Reihe von wesentlichen Vorteilen. Zum einen muss durch das fusionierte HA-Epitop kein LMP1-spezifischer Antikörper verwendet werden. Die zurzeit verfügbaren LMP1-spezifischen Antikörper sind alle gegen den C-Terminus des Proteins gerichtet, wo sie mit interessanten Interaktionspartnern um die Bindung an LMP1 konkurrieren könnten. So werden etwa TRAF-Moleküle durch α -LMP1-Antikörper verdrängt (persönliche Mitteilung von Thomas Knöfel). Durch das fusionierte HA-Epitop bietet sich darüber hinaus die Möglichkeit, eine parallele Kontrolle mit demselben Antikörper durchzuführen. Verwendet man für die Kontrolle eine LCL, die über ein LMP1 ohne HA-Epitop verfügt, kann durch den HA-spezifischen Antikörper kein LMP1 präzipitiert werden. Es wird also eine Situation ähnlich einer HA-LMP1-defizienten LCL geschaffen, nur dass die physiologischen Prozesse in der Zelle nicht durch das Fehlen eines (essentiellen) Proteins beeinträchtigt werden. Dieses Vorgehen hat gegenüber einer Isotypkontrolle den Vorteil, dass Kreuzreaktivitäten aufgedeckt werden können. Bindet der Antikörper neben seinem spezifischen Epitop ein weiteres Protein, so tritt dieses auch in der Kontroll-IP auf und kann aus der Analyse ausgeschlossen werden. Dieses experimentelle System bietet damit die Möglichkeit zur subtraktiven bzw. differentiellen Analyse beider Ansätze. Durch den gewählten, differentiellen Ansatz konnte auf stringentes Waschen (z.B. unter Verwendung eines Waschpuffers mit hoher Salz- bzw. Detergenzkonzentration) verzichtet werden. Unspezifisch gebundene Proteine, die auch in der Kontrolle auftreten, können so im Nachhinein bei der Auswertung aus der Analyse entfernt werden. Durch die schonendere Behandlung wurde die Wahrscheinlichkeit erhöht, dass auch schwach interagierende Proteine aufgereinigt und nicht beim Waschen aus dem Multiproteinkomplex entfernt wurden.

Als weiterer Vorteil kann angeführt werden, dass durch die Substitution des LMP1-Gens durch ein HA-LMP1-Gen kein endogenes LMP1-Protein ohne HA-Epitop mehr in der Zelle vorhanden war. LMP1 würde sonst mit HA-LMP1 um interagierende Proteine kompetitieren, was die mögliche Ausbeute an Interaktionspartnern reduzieren könnte. Schließlich befand sich das Gen von HA-LMP1 in seinem viralen Kontext, so dass es genau wie wildtypisches LMP1 reguliert werden konnte.

Dennoch konnte mit der IP aus HA-LCLs kein durchweg überzeugendes Ergebnis erreicht werden (siehe Abbildung 15), da sich die identifizierten Proteine beinahe ausschließlich auf das Zytoskelett beschränkten und nach dem Entfernen der identifizierten Proteine, die auch in der Kontrolle auftraten, nur noch wenige Kandidaten übrig blieben. Bei den Proteinen des Zytoskeletts handelte es sich wahrscheinlich nicht um eine Kontamination, die durch stringenteres Waschen reduziert werden könnte. Stattdessen ist bekannt, dass LMP1 spezifisch über seinen N-Terminus und Transmembrandomänen mit dem Zytoskelett interagiert (Coffin et al., 2001). Daher musste eine Reinigungsstrategie entworfen werden, bei der der C-Terminus von LMP1 mit seinen assoziierten Proteinen von dem restlichen Protein mit dem interagierenden Zytoskelett nach der Präzipitation des Komplexes abgeschnitten werden konnte. Dies wurde durch die eingefügte TEV-Schnittstelle realisiert. Nach dem Einfügen einer Übergangssequenz zwischen Transmembrandomänen und der TEV-Schnittstelle konnte eine hohe Effizienz bei der TEV-Protease-Spaltung erzielt werden (ca. 80-100 %). Dieses Verfahren besitzt darüber hinaus den weiteren Vorteil, dass Proteine, die unspezifisch an die *beads* oder den Antikörper binden, nicht aufgereinigt werden. Das resultierende HA-LMP1-2xli-TEV-CT konnte den JNK-Signalweg induzieren (siehe Abbildung 20), was grundsätzlich die Aktivität des Konstrukts bestätigte. Das Auswachsen der TEV-LCLs beweist, dass HA-LMP1-2xli-TEV-CT die für die Immortalisierung von humanen B-Zellen notwendigen Signalwege aktivieren kann, da LCLs von der Aktivität von LMP1 abhängig sind. Damit wurde eine Reinigungsstrategie entworfen, die direkt an die spezielle Topologie des LMP1-Moleküls angepasst sind. Durch den zweiten Aufreinigungsschritt, in dem der C-Terminus von LMP1 abgetrennt wurde, sowie der Inkubation der Lysate über Nacht (vgl. Abschnitt 4.1.2) konnte eine Reduktion des Zytoskeletts in der Analyse erreicht werden (siehe Abbildung 27).

Denkbar wäre es, darüber hinaus einen weiteren Aufreinigungsschritt über einen zusätzlichen *tag* am C-Terminus von LMP1 einzufügen. Hierbei besteht allerdings das Problem, dass für einen aktiven Signalkomplex eine Zusammenlagerung von mehreren LMP1-Molekülen notwendig ist (Gires et al., 1997; Kieser et al., 1997), was durch die Transmembrandomänen erreicht wird. Ein separat exprimierter C-Terminus rekrutiert keine TRAF-Moleküle (persönliche Mitteilung von Thomas Knöfel), was darauf hindeutet, dass nach dem Abschneiden des C-Terminus von LMP1 der Signalkomplex auseinanderbricht. Eine weitere Aufreinigung des TEV-verdauten C-Terminus von LMP1 erschien daher nicht zielführend.

5.1.2 Analyse des LMP1-Signalkomplexes mittels MALDI-TOF/TOF

Die Reduktion der Komplexität einer Probe ist für eine erfolgreiche massenspektrometrische Analyse essentiell. Zwar konnte durch die IP und den anschließenden TEV-Verdau eine gute Anreicherung erzielt werden, doch befanden sich für die direkte massenspektrometrische Untersuchung noch immer zu viele Proteine in der Probe. Prinzipiell stehen zwei Möglichkeiten zur Verfügung, die nach der Reinigung erhaltene Probe für die MALDI-TOF/TOF-Analyse vorzubereiten. Zum einen können die gereinigten Proteinkomplexe in einem SDS-Gel aufgetrennt werden und nach einer Silberfärbung einzelne sichtbare Protein-

banden ausgeschnitten werden. Die in den Banden enthaltenen Proteine werden dann im Gel tryptisch gespalten und die resultierenden Peptide direkt mittels MALDI-TOF/TOF-Analyse analysiert. Problematisch an diesem Verfahren ist, dass eine Bande in einem SDS-Gel nicht nur ein Protein enthält. Bei der massenspektrometrischen Untersuchung werden dann oft nur die abundanten Peptide identifiziert, die aufgrund unterschiedlicher Ionisierung auch aus verschiedenen Proteinen stammen können. Solche Mischspektren sind in der Regel schwierig auszuwerten (Gingras et al., 2005), zumal in diesem Verfahren der Salzgehalt der Probe oft die Ionisierung der Peptide erschwert.

Eine andere Möglichkeit besteht darin, die Proteine zunächst in Peptide zu verdauen und diese anschließend mittels HPLC aufzutrennen. Dieses Verfahren kann auf den gesamten Ansatz angewendet werden, es kann aber auch ein SDS-Gel vorgeschaltet werden. In dieser Arbeit wurden die gereinigten Protein-komplexe zunächst in einem SDS-Gel über eine kurze Strecke aufgetrennt und die Spur in drei Größenbereiche getrennt, was die Komplexität der Probe noch einmal reduzierte. Die Proteine wurden dann im Gel tryptisch verdaut und das resultierende Peptidgemisch mittels nanoHPLC ihrer Hydrophobizität entsprechend aufgetrennt und gleichzeitig entsalzt. Die chromatographische Auftrennung sorgte dafür, dass in jeder Fraktion nur eine geringe Anzahl an Peptiden enthalten war und stellte damit eine weitere Reduktion der Komplexität der Probe dar.

Da bei einer MALDI-TOF/TOF-Analyse die Proben *offline* gemessen werden können, besteht keine zeitliche Limitierung bei der Precursorwahl, wie es bei *online* LC-ESI-MS-Kopplung der Fall ist. Dadurch ist es zum einen möglich, mehr Precursor zu analysieren. Zum anderen kann ein MS/MS-Spektrum für eine Precursormasse optimiert und dadurch eine bessere Proteinidentifizierung ermöglicht werden.

Es stellt sich die Frage, wieso keine bekannten LMP-1 interagierenden Proteine detektiert werden konnten. TRAF5 wurde einmal identifiziert, doch erfüllte die erreichte Signifikanz nicht die geforderten Kriterien (siehe Abschnitt 3.6.3). Experimente mit aufgereinigtem TRAF3 konnten zeigen, dass die Peptide mit der MALDI-Technik eine schlechte Ionisierung aufweisen. Hier könnte eine andere Ionisierungsform mittels ESI Abhilfe schaffen, denn mit MALDI- und ESI-Geräten können oft unterschiedliche Proteine identifiziert werden. Die beiden Methoden lassen sich daher im Bezug auf die Ionisierung als komplementär ansehen (Domon and Aebersold, 2006).

Weiterhin ist anzumerken, dass es sich bei der hier verwendeten Methode nicht um eine quantitative Methode handelt. Die Häufigkeit, mit der ein Protein in den Reinigungen identifiziert werden konnte, lässt somit keine Aussagen über die Menge des gebundenen Proteins zu. Um dieser Frage nachzugehen, müssen andere Techniken verwendet werden, die eine Quantifizierung ermöglichen, etwa SILAC, ICAT oder ICPL.

5.1.3 Potenzielle neue LMP1-Interaktionspartner und ihre möglichen Funktionen im Kontext von LMP1

Die in der massenspektrometrischen Analyse identifizierten möglichen neuen LMP1-Interaktionspartner wurden aufgrund ihrer Funktion in verschiedene Gruppen eingeteilt. Auch in der Analyse aus TEV-LCL5 Zellen sind die meisten Proteine Bestandteile des Zytoskeletts. Hierfür gibt es verschiedene Erklärungsmöglichkeiten. Zum einen könnten sich die Strukturmoleküle während des TEV-Verdaus unspezifisch von

den *beads* lösen. Zum anderen gibt es Hinweise, dass neben dem N-Terminus und den Transmembrandomänen auch CTAR1 und CTAR2 eine Rolle in der Interaktion mit dem Zytoskelett spielen könnten (Higuchi et al., 2001).

Neben den Zytoskelett-Proteinen wurden Proteine aus anderen Funktionsgruppen gefunden, aus der Signaltransduktion, Proteine des Ubiquitin-Proteasom-Systems, Kernproteine oder Proteine, die nicht weiter kategorisiert wurden oder über deren Bedeutung nur sehr wenig bekannt ist. Insbesondere bei der Gruppe der Kernproteine könnte es sich um Kontaminationen handeln, wofür es zwei mögliche Gründe gibt. Zum einen kann es sich um falsch-positiv identifizierte Proteine handeln, d.h. die Proteine waren nicht in dem analysierten Ansatz und stellen einen Artefakt im Rahmen der Auswertung dar. Durch das verwendete Auswertungsverfahren mit der Software Scaffold wurde versucht, diesen Anteil möglichst gering zu halten. Der in Scaffold verwendete Peptide Prophet Algorithmus benutzt eine Regressionsrechnung, um die Verteilung von richtigen und falschen Zuordnungen der Peptide zu bestimmen. Auf die Ergebnisse wird eine Bayes-Statistik angewendet. So können sowohl in großen als auch in kleineren Datensätzen geringe Fehlerraten erreicht werden (Keller et al., 2002; Nesvizhskii et al., 2003). Ein weiterer Grund für das Auftreten von fälschlich identifizierten Proteinen kann in einer Kontamination der Probe liegen; d.h. es befanden sich Proteine in der Probe, die LMP1 nicht spezifisch gebunden hatten. Durch das konsequente Mitführen der Kontrolle konnten einige Proteine aus den Listen ausgeschlossen werden. Dennoch ist es möglich, dass nicht alle Kontaminanten gefunden worden sind. So kann es zum Beispiel durch klonale Effekte dazu kommen, dass manche Proteine in der Kontrolllinie schwächer exprimiert waren und sich dadurch unterhalb der Detektionsgrenze befanden. Eine weitere mögliche Ursache liegt in der Reproduzierbarkeit der Methode. So überlappen die Listen aus zwei gleichen Experimenten nach einer LC/MS/MS-Analyse zu 80 %. Für diese technisch bedingte Differenz sind im Besonderen Verlust an der Vor- und Trennsäule der HPLC verantwortlich. Daher wurden die massenspektrometrischen Experimente in dieser Arbeit jeweils vierfach reproduziert. Dennoch ist nicht auszuschließen, dass es sich bei manchen der identifizierten Proteine um falsch-positive Ergebnisse handelt. Daher ist es wichtig, die hier identifizierten Proteine nur als Kandidaten für eine LMP1-Interaktion anzusehen, die in einem weiteren, unabhängigen Verfahren bestätigt werden müssen.

TNIK und CD48 wurden bereits im Western Blot als LMP1-interagierende Proteine bestätigt. Auf sie wird in den Abschnitten 5.1.4 und 5.1.5 gesondert eingegangen. Die folgende Diskussion von einigen Kandidatenproteinen beschränkt sich auf potentielle LMP1-Interaktionspartner aus der Gruppe der Signalproteine.

5.1.3.1 14-3-3 Proteine

Das Protein 14-3-3 β/α wurde in drei Analysen mit einer Wahrscheinlichkeit von 100 %, 100 % und 87 % identifiziert. Darüber hinaus konnten noch zwei weitere Proteine der gleichen Familie, wenn auch mit deutlich geringerer Wahrscheinlichkeit, identifiziert werden, 14-3-3 ζ/δ und 14-3-3 ϵ in jeweils einer Analyse mit 93 %.

Die Familie der 14-3-3 Proteine wurde 1967 in Proteinanalysen des Gehirns entdeckt (Moore and Perez, 1967), wobei sich ihr Name von der Fraktionsnummer der DEAE-Zellulose Chromatographie und ihrer Position in der nachfolgenden Gelelektrophorese ableitet. 14-3-3 Proteine sind stark konservierte, saure Proteine mit einem Molekulargewicht von ca. 30 kDa, die ubiquitär exprimiert werden (Fu et al., 2000). Sie sind an einer Vielzahl zellulärer Prozesse beteiligt, etwa dem Zellzyklus (Hermeking and Benzinger,

2006), der Reorganisation des Zytoskeletts (Dougherty and Morrison, 2004), der Apoptose (Porter et al., 2006), an verschiedenen Signaltransduktionswegen (Dougherty and Morrison, 2004) und an zahlreichen Krebserkrankungen (Hermeking, 2006). 14-3-3 Proteine besitzen eine Vielzahl an Zielproteinen, die über alle zellulären Kompartimente verteilt sind. Es sind über einhundert 14-3-3-interagierende Proteine bekannt (Dougherty and Morrison, 2004). Um seine Zielproteine zu binden, bilden 14-3-3 Proteine in der Regel Dimere, indem sie über ihre N-Termini interagieren (Aitken, 2006). 14-3-3 Proteine binden spezifisch an phosphorylierte Serine und Threonine, wobei verschiedene Bindemotive existieren (Rittinger et al., 1999; Yaffe et al., 1997). Darüber hinaus ist auch eine phosphorylierungsunabhängige Bindung möglich (Henriksson et al., 2002). LMP1 verfügt über keines der klassischen 14-3-3-Bindemotive. Die Bindung an die Zielproteine kann über verschiedene Phosphorylierungen innerhalb der Konsensussequenz reguliert werden, was über verschiedene Kinasen erfolgen kann. In der Dephosphorylierung und damit in der Regulation spielen die Serin/Threonin-Phosphatasen PP2A und PP1 eine entscheidende Rolle (Dougherty and Morrison, 2004). Interessanterweise konnte auch die katalytische Untereinheit von PP1 auch als potenzieller Interaktionspartner von LMP1 in dieser Arbeit identifiziert werden.

5.1.3.2 Proteinphosphatase 1

Die Serin/Threonin-Phosphatase PP1 ist ein ubiquitär exprimiertes Protein, das sich aus einer katalytischen und einer regulatorischen Untereinheit zusammensetzt, wobei über 50 verschiedene regulatorische Untereinheiten bekannt sind (Cohen, 2002). PP1c, die katalytische Untereinheit, wurde in zwei Analysen mit 99 % und 87 % in dieser Arbeit als potenzielles Bindeprotein von LMP1 identifiziert. Darüber hinaus wurde die regulatorische Untereinheit 12A mit einer Wahrscheinlichkeit von 90 % identifiziert. Das Auffinden einer zweiten Untereinheit erhöht die Wahrscheinlichkeit, dass es sich um eine korrekte Identifizierung handelt.

PP1 kontrolliert eine große Bandbreite an zellulären Prozessen, einschließlich der Zellteilung (Margolis et al., 2003), des Glykogenstoffwechsels (Stralfors et al., 1985), der Transkription (Hagiwara et al., 1992), der Proteintranslation (Novoa et al., 2001) sowie Prozesse des Gedächtnisses und des Lernens (Genoux et al., 2002). Dazu greift PP1 in verschiedene Signalwege ein. Es dephosphoryliert etwa den cAMP-responsiven Faktor CREB, um die cAMP-abhängige Transkription zu inhibieren (Hagiwara et al., 1992).

Weiterhin beeinflusst es den Wnt/ β -Catenin Signalweg, indem es mit Axin interagiert und es dephosphoryliert. Dadurch wird die Interaktion von Axin und der Glykogen Syntase Kinase 3 geschwächt. So wird β -Catenin weniger phosphoryliert und damit stabilisiert. PP1 reguliert also den β -Catenin Degradationskomplex negativ (Luo et al., 2007).

PP1 wirkt auch auf die Regulation des Zellzyklus über Cdc25, wobei hier auch 14-3-3 eine Bedeutung besitzt. Während 14-3-3 Cdc25 im Zytoplasma zurückhält, kann PP1 direkt mit dem N-Terminus von Cdc25 interagieren und die Andockstelle von 14-3-3 dephosphorylieren (Margolis et al., 2003). Cdc25 kann nicht mehr von 14-3-3 gebunden werden und kann in den Nukleus translozieren.

Auch in den MAPK-Signalweg greift PP1 ein, indem es die Raf-1-Aktivität fördert (Jaumot and Hancock, 2001). Hier liegt ein weiterer Berührungspunkt zwischen 14-3-3 und PP1, denn eine Inhibition von PP1 und PP2A führt zu einer Akkumulation von nicht aktivierbaren Raf-1/14-3-3 Komplexen an der Plasmamembran. Jaumot und Hancock stellten daher folgendes Modell auf: Raf-1 interagiert mit 14-3-3 im Zy-

toskelett und wird von GTP-Ras an die Plasmamembran rekrutiert. Nachdem 14-3-3 verdrängt worden ist, kann PP1 Raf-1 dephosphorylieren, wodurch es in eine andere Mikrodomäne der Membran rekrutiert wird. In dieser Mikrodomäne ist Raf-1 jetzt aktivierenden Kinasen zugänglich und kann vollständig aktiviert werden (Jaumot and Hancock, 2001).

PP1 fördert also die Aktivierung von Raf-1. Hier könnte ein Anknüpfungspunkt zur Signaltransduktion von LMP1 liegen, denn LMP1 kann die ERK-MAPK-Signaltransduktion induzieren. In Rat-1 Fibroblasten konnte *in vitro* eine Auswirkung der Aktivierung des ERK-MAPK-Signalwegs durch LMP1 auf die Transformation gezeigt werden (Mainou et al., 2007). Darüber hinaus verstärkt die Aktivierung dieses Signalwegs durch LMP1 die Zellmotilität und führt damit einer höheren Invasivität von Epithelzellen. Hierbei induziert LMP1 ERK-MAPK zwar unabhängig von Ras aber über den kanonischen Raf-MEK-ERK-MAPK-Signalweg (Dawson et al., 2008). Zwar ist der Mechanismus dieser Aktivierung noch unklar, doch könnte auch hier PP1 eine Rolle spielen. Denkbar ist, PP1 auch im Kontext von LMP1 Raf-1 dephosphoryliert und so eine Aktivierung der Kinase ermöglicht.

5.1.3.3 Interleukin-16

Interleukin-16 (IL-16) wurde in einem Experiment mit einer Wahrscheinlichkeit von 100 % identifiziert. IL-16 wurde 1982 zum ersten Mal als chemoanziehender Faktor von T-Zellen beschrieben (Center and Cruikshank, 1982; Cruikshank and Center, 1982), das vor allem von aktivierten CD8⁺ T-Lymphozyten produziert und ausgeschüttet wird (Center et al., 1996). Es wird aber auch von B-Zellen sezerniert (Sharma et al., 2000). Bei IL-16 handelt es sich um ein multifunktionales Zytokin, dessen Vorläufer (pro-IL-16) in verschiedenen Geweben und in peripheren mononuklearen Blutzellen detektiert werden konnte (Chupp et al., 1998). Das Protein wird zunächst als ca. 80 kDa großes Vorläuferprotein synthetisiert (Baier et al., 1997) und durch Caspase 3 proteolytisch in 14 - 17 kDa große Peptide geschnitten und anschließend sezerniert (Chupp et al., 1998; Sciaky et al., 2000; Zhang et al., 1998). Diese Peptide multimerisieren dann zu einem Homotetramer von ca. 56 kDa, das die physiologisch aktive Form bildet. IL-16 bindet direkt an CD4 und reguliert eine Reihe von zellulären Vorgängen, wie etwa den Eintritt in die G₁-Phase des Zellzyklus, die Inhibition der Antigen-spezifischen Proliferation von T-Zellen und die Hochregulation von CD25 (Glass et al., 2006). Darüber hinaus scheint es eine Rolle in infektiösen und immunvermittelten Entzündungserkrankungen zu spielen (Glass et al., 2006).

IL-16 wird auch in B-Lymphozyten produziert (Sharma et al., 2000), wobei es Hinweise gibt, dass EBV die Freisetzung von aktivem IL-16 verstärkt. Spender et al. konnten IL-16 als mögliches Zielgen von EBNA2 identifizieren, wobei sie eine Induktion der Caspase 3-Aktivität nach EBV-Infektion beobachten konnten (Spender et al., 2002). Sie vermuten, dass eine IL-16 Freisetzung während der primären EBV-Infektion *in vivo* die CD4⁺ T-Zell-Aktivität negativ regulieren könnte. CD4⁺ T-Zellen können *in vitro* die Proliferation von frisch infizierten B-Zellen inhibieren (Zhang et al., 1998), so dass IL-16 in der frühen Phase der EBV-Infektion die Proliferation der infizierten Zellen fördern könnte. Es ist beschrieben, dass IL-16 neben CD4 auch mit anderen Rezeptoren interagieren kann, etwa mit CD9 in Mastzellen (Qi et al., 2006). Denkbar wäre daher auch eine Interaktion mit dem Pseudorezeptor LMP1. Im Gegensatz zu zellulären Rezeptoren muss LMP1 allerdings nicht durch einen Liganden aktiviert werden sondern ist konstitutiv aktiv, so dass eine klassische Rezeptor-Liganden-Interaktion zwischen IL-16 und LMP1 unwahrscheinlich ist.

5.1.3.4 LRMP/Jaw1

Das Membranprotein Jaw1 wurde in dem Ansatz aus HA-LCL3-Lysaten in einem Versuch mit einer Wahrscheinlichkeit von 87 % und in einem zweiten mit 15 % identifiziert. In den Experimenten aus TEV-LCL5-Lysaten konnte es hingegen nicht identifiziert werden. Es wird aufgrund seines Expressionsmuster auch als *lymphoid restricted membrane protein* (LRMP) bezeichnet, da es in B- und T-Zellen exprimiert wird. Besonders große Expressionsniveaus konnten in den B-Zellen des Keimzentrums sowie in B-Zell-Lymphomen detektiert werden. Auch in anderen Krebsarten lymphoiden Ursprungs konnte LRMP/Jaw1 nachgewiesen werden, etwa in Burkitt Lymphomen oder bestimmten Subtypen von Hodgkins Erkrankungen. Daher stellt es einen Marker für B-Zell-Lymphome dar (Tedoldi et al., 2006). Die Expression von Jaw1 kann durch LMP1 induziert werden (Cahir-McFarland et al., 2004).

Jaw1 besteht aus 539 AAs mit einer hoch-konservierten *coiled-coil*-Domäne im mittleren Drittel des Proteins und einer C-terminalen Transmembrandomäne und ist im endoplasmatischen Retikulum lokalisiert (Behrens et al., 1994; Behrens et al., 1996). Die Funktion von Jaw1 ist nicht bekannt. Da LMP1 nicht nur in der Plasmamembran als auch intrazellulären Kompartimenten lokalisiert ist (Lam and Sugden, 2003b), könnte es im endoplasmatischen Retikulum mit Jaw1 interagieren.

5.1.4 CD48 und seine mögliche Rolle als LMP1 Interaktionspartner

CD48 konnte als einziges Protein mit Ausnahme des Zytoskeletts mit beiden Methoden in der massenspektrometrischen Analyse identifiziert werden. Zwar erreicht es in der Auswertung mit Scaffold keinen hochsignifikanten Wahrscheinlichkeitswert (*score*), doch ergeben die Auswertungen mit der GPS-Explorer Software in drei von vier Läufen eine Wahrscheinlichkeit der Identifizierung von über 98 %. Darüber hinaus weist das MS/MS-Spektrum fast durchgängige y- und b-Reihen auf, was die Identifikation weiter absichert.

CD48 konnte darüber hinaus in einer unabhängigen IP als LMP1-interagierendes Protein nachgewiesen werden (siehe Abbildung 29). Ein Zusammenhang zwischen EBV und CD48 war bereits vor dieser Arbeit bekannt. CD48 wurde als erstes Zelloberflächenprotein beschrieben, dessen Expression nach einer EBV-Infektion hochreguliert wird (Thorley-Lawson et al., 1982). Stromaufwärts seines Promotors befindet sich ein *enhancer*-Element mit einer NF- κ B-Bindestelle, die von LMP1 aktiviert wird (Klaman and Thorley-Lawson, 1995). LMP1 induziert also CD48 und kann es, wie hier gezeigt werden konnte, darüber hinaus auch rekrutieren.

CD48 wird in humanen B- und T-Zellen exprimiert (Hadam, 1989). Es handelt sich um ein membranständiges Protein, das über Glykosylphosphatidylinositol in der Membran verankert ist (Staunton et al., 1989). In Nagern fungiert es als Ligand von CD2 (Brown et al., 1995; Kaplan et al., 1993; Kato et al., 1992; van der Merwe et al., 1993), wo es in der Aktivierung von T- und B-Zellen eine Rolle spielt (Garnett and Williams, 1994; Maschek et al., 1993; Moran and Miceli, 1998). So induziert die Quervernetzung von CD48 in B-Lymphozyten von Ratten und Mäusen eine starke homotypische Adhäsion, was für eine Bedeutung in der Signaltransduktion und in der B-Zell-Aktivierung spricht (Garnett and Williams, 1994). Die Interaktion von CD48 mit CD2 kann zudem Apoptose in murinen B-Zellen inhibieren (Baixeras et al., 1996). In humanen Zellen interagiert CD48 jedoch nicht mit CD2 (Ianneli et al., 1997). Es konnte aber ein kostimulatori-

scher Effekt von CD48 auf CD40 in B-Lymphozyten gezeigt werden, die zu einer Induktion der Proliferation, der Sekretion von IgG und einer erhöhten Tyrosin-Phosphorylierung in der Zelle führt (Klyushnenkova et al., 1996). Da LMP1 das virale Homolog zu CD40 darstellt (vgl. Abschnitt 1.2.2), liegt die Vermutung nahe, dass die Rekrutierung von CD48 durch LMP1 ebenfalls zur B-Zell-Proliferation beitragen könnte.

5.1.5 TNIK und seine mögliche Rolle als LMP1 Interaktionspartner

TNIK wurde 1999 von Fu et al. kloniert und kodiert für ein Protein aus 1360 Aa, das der Familie der GCK-Kinasen (*germinal center kinase*) zugeordnet werden konnte (Fu et al., 1999). TNIK verfügt über eine N-terminale Kinasedomäne, eine intermediäre Domäne und eine C-terminale GCK-Homologieregion. In Koimmunpräzipitationen wurde gezeigt, dass TNIK mit Nck interagiert. Darüber hinaus kann TNIK über die intermediäre Domäne mit TRAF2 interagieren, wie in *yeast two-hybrid* Untersuchungen gezeigt werden konnte (Fu et al., 1999). Eine Überexpression von TNIK rearrangiert das Aktin-Zytoskelett und aktiviert spezifisch den JNK-Signalweg, was durch die GCK-Homologieregion vermittelt wird (Fu et al., 1999). Eine biologische Funktion oder ein TNIK-aktivierender Rezeptor ist jedoch noch nicht bekannt.

In der massenspektrometrischen Analyse konnte TNIK lediglich mit der GPS-Explorer Software mit einer Wahrscheinlichkeit von über 95% in einem der Versuche als signifikant identifiziert werden, während es mit Hilfe Scaffold Software unter der geforderten Signifikanzschwelle lag. Darüber hinaus konnte TNIK in unserer Arbeitsgruppe mit einem weiteren massenspektrometrischen Ansatz nach GST-Koppräzipitation und anschließendem TEV-Verdau als potenzieller Interaktionspartner von LMP1 detektiert werden (Thomas Knöfel, unpublizierte Daten). Die Interaktion von TNIK und LMP1 wurde hier über Koimmunpräzipitationen in LCLs bestätigt. Darüber hinaus konnte in Koimmunpräzipitationen von verschiedenen LMP1-Mutanten in HEK293 Zellen CTAR2 als Bindedomäne von TNIK identifiziert werden. Ob es sich hierbei um eine direkte Interaktion handelt, kann mit den hier verwendeten Methoden nicht beantwortet werden. Wahrscheinlich scheint aber, dass es sich um eine indirekte Bindung handelt, die etwa über TRAF-Moleküle vermittelt werden konnte, zumal eine Interaktion zwischen TRAF2 und TNIK bereits beschrieben wurde (Fu et al., 1999). Allerdings muss angemerkt werden, dass TRAF2 in der Signaltransduktion von LMP1 an CTAR2 keine Bedeutung besitzt (Luftig et al., 2003; Wan et al., 2004; Xie et al., 2004). Ein weiteres mögliches Mitglied der TRAF-Familie wäre TRAF5, das TRAF2 in TRAF2-defizienten Zellen teilweise substituieren kann (Tada et al., 2001). Allerdings spielt auch TRAF5 an CTAR2 von LMP1 keine Rolle, hier sind stattdessen TRAF3 und TRAF6 von Bedeutung (Luftig et al., 2003; Schultheiss et al., 2001; Wu et al., 2006; Xie and Bishop, 2004; Xie et al., 2004). Eine Bindung könnte daher über eines dieser Proteine vermittelt werden.

Es stellt sich die Frage, welche Bedeutung TNIK in der Signaltransduktion von LMP1 einnimmt. Die Interaktion von TNIK mit CTAR2 deutet auf eine Funktion im JNK- oder NF- κ B-Signalweg hin. Eine Aktivierung des JNK-Signalwegs nach TNIK-Überexpression ist bereits beschrieben (Fu et al., 1999). Daher lag die Vermutung nahe, dass TNIK einen Mediator der JNK-Aktivierung durch LMP1 darstellen könnte. Untersuchungen zur Aktivierung des JNK-Signalwegs haben gezeigt, dass Zellen, die mit TNIK-spezifischer siRNA transfiziert wurden, eine geringere JNK-Aktivität nach LMP1-Expression aufwiesen als solche, die mit Kontroll-siRNA behandelt wurden (persönliche Mitteilung von Anna Skoda). Da der JNK-Signalweg einen entscheidenden Beitrag zur Transformation durch LMP1 leistet (Kutz et al., 2008), konnte mit Hilfe der Ergebnisse dieser Arbeit die erste biologische Funktion von TNIK nachgewiesen werden.

LMP1 stellt den ersten bekannten (Pseudo-) Rezeptor von TNIK dar. Hieraus könnten sich auch Hinweise für die zelluläre Rolle der TNIK ergeben. So könne ein zellulärer Rezeptor der TNIK mit ähnlichen Signalmolekülen wie LMP1 interagieren, wie z. B. CD40, der ebenso wie LMP1 JNK induziert (Li et al., 1996; Sakata et al., 1995).

5.2 SHP-1 als LMP1-assoziiertes Protein

Die Tyrosin-Phosphatase SHP-1 wurde von Thomas Knöfel aus unserer Arbeitsgruppe erstmals in GST-LMP1-Kopräzipitations-Experimenten mit anschließender massenspektrometrischer Analyse gefunden (siehe Abschnitt 4.2). Sie reguliert eine Vielzahl verschiedener Signalwege, wobei ihr oft eine negative Rolle in der Modulation von Zellfunktionen zugeschrieben wird. Eine Vielzahl der Signalwege, in die SHP-1 involviert ist, können von LMP1 aktiviert werden, etwa NF- κ B, JNK oder PI3K/Akt1 (siehe Abschnitt 1.2.4 und Abschnitt 1.3.2.2). Es bestehen also zahlreiche Berührungspunkte zwischen LMP1 und SHP-1. So interagieren beide Proteine etwa mit TRAF6 (Schultheiss et al., 2001; Zhang et al., 2003a) oder mit Mitgliedern der Jak/STAT-Familie (Gires et al., 1999; Han et al., 2006a; Han et al., 2006b).

Darüber hinaus wurde SHP-1 bereits als möglicher Effektor der TNFR-Signaltransduktion beschrieben (Xie et al., 2000; Zhang et al., 2003a). Die TNFR-Familie und LMP1 besitzen auffällige Gemeinsamkeiten. So weist die Signaltransduktion des zellulären TNFR1 und des viralen LMP1 deutliche Parallelen im Bezug auf die Zusammensetzung des Signalkomplexes auf, auch wenn die biologische Funktion zum Teil sehr unterschiedlich ist (Schneider, 2005). Funktionell hingegen ähnelt LMP1 einem anderen Mitglied der TNFR-Familie, dem CD40-Rezeptor (siehe Abschnitt 1.2.2). Daher wird LMP1 auch als dessen virales Analogon bezeichnet (Lam and Sugden, 2003a).

Insgesamt schien zu Beginn der vorliegenden Arbeit viel für eine Verbindung zwischen SHP-1 und LMP1 zu sprechen. Daher bestand ein Ziel dieser Doktorarbeit darin, die Bindung zwischen LMP1 und SHP-1 näher zu charakterisieren und die Funktion von SHP-1 in der LMP1-Signaltransduktion zu untersuchen.

5.2.1 Kartierung der Bindungsstelle von SHP-1 an LMP1

Wie in Abschnitt 5.1.3 erwähnt, ergibt die Identifikation eines Proteins in einem Massenspektrometrie-Ansatz erst einen ersten Hinweis auf eine tatsächliche Interaktion. Ein wichtiges Ziel war es daher, SHP-1 als Interaktionspartner von LMP1 zu bestätigen. Wie bereits erwähnt, wurde SHP-1 in Präzipitationsexperimenten mit bakteriell aufgereinigtem GST-LMP1-Fusionsprotein detektiert. Durch Koimmunpräzipitationen in LCLs konnte in dieser Arbeit die Bindung bestätigt werden (siehe Abbildung 34). Damit wurde weiterhin gezeigt, dass die Interaktion auch unter physiologischen Bedingungen gegeben ist und somit nicht nur bei starker Überexpression von LMP1 wie in dem Kopräzipitationsexperiment.

Weiterhin konnte die Bindestelle von SHP-1 an LMP1 eingegrenzt werden und gezeigt werden, dass die beiden As Y₁₈₅ und Y₁₈₆ in GST-Kopräzipitationen essenziell sind (siehe Abbildung 39). Hierbei ist anzumerken, dass sich das Bindemotiv von SHP-1 an LMP1 nicht notwendigerweise auf die beiden Tyrosine beschränken muss. Vielmehr ist davon auszugehen, dass daneben noch weitere Aminosäuren für die Interaktion notwendig sind. Zwei aufeinander folgende Tyrosine kommen in Proteinen häufig vor, weshalb anzunehmen ist, dass es noch weiterer Aminosäuren bedarf, um das Bindemotiv vollständig zu beschrei-

ben. Die Bindung zwischen SHP-1 und LMP1 ist unabhängig von TRAF-Molekülen, da auch in Abwesenheit von TRAF-Bindestellen SHP-1 mit LMP1 interagieren kann. Stattdessen beruht sie auf einem völlig neuen Bindemotiv in LMP1, das unabhängig von CTAR1 und CTAR2 direkt an den Transmembrandomänen lokalisiert ist.

Die ungewöhnliche Bindestelle von SHP-1 an LMP1 liefert die Begründung dafür, dass SHP-1 in den TEV-Eluaten aus TEV-LCL5-Zellen nicht identifiziert werden konnte. Die TEV-Schnittstelle ist C-terminal direkt hinter der SHP-1-Interaktionsstelle lokalisiert, so dass SHP-1 nicht mit dem C-Terminus von LMP1 von den *beads* geschnitten werden kann.

Die Frage, ob SHP-1 direkt an LMP1 bindet, konnte mit den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten nicht beantwortet werden. In den verwendeten Zelllysaten könnten auch weitere Proteine die Bindung vermitteln. Zwar kommen die bekanntesten LMP1-interagierenden Proteine der TRAF-Familie, TRADD oder RIP1 nicht in Betracht, da das gefundene Bindemotiv von SHP-1 außerhalb der bekannten Interaktionsstellen dieser Proteine an LMP1 lokalisiert ist. Dennoch könnte theoretisch ein weiteres, unbekanntes Protein die Bindung vermitteln. Dieser Frage wurde im Rahmen einer Kooperation mit Stephan Feller (Weatherall Institute of Molecular Medicine, Oxford University, Oxford, UK) nachgegangen. In den dort durchgeführten Studien, konnte rekombinantes aufgereinigtes GST-SHP-1 an LMP1-Peptide mit der von mir kartierten Bindungsstelle direkt binden. Es handelt sich demnach um eine direkte Interaktion. Interessant ist weiterhin, dass auch SHP-1 Mutanten, die über keine SH2-Domänen mehr verfügten, die LMP1-Peptide binden konnten (persönliche Mitteilung von Stefan Feller). Auch wenn zwei Tyrosine (Y₁₈₅ und Y₁₈₆) in LMP1 von zentraler Bedeutung für die Interaktion sind, beruht die Bindung nicht auf der klassischen Interaktion eines phosphorylierten Tyrosins mit den SH2-Domänen von SHP-1. Diese neuartige Interaktion könnte auch über LMP1 in zellulären Proteinen eine Bedeutung haben. So könnten Proteine, von denen eine Interaktion mit SHP-1 beschrieben ist, die aber nicht über die SH2-Domänen an SHP-1 binden, wie etwa Jak2 (Wu et al., 2000), über einen ähnlichen Bindungsmechanismus verfügen.

5.2.2 Die Rolle von SHP-1 in der Signaltransduktion von LMP1

Ein wichtiges Ziel dieser Doktorarbeit war schließlich die Charakterisierung der Rolle von SHP-1 in der Signaltransduktion von LMP1. Hierzu wurden drei verschiedene Systeme verwendet: SHP-1 defiziente DT40 Zellen (Maeda et al., 1998; Ono et al., 1997), die Expression von dominant negativem SHP-1 (SHP-1 C₄₅₃S) sowie Studien mit LMP1 Mutanten, die SHP-1 nicht mehr rekrutieren konnten.

In NF- κ B-Luziferase-Reporter-Gen-Experimenten konnte gezeigt werden, dass SHP-1 die LMP1-induzierte NF- κ B-Aktivierung negativ reguliert. DT40 SHP-1^{-/-} Zellen wiesen eine ca. doppelt so hohe Aktivierung von NF- κ B nach LMP1-Expression auf wie DT40 Zellen, die über ein funktionelles SHP-1 verfügten (siehe Abbildung 44). Diese erhöhte NF- κ B-Aktivität ließ sich durch die Expression von exogenem SHP-1 reverteren (siehe Abbildung 45). In Studien mit den LMP1 Mutanten LMP1 A₁₈₅A und LMP1 A₁₈₁AxxAA konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass eine Interaktion zwischen LMP1 und SHP-1 für den negativen Effekt von SHP-1 auf die NF- κ B-Aktivierung durch LMP1 notwendig ist (siehe Abbildung 45). Damit konnte nicht nur die Bedeutung der Tyrosine Y₁₈₅ und Y₁₈₆ für die SHP-1-Bindung bestätigt werden, sondern darüber hinaus ein funktioneller Effekt der Mutanten gezeigt werden. LMP1 aktiviert damit nicht nur NF- κ B, es verfügt gleichzeitig über einen Mechanismus, der die Aktivierung begrenzt. Auf eine negative Regulation

von NF- κ B durch SHP-1 weisen auch *in vivo* Studien hin. So verfügen *me^v/me^v*-Mäuse über erhöhte NF- κ B-Aktivität nach verschiedenen Stimuli wie Tumornekrosefaktor α , doppelsträngiger RNA und Interferon γ (Khaled et al., 1998; Massa and Wu, 1998). Der Mechanismus dieser Regulation ist jedoch nicht bekannt.

Im Rahmen dieser Arbeit war eine Aktivierung von NF- κ B durch die Expression von p65 unabhängig von SHP-1. Die Phosphatase muss daher oberhalb vom Transkriptionsfaktor in den Signalkaskaden die Aktivierung von NF- κ B durch LMP1 regulieren. Es stellt sich die Frage, an welcher Stelle SHP-1 ansetzt, um die NF- κ B-Signaltransduktion abzuschwächen, zumal NF- κ B von LMP1 über verschiedene Signalwege aktiviert wird. Experimente mit LMP1-Mutanten im Rahmen dieser Arbeit haben gezeigt, dass sowohl die Signaltransduktion durch CTAR1 als auch durch CTAR2 von SHP-1 negativ reguliert werden (Daten nicht gezeigt). Dieses Verhalten weist darauf hin, dass sowohl der kanonische als auch der nicht-kanonische NF- κ B-Signalweg beeinflusst werden. Die Familie der IKK Kinase besitzt eine zentrale Bedeutung in beiden Kaskaden. Während die nicht-kanonische NF- κ B-Aktivierung von IKK α abhängig ist, wird IKK β für die Induktion des kanonischen NF- κ B-Signalwegs benötigt (Luftig et al., 2003). Dennoch kann man die Signalwege nicht unabhängig betrachten, vielmehr beeinflussen sich die Signalwege gegenseitig. So werden in IKK α -defizienten murinen Mausfibroblasten Zielgene des kanonischen IKK β -abhängigen NF- κ B-Signalwegs verstärkt exprimiert (Luftig et al., 2003). Es wäre denkbar, dass SHP-1 auf die Proteine des IKK-Komplexes einwirkt, da es Hinweise gibt, dass in der IKK-Familie eine Phosphorylierung an Tyrosinen eine Bedeutung für die Aktivierung der Kinasen besitzt. So konnte für IKK β gezeigt werden, dass die beiden Tyrosine Tyr₁₈₈ und Tyr₁₉₉ phosphoryliert werden, was für die Aktivität essentiell ist (Huang et al., 2003). Ein möglicher Mechanismus, wie SHP-1 die von LMP1 induzierten NF- κ B-Signalwege regulieren könnte, wäre damit eine Dephosphorylierung von IKK β . Möglich wäre auch, dass IKK α über einen analogen Mechanismus von SHP-1 reguliert wird. Um diese These zu überprüfen, könnten z.B. IKK-Präzipitationen nach transienter Expression von LMP1 wt und SHP-1-bindungsdefizienten LMP1-Mutanten mit anschließendem Nachweis mit Phospho-Tyrosin-spezifischen Antikörper Aufschluss geben. Darüber hinaus könnten IKK-Immunkomplex-Kinaseversuche in An- und Abwesenheit von SHP-1 Klarheit bringen, ob SHP-1 die Aktivität der Kinasen beeinflusst.

Ein weiteres mögliches Zielprotein von SHP-1 in der Signaltransduktion von LMP1 könnte die Januskinase Tyk2 darstellen. Eine Interaktion zwischen LMP1 und Tyk2 wurde von Geiger und Martin beschrieben, wobei diese Interaktion ebenso wie die von LMP1 und SHP-1 unabhängig von CTAR1 und CTAR2 ist (Geiger and Martin, 2006). Für die Aktivierung muss Tyk2 tyrosin-phosphoryliert werden, woraufhin es seine Substrate, wie etwa STAT2, phosphorylieren kann. Geiger et. al. beschreiben, dass LMP1 die Phosphorylierung von Tyk2 vermindert und die Kinase so inaktiviert wird. Die Januskinasen stellen bekannte Zielproteine von SHP-1 dar. Zwar ist die Aktivität von Tyk2 in SHP-1 defizienten *motheaten* Zellen nicht erhöht (Shuai and Liu, 2003), doch konnte von Wu et al. in H9 Zellen gezeigt werden, dass SHP-1 das Proteinniveau von Tyk2 negativ beeinflusst, indem es die Degradation der Kinase beschleunigt (Wu et al., 2003a). Damit könnte die Interaktion von LMP1 mit SHP-1 den Mechanismus für die Inhibition der Tyk2-Phosphorylierung durch LMP1 darstellen. Diese These sollte im Rahmen dieser Arbeit überprüft werden, doch konnte der Effekt von LMP1 auf die Phosphorylierung von Tyk2 in unseren Händen nicht reproduziert werden, so dass auch nicht untersucht werden konnte, ob eine SHP-1 bindungsdefiziente LMP1-Mutante diesen Effekt reduziert.

Stattdessen konnte ein Einfluss der Interaktion von LMP1 und SHP-1 auf ein anderes Mitglied der Januskinasen-Familie gezeigt werden. So konnte in DG75 Zellen, die mit der SHP-1 bindungsdefizienten Mutante LMP1 A₁₈₅A transfiziert worden waren, eine stärkere Jak3-Phosphorylierung nachgewiesen werden als in Zellen, die mit LMP1 wt transfiziert worden waren (siehe Abbildung 50). Die Interaktion von SHP-1 und LMP1 scheint also die Aktivierung von Jak3, die durch LMP1 induziert wird, teilweise wieder aufzuheben. Dieser Effekt konnte durch dominant negatives SHP-1 (SHP-1 C₄₅₃S) aufgehoben werden, denn bei Koexpression von SHP-1 C₄₅₃S, Jak3 und LMP1 in DG75 Zellen war eine deutlich stärkere Phosphorylierung von Jak3 zu erkennen als bei einer Expression von Jak3 und LMP1 alleine (siehe Abbildung 51). In HEK293 Zellen hingegen waren die Unterschiede in der Phosphorylierung von Jak3 nach Transfektion mit LMP1 wt oder LMP1 A₁₈₅A nicht zu erkennen (siehe Abbildung 49). Diese Zellen verfügten über ein sehr geringes endogenes Expressionsniveau von SHP-1. Daher ist anzunehmen, dass die Menge an SHP-1 in der Zelle nicht ausreichend war, um mit der Phosphorylierung von Jak3 zu interferieren. Dass die Abwesenheit von SHP-1 in B-Zellen zu einer verstärkten Jak3-Phosphorylierung und einer verstärkten Aktivität führt, wurde bereits von Han et al. beschrieben (Han et al., 2006a; Han et al., 2006b).

Ein weiterer Signalweg, der durch das Rekrutieren von SHP-1 an LMP1 reguliert werden könnte, ist der JNK-Signalweg. Wie bereits in der Einleitung (siehe Abschnitt 1.3.2.2) dargestellt, besitzen B-Zellen aus *me/me* Mäusen ein konstitutiv aktives JNK (Mizuno et al., 2002). Transfiziert man B-Lymphozyten mit dominant negativem SHP-1, führt dies zu einem Anstieg der JNK-Phosphorylierung (Mizuno et al., 2000). JNK-Immunkomplex-Kinaseversuche, die im Rahmen dieser Arbeit im DT40-SHP-1 *-/-* System und in DG75 Zellen mit und ohne dominant negativem SHP-1 durchgeführt wurden, konnten bis jetzt keine belastbaren Daten liefern. DT40-Zellen weisen eine sehr geringe Transfektionseffizienz auf, so dass aus technischen Gründen keine ausreichenden Signalintensitäten generiert werden konnten. Die Experimente in DG75 Zellen konnten aus Zeitgründen nicht vollständig abgeschlossen werden. Dennoch gibt es erste Hinweise darauf, dass eine fehlende SHP-1-Bindung an LMP1 zu einer erhöhten JNK-Aktivität führen könnte. So wiesen die Konstrukte pSV-HA-LMP1-1xli-TEV-CT und pSV-HA-LMP1-2xli-TEV-CT in Abbildung 20 eine höhere JNK-Aktivität als wildtypisches LMP1 auf, obwohl die Proteine gleichstark exprimiert wurden. Die eingefügte TEV-Schnittstelle liegt direkt unterhalb der kartierten SHP-1 Bindestelle von LMP1. Geht man davon aus, dass das Einfügen der TEV-Schnittstelle sich negativ auf die Rekrutierung von SHP-1 auswirkt, könnte es die erhöhte JNK-Aktivität der Mutanten erklären. Dennoch kann die Auswirkung der SHP-1-Interaktion auf die JNK-Aktivität durch LMP1 nicht abschließend beantwortet werden, zumal SHP-1 auch einen positiven Einfluss auf die JNK-Aktivität haben kann (Xie et al., 2000).

Ein weiterer Signalweg, der sowohl von SHP-1 als auch von LMP1 reguliert wird, ist der PI3K/Akt-Signalweg. Während LMP1 den Signalweg induziert, kann SHP-1 über verschiedene Mechanismen inhibitorisch auf die Akt-Aktivität einwirken. So dephosphoryliert SHP-1 PTEN, was zu einer Aktivierung dieser Phosphatase führt. Das aktivierte PTEN kann dadurch vermehrt PIP3 zu PIP2 dephosphorylieren, so dass weniger Akt an die Membran rekrutiert und aktiviert wird (Lu et al., 2003b). Darüber hinaus kann SHP-1 die regulatorische Untereinheit p85 der PI3K dephosphorylieren. Im dephosphorylierten Zustand inhibiert diese Untereinheit die katalytische Untereinheit von p110, während die Phosphorylierung von p85 durch Src-Kinasen zu einer Aktivierung des PI3K/Akt-Signalwegs führt (Cuevas et al., 1999; Cuevas et al., 2001; Lu et al., 2003b; Yu et al., 1998). LMP1 hingegen induziert die PI3K/Akt-Signalkaskade (Dawson et al., 2003; Fresno Vara et al., 2004; Mainou et al., 2005). Denkbar wäre demnach, dass SHP-1 durch die In-

teraktion mit LMP1 in die Nähe von der PI3K gebracht wird und so die Phosphorylierung von p85 negativ regulieren könnte. Demnach müssten SHP-1-bindungsdefiziente LMP1 Mutanten über eine vermehrte Phosphorylierung und damit eine höhere Aktivität der PI3K verfügen. Denkbar ist auch, dass die Aktivität von PTEN durch SHP-1 erhöht wird, nachdem der PI3K-Signalweg zunächst durch LMP1 aktiviert worden ist. Hier würde die Interaktion von SHP-1 mit LMP1 sich nicht in einer verringerten Aktivität der PI3K sondern erst auf der Ebene von PIP3 und Akt niederschlagen. Der PI3K/Akt-Signalweg scheint besonders in Nager-Fibroblasten von Bedeutung zu sein, da er für deren Transformation durch LMP1 essentiell ist (Mainou et al., 2005). In B-Zellen konnte in meinen Händen keine überzeugende Akt-Phosphorylierung nach LMP1 Expression gezeigt werden. Auch Experimente in Rat-1 Zellen, die stabil mit verschiedenen LMP1-Mutanten transfiziert worden waren, ergaben aus technischen Gründen keine belastbaren Daten. Dennoch ist es denkbar, dass die Aktivierung von PI3K/Akt durch LMP1 von SHP-1 reguliert werden kann. Für beide vorgestellten Modelle könnte eine Western-Blot-Analyse mit Phospho-Akt-spezifischen Antikörper aus Zellen mit SHP-1 bindungsdefizienten LMP1 Mutanten vergleichend mit LMP1 wt einen Hinweis geben. Anschließend könnte die Kinaseaktivität von Akt bzw. PI3K untersucht werden.

Ein weiterer interessanter Anknüpfungspunkt für eine mögliche Funktion der Interaktion von SHP-1 und LMP1 besteht in der BCR-Signaltransduktion. Sowohl SHP-1 als auch LMP1 können in diese inhibierend eingreifen. SHP-1 wurde als negativer Regulator des BCRs beschrieben, indem es sowohl den BCR selbst als auch assoziierte Faktoren dephosphoryliert und damit inaktiviert (Dustin et al., 1999; Monroe, 2006). Darüber hinaus kann SHP-1 negative Faktoren in der BCR-Aktivierung, wie etwa CD72, durch Dephosphorylierung aktivieren (Adachi et al., 1998; Blasioli et al., 1999; Bolland and Ravetch, 1999; Cambier, 1997; Sen et al., 1999; Thomas, 1995; Wu et al., 1998). Die Interaktion von CD22 mit SHP-1 hingegen führt nicht zu einer Dephosphorylierung von CD22. Vielmehr wird SHP-1 durch CD22 zu seinen Substraten rekrutiert (Siminovitch and Neel, 1998). Durch die Aktivierung der BCR-Signaltransduktion kann in LCLs der lytische Zyklus von EBV aktiviert werden. LMP1 inhibiert diese Induktion (Adler et al., 2002), so dass es denkbar wäre, dass LMP1 durch SHP-1 diese Inhibition direkt vermittelt. Mit der hier entwickelten Kombination aus EREB2-5-Zelllinien und induzierbaren pRTS1-LMP1-Konstrukten konnten zwar die Ergebnisse von Adler et al. bestätigt werden, eine Interaktion von SHP-1 mit LMP1 scheint für die Inhibition des lytischen Zyklus durch LMP1 jedoch nicht von Bedeutung zu sein (siehe Abbildung 52 bis Abbildung 55).

Es stellt sich die Frage, wieso LMP1 ein Protein rekrutiert, das die durch LMP1 aktivierten Signalwege teilweise wieder inaktiviert. Hierbei ist zu beachten, dass LMP1 durch verschiedene Mechanismen von EBV streng reguliert wird. Eine Überexpression von LMP1 führt zu toxischen Effekten (Floettmann et al., 1996; Gahn and Sugden, 1993; Hammerschmidt et al., 1989), was für ein Virus, das hauptsächlich latent in seinen Wirtszellen persistiert, nicht vorteilhaft sein kann. Weiterhin konnte etwa gezeigt werden, dass eine zweifache höhere Expression von LMP1 als der Durchschnitt in EBV-positiven Lymphoblasten die Genexpression inhibiert und zu Zytostase führt (Kaykas and Sugden, 2000; Sandberg et al., 2000). Eine Regulation von LMP1 erscheint daher notwendig und findet auf verschiedenen Ebenen statt.

Zunächst wird LMP1 bereits auf der Ebene der Translation reguliert. Das EBV-Genom kodiert für mikro-RNAs (BART), die auf den 3' untranskribierten Bereich der mRNA von LMP1 abzielen. Sie modulieren so die LMP1-induzierte NF- κ B-Signaltransduktion (Lo et al., 2007). Auf Proteinebene wird LMP1 zum einen durch proteasomale Degradation reguliert. Seine Halbwertszeit liegt je nach Zelltyp bei 1,5 bis 5 Stunden

(Baichwal and Sugden, 1987; Mann and Thorley-Lawson, 1987; Martin and Sugden, 1991). Zum anderen reguliert LMP1 sich auch selbst, indem es die Autophagie in den B-Zellen fördert. Eine Inhibition der Autophagie führt zu einer Ansammlung von LMP1 und vermindert die Proliferation (Lee and Sugden, 2007). Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, reguliert sich LMP1 auch durch die Interaktion mit SHP-1 selbst. Der hier gefundene Mechanismus beeinflusst jedoch nicht die Menge des vorhandenen LMP1 sondern greift in dessen Signaltransduktion ein. Welche Bedeutung diese Art der Regulation auf die biologische Funktion besitzt, ist zurzeit noch nicht geklärt. Eine Bedeutung könnte im Überleben und in der Proliferation der Zellen bestehen, da eine LMP1-Überexpression sich hier negativ auswirkt (s.o.). Zwar wurden mit dem EREB-pRTS1 Zellsystem erste MTT-Versuche durchgeführt, doch konnten hier keine signifikanten Unterschiede für LMP1 wt und die SHP-1 bindungsdefizienten Mutanten gefunden werden. Um eine verlässliche Aussage zu ermöglichen, müssten hier weitere Experimente durchgeführt werden. Dieses war aus zeitlichen Gründen im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr möglich.

Obwohl mit den hier verwendeten Methoden bisher keine biologische Funktion der Interaktion zwischen LMP1 und SHP-1 gefunden werden konnte, heißt das nicht, dass die Bindung irrelevant ist. Die verwendeten Experimente beleuchten lediglich die Funktion *in vitro*, so dass Effekte, die sich nur *in vivo* äußern, nicht erfasst werden können. Einflüsse, die sich etwa auf die Sekretion von Zytokinen, die Interaktion mit dem Immunsystem des Wirts oder Vorgänge in den Keimzentren auswirken, konnten hier nicht detektiert werden. Es stellt sich die Frage, ob die negative Regulation der LMP1-Signaltransduktion durch SHP-1 eine Auswirkung *in vivo* besitzt. Denkbar ist, dass die Regulation von LMP1 an Bedeutung gewinnt, wenn das Immunsystem EBV-infizierte Zellen bekämpft. Durch eine unregulierte Signaltransduktion könnten etwa Mechanismen angeregt werden, die infizierte Zellen verstärkt zu einem Ziel des Immunsystems machen. Solche Überlegungen müssen jedoch reine Spekulation bleiben. Da das Wirtsspektrum von EBV ausschließlich humane Zellen umfasst, beschränken sich *in vivo* Studien nach dem heutigen Stand der Wissenschaft auf Biopsien und sind daher rein deskriptiv. Mausmodelle für EBV stehen trotz intensiver Bemühungen noch nicht zur Verfügung (Zychlinska, 2007).

Zusammenfassend lässt sich unter Einbeziehung der in dieser Doktorarbeit gewonnen Erkenntnisse das in Abbildung 56 gezeigte Modell für die Rolle von SHP-1 in der Signaltransduktion von LMP1 aufstellen.

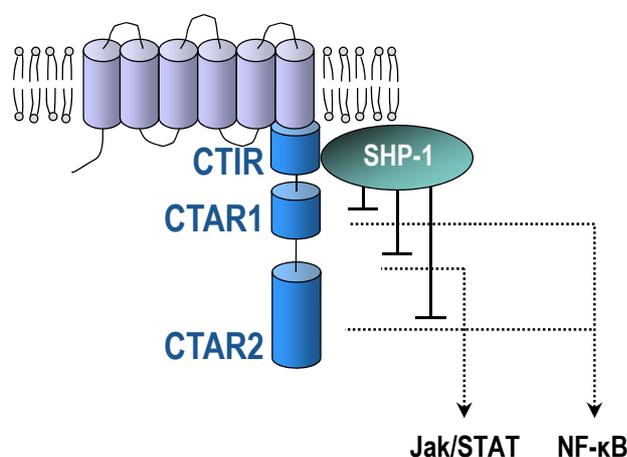


Abbildung 56: Modell der Funktion von SHP-1 in der Signaltransduktion von LMP1.

SHP-1 bindet an LMP1 über CTIR und hemmt die Aktivierung des Jak/STAT- und des NF-κB-Signalweges durch LMP1.

SHP-1 bindet über eine neue Region des C-Terminus von LMP1 direkt unterhalb der Transmembrandomänen. Durch diese Interaktion inhibiert es sowohl den Jak/STAT- als auch den NF- κ B-Signalweg von LMP1. Dieses neuartige Motiv von LMP1 stellt damit eine C-terminale inhibitorische Region (CTIR) dar, funktionell vergleichbar mit den ITIM-Motiven, an die SHP-1 rekrutiert wird.

Damit tragen die in dieser Arbeit erreichten Ergebnisse dazu bei, die komplexen Vorgänge der Signaltransduktion von LMP1 weiter aufzuklären. Mit Hilfe der Massenspektrometrie konnten neue potenzielle Interaktionspartner von LMP1 identifiziert werden. Die hier etablierte Methodik kombiniert eine Aufreinigung mit niedriger Stringenz mit einem subtraktiven Ansatz, so dass schwach bindende Proteine untersucht werden können und dennoch die Rate der falsch-positiven Interaktionspartner gering gehalten werden konnte. Damit steht uns ein System zur Verfügung, mit dem sich der Signalkomplex um LMP1 genauer untersuchen lässt. TNIK und CD48 konnten im Rahmen dieser Arbeit bereits als LMP1-interagierende Proteine mit einer unabhängigen Methode bestätigt werden. Damit ist der Grundstein gelegt, um weitere Einblicke in funktionelle Bedeutung dieser Proteine in der Signaltransduktion von LMP1 zu erlangen. So soll in nächsten Schritten zum Beispiel mittels siRNA untersucht werden, welche in welchen LMP1 induzierten Signalwegen diese Proteine eingreifen. Mit LMP1 konnte für TNIK der erste Rezeptor gefunden werden. Weiterführende Untersuchungen sollen aufdecken, mit welchen Rezeptoren die Kinase im zellulären Kontext spielt. Darüber hinaus konnten weitere interessante potenzielle Interaktionspartner von LMP1 identifiziert werden, die in weiterführenden Arbeiten bestätigt und genauer untersucht werden sollen.

Schlussendlich konnte SHP-1 als negativer Regulator der LMP1-induzierten NF- κ B- und Jak3-Signaltransduktion nachgewiesen werden. Hierzu interagiert die Protease mit LMP1 über ein neues Motiv oberhalb von CTAR1. Ob SHP-1 auch in weitere, LMP1-induzierte Signalwege, wie etwa den JNK-Signalweg, eingreift, soll Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

6 Zusammenfassung

Das Membranprotein LMP1 des Epstein-Barr Virus (EBV) stellt das primäre Onkogen des Virus dar. Es ist essentiell für eine effiziente Transformation von B-Zellen durch das Virus und ist allein ausreichend, um Nagerfibroblasten zu transformieren. LMP1 aktiviert eine Vielzahl von Signalwegen über zwei carboxyterminale Aktivierungsregionen (CTAR1 und CTAR2), unter anderem die JNK-, die NF- κ B-, die PI3K- und die Jak/STAT-Signalkaskaden. Die Aufklärung der Signaltransduktion von LMP1 auf molekularer Ebene ist der Fokus intensiver wissenschaftlicher Forschung.

Ziel der vorliegenden Doktorarbeit war es, neue Interaktionspartner von LMP1 zu identifizieren und so Lücken zwischen LMP1 und den weiter stromabwärts liegenden Signalwegen zu schließen. Dazu wurde im ersten Teil der Arbeit eine Methodik entwickelt, mit dem der Signalkomplex von LMP1 massenspektrometrisch untersucht werden konnte. Hierzu wurde zunächst ein Zellsystem etabliert, mit dem der LMP1-Multiproteinkomplex aus lymphoblastoiden Zelllinien (LCLs), also im viralen Kontext, präzipitiert werden konnte. Darüber hinaus wurde ein zusätzlicher Aufreinigungsschritt durch die Integration einer TEV-Protease-Schnittstelle zwischen den Transmembrandomänen und dem C-Terminus von LMP1 eingeführt. Mit diesem Verfahren wurde eine Reihe von neuen potenziellen Interaktionspartnern von LMP1 identifiziert. Von diesen konnten bereits zwei Proteine als LMP1 Interaktionspartner mit weiteren Methoden verifiziert werden, das Transmembranprotein CD48 und die Kinase TNIK.

Der zweite Teil der Arbeit beleuchtet die Rolle der Protein-Tyrosin-Phosphatase SHP-1 in der Signaltransduktion von LMP1. Sie wurde in unserer Arbeitsgruppe als Interaktionskandidat von LMP1 identifiziert. Neben der Verifikation der Bindung gelang es in dieser Arbeit, die Interaktionsstelle von SHP-1 auf die beiden Tyrosine Y₁₈₅ und Y₁₈₆ von LMP1 zu kartieren. Damit wurde neben CTAR1 und CTAR2 ein weiteres, neues Bindemotiv von LMP1 entdeckt.

Es konnte im Rahmen dieser Doktorarbeit gezeigt werden, dass LMP1 den NF- κ B- und den Jak/STAT-Signalweg nicht nur induziert sondern durch die Interaktion von LMP1 mit SHP-1 diese Aktivierung reguliert und begrenzt. LMP1 verfügt somit auch direkt auf der Ebene der Signaltransduktion über einen Mechanismus, der seine eigene Aktivität moduliert.

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
ACN	Acetonitril
AP-1	Aktivierungsprotein-1
APS	Ammoniumperoxodisulfat
As	Aminosäure
ATF-2	aktivierter Transkriptionsfaktor 2
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
Bp	Basenpaare
Bcl-2	B-Zell Lymphom-2 (<i>b cell lymphoma-2</i>)
BCR	B-Zell Rezeptor
BL	Burkitt-Lymphom
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
CD	Zell-Differenzierungsmarker (<i>cell differentiation marker</i>)
Ci	Curie
cl.	Klon (<i>clone</i>)
CTAR	carboxyterminale Aktivierungsregion
CTIR	carboxyterminale Inhibierungsregion
Da	Dalton
DD	Todesdomäne (<i>death domain</i>)
d.h.	das heißt
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleotid-triphosphat
DOC	Natriumdesoxycholat (<i>sodium deoxycholate</i>)
dox	Doxicyclin
DMP	Dimethylpimelimidat
DTT	Dithiothreitol
e	Elementarladung ($1,602 \times 10^{-19}$ Coulomb)
EBNA	Epstein-Barr Virus nukleares Antigen
EBER	EBV-kodierte RNA (<i>EBV-encoded RNA</i>)
EBV	Epstein-Barr-Virus
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N,N-tetra-acetat
ESI	Elektrospray-Ionisierung
et al.	und andere (<i>et alterae</i>)
F	Farad
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>
FADD	Fas-associated death domain protein

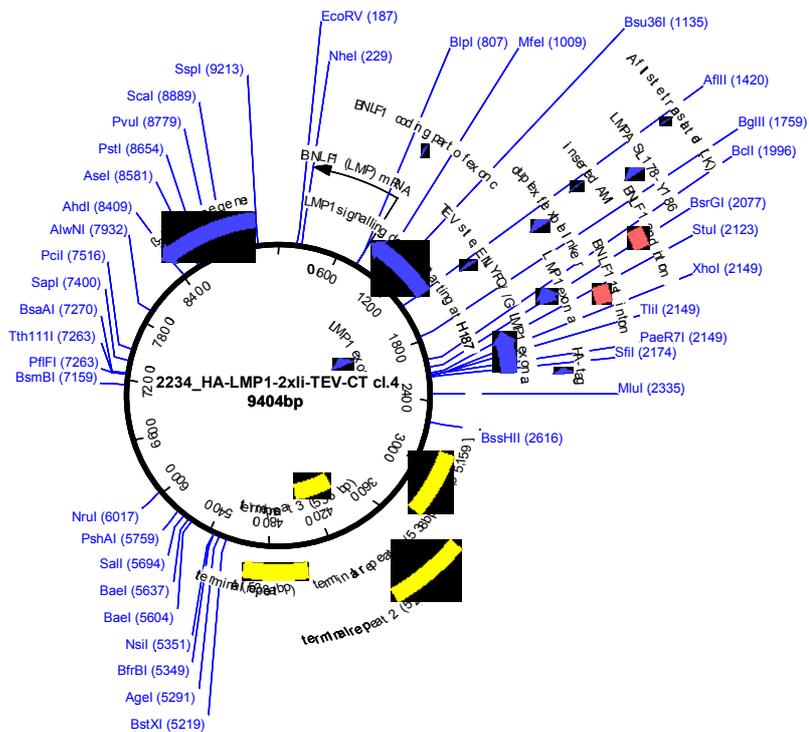
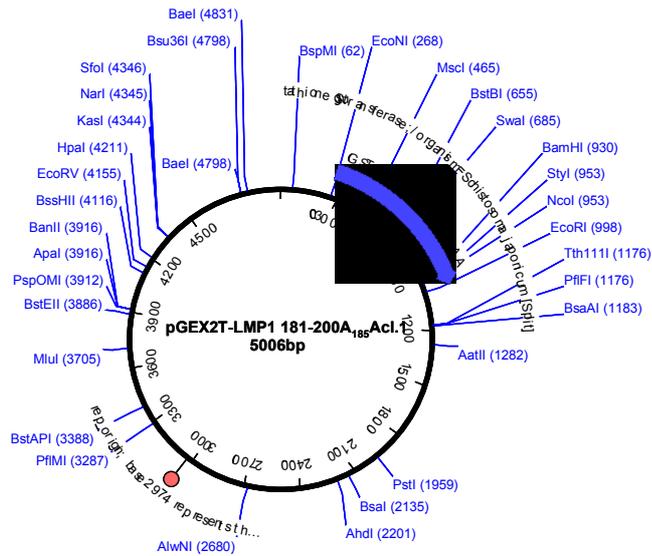
FKS	fötales Kälberserum
FSC	<i>forward scatter</i>
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
g	Gramm
ggf.	gegebenenfalls
GFP	grün-fluoreszierendes Protein (<i>green fluorescent protein</i>)
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde (<i>hour</i>)
HA	Hämagglutinin
HD	Hodgkin-Lymphom
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinethan-Sulfonsäure
HPLC	Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie
HRP	Meerrettichperoxidase (<i>horse redish peroxidase</i>)
HRS	Hodgkin-Reed-Sternberg Zellen (<i>maligne Zellen des cHL</i>)
Ig	Immunglobulin
IFN	Interferon
IL-16	Interleukin-16
I-κB	Inhibitor von NF-κB
IKK	I-κB Kinase
IL	Interleukin
IM	Infektiöse Mononukleose, Pfeiffersches Drüsenfieber
IP	Immunpräzipitation
IRAK-1	Interleukin-1-Rezeptor assoziierte Kinase-1
IRAK-2	Interleukin-1-Rezeptor assoziierte Kinase -2
ITIM	Immunrezeptor-Tyrosin-basiertes Inhibitormotiv
ITAM	Immunrezeptor-Tyrosin-basiertes Aktivationsmotiv
Jak	Janus Kinase
Jak3	Janus Kinase 3
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
kBp	Kilobasenpaar(e)
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	Luria-Bertani
LC	Flüssigkeitschromatographie (<i>liquid chromatography</i>)
LCL	lymphoblastoide Zelllinie (<i>lymphoblastoid cell line</i>)
LMP1	Latentes Membranprotein 1
mA	Milliampere
ml	Milliliter
mM	Millimol
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
MALDI	<i>Matrix assisted laser desorption/ionization</i>

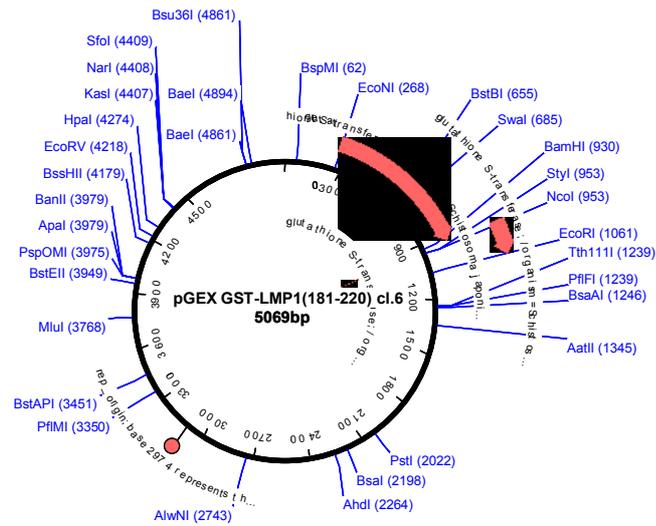
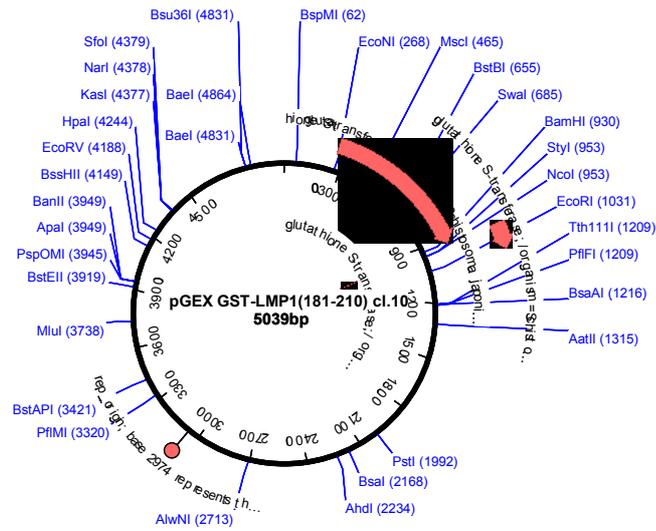
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
min	Minute
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem Massenspektrometrie
mRNA	Boten-RNA (<i>messenger RNA</i>)
MW	Molekulargewicht
m/z	Masse-zu-Ladung-Verhältnis
NaCl	Natriumchlorid
Nano-LC	Nano-Flüssigkeitschromatographie
NES	nukleäres Exportsignal
NF- κ B	<i>Nuclear factor kappa B</i>
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
ORF	offener Leserahmen
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PEI	Polyethylenimin
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PP1	Proteinphosphatase 1
Primer	Startoligonukleotid für die DNA-Polymerase
PTK	Phospho-Tyrosin-Kinase
RIP1	Rezeptor-interagierendes Protein 1
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA <i>interference</i>
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	reverse Transkription mit Polymerasekettenreaktion
s.	siehe
SAPK	Stress aktivierte Proteinkinase
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
sec	Sekunde
SHP-1	<i>SH2 domain containing protein 1</i>
siRNA	<i>short interfering RNA</i>
s.o.	siehe oben
SSC	<i>sideward scatter</i>
STAT	Signaltransduktions-aktiver Transkriptionsfaktor
SV40	Simian Virus 40
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borat-EDTA

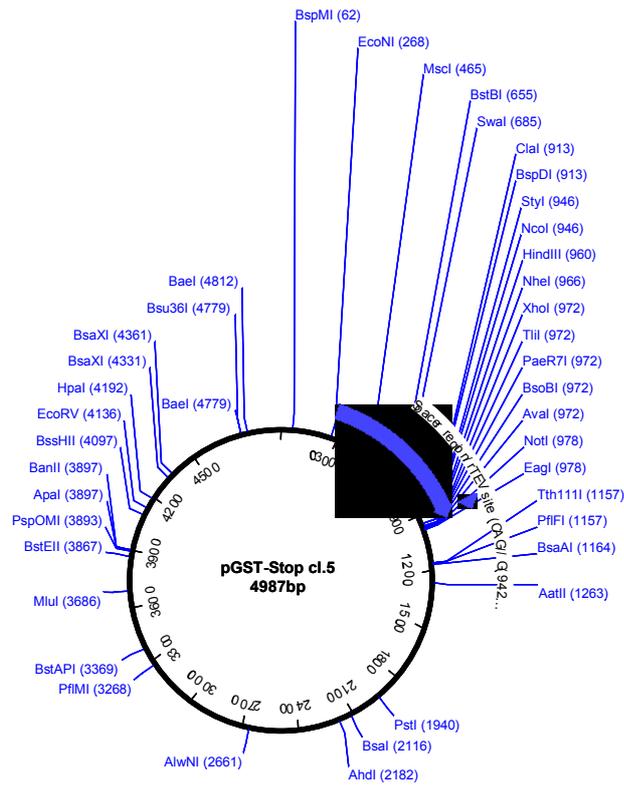
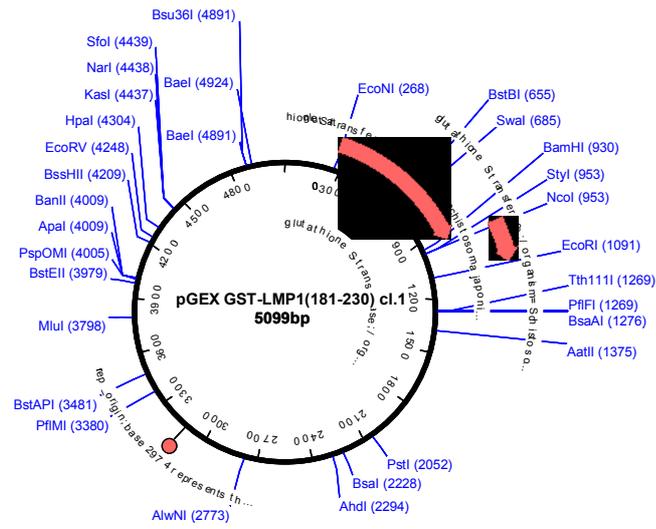
TFA	Trifluoressigsäure (<i>trifluor acetic acid</i>)
TOF	Flugzeit (<i>time of flight</i>)
TOF/TOF	<i>time of flight/time of flight</i>
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethyldiamin
TEV	Tabacco Etch Virus
TNIK	<i>TRAF2 and Nck Interacting Kinase</i>
TNF α	Tumornekrosefaktor α
TNFR1	Tumornekrosefaktor-Rezeptor 1
TNFR2	Tumornekrosefaktor-Rezeptor 2
TRADD	TNF-Rezeptor 1 assoziiertes Todesdomänen Protein
TRAF	TNF-Rezeptor assoziierter Faktor
Tris	Tri-Hydroxymethyl-Aminomethan
tRNA	Transfer-RNA
ts	temperatursensitiv
U	Enzymaktivitätseinheit (<i>unit</i>)
u.a.	unter anderem
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
Vol.	Volumen
vs.	Versus
wt	Wildtyp
w/v	Gewicht/Volumen (<i>weight/volume</i>)
z.B.	zum Beispiel

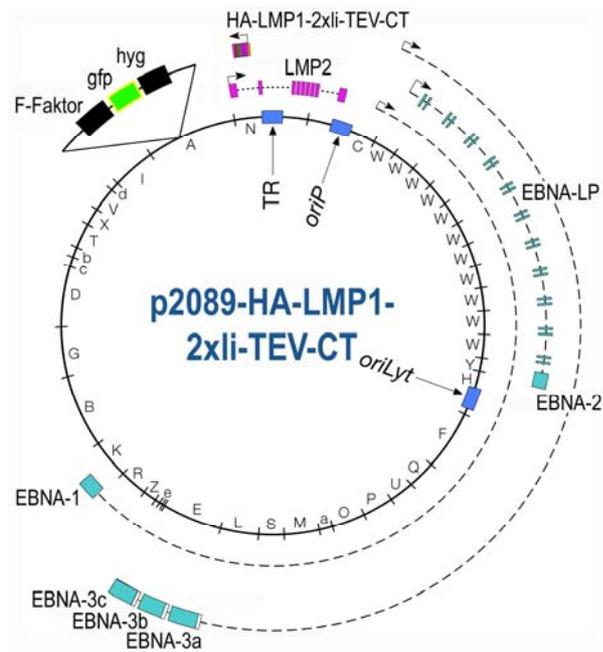
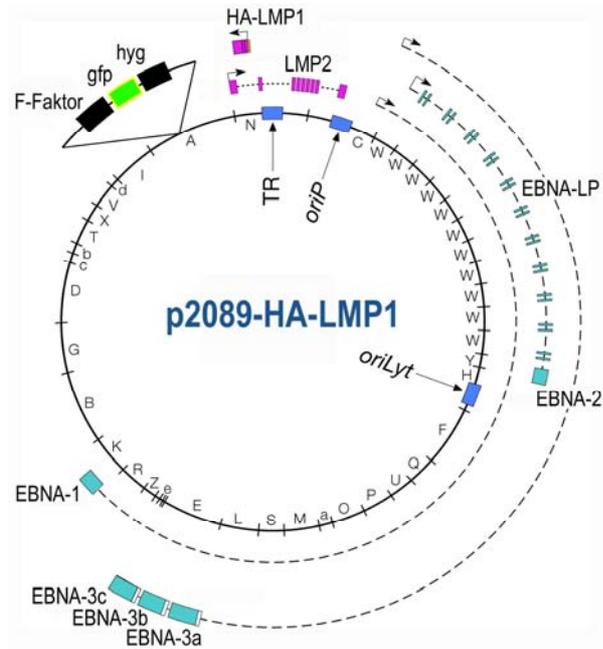
Anhang A: Vektorkarten der klonierten Plasmide

Die nachfolgenden Abbildungen stellen Vektorkarten der klonierten Plasmide dar. Schnittstellen von Restriktionsenzymen, die genau einmal in dem Konstrukt schneiden, sind in blau dargestellt.









Anhang B: Restriktionsfragmente von Maxi-EBV Plasmiden nach BamHI-Verdau

Gelb hervorgehoben sind Unterschiede in den Fragmentgrößen nach BamHI-Verdau zwischen 2089, 2089-HA-LMP1 und 2089-HA-LMP1-2xli-TEV-CT.

2089		2089-HA-LMP1		2089-HA-LMP1-2xli-TEV-CT	
Fragmentgröße [Bp]	Bereich im Vektor	Fragmentgröße [Bp]	Bereich im Vektor	Fragmentgröße [Bp]	Bereich im Vektor
11867	164582:176448	13419	164582:178000	13419	164582:178000
10477	154105:164581	10477	154105:164581	10477	154105:164581
9693	112621:122313	9693	112621:122313	9711	178001:3955
9622	176449:3955	9665	178001:3955	9693	112621:122313
9221	3995:13215	9221	3995:13215	9221	3995:13215
8020	128849:136868	8020	128849:136868	8020	128849:136868
7910	92704:100613	7910	92704:100613	7910	92704:100613
7396	54854:62249	7396	54854:62249	7396	54854:62249
6535	122314:128848	6535	122314:128848	6535	122314:128848
6005	48849:54853	6005	48849:54853	6005	48849:54853
5055	107566:112620	5055	107566:112620	5055	107566:112620
5053	87651:92703	5053	87651:92703	5053	87651:92703
4696	79538:84233	4696	79538:84233	4696	79538:84233
4367	73469:77835	4367	73469:77835	4367	73469:77835
4058	69411:73468	4058	69411:73468	4058	69411:73468
3872	62250:66121	3872	62250:66121	3872	62250:66121
3641	103817:107457	3641	103817:107457	3641	103817:107457
3417	84234:87650	3417	84234:87650	3417	84234:87650
3388	139353:142740	3388	139353:142740	3388	139353:142740
3289	66122:69410	3289	66122:69410	3289	66122:69410
3145	144863:148007	3145	144863:148007	3145	144863:148007
3072	28576:31647	3072	28576:31647	3072	28576:31647
3072	13216:16287	3072	13216:16287	3072	13216:16287
3072	25504:28575	3072	25504:28575	3072	25504:28575
3072	19360:22431	3072	19360:22431	3072	19360:22431
3072	22432:25503	3072	22432:25503	3072	22432:25503
3072	16288:19359	3072	16288:19359	3072	16288:19359
3072	37792:40863	3072	37792:40863	3072	37792:40863
3072	34720:37791	3072	34720:37791	3072	34720:37791
3072	43936:47007	3072	43936:47007	3072	43936:47007
3072	40864:43935	3072	40864:43935	3072	40864:43935
3072	31648:34719	3072	31648:34719	3072	31648:34719
2926	149116:152041	2926	149116:152041	2926	149116:152041
2122	142741:144862	2122	142741:144862	2122	142741:144862
2063	152042:154104	2063	152042:154104	2063	152042:154104
1841	47008:48848	1841	47008:48848	1841	47008:48848
1794	101948:103741	1794	101948:103741	1794	101948:103741
1702	77836:79537	1702	77836:79537	1702	77836:79537
1333	138020:139352	1333	138020:139352	1333	138020:139352
1151	136869:138019	1151	136869:138019	1151	136869:138019
1108	148008:149115	1108	148008:149115	1108	148008:149115
521	101427:101947	521	101427:101947	521	101427:101947
507	100920:101426	507	100920:101426	507	100920:101426
306	100614:100919	306	100614:100919	306	100614:100919
108	107458:107565	108	107458:107565	108	107458:107565
75	103742:103816	75	103742:103816	75	103742:103816
39	3956:3994	39	3956:3994	39	3956:3994

Literaturverzeichnis

- Adachi, T., Flawinkel, H., Yakura, H., Reth, M. and Tsubata, T.** (1998). The B cell surface protein CD72 recruits the tyrosine phosphatase SHP-1 upon tyrosine phosphorylation. *J Immunol* **160**, 4662-5.
- Adler, B., Schaadt, E., Kempkes, B., Zimmer-Strobl, U., Baier, B. and Bornkamm, G. W.** (2002). Control of Epstein-Barr virus reactivation by activated CD40 and viral latent membrane protein 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 437-42.
- Aebersold, R. and Mann, M.** (2003). Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* **422**, 198-207.
- Aitken, A.** (2006). 14-3-3 proteins: a historic overview. *Semin Cancer Biol* **16**, 162-72.
- Allday, M. J., Crawford, D. H. and Griffin, B. E.** (1989). Epstein-Barr virus latent gene expression during the initiation of B cell immortalization. *J Gen Virol* **70** (Pt 7), 1755-64.
- Alonso, A., Sasin, J., Bottini, N., Friedberg, I., Osterman, A., Godzik, A., Hunter, T., Dixon, J. and Mustelin, T.** (2004). Protein tyrosine phosphatases in the human genome. *Cell* **117**, 699-711.
- Altmann, M. and Hammerschmidt, W.** (2005). Epstein-Barr virus provides a new paradigm: a requirement for the immediate inhibition of apoptosis. *PLoS Biol* **3**, e404.
- Altmann, M., Pich, D., Ruiss, R., Wang, J., Sugden, B. and Hammerschmidt, W.** (2006). Transcriptional activation by EBV nuclear antigen 1 is essential for the expression of EBV's transforming genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 14188-93.
- Ambinder, R. F., Browning, P. J., Lorenzana, I., Leventhal, B. G., Cosenza, H., Mann, R. B., MacMahon, E. M., Medina, R., Cardona, V., Grufferman, S. et al.** (1993). Epstein-Barr virus and childhood Hodgkin's disease in Honduras and the United States. *Blood* **81**, 462-7.
- Arch, R. H., Gedrich, R. W. and Thompson, C. B.** (1998). Tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs)--a family of adapter proteins that regulates life and death. *Genes Dev* **12**, 2821-30.
- Ardila-Osorio, H., Clause, B., Mishal, Z., Wiels, J., Tursz, T. and Busson, P.** (1999). Evidence of LMP1-TRAF3 interactions in glycosphingolipid-rich complexes of lymphoblastoid and nasopharyngeal carcinoma cells. *Int J Cancer* **81**, 645-9.
- Arvanitakis, L., Yaseen, N. and Sharma, S.** (1995). Latent membrane protein-1 induces cyclin D2 expression, pRb hyperphosphorylation, and loss of TGF-beta 1-mediated growth inhibition in EBV-positive B cells. *J Immunol* **155**, 1047-56.
- Aviel, S., Winberg, G., Massucci, M. and Ciechanover, A.** (2000). Degradation of the Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 (LMP1) by the ubiquitin-proteasome pathway. Targeting via ubiquitination of the N-terminal residue. *J Biol Chem* **275**, 23491-9.
- Baichwal, V. R. and Sugden, B.** (1987). Posttranslational processing of an Epstein-Barr virus-encoded membrane protein expressed in cells transformed by Epstein-Barr virus. *J Virol* **61**, 866-75.
- Baichwal, V. R. and Sugden, B.** (1988). Transformation of Balb 3T3 cells by the BNLF-1 gene of Epstein-Barr virus. *Oncogene* **2**, 461-7.

- Baier, M., Bannert, N., Werner, A., Lang, K. and Kurth, R.** (1997). Molecular cloning, sequence, expression, and processing of the interleukin 16 precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 5273-7.
- Baixeras, E., Garcia-Lozano, E. and Martinez, A. C.** (1996). Decrease in cAMP levels promoted by CD48-CD2 interaction correlates with inhibition of apoptosis in B cells. *Scand J Immunol* **43**, 406-12.
- Baker, S. J. and Reddy, E. P.** (1998). Modulation of life and death by the TNF receptor superfamily. *Oncogene* **17**, 3261-70.
- Banville, D., Stocco, R. and Shen, S. H.** (1995). Human protein tyrosine phosphatase 1C (PTPN6) gene structure: alternate promoter usage and exon skipping generate multiple transcripts. *Genomics* **27**, 165-73.
- Beghini, A., Ripamonti, C. B., Peterlongo, P., Roversi, G., Cairoli, R., Morra, E. and Larizza, L.** (2000). RNA hyperediting and alternative splicing of hematopoietic cell phosphatase (PTPN6) gene in acute myeloid leukemia. *Hum Mol Genet* **9**, 2297-304.
- Behrens, T. W., Jagadeesh, J., Scherle, P., Kearns, G., Yewdell, J. and Staudt, L. M.** (1994). Jaw1, A lymphoid-restricted membrane protein localized to the endoplasmic reticulum. *J Immunol* **153**, 682-90.
- Behrens, T. W., Kearns, G. M., Rivard, J. J., Bernstein, H. D., Yewdell, J. W. and Staudt, L. M.** (1996). Carboxyl-terminal targeting and novel post-translational processing of JAW1, a lymphoid protein of the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* **271**, 23528-34.
- Blasioli, J., Paust, S. and Thomas, M. L.** (1999). Definition of the sites of interaction between the protein tyrosine phosphatase SHP-1 and CD22. *J Biol Chem* **274**, 2303-7.
- Bolland, S. and Ravetch, J. V.** (1999). Inhibitory pathways triggered by ITIM-containing receptors. *Adv Immunol* **72**, 149-77.
- Bonizzi, G. and Karin, M.** (2004). The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol* **25**, 280-8.
- Bornkamm, G. W., Berens, C., Kuklik-Roos, C., Bechet, J. M., Laux, G., Bachel, J., Korndorfer, M., Schlee, M., Holzel, M., Malamoussi, A. et al.** (2005). Stringent doxycycline-dependent control of gene activities using an episomal one-vector system. *Nucleic Acids Res* **33**, e137.
- Bornkamm, G. W. and Hammerschmidt, W.** (2001). Molecular virology of Epstein-Barr virus. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **356**, 437-59.
- Borza, C. M. and Hutt-Fletcher, L. M.** (2002). Alternate replication in B cells and epithelial cells switches tropism of Epstein-Barr virus. *Nat Med* **8**, 594-9.
- Bouchard, P., Zhao, Z., Banville, D., Dumas, F., Fischer, E. H. and Shen, S. H.** (1994). Phosphorylation and identification of a major tyrosine phosphorylation site in protein tyrosine phosphatase 1C. *J Biol Chem* **269**, 19585-9.
- Bouwmeester, T., Bauch, A., Ruffner, H., Angrand, P. O., Bergamini, G., Crougton, K., Cruciat, C., Eberhard, D., Gagneur, J., Ghidelli, S. et al.** (2004). A physical and functional map of the human TNF-alpha/NF-kappa B signal transduction pathway. *Nat Cell Biol* **6**, 97-105.
- Bradford, M. M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-54.

- Brodeur, S. R., Cheng, G., Baltimore, D. and Thorley-Lawson, D. A.** (1997). Localization of the major NF-kappaB-activating site and the sole TRAF3 binding site of LMP-1 defines two distinct signaling motifs. *J Biol Chem* **272**, 19777-84.
- Brown, M. H., Preston, S. and Barclay, A. N.** (1995). A sensitive assay for detecting low-affinity interactions at the cell surface reveals no additional ligands for the adhesion pair rat CD2 and CD48. *Eur J Immunol* **25**, 3222-8.
- Brucecher-Encke, B., Griffin, J. D., Neel, B. G. and Lorenz, U.** (2001). Role of the tyrosine phosphatase SHP-1 in K562 cell differentiation. *Leukemia* **15**, 1424-32.
- Brumell, J. H., Chan, C. K., Butler, J., Borregaard, N., Siminovitch, K. A., Grinstein, S. and Downey, G. P.** (1997). Regulation of Src homology 2-containing tyrosine phosphatase 1 during activation of human neutrophils. Role of protein kinase C. *J Biol Chem* **272**, 875-82.
- Burkitt, D., Hutt, M. S. and Wright, D. H.** (1965). The African Lymphoma: Preliminary Observations on Response to Therapy. *Cancer* **18**, 399-410.
- Cahir McFarland, E. D., Izumi, K. M. and Mosialos, G.** (1999). Epstein-barr virus transformation: involvement of latent membrane protein 1-mediated activation of NF-kappaB. *Oncogene* **18**, 6959-64.
- Cahir-McFarland, E. D., Carter, K., Rosenwald, A., Giltane, J. M., Henrickson, S. E., Staudt, L. M. and Kieff, E.** (2004). Role of NF-kappa B in cell survival and transcription of latent membrane protein 1-expressing or Epstein-Barr virus latency III-infected cells. *J Virol* **78**, 4108-19.
- Cambier, J. C.** (1997). Inhibitory receptors abound? *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 5993-5.
- Center, D. M. and Cruikshank, W.** (1982). Modulation of lymphocyte migration by human lymphokines. I. Identification and characterization of chemoattractant activity for lymphocytes from mitogen-stimulated mononuclear cells. *J Immunol* **128**, 2563-8.
- Center, D. M., Kornfeld, H. and Cruikshank, W. W.** (1996). Interleukin 16 and its function as a CD4 ligand. *Immunol Today* **17**, 476-81.
- Chang, S. H., Chang, H. C. and Hung, W. C.** (2008). Transcriptional repression of tissue inhibitor of metalloproteinase-3 by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 enhances invasiveness of nasopharyngeal carcinoma cells. *Oral Oncol.*
- Cheng, G. and Baltimore, D.** (1996). TANK, a co-inducer with TRAF2 of TNF- and CD 40L-mediated NF-kappaB activation. *Genes Dev* **10**, 963-73.
- Chim, C. S., Fung, T. K., Cheung, W. C., Liang, R. and Kwong, Y. L.** (2004). SOCS1 and SHP1 hypermethylation in multiple myeloma: implications for epigenetic activation of the Jak/STAT pathway. *Blood* **103**, 4630-5.
- Chupp, G. L., Wright, E. A., Wu, D., Vallen-Mashikian, M., Cruikshank, W. W., Center, D. M., Kornfeld, H. and Berman, J. S.** (1998). Tissue and T cell distribution of precursor and mature IL-16. *J Immunol* **161**, 3114-9.
- Clausse, B., Fizazi, K., Walczak, V., Tetaud, C., Wiels, J., Tursz, T. and Busson, P.** (1997). High concentration of the EBV latent membrane protein 1 in glycosphingolipid-rich complexes from both epithelial and lymphoid cells. *Virology* **228**, 285-93.
- Coffin, W. F., 3rd, Erickson, K. D., Hoedt-Miller, M. and Martin, J. M.** (2001). The cytoplasmic amino-terminus of the Latent Membrane Protein-1 of Epstein-Barr Virus: relationship between transmembrane orientation and effector functions of the carboxy-terminus and transmembrane domain. *Oncogene* **20**, 5313-30.

- Coffin, W. F., 3rd, Geiger, T. R. and Martin, J. M.** (2003). Transmembrane domains 1 and 2 of the latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus contain a lipid raft targeting signal and play a critical role in cytoskeleton. *J Virol* **77**, 3749-58.
- Cohen, P. T.** (2002). Protein phosphatase 1--targeted in many directions. *J Cell Sci* **115**, 241-56.
- Cordier, M., Calender, A., Billaud, M., Zimmer, U., Rousselet, G., Pavlish, O., Banchereau, J., Tursz, T., Bornkamm, G. and Lenoir, G. M.** (1990). Stable transfection of Epstein-Barr virus (EBV) nuclear antigen 2 in lymphoma cells containing the EBV P3HR1 genome induces expression of B-cell activation molecules CD21 and CD23. *J Virol* **64**, 1002-13.
- Cottrell, J. S.** (1994). Protein identification by peptide mass fingerprinting. *Pept Res* **7**, 115-24.
- Countryman, J., Jenson, H., Seibl, R., Wolf, H. and Miller, G.** (1987). Polymorphic proteins encoded within BZLF1 of defective and standard Epstein-Barr viruses disrupt latency. *J Virol* **61**, 3672-9.
- Covey, T. R., Bonner, R. F., Shushan, B. I. and Henion, J.** (1988). The determination of protein, oligonucleotide and peptide molecular weights by ion-spray mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* **2**, 249-56.
- Crawford, D. H.** (2001). Biology and disease associations of Epstein-Barr virus. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **356**, 461-73.
- Croce, C. M., Thierfelder, W., Erikson, J., Nishikura, K., Finan, J., Lenoir, G. M. and Nowell, P. C.** (1983). Transcriptional activation of an unrearranged and untranslocated c-myc oncogene by translocation of a C lambda locus in Burkitt. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**, 6922-6.
- Cruikshank, W. and Center, D. M.** (1982). Modulation of lymphocyte migration by human lymphokines. II. Purification of a lymphotactic factor (LCF). *J Immunol* **128**, 2569-74.
- Cuevas, B., Lu, Y., Watt, S., Kumar, R., Zhang, J., Siminovitch, K. A. and Mills, G. B.** (1999). SHP-1 regulates Lck-induced phosphatidylinositol 3-kinase phosphorylation and activity. *J Biol Chem* **274**, 27583-9.
- Cuevas, B. D., Lu, Y., Mao, M., Zhang, J., LaPushin, R., Siminovitch, K. and Mills, G. B.** (2001). Tyrosine phosphorylation of p85 relieves its inhibitory activity on phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem* **276**, 27455-61.
- Curran, J. A., Lavery, F. S., Campbell, D., Macdiarmid, J. and Wilson, J. B.** (2001). Epstein-Barr virus encoded latent membrane protein-1 induces epithelial cell proliferation and sensitizes transgenic mice to chemical carcinogenesis. *Cancer Res* **61**, 6730-8.
- Daigle, I., Yousefi, S., Colonna, M., Green, D. R. and Simon, H. U.** (2002). Death receptors bind SHP-1 and block cytokine-induced anti-apoptotic signaling in neutrophils. *Nat Med* **8**, 61-7.
- Datta, S. R., Dudek, H., Tao, X., Masters, S., Fu, H., Gotoh, Y. and Greenberg, M. E.** (1997). Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* **91**, 231-41.
- Dawson, C. W., Laverick, L., Morris, M. A., Tramoutanis, G. and Young, L. S.** (2008). Epstein-Barr virus-encoded LMP1 regulates epithelial cell motility and invasion via the ERK-MAPK pathway. *J Virol* **82**, 3654-64.
- Dawson, C. W., Tramoutanis, G., Eliopoulos, A. G. and Young, L. S.** (2003). Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 (LMP1) activates the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway to promote cell survival and induce actin filament remodeling. *J Biol Chem* **278**, 3694-704.

- Deacon, E. M., Pallesen, G., Niedobitek, G., Crocker, J., Brooks, L., Rickinson, A. B. and Young, L. S.** (1993). Epstein-Barr virus and Hodgkin's disease: transcriptional analysis of virus latency in the malignant cells. *J Exp Med* **177**, 339-49.
- Decker, L. L., Klamon, L. D. and Thorley-Lawson, D. A.** (1996). Detection of the latent form of Epstein-Barr virus DNA in the peripheral blood of healthy individuals. *J Virol* **70**, 3286-9.
- Delecluse, H. J., Hilsendegen, T., Pich, D., Zeidler, R. and Hammerschmidt, W.** (1998). Propagation and recovery of intact, infectious Epstein-Barr virus from prokaryotic to human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 8245-50.
- Delecluse, H. J., Pich, D., Hilsendegen, T., Baum, C. and Hammerschmidt, W.** (1999). A first-generation packaging cell line for Epstein-Barr virus-derived vectors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 5188-93.
- Delibrias, C. C., Floettmann, J. E., Rowe, M. and Fearon, D. T.** (1997). Downregulated expression of SHP-1 in Burkitt lymphomas and germinal center B lymphocytes. *J Exp Med* **186**, 1575-83.
- Deng, L., Wang, C., Spencer, E., Yang, L., Braun, A., You, J., Slaughter, C., Pickart, C. and Chen, Z. J.** (2000). Activation of the I κ B kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain. *Cell* **103**, 351-61.
- Devergne, O., Cahir McFarland, E. D., Mosialos, G., Izumi, K. M., Ware, C. F. and Kieff, E.** (1998). Role of the TRAF binding site and NF- κ B activation in Epstein-Barr virus latent membrane protein 1-induced cell gene expression. *J Virol* **72**, 7900-8.
- Devergne, O., Hatzivassiliou, E., Izumi, K. M., Kaye, K. M., Kleijnen, M. F., Kieff, E. and Mosialos, G.** (1996). Association of TRAF1, TRAF2, and TRAF3 with an Epstein-Barr virus LMP1 domain important for B-lymphocyte transformation: role in NF- κ B activation. *Mol Cell Biol* **16**, 7098-108.
- Ding, L., Li, L., Yang, J., Zhou, S., Li, W., Tang, M., Shi, Y., Yi, W. and Cao, Y.** (2007). Latent membrane protein 1 encoded by Epstein-Barr virus induces telomerase activity via p16INK4A/Rb/E2F1 and JNK signaling pathways. *J Med Virol* **79**, 1153-63.
- Ding, L., Li, L. L., Yang, J., Tao, Y. G., Ye, M., Shi, Y., Tang, M., Yi, W., Li, X. L., Gong, J. P. et al.** (2005). Epstein-Barr virus encoded latent membrane protein 1 modulates nuclear translocation of telomerase reverse transcriptase protein by activating nuclear factor- κ B p65 in human nasopharyngeal carcinoma cells. *Int J Biochem Cell Biol* **37**, 1881-9.
- Dirmeier, U., Hoffmann, R., Kilger, E., Schultheiss, U., Briseno, C., Gires, O., Kieser, A., Eick, D., Sugden, B. and Hammerschmidt, W.** (2005). Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus coordinately regulates proliferation with control of apoptosis. *Oncogene* **24**, 1711-7.
- Dirmeier, U., Neuhierl, B., Kilger, E., Reisbach, G., Sandberg, M. L. and Hammerschmidt, W.** (2003). Latent membrane protein 1 is critical for efficient growth transformation of human B cells by Epstein-Barr virus. *Cancer Res* **63**, 2982-9.
- Domon, B. and Aebersold, R.** (2006). Mass spectrometry and protein analysis. *Science* **312**, 212-7.
- D'Orlando, O., Gri, G., Cattaruzzi, G., Merluzzi, S., Betto, E., Gattei, V. and Pucillo, C.** (2007). Outside inside signalling in CD40-mediated B cell activation. *J Biol Regul Homeost Agents* **21**, 49-62.
- Dougherty, M. K. and Morrison, D. K.** (2004). Unlocking the code of 14-3-3. *J Cell Sci* **117**, 1875-84.
- D'Souza, B., Rowe, M. and Walls, D.** (2000). The bfl-1 gene is transcriptionally upregulated by the Epstein-Barr virus LMP1, and its expression promotes the survival of a Burkitt's lymphoma cell line. *J Virol* **74**, 6652-8.

- Dubois, M. J., Bergeron, S., Kim, H. J., Dombrowski, L., Perreault, M., Fournes, B., Faure, R., Olivier, M., Beauchemin, N., Shulman, G. I. et al.** (2006). The SHP-1 protein tyrosine phosphatase negatively modulates glucose homeostasis. *Nat Med* **12**, 549-56.
- Dudziak, D., Kieser, A., Dirmeier, U., Nimmerjahn, F., Berchtold, S., Steinkasserer, A., Marschall, G., Hammerschmidt, W., Laux, G. and Bornkamm, G. W.** (2003). Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus induces CD83 by the NF-kappaB signaling pathway. *J Virol* **77**, 8290-8.
- Dustin, L. B., Plas, D. R., Wong, J., Hu, Y. T., Soto, C., Chan, A. C. and Thomas, M. L.** (1999). Expression of dominant-negative src-homology domain 2-containing protein tyrosine phosphatase-1 results in increased Syk tyrosine kinase activity and B cell activation. *J Immunol* **162**, 2717-24.
- Eliopoulos, A. G., Caamano, J. H., Flavell, J., Reynolds, G. M., Murray, P. G., Poyet, J. L. and Young, L. S.** (2003a). Epstein-Barr virus-encoded latent infection membrane protein 1 regulates the processing of p100 NF-kappaB2 to p52 via an IKKgamma/NEMO-independent signalling pathway. *Oncogene* **22**, 7557-69.
- Eliopoulos, A. G., Gallagher, N. J., Blake, S. M., Dawson, C. W. and Young, L. S.** (1999). Activation of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway by Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1 coregulates interleukin-6 and interleukin-8 production. *J Biol Chem* **274**, 16085-96.
- Eliopoulos, A. G., Stack, M., Dawson, C. W., Kaye, K. M., Hodgkin, L., Sihota, S., Rowe, M. and Young, L. S.** (1997). Epstein-Barr virus-encoded LMP1 and CD40 mediate IL-6 production in epithelial cells via an NF-kappaB pathway involving TNF receptor-associated factors. *Oncogene* **14**, 2899-916.
- Eliopoulos, A. G., Waites, E. R., Blake, S. M., Davies, C., Murray, P. and Young, L. S.** (2003b). TRAF1 is a critical regulator of JNK signaling by the TRAF-binding domain of the Epstein-Barr virus-encoded latent infection membrane protein 1 but not CD40. *J Virol* **77**, 1316-28.
- Eliopoulos, A. G. and Young, L. S.** (1998). Activation of the cJun N-terminal kinase (JNK) pathway by the Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1 (LMP1). *Oncogene* **16**, 1731-42.
- Epstein, M. A., Achong, B. G. and Barr, Y. M.** (1964). Virus Particles in Cultured Lymphoblasts from Burkitt's Lymphoma. *Lancet* **1**, 702-3.
- Erikson, J., ar-Rushdi, A., Drwinga, H. L., Nowell, P. C. and Croce, C. M.** (1983). Transcriptional activation of the translocated c-myc oncogene in burkitt lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**, 820-4.
- Evans, A. S.** (1972). Clinical syndromes associated with EB virus infection. *Adv Intern Med* **18**, 77-93.
- Faggioni, A., Zompetta, C., Grimaldi, S., Barile, G., Frati, L. and Lazdins, J.** (1986). Calcium modulation activates Epstein-Barr virus genome in latently infected cells. *Science* **232**, 1554-6.
- Fenn, J. B., Mann, M., Meng, C. K., Wong, S. F. and Whitehouse, C. M.** (1989). Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* **246**, 64-71.
- Finke, J., Fritzen, R., Ternes, P., Trivedi, P., Bross, K. J., Lange, W., Mertelsmann, R. and Dolken, G.** (1992). Expression of bcl-2 in Burkitt's lymphoma cell lines: induction by latent Epstein-Barr virus genes. *Blood* **80**, 459-69.
- Firestone, G. L. and Winguth, S. D.** (1990). Immunoprecipitation of proteins. *Methods Enzymol* **182**, 688-700.
- Fisher, C., Abdul-Aziz, D. and Blacklow, S. C.** (2004). A two-module region of the low-density lipoprotein receptor sufficient for formation of complexes with apolipoprotein E ligands. *Biochemistry* **43**, 1037-44.

- Flemington, E. K., Goldfeld, A. E. and Speck, S. H.** (1991). Efficient transcription of the Epstein-Barr virus immediate-early BZLF1 and BRLF1 genes requires protein synthesis. *J Virol* **65**, 7073-7.
- Floettmann, J. E. and Rowe, M.** (1997). Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 (LMP1) C-terminus activation region 2 (CTAR2) maps to the far C-terminus and requires oligomerisation for NF-kappaB activation. *Oncogene* **15**, 1851-8.
- Floettmann, J. E., Ward, K., Rickinson, A. B. and Rowe, M.** (1996). Cytostatic effect of Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 analyzed using tetracycline-regulated expression in B cell lines. *Virology* **223**, 29-40.
- Forget, G., Gregory, D. J., Whitcombe, L. A. and Olivier, M.** (2006). Role of host protein tyrosine phosphatase SHP-1 in Leishmania donovani-induced inhibition of nitric oxide production. *Infect Immun* **74**, 6272-9.
- Frank, C., Burkhardt, C., Imhof, D., Ringel, J., Zschornig, O., Wieligmann, K., Zacharias, M. and Bohmer, F. D.** (2004). Effective dephosphorylation of Src substrates by SHP-1. *J Biol Chem* **279**, 11375-83.
- Frank, C., Keilhack, H., Opitz, F., Zschornig, O. and Bohmer, F. D.** (1999). Binding of phosphatidic acid to the protein-tyrosine phosphatase SHP-1 as a basis for activity modulation. *Biochemistry* **38**, 11993-2002.
- Franken, M., Devergne, O., Rosenzweig, M., Annis, B., Kieff, E. and Wang, F.** (1996). Comparative analysis identifies conserved tumor necrosis factor receptor-associated factor 3 binding sites in the human and simian Epstein-Barr virus oncogene LMP1. *J Virol* **70**, 7819-26.
- Freemont, P. S.** (2000). RING for destruction? *Curr Biol* **10**, R84-7.
- Fresno Vara, J. A., Casado, E., de Castro, J., Cejas, P., Belda-Iniesta, C. and Gonzalez-Baron, M.** (2004). PI3K/Akt signalling pathway and cancer. *Cancer Treat Rev* **30**, 193-204.
- Fries, K. L., Miller, W. E. and Raab-Traub, N.** (1996). Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 blocks p53-mediated apoptosis through the induction of the A20 gene. *J Virol* **70**, 8653-9.
- Frisan, T., Levitsky, V. and Masucci, M.** (2001). Limiting dilution assay. *Methods Mol Biol* **174**, 213-6.
- Fu, C. A., Shen, M., Huang, B. C., Lasaga, J., Payan, D. G. and Luo, Y.** (1999). TNIK, a novel member of the germinal center kinase family that activates the c-Jun N-terminal kinase pathway and regulates the cytoskeleton. *J Biol Chem* **274**, 30729-37.
- Fu, H., Subramanian, R. R. and Masters, S. C.** (2000). 14-3-3 proteins: structure, function, and regulation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **40**, 617-47.
- Fukuda, M. and Longnecker, R.** (2005). Epstein-Barr virus (EBV) latent membrane protein 2A regulates B-cell receptor-induced apoptosis and EBV reactivation through tyrosine phosphorylation. *J Virol* **79**, 8655-60.
- Fukushima, K., Ikehara, Y. and Yamashita, K.** (2005). Functional role played by the glycosylphosphatidylinositol anchor glycan of CD48 in interleukin-18-induced interferon-gamma production. *J Biol Chem* **280**, 18056-62.
- Gahn, T. A. and Sugden, B.** (1993). Marked, transient inhibition of expression of the Epstein-Barr virus latent membrane protein gene in Burkitt's lymphoma cell lines by electroporation. *J Virol* **67**, 6379-86.

- Garnett, D. and Williams, A. F.** (1994). Homotypic adhesion of rat B cells, but not T cells, in response to cross-linking of CD48. *Immunology* **81**, 103-10.
- Geiger, T. R. and Martin, J. M.** (2006). The Epstein-Barr virus-encoded LMP-1 oncoprotein negatively affects Tyk2 phosphorylation and interferon signaling in human B cells. *J Virol* **80**, 11638-50.
- Genoux, D., Haditsch, U., Knobloch, M., Michalon, A., Storm, D. and Mansuy, I. M.** (2002). Protein phosphatase 1 is a molecular constraint on learning and memory. *Nature* **418**, 970-5.
- Ghosh, S. and Karin, M.** (2002). Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell* **109 Suppl**, S81-96.
- Gingras, A. C., Aebersold, R. and Raught, B.** (2005). Advances in protein complex analysis using mass spectrometry. *J Physiol* **563**, 11-21.
- Gires, O., Kohlhuber, F., Kilger, E., Baumann, M., Kieser, A., Kaiser, C., Zeidler, R., Scheffer, B., Ueffing, M. and Hammerschmidt, W.** (1999). Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus interacts with JAK3 and activates STAT proteins. *Embo J* **18**, 3064-73.
- Gires, O., Zimmer-Strobl, U., Gonnella, R., Ueffing, M., Marschall, G., Zeidler, R., Pich, D. and Hammerschmidt, W.** (1997). Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus mimics a constitutively active receptor molecule. *Embo J* **16**, 6131-40.
- Glass, W. G., Sarisky, R. T. and Vecchio, A. M.** (2006). Not-so-sweet sixteen: the role of IL-16 in infectious and immune-mediated inflammatory diseases. *J Interferon Cytokine Res* **26**, 511-20.
- Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C. and Nairn, R.** (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* **36**, 59-74.
- Grasser, F. A., Murray, P. G., Kremmer, E., Klein, K., Remberger, K., Feiden, W., Reynolds, G., Niedobitek, G., Young, L. S. and Mueller-Lantzsch, N.** (1994). Monoclonal antibodies directed against the Epstein-Barr virus-encoded nuclear antigen 1 (EBNA1): immunohistologic detection of EBNA1 in the malignant cells of Hodgkin's disease. *Blood* **84**, 3792-8.
- Green, M. C. and Shultz, L. D.** (1975). Motheaten, an immunodeficient mutant of the mouse. I. Genetics and pathology. *J Hered* **66**, 250-8.
- Gregory, C. D., Tursz, T., Edwards, C. F., Tetaud, C., Talbot, M., Caillou, B., Rickinson, A. B. and Lipinski, M.** (1987). Identification of a subset of normal B cells with a Burkitt's lymphoma (BL)-like phenotype. *J Immunol* **139**, 313-8.
- Greiner, D. L., Goldschneider, I., Komschlies, K. L., Medlock, E. S., Bollum, F. J. and Schultz, L.** (1986). Defective lymphopoiesis in bone marrow of motheaten (me/me) and viable motheaten (mev/mev) mutant mice. I. Analysis of development of prothymocytes, early B lineage cells, and terminal deoxynucleotidyl transferase-positive cells. *J Exp Med* **164**, 1129-44.
- Grimm, T., Schneider, S., Naschberger, E., Huber, J., Guenzi, E., Kieser, A., Reitmeir, P., Schulz, T. F., Morris, C. A. and Sturzl, M.** (2005). EBV latent membrane protein-1 protects B cells from apoptosis by inhibition of BAX. *Blood* **105**, 3263-9.
- Hadam, M.** (1989). Leucocyte Typin IV. Oxford: Oxford Univ. Press.
- Hagiwara, M., Alberts, A., Brindle, P., Meinkoth, J., Feramisco, J., Deng, T., Karin, M., Shenolikar, S. and Montminy, M.** (1992). Transcriptional attenuation following cAMP induction requires PP-1-mediated dephosphorylation of CREB. *Cell* **70**, 105-13.
- Hammerschmidt, W. and Sugden, B.** (1988). Identification and characterization of oriLyt, a lytic origin of DNA replication of Epstein-Barr virus. *Cell* **55**, 427-33.

- Hammerschmidt, W., Sugden, B. and Baichwal, V. R.** (1989). The transforming domain alone of the latent membrane protein of Epstein-Barr virus is toxic to cells when expressed at high levels. *J Virol* **63**, 2469-75.
- Han, Y., Amin, H. M., Franko, B., Frantz, C., Shi, X. and Lai, R.** (2006a). Loss of SHP1 enhances JAK3/STAT3 signaling and decreases proteasome degradation of JAK3 and NPM-ALK in ALK+ anaplastic large-cell lymphoma. *Blood* **108**, 2796-803.
- Han, Y., Amin, H. M., Frantz, C., Franko, B., Lee, J., Lin, Q. and Lai, R.** (2006b). Restoration of shp1 expression by 5-AZA-2'-deoxycytidine is associated with downregulation of JAK3/STAT3 signaling in ALK-positive anaplastic large cell lymphoma. *Leukemia* **20**, 1602-9.
- Hanahan, D.** (1985). Techniques for transformation of *E. coli*. In *DNA cloning. A practical approach.*, vol. Vol. 1 (ed. D. In Glover), pp. pp. 109-135. Oxford: IRL Press.
- Haque, T. and Crawford, D. H.** (1998). Role of donor versus recipient type Epstein-Barr virus in post-transplant lymphoproliferative disorders. *Springer Semin Immunopathol* **20**, 375-87.
- Hatzivassiliou, E., Miller, W. E., Raab-Traub, N., Kieff, E. and Mosialos, G.** (1998). A fusion of the EBV latent membrane protein-1 (LMP1) transmembrane domains to the CD40 cytoplasmic domain is similar to LMP1 in constitutive activation of epidermal growth factor receptor expression, nuclear factor-kappa B, and stress-activated protein kinase. *J Immunol* **160**, 1116-21.
- Henderson, S., Rowe, M., Gregory, C., Croom-Carter, D., Wang, F., Longnecker, R., Kieff, E. and Rickinson, A.** (1991). Induction of bcl-2 expression by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 protects infected B cells from programmed cell death. *Cell* **65**, 1107-15.
- Hennessy, K., Fennewald, S., Hummel, M., Cole, T. and Kieff, E.** (1984). A membrane protein encoded by Epstein-Barr virus in latent growth-transforming infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 7207-11.
- Henriksson, M. L., Francis, M. S., Peden, A., Aili, M., Stefansson, K., Palmer, R., Aitken, A. and Hallberg, B.** (2002). A nonphosphorylated 14-3-3 binding motif on exoenzyme S that is functional in vivo. *Eur J Biochem* **269**, 4921-9.
- Herbst, H., Dallenbach, F., Hummel, M., Niedobitek, G., Pileri, S., Muller-Lantzsch, N. and Stein, H.** (1991). Epstein-Barr virus latent membrane protein expression in Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 4766-70.
- Herbst, H., Stein, H. and Niedobitek, G.** (1993). Epstein-Barr virus and CD30+ malignant lymphomas. *Crit Rev Oncog* **4**, 191-239.
- Hermeking, H.** (2006). 14-3-3 proteins and cancer biology. *Semin Cancer Biol* **16**, 161.
- Hermeking, H. and Benzinger, A.** (2006). 14-3-3 proteins in cell cycle regulation. *Semin Cancer Biol* **16**, 183-92.
- Herrmann, K. and Niedobitek, G.** (2003). Epstein-Barr virus-associated carcinomas: facts and fiction. *J Pathol* **199**, 140-5.
- Higuchi, M., Izumi, K. M. and Kieff, E.** (2001). Epstein-Barr virus latent-infection membrane proteins are palmitoylated and raft-associated: protein 1 binds to the cytoskeleton through TNF receptor cytoplasmic factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 4675-80.
- Higuchi, M., Kieff, E. and Izumi, K. M.** (2002). The Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 putative Janus kinase 3 (JAK3) binding domain does not mediate JAK3 association or activation in B-lymphoma or lymphoblastoid cell lines. *J Virol* **76**, 455-9.

- Hillenkamp, F., Karas, M., Beavis, R. C. and Chait, B. T.** (1991). Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of biopolymers. *Anal Chem* **63**, 1193A-1203A.
- Holmes, D. S. and Quigley, M.** (1981). A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal Biochem* **114**, 193-7.
- Honda, K., Yanai, H., Negishi, H., Asagiri, M., Sato, M., Mizutani, T., Shimada, N., Ohba, Y., Takaoka, A., Yoshida, N. et al.** (2005). IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses. *Nature* **434**, 772-7.
- Hsu, H., Xiong, J. and Goeddel, D. V.** (1995). The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. *Cell* **81**, 495-504.
- Hu, H. M., O'Rourke, K., Boguski, M. S. and Dixit, V. M.** (1994). A novel RING finger protein interacts with the cytoplasmic domain of CD40. *J Biol Chem* **269**, 30069-72.
- Huang, W. C., Chen, J. J., Inoue, H. and Chen, C. C.** (2003). Tyrosine phosphorylation of I-kappa B kinase alpha/beta by protein kinase C-dependent c-Src activation is involved in TNF-alpha-induced cyclooxygenase-2 expression. *J Immunol* **170**, 4767-75.
- Huen, D. S., Henderson, S. A., Croom-Carter, D. and Rowe, M.** (1995). The Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 (LMP1) mediates activation of NF-kappa B and cell surface phenotype via two effector regions in its carboxy-terminal cytoplasmic domain. *Oncogene* **10**, 549-60.
- Hummel, M., Anagnostopoulos, I., Korbjuhn, P. and Stein, H.** (1995). Epstein-Barr virus in B-cell non-Hodgkin's lymphomas: unexpected infection patterns and different infection incidence in low- and high-grade types. *J Pathol* **175**, 263-71.
- Huye, L. E., Ning, S., Kelliher, M. and Pagano, J. S.** (2007). Interferon regulatory factor 7 is activated by a viral oncoprotein through RIP-dependent ubiquitination. *Mol Cell Biol* **27**, 2910-8.
- Ianelli, C. J., Edson, C. M. and Thorley-Lawson, D. A.** (1997). A ligand for human CD48 on epithelial cells. *J Immunol* **159**, 3910-20.
- Ishida, T., Mizushima, S., Azuma, S., Kobayashi, N., Tojo, T., Suzuki, K., Aizawa, S., Watanabe, T., Mosialos, G., Kieff, E. et al.** (1996). Identification of TRAF6, a novel tumor necrosis factor receptor-associated factor protein that mediates signaling from an amino-terminal domain of the CD40 cytoplasmic region. *J Biol Chem* **271**, 28745-8.
- Izumi, K. M.** (2001). Identification of EBV transforming genes by recombinant EBV technology. *Semin Cancer Biol* **11**, 407-14.
- Izumi, K. M., Cahir McFarland, E. D., Riley, E. A., Rizzo, D., Chen, Y. and Kieff, E.** (1999a). The residues between the two transformation effector sites of Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 are not critical for B-lymphocyte growth transformation. *J Virol* **73**, 9908-16.
- Izumi, K. M., Cahir McFarland, E. D., Ting, A. T., Riley, E. A., Seed, B. and Kieff, E. D.** (1999b). The Epstein-Barr virus oncoprotein latent membrane protein 1 engages the tumor necrosis factor receptor-associated proteins TRADD and receptor-interacting protein (RIP) but does not induce apoptosis or require RIP for NF-kappaB activation. *Mol Cell Biol* **19**, 5759-67.
- Izumi, K. M., Kaye, K. M. and Kieff, E. D.** (1994). Epstein-Barr virus recombinant molecular genetic analysis of the LMP1 amino-terminal cytoplasmic domain reveals a probable structural role, with no component essential for primary B-lymphocyte growth transformation. *J Virol* **68**, 4369-76.

Izumi, K. M., Kaye, K. M. and Kieff, E. D. (1997). The Epstein-Barr virus LMP1 amino acid sequence that engages tumor necrosis factor receptor associated factors is critical for primary B lymphocyte growth transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 1447-52.

Izumi, K. M. and Kieff, E. D. (1997). The Epstein-Barr virus oncogene product latent membrane protein 1 engages the tumor necrosis factor receptor-associated death domain protein to mediate B lymphocyte growth transformation and activate NF-kappaB. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 12592-7.

Jaumot, M. and Hancock, J. F. (2001). Protein phosphatases 1 and 2A promote Raf-1 activation by regulating 14-3-3 interactions. *Oncogene* **20**, 3949-58.

Jiao, H., Berrada, K., Yang, W., Tabrizi, M., Platanias, L. C. and Yi, T. (1996). Direct association with and dephosphorylation of Jak2 kinase by the SH2-domain-containing protein tyrosine phosphatase SHP-1. *Mol Cell Biol* **16**, 6985-92.

Jin, Y. J., Yu, C. L. and Burakoff, S. J. (1999). Human 70-kDa SHP-1L differs from 68-kDa SHP-1 in its C-terminal structure and catalytic activity. *J Biol Chem* **274**, 28301-7.

Johan, M. F., Bowen, D. T., Frew, M. E., Goodeve, A. C. and Reilly, J. T. (2005). Aberrant methylation of the negative regulators RASSF1A, SHP-1 and SOCS-1 in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* **129**, 60-5.

Jones, M. L., Craik, J. D., Gibbins, J. M. and Poole, A. W. (2004). Regulation of SHP-1 tyrosine phosphatase in human platelets by serine phosphorylation at its C terminus. *J Biol Chem* **279**, 40475-83.

Kaiser, C., Laux, G., Eick, D., Jochner, N., Bornkamm, G. W. and Kempkes, B. (1999). The proto-oncogene c-myc is a direct target gene of Epstein-Barr virus nuclear antigen 2. *J Virol* **73**, 4481-4.

Kaplan, A. J., Chavin, K. D., Yagita, H., Sandrin, M. S., Qin, L. H., Lin, J., Lindenmayer, G. and Bromberg, J. S. (1993). Production and characterization of soluble and transmembrane murine CD2. Demonstration that CD48 is a ligand for CD2 and that CD48 adhesion is regulated by CD2. *J Immunol* **151**, 4022-32.

Karas, M. and Hillenkamp, F. (1988). Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal Chem* **60**, 2299-301.

Karin, M. and Greten, F. R. (2005). NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nat Rev Immunol* **5**, 749-59.

Kato, K., Koyanagi, M., Okada, H., Takanashi, T., Wong, Y. W., Williams, A. F., Okumura, K. and Yagita, H. (1992). CD48 is a counter-receptor for mouse CD2 and is involved in T cell activation. *J Exp Med* **176**, 1241-9.

Kaye, K. M., Devergne, O., Harada, J. N., Izumi, K. M., Yalamanchili, R., Kieff, E. and Mosialos, G. (1996). Tumor necrosis factor receptor associated factor 2 is a mediator of NF-kappa B activation by latent infection membrane protein 1, the Epstein-Barr virus transforming protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 11085-90.

Kaye, K. M., Izumi, K. M. and Kieff, E. (1993). Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 is essential for B-lymphocyte growth transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 9150-4.

Kaye, K. M., Izumi, K. M., Li, H., Johannsen, E., Davidson, D., Longnecker, R. and Kieff, E. (1999). An Epstein-Barr virus that expresses only the first 231 LMP1 amino acids efficiently initiates primary B-lymphocyte growth transformation. *J Virol* **73**, 10525-30.

- Kaye, K. M., Izumi, K. M., Mosialos, G. and Kieff, E.** (1995). The Epstein-Barr virus LMP1 cytoplasmic carboxy terminus is essential for B-lymphocyte transformation; fibroblast cocultivation complements a critical function within the terminal 155 residues. *J Virol* **69**, 675-83.
- Kaykas, A. and Sugden, B.** (2000). The amino-terminus and membrane-spanning domains of LMP-1 inhibit cell proliferation. *Oncogene* **19**, 1400-10.
- Kaykas, A., Worringer, K. and Sugden, B.** (2001). CD40 and LMP-1 both signal from lipid rafts but LMP-1 assembles a distinct, more efficient signaling complex. *Embo J* **20**, 2641-54.
- Keller, A., Nesvizhskii, A. I., Kolker, E. and Aebersold, R.** (2002). Empirical statistical model to estimate the accuracy of peptide identifications made by MS/MS and database search. *Anal Chem* **74**, 5383-92.
- Kempkes, B., Spitkovsky, D., Jansen-Durr, P., Ellwart, J. W., Kremmer, E., Delecluse, H. J., Rottenberger, C., Bornkamm, G. W. and Hammerschmidt, W.** (1995). B-cell proliferation and induction of early G1-regulating proteins by Epstein-Barr virus mutants conditional for EBNA2. *Embo J* **14**, 88-96.
- Kempkes, B., Zimmer-Strobl, U., Eissner, G., Pawlita, M., Falk, M., Hammerschmidt, W. and Bornkamm, G. W.** (1996). Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 (EBNA2)-oestrogen receptor fusion proteins complement the EBNA2-deficient Epstein-Barr virus strain P3HR1 in transformation of primary B cells but suppress growth of human B cell lymphoma lines. *J Gen Virol* **77 (Pt 2)**, 227-37.
- Khaled, A. R., Butfiloski, E. J., Sobel, E. S. and Schiffenbauer, J.** (1998). Functional consequences of the SHP-1 defect in motheaten viable mice: role of NF-kappa B. *Cell Immunol* **185**, 49-58.
- Khaled, A. R., Butfiloski, E. J., Villas, B., Sobel, E. S. and Schiffenbauer, J.** (1999). Aberrant expression of the NF-kappaB and IkappaB proteins in B cells from viable motheaten mice. *Autoimmunity* **30**, 115-28.
- Khanna, R., Burrows, S. R., Steigerwald-Mullen, P. M., Thomson, S. A., Kurilla, M. G. and Moss, D. J.** (1995). Isolation of cytotoxic T lymphocytes from healthy seropositive individuals specific for peptide epitopes from Epstein-Barr virus nuclear antigen 1: implications for viral persistence and tumor surveillance. *Virology* **214**, 633-7.
- Kieser, A.** (2001). Assaying the activity of kinases regulated by LMP1. *Methods Mol Biol* **174**, 325-36.
- Kieser, A.** (2007). Signal transduction by the Epstein-Barr virus oncogene latent membrane protein 1 (LMP1). *Signal Transduction* **2007**, 20-33.
- Kieser, A., Kaiser, C. and Hammerschmidt, W.** (1999). LMP1 signal transduction differs substantially from TNF receptor 1 signaling in the molecular functions of TRADD and TRAF2. *Embo J* **18**, 2511-21.
- Kieser, A., Kilger, E., Gires, O., Ueffing, M., Kolch, W. and Hammerschmidt, W.** (1997). Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 triggers AP-1 activity via the c-Jun N-terminal kinase cascade. *Embo J* **16**, 6478-85.
- Kilger, E., Kieser, A., Baumann, M. and Hammerschmidt, W.** (1998). Epstein-Barr virus-mediated B-cell proliferation is dependent upon latent membrane protein 1, which simulates an activated CD40 receptor. *Embo J* **17**, 1700-9.
- Klaman, L. D. and Thorley-Lawson, D. A.** (1995). Characterization of the CD48 gene demonstrates a positive element that is specific to Epstein-Barr virus-immortalized B-cell lines and contains an essential NF-kappa B site. *J Virol* **69**, 871-81.

- Klingmuller, U., Lorenz, U., Cantley, L. C., Neel, B. G. and Lodish, H. F.** (1995). Specific recruitment of SH-PTP1 to the erythropoietin receptor causes inactivation of JAK2 and termination of proliferative signals. *Cell* **80**, 729-38.
- Klyushnenkova, E. N., Li, L., Armitage, R. J. and Choi, Y. S.** (1996). CD48 delivers an accessory signal for CD40-mediated activation of human B cells. *Cell Immunol* **174**, 90-8.
- Kon-Kozlowski, M., Pani, G., Pawson, T. and Siminovitch, K. A.** (1996). The tyrosine phosphatase PTP1C associates with Vav, Grb2, and mSos1 in hematopoietic cells. *J Biol Chem* **271**, 3856-62.
- Kozlowski, M., Mlinaric-Rascan, I., Feng, G. S., Shen, R., Pawson, T. and Siminovitch, K. A.** (1993). Expression and catalytic activity of the tyrosine phosphatase PTP1C is severely impaired in motheaten and viable motheaten mice. *J Exp Med* **178**, 2157-63.
- Krikos, A., Laherty, C. D. and Dixit, V. M.** (1992). Transcriptional activation of the tumor necrosis factor alpha-inducible zinc finger protein, A20, is mediated by kappa B elements. *J Biol Chem* **267**, 17971-6.
- Kulwichit, W., Edwards, R. H., Davenport, E. M., Baskar, J. F., Godfrey, V. and Raab-Traub, N.** (1998). Expression of the Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 induces B cell lymphoma in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 11963-8.
- Kuppers, R.** (2003). B cells under influence: transformation of B cells by Epstein-Barr virus. *Nat Rev Immunol* **3**, 801-12.
- Kutz, H., Reisbach, G., Schultheiss, U. and Kieser, A.** (2008). The c-Jun N-terminal kinase pathway is critical for cell transformation by the latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus. *Virology* **371**, 246-56.
- Laemmlı, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-5.
- Laherty, C. D., Hu, H. M., Oipari, A. W., Wang, F. and Dixit, V. M.** (1992). The Epstein-Barr virus LMP1 gene product induces A20 zinc finger protein expression by activating nuclear factor kappa B. *J Biol Chem* **267**, 24157-60.
- Lam, K. M., Syed, N., Whittle, H. and Crawford, D. H.** (1991). Circulating Epstein-Barr virus-carrying B cells in acute malaria. *Lancet* **337**, 876-8.
- Lam, N. and Sugden, B.** (2003a). CD40 and its viral mimic, LMP1: similar means to different ends. *Cell Signal* **15**, 9-16.
- Lam, N. and Sugden, B.** (2003b). LMP1, a viral relative of the TNF receptor family, signals principally from intracellular compartments. *Embo J* **22**, 3027-38.
- Lambert, S. L. and Martinez, O. M.** (2007). Latent membrane protein 1 of EBV activates phosphatidylinositol 3-kinase to induce production of IL-10. *J Immunol* **179**, 8225-34.
- Laux, G., Dugrillon, F., Eckert, C., Adam, B., Zimmer-Strobl, U. and Bornkamm, G. W.** (1994). Identification and characterization of an Epstein-Barr virus nuclear antigen 2-responsive cis element in the bidirectional promoter region of latent membrane protein and terminal protein 2 genes. *J Virol* **68**, 6947-58.
- Lee, D. Y. and Sugden, B.** (2007). The latent membrane protein 1 oncogene modifies B-cell physiology by regulating autophagy. *Oncogene*.
- Lee, K. and Esselman, W. J.** (2002). Inhibition of PTPs by H₂O₂ regulates the activation of distinct MAPK pathways. *Free Radic Biol Med* **33**, 1121-32.

- Leon, F., Cespon, C., Franco, A., Lombardia, M., Roldan, E., Escribano, L., Harto, A., Gonzalez-Porque, P. and Roy, G.** (2002). SHP-1 expression in peripheral T cells from patients with Sezary syndrome and in the T cell line HUT-78: implications in JAK3-mediated signaling. *Leukemia* **16**, 1470-7.
- Li, L., Guo, L., Tao, Y., Zhou, S., Wang, Z., Luo, W., Hu, D., Li, Z., Xiao, L., Tang, M. et al.** (2007). Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus regulates p53 phosphorylation through MAP kinases. *Cancer Lett* **255**, 219-31.
- Li, Y. Y., Baccam, M., Waters, S. B., Pessin, J. E., Bishop, G. A. and Koretzky, G. A.** (1996). CD40 ligation results in protein kinase C-independent activation of ERK and JNK in resting murine splenic B cells. *J Immunol* **157**, 1440-7.
- Liang, X., Meng, W., Niu, T., Zhao, Z. and Zhou, G. W.** (1997). Expression, purification, and crystallization of the catalytic domain of protein tyrosine phosphatase SHP-1. *J Struct Biol* **120**, 201-3.
- Liebowitz, D., Wang, D. and Kieff, E.** (1986). Orientation and patching of the latent infection membrane protein encoded by Epstein-Barr virus. *J Virol* **58**, 233-7.
- Lindner, S. E., Zeller, K., Schepers, A. and Sugden, B.** (2008). EBNA1's Affinity for its Origin of DNA Synthesis is a Determinant of the Origin's Replicative Efficiency. *J Virol*.
- Liu, M. T., Chang, Y. T., Chen, S. C., Chuang, Y. C., Chen, Y. R., Lin, C. S. and Chen, J. Y.** (2005). Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 represses p53-mediated DNA repair and transcriptional activity. *Oncogene* **24**, 2635-46.
- Lo, A. K., To, K. F., Lo, K. W., Lung, R. W., Hui, J. W., Liao, G. and Hayward, S. D.** (2007). Modulation of LMP1 protein expression by EBV-encoded microRNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 16164-9.
- Lorenz, U., Ravichandran, K. S., Pei, D., Walsh, C. T., Burakoff, S. J. and Neel, B. G.** (1994). Lck-dependent tyrosyl phosphorylation of the phosphotyrosine phosphatase SH-PTP1 in murine T cells. *Mol Cell Biol* **14**, 1824-34.
- Lottspeich, F. and Zorbach, H.** (1998). Bioanalytik. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
- Lu, J., Chua, H. H., Chen, S. Y., Chen, J. Y. and Tsai, C. H.** (2003a). Regulation of matrix metalloproteinase-1 by Epstein-Barr virus proteins. *Cancer Res* **63**, 256-62.
- Lu, Y., Yu, Q., Liu, J. H., Zhang, J., Wang, H., Koul, D., McMurray, J. S., Fang, X., Yung, W. K., Siminovitch, K. A. et al.** (2003b). Src family protein-tyrosine kinases alter the function of PTEN to regulate phosphatidylinositol 3-kinase/AKT cascades. *J Biol Chem* **278**, 40057-66.
- Luftig, M., Prinarakis, E., Yasui, T., Tschritzis, T., Cahir-McFarland, E., Inoue, J., Nakano, H., Mak, T. W., Yeh, W. C., Li, X. et al.** (2003). Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 activation of NF-kappaB through IRAK1 and TRAF6. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 15595-600.
- Luftig, M., Yasui, T., Soni, V., Kang, M. S., Jacobson, N., Cahir-McFarland, E., Seed, B. and Kieff, E.** (2004). Epstein-Barr virus latent infection membrane protein 1 TRAF-binding site induces NIK/IKK alpha-dependent noncanonical NF-kappaB activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 141-6.
- Luo, W., Peterson, A., Garcia, B. A., Coombs, G., Kofahl, B., Heinrich, R., Shabanowitz, J., Hunt, D. F., Yost, H. J. and Virshup, D. M.** (2007). Protein phosphatase 1 regulates assembly and function of the beta-catenin degradation complex. *Embo J* **26**, 1511-21.
- Maeda, A., Kurosaki, M., Ono, M., Takai, T. and Kurosaki, T.** (1998). Requirement of SH2-containing protein tyrosine phosphatases SHP-1 and SHP-2 for paired immunoglobulin-like receptor B (PIR-B)-mediated inhibitory signal. *J Exp Med* **187**, 1355-60.

- Mainou, B. A., Everly, D. N., Jr. and Raab-Traub, N.** (2005). Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 CTAR1 mediates rodent and human fibroblast transformation through activation of PI3K. *Oncogene* **24**, 6917-24.
- Mainou, B. A., Everly, D. N., Jr. and Raab-Traub, N.** (2007). Unique signaling properties of CTAR1 in LMP1-mediated transformation. *J Virol* **81**, 9680-92.
- Mancao, C. and Hammerschmidt, W.** (2007). Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A is a B-cell receptor mimic and essential for B-cell survival. *Blood* **110**, 3715-21.
- Mann, K. P. and Thorley-Lawson, D.** (1987). Posttranslational processing of the Epstein-Barr virus-encoded p63/LMP protein. *J Virol* **61**, 2100-8.
- Margolis, S. S., Walsh, S., Weiser, D. C., Yoshida, M., Shenolikar, S. and Kornbluth, S.** (2003). PP1 control of M phase entry exerted through 14-3-3-regulated Cdc25 dephosphorylation. *Embo J* **22**, 5734-45.
- Marrero, M. B., Venema, V. J., Ju, H., Eaton, D. C. and Venema, R. C.** (1998). Regulation of angiotensin II-induced JAK2 tyrosine phosphorylation: roles of SHP-1 and SHP-2. *Am J Physiol* **275**, C1216-23.
- Martin, J. and Sugden, B.** (1991). Transformation by the oncogenic latent membrane protein correlates with its rapid turnover, membrane localization, and cytoskeletal association. *J Virol* **65**, 3246-58.
- Maschek, B. J., Zhang, W., Rosoff, P. M. and Reiser, H.** (1993). Modulation of the intracellular Ca²⁺ and inositol trisphosphate concentrations in murine T lymphocytes by the glycosylphosphatidylinositol-anchored protein sgp-60. *J Immunol* **150**, 3198-206.
- Massa, P. T. and Wu, C.** (1998). Increased inducible activation of NF-kappaB and responsive genes in astrocytes deficient in the protein tyrosine phosphatase SHP-1. *J Interferon Cytokine Res* **18**, 499-507.
- Matsushita, M., Tsuchiya, N., Oka, T., Yamane, A. and Tokunaga, K.** (1999). New variations of human SHP-1. *Immunogenetics* **49**, 577-9.
- Mehl, A. M., Floettmann, J. E., Jones, M., Brennan, P. and Rowe, M.** (2001). Characterization of intercellular adhesion molecule-1 regulation by Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein-1 identifies pathways that cooperate with nuclear factor kappa B to activate transcription. *J Biol Chem* **276**, 984-92.
- Mei, Y. P., Zhu, X. F., Zhou, J. M., Huang, H., Deng, R. and Zeng, Y. X.** (2006). siRNA targeting LMP1-induced apoptosis in EBV-positive lymphoma cells is associated with inhibition of telomerase activity and expression. *Cancer Lett* **232**, 189-98.
- Meylan, E. and Tschopp, J.** (2005). The RIP kinases: crucial integrators of cellular stress. *Trends Biochem Sci* **30**, 151-9.
- Miller, G., Rabson, M. and Heston, L.** (1984). Epstein-Barr virus with heterogeneous DNA disrupts latency. *J Virol* **50**, 174-82.
- Miller, G., Robinson, J., Heston, L. and Lipman, M.** (1974). Differences between laboratory strains of Epstein-Barr virus based on immortalization, abortive infection, and interference. *Proc Natl Acad Sci U S A* **71**, 4006-10.
- Miller, W. E., Earp, H. S. and Raab-Traub, N.** (1995). The Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 induces expression of the epidermal growth factor receptor. *J Virol* **69**, 4390-8.
- Mitchell, T. and Sugden, B.** (1995). Stimulation of NF-kappa B-mediated transcription by mutant derivatives of the latent membrane protein of Epstein-Barr virus. *J Virol* **69**, 2968-76.

- Miyashita, E. M., Yang, B., Babcock, G. J. and Thorley-Lawson, D. A.** (1997). Identification of the site of Epstein-Barr virus persistence in vivo as a resting B cell. *J Virol* **71**, 4882-91.
- Mizuno, K., Tagawa, Y., Mitomo, K., Arimura, Y., Hatano, N., Katagiri, T., Ogimoto, M. and Yakura, H.** (2000). Src homology region 2 (SH2) domain-containing phosphatase-1 dephosphorylates B cell linker protein/SH2 domain leukocyte protein of 65 kDa and selectively regulates c-Jun NH2-terminal kinase activation in B cells. *J Immunol* **165**, 1344-51.
- Mizuno, K., Tagawa, Y., Mitomo, K., Watanabe, N., Katagiri, T., Ogimoto, M. and Yakura, H.** (2002). Src homology region 2 domain-containing phosphatase 1 positively regulates B cell receptor-induced apoptosis by modulating association of B cell linker protein with Nck and activation of c-Jun NH2-terminal kinase. *J Immunol* **169**, 778-86.
- Mok, S. C., Kwok, T. T., Berkowitz, R. S., Barrett, A. J. and Tsui, F. W.** (1995). Overexpression of the protein tyrosine phosphatase, nonreceptor type 6 (PTPN6), in human epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* **57**, 299-303.
- Monroe, J. G.** (2006). ITAM-mediated tonic signalling through pre-BCR and BCR complexes. *Nat Rev Immunol* **6**, 283-94.
- Moore, B. W. and Perez, V. J.** (1867). Specific acidic proteins of the nervous system. In *Physiological and Biochemical Aspects of Nervous Integration.*, (ed. F. D. Carlson), pp. 343-359. NJ: Englewood Cliffs.
- Moorthy, R. K. and Thorley-Lawson, D. A.** (1993). All three domains of the Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein LMP-1 are required for transformation of rat-1 fibroblasts. *J Virol* **67**, 1638-46.
- Moran, M. and Miceli, M. C.** (1998). Engagement of GPI-linked CD48 contributes to TCR signals and cytoskeletal reorganization: a role for lipid rafts in T cell activation. *Immunity* **9**, 787-96.
- Mosialos, G., Birkenbach, M., Yalamanchili, R., VanArsdale, T., Ware, C. and Kieff, E.** (1995). The Epstein-Barr virus transforming protein LMP1 engages signaling proteins for the tumor necrosis factor receptor family. *Cell* **80**, 389-99.
- Muyrers, J. P., Zhang, Y., Benes, V., Testa, G., Ansorge, W. and Stewart, A. F.** (2000). Point mutation of bacterial artificial chromosomes by ET recombination. *EMBO Rep* **1**, 239-43.
- Nesvizhskii, A. I., Keller, A., Kolker, E. and Aebersold, R.** (2003). A statistical model for identifying proteins by tandem mass spectrometry. *Anal Chem* **75**, 4646-58.
- Neuhierl, B. and Delecluse, H. J.** (2005). Molecular genetics of DNA viruses: recombinant virus technology. *Methods Mol Biol* **292**, 353-70.
- Neuhierl, B., Feederle, R., Hammerschmidt, W. and Delecluse, H. J.** (2002). Glycoprotein gp110 of Epstein-Barr virus determines viral tropism and efficiency of infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 15036-41.
- Niedobitek, G.** (1999). The Epstein-Barr virus: a group 1 carcinogen? *Virchows Arch* **435**, 79-86.
- Niedobitek, G., Kremmer, E., Herbst, H., Whitehead, L., Dawson, C. W., Niedobitek, E., von Ostau, C., Rooney, N., Grasser, F. A. and Young, L. S.** (1997). Immunohistochemical detection of the Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 2A in Hodgkin's disease and infectious mononucleosis. *Blood* **90**, 1664-72.
- Niedobitek, G., Meru, N. and Delecluse, H. J.** (2001). Epstein-Barr virus infection and human malignancies. *Int J Exp Pathol* **82**, 149-70.

Nishikura, K., ar-Rushdi, A., Erikson, J., Watt, R., Rovera, G. and Croce, C. M. (1983). Differential expression of the normal and of the translocated human c-myc oncogenes in B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**, 4822-6.

Novoa, I., Zeng, H., Harding, H. P. and Ron, D. (2001). Feedback inhibition of the unfolded protein response by GADD34-mediated dephosphorylation of eIF2alpha. *J Cell Biol* **153**, 1011-22.

Oka, T., Ouchida, M., Koyama, M., Ogama, Y., Takada, S., Nakatani, Y., Tanaka, T., Yoshino, T., Hayashi, K., Ohara, N. et al. (2002). Gene silencing of the tyrosine phosphatase SHP1 gene by aberrant methylation in leukemias/lymphomas. *Cancer Res* **62**, 6390-4.

Oka, T., Yoshino, T., Hayashi, K., Ohara, N., Nakanishi, T., Yamaai, Y., Hiraki, A., Sogawa, C. A., Kondo, E., Teramoto, N. et al. (2001). Reduction of hematopoietic cell-specific tyrosine phosphatase SHP-1 gene expression in natural killer cell lymphoma and various types of lymphomas/leukemias : combination analysis with cDNA expression array and tissue microarray. *Am J Pathol* **159**, 1495-505.

Ono, M., Okada, H., Bolland, S., Yanagi, S., Kurosaki, T. and Ravetch, J. V. (1997). Deletion of SHIP or SHP-1 reveals two distinct pathways for inhibitory signaling. *Cell* **90**, 293-301.

Pani, G., Kozlowski, M., Cambier, J. C., Mills, G. B. and Siminovitch, K. A. (1995). Identification of the tyrosine phosphatase PTP1C as a B cell antigen receptor-associated protein involved in the regulation of B cell signaling. *J Exp Med* **181**, 2077-84.

Pappin, D. J. (1997). Peptide mass fingerprinting using MALDI-TOF mass spectrometry. *Methods Mol Biol* **64**, 165-73.

Pegman, P. M., Smith, S. M., D'Souza, B. N., Loughran, S. T., Maier, S., Kempkes, B., Cahill, P. A., Simmons, M. J., Gelinas, C. and Walls, D. (2006). Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 trans-activates the cellular antiapoptotic bfl-1 gene by a CBF1/RBPJ kappa-dependent pathway. *J Virol* **80**, 8133-44.

Pei, D., Lorenz, U., Klingmuller, U., Neel, B. G. and Walsh, C. T. (1994). Intramolecular regulation of protein tyrosine phosphatase SH-PTP1: a new function for Src homology 2 domains. *Biochemistry* **33**, 15483-93.

Peng, M. and Lundgren, E. (1992). Transient expression of the Epstein-Barr virus LMP1 gene in human primary B cells induces cellular activation and DNA synthesis. *Oncogene* **7**, 1775-82.

Perkins, D. N., Pappin, D. J., Creasy, D. M. and Cottrell, J. S. (1999). Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* **20**, 3551-67.

Plas, D. R., Williams, C. B., Kersh, G. J., White, L. S., White, J. M., Paust, S., Ulyanova, T., Allen, P. M. and Thomas, M. L. (1999). Cutting edge: the tyrosine phosphatase SHP-1 regulates thymocyte positive selection. *J Immunol* **162**, 5680-4.

Plutzky, J., Neel, B. G., Rosenberg, R. D., Eddy, R. L., Byers, M. G., Jani-Sait, S. and Shows, T. B. (1992). Chromosomal localization of an SH2-containing tyrosine phosphatase (PTPN6). *Genomics* **13**, 869-72.

Poole, A. W. and Jones, M. L. (2005). A SHPing tale: perspectives on the regulation of SHP-1 and SHP-2 tyrosine phosphatases by the C-terminal tail. *Cell Signal* **17**, 1323-32.

Porter, G. W., Khuri, F. R. and Fu, H. (2006). Dynamic 14-3-3/client protein interactions integrate survival and apoptotic pathways. *Semin Cancer Biol* **16**, 193-202.

- Pullen, S. S., Dang, T. T., Crute, J. J. and Kehry, M. R.** (1999a). CD40 signaling through tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs). Binding site specificity and activation of downstream pathways by distinct TRAFs. *J Biol Chem* **274**, 14246-54.
- Pullen, S. S., Labadia, M. E., Ingraham, R. H., McWhirter, S. M., Everdeen, D. S., Alber, T., Crute, J. J. and Kehry, M. R.** (1999b). High-affinity interactions of tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs) and CD40 require TRAF trimerization and CD40 multimerization. *Biochemistry* **38**, 10168-77.
- Pullen, S. S., Miller, H. G., Everdeen, D. S., Dang, T. T., Crute, J. J. and Kehry, M. R.** (1998). CD40-tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) interactions: regulation of CD40 signaling through multiple TRAF binding sites and TRAF hetero-oligomerization. *Biochemistry* **37**, 11836-45.
- Puls, A., Eliopoulos, A. G., Nobes, C. D., Bridges, T., Young, L. S. and Hall, A.** (1999). Activation of the small GTPase Cdc42 by the inflammatory cytokines TNF(alpha) and IL-1, and by the Epstein-Barr virus transforming protein LMP1. *J Cell Sci* **112 (Pt 17)**, 2983-92.
- Qi, J. C., Wang, J., Mandadi, S., Tanaka, K., Roufogalis, B. D., Madigan, M. C., Lai, K., Yan, F., Chong, B. H., Stevens, R. L. et al.** (2006). Human and mouse mast cells use the tetraspanin CD9 as an alternate interleukin-16 receptor. *Blood* **107**, 135-42.
- Rastelli, J., Homig-Holzel, C., Seagal, J., Muller, W., Hermann, A. C., Rajewsky, K. and Zimmer-Strobl, U.** (2008). LMP1 signaling can replace CD40 signaling in B cells in vivo and has unique features of inducing class-switch recombination to IgG1. *Blood* **111**, 1448-55.
- Rawlins, D. R., Milman, G., Hayward, S. D. and Hayward, G. S.** (1985). Sequence-specific DNA binding of the Epstein-Barr virus nuclear antigen (EBNA-1) to clustered sites in the plasmid maintenance region. *Cell* **42**, 859-68.
- Rickinson, A. B. and Kieff, E.** (1996). Epstein-Barr virus. In *Fields virology*, vol. Vol. 2 (ed. P. M. H. D.M. Knipe, D.E. Griffin, R.A. Lamb, M.A. Martin, B. Roizman, and S.E. Straus, Eds.), pp. 2575-2627. Philadelphia: Lippincott Williams &Wilkins,.
- Rittinger, K., Budman, J., Xu, J., Volinia, S., Cantley, L. C., Smerdon, S. J., Gamblin, S. J. and Yaffe, M. B.** (1999). Structural analysis of 14-3-3 phosphopeptide complexes identifies a dual role for the nuclear export signal of 14-3-3 in ligand binding. *Mol Cell* **4**, 153-66.
- Roepstorff, P. and Fohlman, J.** (1984). Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. *Biomed Mass Spectrom* **11**, 601.
- Rooney, C., Howe, J. G., Speck, S. H. and Miller, G.** (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**, 1531-9.
- Rothenberger, S., Rousseaux, M., Knecht, H., Bender, F. C., Legler, D. F. and Bron, C.** (2002). Association of the Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 with lipid rafts is mediated through its N-terminal region. *Cell Mol Life Sci* **59**, 171-80.
- Sakata, N., Patel, H. R., Terada, N., Aruffo, A., Johnson, G. L. and Gelfand, E. W.** (1995). Selective activation of c-Jun kinase mitogen-activated protein kinase by CD40 on human B cells. *J Biol Chem* **270**, 30823-8.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T.** (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Sambrook, J. and Gething, M. J.** (1989). Protein structure. Chaperones, paperones. *Nature* **342**, 224-5.

- Sandberg, M., Hammerschmidt, W. and Sugden, B.** (1997). Characterization of LMP-1's association with TRAF1, TRAF2, and TRAF3. *J Virol* **71**, 4649-56.
- Sandberg, M. L., Kaykas, A. and Sugden, B.** (2000). Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus inhibits as well as stimulates gene expression. *J Virol* **74**, 9755-61.
- Schall, T. J., Lewis, M., Koller, K. J., Lee, A., Rice, G. C., Wong, G. H., Gatanaga, T., Granger, G. A., Lentz, R., Raab, H. et al.** (1990). Molecular cloning and expression of a receptor for human tumor necrosis factor. *Cell* **61**, 361-70.
- Schepers, A., Ritz, M., Bousset, K., Kremmer, E., Yates, J. L., Harwood, J., Diffley, J. F. and Hammerschmidt, W.** (2001). Human origin recognition complex binds to the region of the latent origin of DNA replication of Epstein-Barr virus. *Embo J* **20**, 4588-602.
- Schneider, F.** (2005). Die Rolle des TRADD Adapterproteins in der Signaltransduktion des zellulären TNF-Rezeptors 1 und des Latenten Membranproteins 1 des Epstein-Barr-Virus. München: Ludwig-Maximilians-Universität.
- Schneider, F., Neugebauer, J., Griese, J., Liefold, N., Kutz, H., Briseno, C. and Kieser, A.** (2008). The viral oncoprotein LMP1 exploits TRADD for signaling by masking its apoptotic activity. *PLoS Biol* **6**, e8.
- Schultheiss, U., Puschner, S., Kremmer, E., Mak, T. W., Engelmann, H., Hammerschmidt, W. and Kieser, A.** (2001). TRAF6 is a critical mediator of signal transduction by the viral oncogene latent membrane protein 1. *Embo J* **20**, 5678-91.
- Sciaky, D., Brazer, W., Center, D. M., Cruikshank, W. W. and Smith, T. J.** (2000). Cultured human fibroblasts express constitutive IL-16 mRNA: cytokine induction of active IL-16 protein synthesis through a caspase-3-dependent mechanism. *J Immunol* **164**, 3806-14.
- Sen, G., Bikah, G., Venkataraman, C. and Bondada, S.** (1999). Negative regulation of antigen receptor-mediated signaling by constitutive association of CD5 with the SHP-1 protein tyrosine phosphatase in B-1 B cells. *Eur J Immunol* **29**, 3319-28.
- Sharma, V., Sparks, J. L. and Vail, J. D.** (2000). Human B-cell lines constitutively express and secrete interleukin-16. *Immunology* **99**, 266-71.
- Shuai, K. and Liu, B.** (2003). Regulation of JAK-STAT signalling in the immune system. *Nat Rev Immunol* **3**, 900-11.
- Shultz, L. D., Coman, D. R., Bailey, C. L., Beamer, W. G. and Sidman, C. L.** (1984). "Viable motheaten," a new allele at the motheaten locus. I. Pathology. *Am J Pathol* **116**, 179-92.
- Shultz, L. D., Rajan, T. V. and Greiner, D. L.** (1997). Severe defects in immunity and hematopoiesis caused by SHP-1 protein-tyrosine-phosphatase deficiency. *Trends Biotechnol* **15**, 302-7.
- Shultz, L. D., Schweitzer, P. A., Rajan, T. V., Yi, T., Ihle, J. N., Matthews, R. J., Thomas, M. L. and Beier, D. R.** (1993). Mutations at the murine motheaten locus are within the hematopoietic cell protein-tyrosine phosphatase (Hcph) gene. *Cell* **73**, 1445-54.
- Shultz, L. D. and Sidman, C. L.** (1987). Genetically determined murine models of immunodeficiency. *Annu Rev Immunol* **5**, 367-403.
- Sidman, C. L., Shultz, L. D., Hardy, R. R., Hayakawa, K. and Herzenberg, L. A.** (1986). Production of immunoglobulin isotypes by Ly-1+ B cells in viable motheaten and normal mice. *Science* **232**, 1423-5.

- Siminovitch, K. A., Lamhonwah, A. M., Somani, A. K., Cardiff, R. and Mills, G. B.** (1999). Involvement of the SHP-1 tyrosine phosphatase in regulating B lymphocyte antigen receptor signaling, proliferation and transformation. *Curr Top Microbiol Immunol* **246**, 291-7; discussion 298.
- Siminovitch, K. A. and Neel, B. G.** (1998). Regulation of B cell signal transduction by SH2-containing protein-tyrosine phosphatases. *Semin Immunol* **10**, 329-47.
- Song, Y. J., Jen, K. Y., Soni, V., Kieff, E. and Cahir-McFarland, E.** (2006). IL-1 receptor-associated kinase 1 is critical for latent membrane protein 1-induced p65/RelA serine 536 phosphorylation and NF-kappaB activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 2689-94.
- Songyang, Z., Shoelson, S. E., McGlade, J., Olivier, P., Pawson, T., Bustelo, X. R., Barbacid, M., Sabe, H., Hanafusa, H., Yi, T. et al.** (1994). Specific motifs recognized by the SH2 domains of Csk, 3BP2, fps/fes, GRB-2, HCP, SHC, Syk, and Vav. *Mol Cell Biol* **14**, 2777-85.
- Soni, V., Cahir-McFarland, E. and Kieff, E.** (2007). LMP1 TRAFficking activates growth and survival pathways. *Adv Exp Med Biol* **597**, 173-87.
- Soni, V., Yasui, T., Cahir-McFarland, E. and Kieff, E.** (2006). LMP1 transmembrane domain 1 and 2 (TM1-2) FWLY mediates intermolecular interactions with TM3-6 to activate NF-kappaB. *J Virol* **80**, 10787-93.
- Spear, P. G. and Longnecker, R.** (2003). Herpesvirus entry: an update. *J Virol* **77**, 10179-85.
- Spender, L. C., Cornish, G. H., Sullivan, A. and Farrell, P. J.** (2002). Expression of transcription factor AML-2 (RUNX3, CBF(alpha)-3) is induced by Epstein-Barr virus EBNA-2 and correlates with the B-cell activation phenotype. *J Virol* **76**, 4919-27.
- Staunton, D. E., Fisher, R. C., LeBeau, M. M., Lawrence, J. B., Barton, D. E., Francke, U., Dustin, M. and Thorley-Lawson, D. A.** (1989). Blast-1 possesses a glycosyl-phosphatidylinositol (GPI) membrane anchor, is related to LFA-3 and OX-45, and maps to chromosome 1q21-23. *J Exp Med* **169**, 1087-99.
- Steen, H. and Mann, M.** (2004). The ABC's (and XYZ's) of peptide sequencing. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 699-711.
- Stralfors, P., Hiraga, A. and Cohen, P.** (1985). The protein phosphatases involved in cellular regulation. Purification and characterisation of the glycogen-bound form of protein phosphatase-1 from rabbit skeletal muscle. *Eur J Biochem* **149**, 295-303.
- Stults, J. T.** (1995). Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry (MALDI-MS). *Curr Opin Struct Biol* **5**, 691-8.
- Sugden, B. and Mark, W.** (1977). Clonal transformation of adult human leukocytes by Epstein-Barr virus. *J Virol* **23**, 503-8.
- Tada, K., Okazaki, T., Sakon, S., Koburai, T., Kurosawa, K., Yamaoka, S., Hashimoto, H., Mak, T. W., Yagita, H., Okumura, K. et al.** (2001). Critical roles of TRAF2 and TRAF5 in tumor necrosis factor-induced NF-kappa B activation and protection from cell death. *J Biol Chem* **276**, 36530-4.
- Takada, K. and Ono, Y.** (1989). Synchronous and sequential activation of latently infected Epstein-Barr virus genomes. *J Virol* **63**, 445-9.
- Takeshita, H., Yoshizaki, T., Miller, W. E., Sato, H., Furukawa, M., Pagano, J. S. and Raab-Traub, N.** (1999). Matrix metalloproteinase 9 expression is induced by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 C-terminal activation regions 1 and 2. *J Virol* **73**, 5548-55.

- Tedoldi, S., Paterson, J. C., Cordell, J., Tan, S. Y., Jones, M., Manek, S., Dei Tos, A. P., Robertson, H., Masir, N., Natkunam, Y. et al.** (2006). Jaw1/LRMP, a germinal centre-associated marker for the immunohistological study of B-cell lymphomas. *J Pathol* **209**, 454-63.
- Thomas, M. L.** (1995). Of ITAMs and ITIMs: turning on and off the B cell antigen receptor. *J Exp Med* **181**, 1953-6.
- Thorley-Lawson, D. A.** (2001). Epstein-Barr virus: exploiting the immune system. *Nat Rev Immunol* **1**, 75-82.
- Thorley-Lawson, D. A. and Mann, K. P.** (1985). Early events in Epstein-Barr virus infection provide a model for B cell activation. *J Exp Med* **162**, 45-59.
- Thorley-Lawson, D. A., Schooley, R. T., Bhan, A. K. and Nadler, L. M.** (1982). Epstein-Barr virus superinduces a new human B cell differentiation antigen (B-LAST 1) expressed on transformed lymphoblasts. *Cell* **30**, 415-25.
- Tomic, S., Greiser, U., Lammers, R., Kharitonov, A., Imyanov, E., Ullrich, A. and Bohmer, F. D.** (1995). Association of SH2 domain protein tyrosine phosphatases with the epidermal growth factor receptor in human tumor cells. Phosphatidic acid activates receptor dephosphorylation by PTP1C. *J Biol Chem* **270**, 21277-84.
- Tovey, M. G., Lenoir, G. and Begon-Lours, J.** (1978). Activation of latent Epstein-Barr virus by antibody to human IgM. *Nature* **276**, 270-2.
- Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J.** (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 4350-4.
- Tsui, H. W., Hasselblatt, K., Martin, A., Mok, S. C. and Tsui, F. W.** (2002). Molecular mechanisms underlying SHP-1 gene expression. *Eur J Biochem* **269**, 3057-64.
- Tsurumi, T., Fujita, M. and Kudoh, A.** (2005). Latent and lytic Epstein-Barr virus replication strategies. *Rev Med Virol* **15**, 3-15.
- Uchida, J., Yasui, T., Takaoka-Shichijo, Y., Muraoka, M., Kulwichit, W., Raab-Traub, N. and Kikutani, H.** (1999). Mimicry of CD40 signals by Epstein-Barr virus LMP1 in B lymphocyte responses. *Science* **286**, 300-3.
- Uchida, T., Matozaki, T., Noguchi, T., Yamao, T., Horita, K., Suzuki, T., Fujioka, Y., Sakamoto, C. and Kasuga, M.** (1994). Insulin stimulates the phosphorylation of Tyr538 and the catalytic activity of PTP1C, a protein tyrosine phosphatase with Src homology-2 domains. *J Biol Chem* **269**, 12220-8.
- Uemura, N., Kajino, T., Sanjo, H., Sato, S., Akira, S., Matsumoto, K. and Ninomiya-Tsuji, J.** (2006). TAK1 is a component of the Epstein-Barr virus LMP1 complex and is essential for activation of JNK but not of NF-kappaB. *J Biol Chem* **281**, 7863-72.
- van der Merwe, P. A., Brown, M. H., Davis, S. J. and Barclay, A. N.** (1993). Affinity and kinetic analysis of the interaction of the cell adhesion molecules rat CD2 and CD48. *Embo J* **12**, 4945-54.
- Vockerodt, M., Haier, B., Buttgerit, P., Tesch, H. and Kube, D.** (2001). The Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 induces interleukin-10 in Burkitt's lymphoma cells but not in Hodgkin's cells involving the p38/SAPK2 pathway. *Virology* **280**, 183-98.
- Wajant, H., Henkler, F. and Scheurich, P.** (2001). The TNF-receptor-associated factor family: scaffold molecules for cytokine receptors, kinases and their regulators. *Cell Signal* **13**, 389-400.

- Walton, K. M. and Dixon, J. E.** (1993). Protein tyrosine phosphatases. *Annu Rev Biochem* **62**, 101-20.
- Wan, J., Sun, L., Mendoza, J. W., Chui, Y. L., Huang, D. P., Chen, Z. J., Suzuki, N., Suzuki, S., Yeh, W. C., Akira, S. et al.** (2004). Elucidation of the c-Jun N-terminal kinase pathway mediated by Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1. *Mol Cell Biol* **24**, 192-9.
- Wan, J., Zhang, W., Wu, L., Bai, T., Zhang, M., Lo, K. W., Chui, Y. L., Cui, Y., Tao, Q., Yamamoto, M. et al.** (2006). BS69, a specific adaptor in the latent membrane protein 1-mediated c-Jun N-terminal kinase pathway. *Mol Cell Biol* **26**, 448-56.
- Wang, D., Liebowitz, D. and Kieff, E.** (1985). An EBV membrane protein expressed in immortalized lymphocytes transforms established rodent cells. *Cell* **43**, 831-40.
- Wang, F., Gregory, C., Sample, C., Rowe, M., Liebowitz, D., Murray, R., Rickinson, A. and Kieff, E.** (1990). Epstein-Barr virus latent membrane protein (LMP1) and nuclear proteins 2 and 3C are effectors of phenotypic changes in B lymphocytes: EBNA-2 and LMP1 cooperatively induce CD23. *J Virol* **64**, 2309-18.
- Wang, S., Rowe, M. and Lundgren, E.** (1996). Expression of the Epstein Barr virus transforming protein LMP1 causes a rapid and transient stimulation of the Bcl-2 homologue Mcl-1 levels in B-cell lines. *Cancer Res* **56**, 4610-3.
- Winding, P. and Berchtold, M. W.** (2001). The chicken B cell line DT40: a novel tool for gene disruption experiments. *J Immunol Methods* **249**, 1-16.
- Wood, V. H., O'Neil, J. D., Wei, W., Stewart, S. E., Dawson, C. W. and Young, L. S.** (2007). Epstein-Barr virus-encoded EBNA1 regulates cellular gene transcription and modulates the STAT1 and TGFbeta signaling pathways. *Oncogene* **26**, 4135-47.
- Wu, C., Guan, Q., Wang, Y., Zhao, Z. J. and Zhou, G. W.** (2003a). SHP-1 suppresses cancer cell growth by promoting degradation of JAK kinases. *J Cell Biochem* **90**, 1026-37.
- Wu, C., Sun, M., Liu, L. and Zhou, G. W.** (2003b). The function of the protein tyrosine phosphatase SHP-1 in cancer. *Gene* **306**, 1-12.
- Wu, D. W., Stark, K. C., Dunnington, D., Dillon, S. B., Yi, T., Jones, C. and Pelus, L. M.** (2000). SH2-Containing protein tyrosine phosphatase-1 (SHP-1) association with Jak2 in UT-7/Epo cells. *Blood Cells Mol Dis* **26**, 15-24.
- Wu, L., Nakano, H. and Wu, Z.** (2006). The C-terminal activating region 2 of the Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1 activates NF-kappaB through TRAF6 and TAK1. *J Biol Chem* **281**, 2162-9.
- Wu, Y., Nadler, M. J., Brennan, L. A., Gish, G. D., Timms, J. F., Fusaki, N., Jongstra-Bilen, J., Tada, N., Pawson, T., Wither, J. et al.** (1998). The B-cell transmembrane protein CD72 binds to and is an in vivo substrate of the protein tyrosine phosphatase SHP-1. *Curr Biol* **8**, 1009-17.
- Xia, Z. P. and Chen, Z. J.** (2005). TRAF2: a double-edged sword? *Sci STKE* **2005**, pe7.
- Xie, P. and Bishop, G. A.** (2004). Roles of TNF receptor-associated factor 3 in signaling to B lymphocytes by carboxyl-terminal activating regions 1 and 2 of the EBV-encoded oncoprotein latent membrane protein 1. *J Immunol* **173**, 5546-55.
- Xie, P., Hostager, B. S. and Bishop, G. A.** (2004). Requirement for TRAF3 in signaling by LMP1 but not CD40 in B lymphocytes. *J Exp Med* **199**, 661-71.

- Xie, Z. H., Zhang, J. and Siraganian, R. P.** (2000). Positive regulation of c-Jun N-terminal kinase and TNF-alpha production but not histamine release by SHP-1 in RBL-2H3 mast cells. *J Immunol* **164**, 1521-8.
- Yaffe, M. B., Rittinger, K., Volinia, S., Caron, P. R., Aitken, A., Leffers, H., Gamblin, S. J., Smerdon, S. J. and Cantley, L. C.** (1997). The structural basis for 14-3-3:phosphopeptide binding specificity. *Cell* **91**, 961-71.
- Yang, J., Cheng, Z., Niu, T., Liang, X., Zhao, Z. J. and Zhou, G. W.** (2000a). Structural basis for substrate specificity of protein-tyrosine phosphatase SHP-1. *J Biol Chem* **275**, 4066-71.
- Yang, J., Cheng, Z., Niu, T., Liang, X., Zhao, Z. J. and Zhou, G. W.** (2001). Protein tyrosine phosphatase SHP-1 specifically recognizes C-terminal residues of its substrates via helix alpha0. *J Cell Biochem* **83**, 14-20.
- Yang, J., Deng, X., Deng, L., Gu, H., Fan, W. and Cao, Y.** (2004). Telomerase activation by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 is associated with c-Myc expression in human nasopharyngeal epithelial cells. *J Exp Clin Cancer Res* **23**, 495-506.
- Yang, J., Liang, X., Niu, T., Meng, W., Zhao, Z. and Zhou, G. W.** (1998a). Crystal structure of the catalytic domain of protein-tyrosine phosphatase SHP-1. *J Biol Chem* **273**, 28199-207.
- Yang, J., Liu, L., He, D., Song, X., Liang, X., Zhao, Z. J. and Zhou, G. W.** (2003). Crystal structure of human protein-tyrosine phosphatase SHP-1. *J Biol Chem* **278**, 6516-20.
- Yang, W., Tabrizi, M., Berrada, K. and Yi, T.** (1998b). SHP-1 phosphatase C-terminus interacts with novel substrates p32/p30 during erythropoietin and interleukin-3 mitogenic responses. *Blood* **91**, 3746-55.
- Yang, X., He, Z., Xin, B. and Cao, L.** (2000b). LMP1 of Epstein-Barr virus suppresses cellular senescence associated with the inhibition of p16INK4a expression. *Oncogene* **19**, 2002-13.
- Yang, X., Sham, J. S., Ng, M. H., Tsao, S. W., Zhang, D., Lowe, S. W. and Cao, L.** (2000c). LMP1 of Epstein-Barr virus induces proliferation of primary mouse embryonic fibroblasts and cooperatively transforms the cells with a p16-insensitive CDK4 oncogene. *J Virol* **74**, 883-91.
- Yasui, T., Luftig, M., Soni, V. and Kieff, E.** (2004). Latent infection membrane protein transmembrane FWLY is critical for intermolecular interaction, raft localization, and signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 278-83.
- Yeung, Y. G., Berg, K. L., Pixley, F. J., Angeletti, R. H. and Stanley, E. R.** (1992). Protein tyrosine phosphatase-1C is rapidly phosphorylated in tyrosine in macrophages in response to colony stimulating factor-1. *J Biol Chem* **267**, 23447-50.
- Yi, T. and Ihle, J. N.** (1993). Association of hematopoietic cell phosphatase with c-Kit after stimulation with c-Kit ligand. *Mol Cell Biol* **13**, 3350-8.
- Young, L. S., Dawson, C. W. and Eliopoulos, A. G.** (2000). The expression and function of Epstein-Barr virus encoded latent genes. *Mol Pathol* **53**, 238-47.
- Young, L. S. and Rickinson, A. B.** (2004). Epstein-Barr virus: 40 years on. *Nat Rev Cancer* **4**, 757-68.
- Yu, Z., Su, L., Hoglinger, O., Jaramillo, M. L., Banville, D. and Shen, S. H.** (1998). SHP-1 associates with both platelet-derived growth factor receptor and the p85 subunit of phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem* **273**, 3687-94.
- Zapata, P. D., Roper, R. M., Valencia, A. M., Buscail, L., Lopez, J. I., Martin-Orozco, R. M., Prieto, J. C., Angulo, J., Susini, C., Lopez-Ruiz, P. et al.** (2002). Autocrine regulation of human prostate

carcinoma cell proliferation by somatostatin through the modulation of the SH2 domain containing protein tyrosine phosphatase (SHP)-1. *J Clin Endocrinol Metab* **87**, 915-26.

Zhang, Q., Raghunath, P. N., Vonderheid, E., Odum, N. and Wasik, M. A. (2000). Lack of phosphotyrosine phosphatase SHP-1 expression in malignant T-cell lymphoma cells results from methylation of the SHP-1 promoter. *Am J Pathol* **157**, 1137-46.

Zhang, Y., Center, D. M., Wu, D. M., Cruikshank, W. W., Yuan, J., Andrews, D. W. and Kornfeld, H. (1998). Processing and activation of pro-interleukin-16 by caspase-3. *J Biol Chem* **273**, 1144-9.

Zhang, Z., Jimi, E. and Bothwell, A. L. (2003a). Receptor activator of NF-kappa B ligand stimulates recruitment of SHP-1 to the complex containing TNFR-associated factor 6 that regulates osteoclastogenesis. *J Immunol* **171**, 3620-6.

Zhang, Z., Shen, K., Lu, W. and Cole, P. A. (2003b). The role of C-terminal tyrosine phosphorylation in the regulation of SHP-1 explored via expressed protein ligation. *J Biol Chem* **278**, 4668-74.

Zhao, Z., Larocque, R., Ho, W. T., Fischer, E. H. and Shen, S. H. (1994). Purification and characterization of PTP2C, a widely distributed protein tyrosine phosphatase containing two SH2 domains. *J Biol Chem* **269**, 8780-5.

Zhao, Z., Shen, S. H. and Fischer, E. H. (1993). Stimulation by phospholipids of a protein-tyrosine-phosphatase containing two src homology 2 domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 4251-5.

Zimber-Strobl, U., Kempkes, B., Marschall, G., Zeidler, R., Van Kooten, C., Banchereau, J., Bornkamm, G. W. and Hammerschmidt, W. (1996). Epstein-Barr virus latent membrane protein (LMP1) is not sufficient to maintain proliferation of B cells but both it and activated CD40 can prolong their survival. *Embo J* **15**, 7070-8.

Zimber-Strobl, U., Kremmer, E., Grasser, F., Marschall, G., Laux, G. and Bornkamm, G. W. (1993). The Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 interacts with an EBNA2 responsive cis-element of the terminal protein 1 gene promoter. *Embo J* **12**, 167-75.

zur Hausen, H., Schulte-Holthausen, H., Klein, G., Henle, W., Henle, G., Clifford, P. and Santesson, L. (1970). EBV DNA in biopsies of Burkitt tumours and anaplastic carcinomas of the nasopharynx. *Nature* **228**, 1056-8.

Zychlinska, M. (2007). Murine Model System for EBV-related Diseases. In *Faculty of Biology*, pp. 124. München: Ludwig-Maximilians-Universitaet Muenchen.

Danksagungen

An dieser Stelle möchte ich den vielen Menschen danken, die mich während meiner Dissertation unterstützt haben. Mein besonderer Dank gilt:

meinem Betreuer, Dr. Arnd Kieser, für das Überlassen des Themas, seine Unterstützung mit Ideen und Zuspruch in schwierigen Situationen und nicht zuletzt für die gründliche Korrektur der Arbeit.

Prof. Dr. Dirk Eick für die Übernahme der offiziellen Betreuung.

Prof. Dr. Wolfgang Hammerschmidt, Dr. Markus Altmann, Markus Kalla und Dagmar Pich für die Hilfe bei der Klonierung der rekombinanten Maxi-EBVs und die Generierung der LCLs. Wolfgang, ohne dich würde ich noch immer Maxis machen...

Dr. Thomas Knöfel, dass er mich in die Welt der Massenspektrometrie eingeführt hat, für Diskussionen und für die Identifizierung von SHP-1.

Dr. Hakan Sarioglu, der bei MALDI-Fragen immer mit Rat und Tat zur Seite stand, für Zuspruch und aufbauende Worte, wenn unsere Großgeräte wieder einmal gegen uns waren.

der „MALDI-Truppe“ Melanie, Andrea, Stephi, Silke und Karsten für aufmunternde Worte und den unglaublichen Zusammenhalt. Wie schön, wenn man über Katastrophen gemeinsam lachen kann.

meinen Laborkollegen Viktoryia, Anna und Helmi sowie meinen Ex-Kollegen Franky, Julia und Cinthia für die freundschaftliche und humorvolle Arbeitsatmosphäre im Labor und der Unterstützung bei allen großen und kleinen Laborproblemen.

Dr. Elisabeth Kremmer für Tonnen an Antikörpern.

allen anderen Kollegen der AGV für ihre Hilfsbereitschaft und das angenehme Arbeitsklima. Danke, Steffi, für alle „FACSen“. Danke, Manuel, für die IF-Versuche und für dein Lächeln am Morgen.

Alex, Claudia und Jen für die Ruhe und Gelassenheit, die ich durch euch geschenkt bekommen habe. Ohne euch hätte ich es nicht geschafft.

Sabine für die wunderbare Freundschaft, tolle Gespräche und einen Samstag Vormittag ohne Labor.

meinen Eltern, dass ich meinen Frust bei dir, liebe Mama, abladen konnte und ihr mich immer wieder aufgebaut habt. Papa, dir danke ich besonders, dass du so schnell und zuverlässig Stilblüten und Rechtschreibfehler in dieser Arbeit korrigiert hast.

Meinem Mann Peter danke ich für die unendliche Geduld und Nachsicht, für all die Aufgaben, die du für mich übernommen hast, als Administrator, Druckleger, Graphiker und Motivator. Danke für die Ruhe in dieser turbulenten Zeit. Danke für deine Liebe und das Lachen, das du in mein Leben bringst. Danke, dass es dich gibt.

Erklärung

Meine Dissertation mit dem Thema „Identifizierung und Charakterisierung von neuen Interaktionspartnern des latenten Membranproteins 1 (LMP1) des Epstein-Barr Virus“ habe ich selbständig wie angegeben und ohne unerlaubte fremde Hilfe angefertigt. Diese Dissertation wurde weder in dieser noch in ähnlicher Form an einer anderen Hochschule eingereicht. Einer anderen Doktorprüfung habe ich mich nicht ohne Erfolg unterzogen.

München, 24. Juli 2008

(Janine Griese)

Curriculum Vitae

ZUR PERSON

geboren am 24. Juli 1978 in Bremen

AUSBILDUNG

Promotion

Am Helmholtz Zentrum München

2005-2008

Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt; Abteilung Genvektoren

Thema: „Identifizierung und Charakterisierung von neuen Interaktionspartnern des latenten Membranproteins 1 aus dem Epstein-Barr Virus“

Studium der Biologie an der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg

1999-2004

Hauptfach: Genetik und Molekularbiologie

Nebenfächer: Pflanzenbiotechnologie, Bioinformatik, Informatik

Studienbegleitend: Betriebswirtschaft, klinische Medizin

Diplomarbeit

An der Klinik für Tumorbilogie

Thema: „Analyse des IGF1-R-Signaltransduktionswegs über Phosphoprotein-Anreicherung und differentielle 2D-Gelelektrophorese“

Auslandsstudium

2001-2002

an der McGill University Montreal, Kanada

Studium der Rechtswissenschaft

1998-1999

an der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg

Schulbildung

bis 1998

Abitur am Gymnasium Syke