

Regulation des Zelloberflächenmoleküls CD83 durch das Epstein-Barr Virus und Analyse seiner Funktion

Dissertation

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

Diana Dudziak

München, April 2002

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

Erster Gutachter: Prof. Dr. Eick

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Brack-Werner

Tag der mündlichen Prüfung: 21.10.2002

Teile dieser Arbeit sind oder werden wie folgt veröffentlicht:

Pajic A, Staeger MS, Dudziak D, Schuhmacher M, Spitkovski D, Eissner G, Brielmeier M, Polack A, Bornkamm GW; **Antagonistic effects of c-myc and Epstein-Barr virus latent genes on the phenotype of human B cells**

Int J Cancer. 2001 Sept15; 93 (6), 810-816

Lechmann M, Krooshoop DJ, Dudziak D, Kremmer E, Kuhnt C, Figdor CG, Schuler G, Steinkasserer A; **The extracellular domain of CD83 inhibits dendritic cell-mediated T cell stimulation and binds to a ligand on dendritic cells**

J Exp Med. 2001 Dec 17; 194 (12): 1813-1821

Dirmeier U, Hoffmann R, Kilger E, Schultheiss U, Gires O, Dudziak D, Kieser A, Eick D, Sugden B, Hammerschmidt W; **Target genes of CD40 and the Latent Membrane Protein 1 (LMP1) of Epstein-Barr virus in human B cells**

Manuskript zur Veröffentlichung eingereicht

Dudziak D, Kieser A, Dirmeier U, Nimmerjahn F, Marschall G, Berchtold S, Steinkasserer A, Hammerschmidt W, Laux G, Bornkamm GW; **The Latent Membrane Protein 1 (LMP1) of Epstein-Barr virus induces CD83 by the NF- κ B signaling pathway**

Manuskript zur Veröffentlichung eingereicht

Dudziak D, Nimmerjahn F, Mautner J, Kremmer E, Bornkamm GW, Laux G; **Generation of soluble CD83 by alternative splicing**

Manuskript in Vorbereitung

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung	3
2.1	Das Epstein-Barr Virus (EBV)	3
2.2	EBV-Infektion	3
2.3	Mechanismus der Immortalisierung	6
2.4	Bedeutung der Latenzgene für die Immortalisierung	7
2.5	EBNA-2, seine Zielgene und das ER/EB2-5 Zellsystem	8
2.6	Das Latente Membranprotein (LMP-1)	10
2.7	LMP-1 Signalwege und Zielgene	12
2.8	CD83	15
2.9	Fragestellung dieser Arbeit	17
3	Ergebnisse	18
3.1	Charakterisierung der CD83-Expression in ER/EB Zellen	18
3.1.1	CD83-Expression in ER/EB2-5 Zellen nach Induktion mit Östrogen	18
3.1.2	CD83 ist ein indirektes Zielgen von EBNA-2	20
3.1.3	Die Regulation der CD83-Expression erfolgt sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene	21
3.2	Charakterisierung der CD83-Expression in verschiedenen Zelllinien	23
3.2.1	CD83-Expression in BL41 Zellen sowie in P3HR1 und B95-8 Virus infizierten BL41 Zellen	23
3.3	EBNA-2 induziert CD83 über einen Notch-unabhängigen Signalweg	23
3.4	EBNA-2 induziert die CD83-Expression über LMP-1	25
3.4.1	CD83-Expression in der P493-6 Zelllinie	25
3.4.2	CD83-Expression in der Zelllinie 1194-3	27
3.4.3	CD83-Expression in der Zelllinie B64-19	29
3.5	Regulation des CD83-Promotors	31
3.5.1	CD83-Promotormutanten	31

3.5.2	Die Zelllinie 293-T als System der Wahl zur Untersuchung des CD83-Promotors	32
3.5.3	CD83-Promotoraktivierung durch LMP-1	33
3.5.4	CD83- und LMP-1-Mutanten	34
3.5.5	Inhibition der CD83-Promotoraktivierung von LMP-1 durch dominant/negatives I- κ B	36
3.5.6	Untersuchung der Transaktivierung des CD83-Promotors durch Proteine der LMP-1 Signalkaskaden	37
3.5.6.1	Transaktivierung des CD83-Promotors durch TRAF-2 und TRAF-6	37
3.5.6.2	CD83 wird nicht über den STAT-Signalweg reguliert	38
3.5.6.3	CD83 wird nicht über p38-MAPK aktiviert	39
3.5.7	Das LMP-1:CD40-Fusionsgen aktiviert den CD83-Promotor	40
3.5.8	LMP-1:TNF-R1 und -R2 Fusionsgene aktivieren den CD83-Promotor	42
3.6	Alternatives Spleißen von CD83	44
3.6.1	Spleißvarianten in ER/EB2-5, BL41-Triplett und anderen Zelllinien	44
3.6.2	Verifikation der Spleißvarianten	46
3.6.3	Lösliche CD83-Varianten sind nur in unstimulierten PBMCs exprimiert	47
3.6.4	Analyse der Spleißvarianten im Northern-Blot	49
3.6.5	Gewebeverteilung	51
3.6.6	Rekombinant hergestelltes lösliches CD83	52
3.7	Funktionelle Rolle von CD83 bei der Immunantwort	53
3.7.1	Untersuchungen der Aktivierung CD4 ⁺ T-Zellen	54
3.7.1.1	Untersuchung der Aktivierung von CD4 ⁺ T-Zellen durch unterschiedlich stark CD83-exprimierende LCLs	54
3.7.1.2	Untersuchung der Funktion von CD83 in A1 Zellen	55
3.7.1.3	Co-stimulatorische Funktion von CD83 auf nicht-professionellen APCs	58
3.8	Suche nach dem CD83-Liganden	61
3.8.1	Suche nach dem CD83-Liganden mit einem CD83-Ig Fusionsprotein	61
3.8.1.1	Produktion des CD83-Ig Fusionsproteins	62
3.8.1.2	FACS mit CD83-Ig	64
3.8.2	Suche nach dem CD83-Liganden mit einem CD83-Tetramer	68
3.8.2.1	Klonierung des CD83-Tetramers	68
3.8.2.2	Produktion und Aufreinigung der CD83-Monomere	70
3.8.2.3	Streptavidin-Shift-Assay	71

3.8.2.4	FACS von PBMCs mit CD83-Tetrameren	72
3.8.2.5	Bindungsstudien mit den CD83-Tetrameren auf CD4 ⁺ und CD8 ⁺ Zellen	75
3.8.2.6	Bindung des CD83-Tetramers an der T-Zellkultur KS	75
4	Diskussion	80
4.1	Induktion und Regulation von CD83 in ER/EB2-5 und anderen Zelllinien	80
4.2	Suche nach dem Transaktivator von CD83	82
4.3	Regulation des CD83-Promotors	84
4.4	Alternatives Spleißen von CD83	87
4.5	Co-stimulatorische Funktion von CD83	89
4.6	Identifikation einer CD83-Ligand positiven Population	92
4.7	Ausblick	97
5	Material	98
5.1	Zelllinien	98
5.2	Material für die Zellkultur	101
5.2.1	Serum	101
5.2.2	Medium und Zusätze	101
5.2.3	Verbrauchsmaterial	102
5.2.4	Antibiotika	102
5.3	Material für die Bakterienkultur	103
5.3.1	Bakterien	103
5.3.2	Antibiotika	103
5.3.3	Medium	103
5.3.4	Verbrauchsmaterial	103
5.4	Plasmide	104
5.4.1	CD83-Promotor und Promotormutanten	104
5.4.2	Expressionsplasmide für LMP-1, LMP-1 Mutanten, LMP-1 Fusionsproteine und Proteine der LMP-1 Signalkaskade	104
5.4.3	Weitere Plasmide	105
5.4.4	Klonierte Vektoren	106
5.5	Antikörper	106

5.5.1	FACS	106
5.5.2	Aufreinigung	107
5.5.3	B64-19 Induktion	107
5.6	Kits	107
5.7	Oligonukleotide (Primer)	107
5.8	Radioaktive Isotope	108
5.9	Enzyme	108
5.10	Molekulare Größenmarker	108
5.11	Software	109
6	Methoden	110
6.1	Kultivierung eukaryontischer Zellen	110
6.1.1	Humane B-Zellen	110
6.1.1.1	Entzug von Östrogen, bzw. Tetrazyklin	111
6.1.1.2	Kultivierung und Induktion der Zelllinie B64-19	111
6.1.2	T-Zellen	112
6.1.3	Adhärente Zellen	112
6.1.4	Aufbewahrung und Wiederaufnahme	112
6.1.5	Bestimmung der Lebendzellzahl	113
6.1.6	MTT-Assay	113
6.2	Transfektion	113
6.2.1	Transiente Transfektion von 293-T Zellen mit LipofectAMIN™	113
6.2.2	Transiente Transfektion von 293-T Zellen mit der Ca ²⁺ Phosphat-Methode	113
6.2.3	Stabile Transfektion von A1 Zellen	114
6.3	Virale Infektion mit pINCO	114
6.3.1	Produktion retroviraler Überstände	114
6.3.2	Infektion von B-Zellen	115
6.3.3	Infektion von RCC-Zellen	115
6.4	T-Zell-Assay	115
6.4.1	LCL	115
6.4.2	A1 Zellen	116
6.4.3	RCC-Zellen	116

6.4.4	ELISA	117
6.5	Aufreinigung von PBMCs	117
6.6	FACS™-Analyse	117
6.7	RNA-Methoden	118
6.7.1	Isolierung von RNA	118
6.7.2	Northern-Blot und Hybridisierung	118
6.7.3	Radioaktive Markierung und Northern-Blot Sonden	119
6.7.4	cDNA-Synthese	120
6.8	Proteinmethoden	120
6.8.1	Probengewinnung mit β -Mercaptoethanol-Puffer	120
6.8.2	Auftrennung von Proteinen durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	120
6.8.3	Silberfärbung	121
6.8.4	Western-Blot	122
6.9	Luziferase-Assay	123
6.9.1	Transfektion	123
6.9.2	Proteinextrakte	123
6.9.3	Luziferase-Assay	124
6.9.4	β -Galaktosidase-Assay	124
6.9.5	Standardisierung und Berechnung der x-fachen Transaktivierung	124
6.10	Tetramer-Produktion	125
6.10.1	Transfektion	125
6.10.2	Anreicherung (Tangentialflow, NiNTA)	125
6.10.3	Imidazol-Aufreinigung	126
6.10.4	Biotinylierung	126
6.10.5	Aufreinigung der biotinylierten CD83-Monomere	126
6.10.6	Streptavidin-Shift-Assay	127
6.10.7	Multimerisierung der biotinylierten CD83-Monomere	128
6.10.8	FACS mit CD83-Tetramer	128
6.11	Produktion des CD83-Ig Fusionsproteins	129
6.11.1	Transfektion	129
6.11.2	Aufreinigung der Überstände über Protein A	129
6.12	Bakterien	130
6.12.1	Kultivierung und Aufbewahrung von Bakterien	130
6.12.2	Kompetente Bakterien	130

6.13	Präparative Aufarbeitung von Plasmid-DNA	131
6.14	Klonierte Plasmide	131
6.14.1	CD83-Spleißprodukte	131
6.14.2	CD83-Ig-Fusionsprotein	132
6.14.3	CD83-Tetramere	132
6.14.4	pINCO/CD80 und pINCO/CD83	133
7	Literaturverzeichnis	134
8	Abkürzungsverzeichnis	149
9	Anhang	153
9.1	CD83 und CD83-Spleißprodukte	153
9.1.1	Darstellung der verschiedenen Exons von CD83	153
9.1.2	CD83-TM	153
9.1.3	CD83-a	154
9.1.4	CD83-b	154
9.1.5	CD83-c	154
9.1.6	CD83-c-His	155
9.2	CD83-Ig Fusionsproteine	155
9.2.1	CD83-S-Ig	155
9.2.2	CD83-L-Ig	155
9.3	CD83-Tetramere	156
9.3.1	CD83-Tetramer 101	156
9.3.2	CD83-Tetramer 102	156
9.3.3	CD83-Tetramer 103	156
9.4	Retrovirale Vektoren	157

1 Zusammenfassung

Das Epstein-Barr Virus (EBV) infiziert humane ruhende B-Zellen und transformiert diese *in vitro* zu kontinuierlich wachsenden lymphoblastoiden Zelllinien (LCLs). EBNA-2 ist eines der ersten viralen Proteine, die nach Infektion exprimiert werden. Es interagiert mit zellulären Transkriptionsfaktoren wie PU.1 oder RBP-J κ und induziert dadurch sowohl zelluläre als auch virale Gene wie LMP-1, LMP-2, EBNA-3A, -3B und -3C. Da EBNA-2 in der LCL ER/EB2-5 als Fusionsprodukt mit der Hormonbindungsdomäne des Östrogenrezeptors exprimiert wird, kann die Aktivität von EBNA-2 durch Zugabe und Entzug von Östrogen in diesen Zellen reguliert werden. Nach Entzug von Östrogen werden die Zellen arretiert, was in einem Phänotyp ähnlich dem ruhender B-Zellen resultiert. Die Wiedergabe von Östrogen induziert die Proliferation und Aktivierung der ER/EB2-5 Zellen mit Expression von Aktivierungsmarkern und Adhäsionsmolekülen wie CD21, CD23, CD39 und CD54.

In dieser Arbeit wurde der Frage nachgegangen, ob die Expression des Oberflächenmoleküls CD83, eines Markers für die Reifung dendritischer Zellen und die Aktivierung von Lymphozyten, durch EBV beeinflusst wird. CD83 wird in ER/EB2-5 Zellen nur in Gegenwart von aktivem EBNA-2 (+Östrogen) auf der Oberfläche exprimiert. Es zeigte sich, daß die CD83-Expression sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene reguliert ist. Weiterhin wurde gefunden, daß CD83 nicht direkt über EBNA-2, sondern über das virale latente Membranprotein LMP-1 induziert wird. In Promotor-Reporter-Assays konnte durch Co-Transfektion von verschiedenen CD83-Promotor Luziferase-Konstrukten mit Expressionsplasmiden für LMP-1, LMP-1 Mutanten und den an der LMP-1 Signalübertragung beteiligten Proteine gezeigt werden, daß der CD83-Promotor durch LMP-1 über NF- κ B reguliert wird. Der CD83-Promotor wird auch durch Mitglieder der TNF-Rezeptor Familie (CD40, TNF-R1, TNF-R2) in sehr ähnlicher Weise wie durch LMP-1 aktiviert.

Über die Funktion von CD83 ist bislang sehr wenig bekannt. Aufgrund seiner Immunglobulin-ähnlichen Domäne und seines Expressionsmusters wird CD83 eine wichtige Rolle in der Antigenpräsentation und/oder den zellulären Interaktionen, die der Lymphozytenaktivierung folgen, zugesprochen. Nach retroviraler Infektion mit CD83 wurde in der nicht professionellen Antigen-präsentierenden Zelllinie RCC p18.S bei der Untersuchung einer möglichen co-stimulatorischen Funktion von CD83 eine leichte Aktivierung eines spezifischen CD4⁺ T-Zellklons beobachtet. In einer gemischten Lymphozytenkultur konnte eine co-stimulatorische Aktivität von CD83 nicht direkt demonstriert werden, obwohl ein lösliches CD83-Ig Konstrukt eine schwache inhibitorische Wirkung zeigte. Ein Hinweis auf die Existenz von lösli-

chen Formen von CD83 wurden auf RNA-Niveau durch Analyse alternativer Spleißprodukte gefunden. Ein weiterer wichtiger Schwerpunkt war die Identifikation einer Zellpopulation, die den Liganden von CD83 exprimiert. Mit Hilfe eines CD83-Ig Fusionsproteins und eines CD83-Tetramer-Konstrukts konnten CD83-Ligand positive Zellen sowohl auf CD4⁺ als auch auf CD8⁺ T-Zellen isolierter PBMCs sowie auf dem T-Zellklon KS festgestellt werden. Weiterhin ließ sich eine kleine Population aktivierter Granulozyten mit dem CD83-Tetramer färben. Diese Ergebnisse bieten gute Voraussetzungen für die Identifikation eines Liganden und zur Aufklärung der Funktion von CD83.

2 Einleitung

2.1 Das Epstein-Barr Virus (EBV)

Mit Hilfe der Elektronenmikroskopie wurde 1965 in Burkitt-Lymphomzellen ein neues Herpesvirus von M.A. Epstein, B. Achong und Y. Barr entdeckt (*Epstein et al., 1965*). Das ubiquitär vorkommende, humane γ -Herpesvirus wurde der Gattung der Lymphocryptoviren zugeordnet und als Epstein-Barr Virus (EBV) bezeichnet. EBV besteht aus einem ikosaedrischen Capsid, das aus 162 Capsomeren gebildet wird, dem Tegument und einer Virushülle (Envelope) mit externen Glykoproteinen. Im ikosaedrisch-geformten Core befindet sich eine doppelsträngige lineare DNA mit einer Gesamtgröße von ca. 180 Kilobasenpaaren, die für etwa 80 Gene kodiert (*Farrell, 2001*). Das EBV-Genom ist durch verschiedene Wiederholungseinheiten charakterisiert und an seinen Enden von repetitiven Sequenzen (TR) flankiert (*Übersicht bei Kieff und Rickinson, 2001*).

2.2 EBV-Infektion

Die normale EBV-Infektion erfolgt über Mund zu Mund Kontakt, geschieht in der Regel in der Kindheit und verläuft meist asymptomatisch. Ist die Infektion erfolgt, bleibt die Wirtsperson ein Leben lang Träger des Virus. Ca. 20% aller infizierten Individuen scheiden das Virus über das Sputum aus (*Übersicht bei Gulley, 2001*), was zu einer nahezu weltweiten Durchseuchung mit EBV in mehr als 90% der Erwachsenenpopulation führt (*Übersicht bei Rickinson und Kieff, 2001*). Eine verspätete EBV-Infektion im Jugendlichen- oder Erwachsenenalter kann sich als infektiöse Mononukleose, auch Pfeiffersches Drüsenfieber genannt, manifestieren (*Henle et al., 1968*). Über die frühen Ereignisse bei einer Infektion des natürlichen Wirts mit EBV ist wenig bekannt. Es wird angenommen, daß EBV während der Primärinfektion im Oro- und Nasopharynxepithel repliziert. Wahrscheinlich dringt EBV in das lymphoide System über benachbarte B-Zellen ein und führt dabei zu einer Virus-getriebenen Expansion dieser infizierten B-Zellen (1 von 10^4 B-Zellen ist infiziert; *Rocchi et al., 1977; Tosato et al., 1984; Übersicht bei Rickinson und Moss, 1997*). Als Antwort auf die EBV-Infektion erfolgt eine massive Proliferation von T-Zellen (*Callan et al., 1996; 1998*), die die meisten der EBV-infizierten Zellen eliminieren. Diejenigen Zellen, die EBV-kodierte, aber kaum immunogene Proteine exprimieren, können der Immunantwort entgehen (*Babcock et al., 2000a, b; Kurth et al., 2000; Miyashita et al., 1997*). In gesunden Individuen werden EBV-infizierte B-Zellen

auf eine von 10^5 - 10^6 peripheren B-Zellen durch $CD8^+$ zytotoxische T-Zellen reduziert, aber nicht vollständig eliminiert (Wagner *et al.*, 1992; Miyashita *et al.*, 1995).

EBV infiziert B-Zellen über eine Rezeptor-vermittelte Endozytose (Carel *et al.*, 1990; Nemerow und Cooper, 1984). Dabei bindet das Virus über seine Glykoproteine gp350/220 an den Komplementrezeptor CD21 (Nemerow *et al.*, 1987; Tanner *et al.*, 1987) und wird anschließend in große, dünnwandige nicht-Clathrin ummantelte Vesikel aufgenommen. Es folgt eine Fusion der viralen Hülle mit der Vesikelmembran und unter Beteiligung des viralen Glykoproteins gp85 der Eintritt des Nukleocapsids in das Zytoplasma (Miller und Hutt-Fletcher, 1988). Wie das Virusgenom in den Zellkern gelangt, ist noch immer unbekannt. Wahrscheinlich wird das Nukleocapsid zum Zellkern transportiert und die DNA dort freigesetzt. Neben gp350/220 gibt es wahrscheinlich weitere, bislang nicht identifizierte virale Proteine, die für eine EBV-Infektion verantwortlich sind (Janz *et al.*, 2000).

Nach der Infektion zirkularisiert ein EBV-Genom innerhalb von ca. 16-20 Stunden (Hurley und Thorley-Lawson, 1988) über seine Terminalen-Repeats (Abb. 1). In immortalisierten Lymphozyten amplifiziert sich das virale Episom (kovalent geschlossener Ring) so, daß jede Zelle multiple Genomkopien enthält. Daneben kommt es auch vor, daß wenige DNA-Moleküle in die Wirts-DNA stabil integrieren (Delecluse *et al.*, 1993; Henderson *et al.*, 1983; Lawrence *et al.*, 1988; Matsuo *et al.*, 1984).

EBV wird mit einer Reihe neoplastischer Tumorerkrankungen in Verbindung gebracht. So sind das Nasopharynxkarzinom und lymphoproliferative Erkrankungen nach Transplantation (PTLD) ausschließlich mit EBV assoziiert. Das Burkitt-Lymphom ist ein sehr häufiger Tumor des Kindesalters in Malaria-Endemiegebieten und weist meistens eine EBV-Assoziation auf. Der gleiche Tumor kommt überall auf der Welt mit niedrigerer Inzidenz und geringerer Assoziation mit EBV vor (20%). Ein weiterer wichtiger Risikofaktor für das Auftreten des Burkitt-Lymphoms ist eine HIV-Infektion (50% der Tumoren sind EBV^+). Allen Burkitt-Lymphomen sind unabhängig von ihrem geografischen Auftreten Chromosomentranslokationen gemeinsam, die das Proto-Onkogen *c-myc* in die Nachbarschaft eines der Immunglobulin-Loci bringen (Übersicht bei Klein, 1989). Andere Tumoren wie der Morbus Hodgkin, non-Hodgkin Lymphome oder das Adenokarzinom des Magens zeigen seltener eine EBV-Assoziation (Glaser *et al.*, 1997; Imai *et al.*, 1994).

EBV infiziert und immortalisiert ruhende B-Zellen. Daneben wurde EBV-DNA auch in einer Reihe anderer Zelltypen nachgewiesen, so daß sich der Tropismus von EBV wohl nicht nur auf B-Zellen beschränkt. Wie andere Herpesviren etabliert auch EBV in seinem Wirt eine latente Infektion, d.h., das Virus verbleibt lebenslang, im allgemeinen in inapparenter Form

im Körper. Neuere Daten zeigen, daß das Virus sehr wahrscheinlich in den B-Gedächtniszellen persistiert. Ob in diesen Zellen virale Genprodukte exprimiert sind, ist nicht zweifelsfrei geklärt. Man findet in ihnen regelmäßig Transkripte von LMP-2 und den kleinen nicht-polyadenylierten RNAs EBER-1 und EBER-2 (*Thorley-Lawson und Mann, 1985; Rowe et al., 1986; Ernberg et al., 1987*). Die Reaktivierung des Virus nimmt vermutlich von diesen persistent infizierten B-Zellen ihren Ausgang.

Von der *in vivo* Latenz zu unterscheiden ist die Form des Virus in proliferierenden Zellen (Burkitt-Lymphom und Lymphoblastoide Zellen, LCLs). Je nach Expressionsmuster der viralen Gene spricht man von Latenz I, II und III (*Rowe et al., 1986, 1987, 1992*). In EBV immortalisierten Zellen sind 6 nukleäre Antigene (EBNA-1, -2, -3A, -3B, -3C (Epstein-Barr Virus nukleäres Antigen) und EBNA-LP (EBNA-Leader-Protein)), drei Transmembranproteine (LMP-1, LMP-2A und LMP-2B (Latente Membranproteine; LMP-2A und -2B werden auch TP-1 und TP-2 genannt), zwei kurze nukleäre nicht-polyadenylierte RNAs (EBER-1 und -2) sowie einige weitere Transkripte (BARTs: complementary-strand *Bam* A rightward transcripts) exprimiert, die gemeinsam die Proliferation der EBV-immortalisierten Zelle treiben (Latenz III). Die Typ III Latenz wird überwiegend in *in vitro* immortalisierten lymphoblastoiden Zelllinien und transient in der akuten Phase einer infektiösen Mononukleose beobachtet (*Übersicht bei Bornkamm und Hammerschmidt, 2001; Rickinson und Kieff, 2001*). Im Gegensatz dazu sind in Burkitt-Lymphom Zellen *in vivo* nur EBNA-1, die EBER RNAs sowie BART mRNAs nachweisbar (Latenz I). Die Latenz II ist charakterisiert durch zusätzliche Expression von LMP-1 und LMP-2 und ist ein Merkmal von Hodgkin- und Nasopharynxkarzinom-Zellen (NPC; *Brooks et al., 1992; Minarovits et al., 1994; Yoshiyama et al., 1995*). Die Nomenklatur fortführend wird die *in vivo* Latenz auch als Latenz 0 bezeichnet (*Übersicht bei Rickinson und Kieff, 2001*).

Durch die Ausbildung der verschiedenen Latenzformen kann EBV sich der Immunerkennung entziehen. So wird EBNA-1 nicht zu Peptiden prozessiert, die über MHC-Klasse-I-Moleküle auf der Oberfläche präsentiert werden (*Levitskaya et al., 1995*). Alle anderen EBV-kodierten Proteine stellen antigene Epitope dar und werden im Kontext von MHC-Klasse-I präsentiert. Vor allem gegen Epitope von LMP-1, LMP-2, EBNA-3A, -3B und -3C wird eine zytotoxische CD8⁺-Antwort beobachtet (*Übersicht bei Rickinson et al., 1996*).

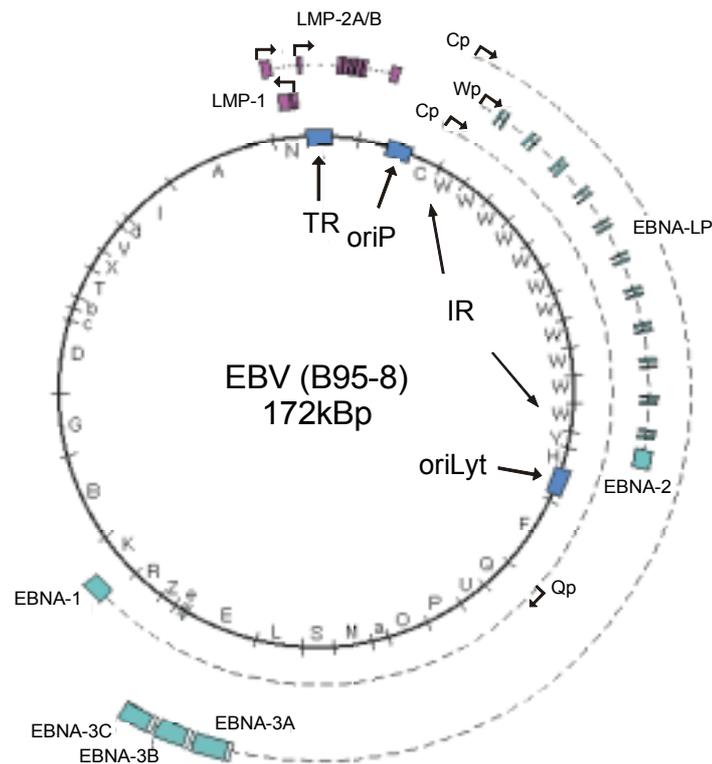


Abbildung 1: Schematische Darstellung des zirkulären EBV-Genoms (B95-8 Stamm)

EBV wurde von einer klonierten *Bam*HI-geschnittenen Genbank ausgehend sequenziert. Die EBV-Promotoren Cp, Wp und Qp wurden nach ihrer Lokalisation in den entsprechenden *Bam*HI-Fragmenten benannt. Dargestellt sind alle latent exprimierten Gene EBNA-1, -2, -3A, -3B, -3C, EBNA-LP, LMP-1, -2A und 2B. Die EBNA-Transkripte tragen die gleiche 5' Leader-Sequenz, die für EBNA-LP kodiert. Die internen repetitiven Sequenzen (IR) sind durch die *Bam*HI-W-Fragmente dargestellt. Weiterhin dargestellt wurden die DNA-Replikationsursprünge oriLyt für die lytische Replikation sowie der Replikationsursprung oriP, der für die synchrone Replikation des viralen Episoms während der Zellteilung benötigt wird. An den Terminalen Repeats (TR) zirkularisiert das EBV-Genom nach Infektion der B-Zelle.

2.3 Mechanismus der Immortalisierung

Als das Epstein-Barr Virus 1964 entdeckt worden war, war es nicht gelungen das Virus auf andere Zellen zu übertragen. Henle und Mitarbeitern gelang es 1967, B-Lymphozyten *in vitro* mit EBV zu infizieren und diese dadurch zu unbegrenzter Proliferation zu treiben (*Henle et al., 1967*). Die daraus etablierten lymphoblastoiden Zelllinien (LCL) stellen ein wichtiges Modell für die Immortalisierung von humanen Zellen dar. Bei einer Infektion von B-Zellen *in vitro* kommt es zur Expression aller viralen latenten Antigene, EBNA-1, -2, -3A, -3B, -3C, -LP, LMP-1, -2A, -2B, den EBER- und den BART-RNAs, wodurch LCLs den typischen Phänotyp von Zellen in der Latenzphase III zeigen (*Übersicht bei Rickinson und Kieff, 2001*).

Nach der Infektion wird ein langes RNA-Transkript vom *Bam*HI-W-Promotor (Wp) im Abschnitt der langen internen Wiederholungseinheiten (IR, Abb. 1; *Bam*HI-W-Fragmente) durch die RNA-Polymerase-II abgelesen (*Woisetschlaeger et al., 1989*). EBNA-2 und EBNA-LP sind die ersten viralen Gene, die nach einer Infektion transkribiert werden, gefolgt von EBNA-1 (*Allday et al., 1989; Rooney et al., 1989*). Nach Transkription von EBNA-1 und EBNA-2 kommt es zum Umschalten auf einen stromaufwärts gelegenen Promotor (Cp), von dem ein langes Vorläufer-Transkript initiiert wird. Aus diesem entstehen durch alternatives Spleißen die verschiedenen mRNAs für EBNA-LP, EBNA-2, EBNA-3A, -3B, -3C und EBNA-1 (Abb. 1; *Puglielli et al., 1996; Schlager et al., 1996; Woisetschlaeger et al., 1991; Farrel, 2001*). In der Latenz III wird ausschließlich der Cp-Promotor zur Expression aller EBNA-mRNAs benutzt. Dieser Promotor ist in Latenzphase I und II nicht aktiv. Deshalb wird dann das für EBNA-1 benötigte Transkript vom Qp-Promotor (im *Bam*HI-Q-Fragment) aus initiiert (*Übersicht bei Bornkamm und Hammerschmidt, 2001; Puglielli et al., 1996; 1997*). LMP1 wird linksseitig und LMP-2B rechtsseitig von einem bidirektionalen Promotor in *Bam*HI-N_{het}-Fragment exprimiert (Abb. 1). Die Expression von LMP-2A und -2B ist nur möglich, wenn die virale DNA zum Ring geschlossen vorliegt (*Laux et al., 1988, 1989*). LMP-2A wird von einem eigenen EBNA-2 regulierten Promotor transkribiert (*Übersicht bei Rickinson und Kieff, 2001*).

2.4 Bedeutung der Latenzgene für die Immortalisierung

Durch genetische Analysen konnte gezeigt werden, daß EBNA-1, EBNA-2, -3A, -3C und LMP-1 zur Immortalisierung absolut notwendig sind (*Cohen et al., 1989; Hammerschmidt und Sugden, 1989; Kaye et al., 1993; Tomkinson et al., 1993*). EBNA-2 und LMP-1 werden zusätzlich auch für die Aufrechterhaltung der Immortalisierung (*Kempkes et al., 1995b; Kilger et al., 1998*) benötigt. Die Beobachtung, daß der transformationsinkompetente, aber replikationskompetente EBV Stamm P3HR-I (*Hinuma et al., 1967; Miller et al., 1974*), eine 6,8 kBp große Deletion in den *Bam*HI-W-Y-H Fragmenten besitzt (*Bornkamm et al., 1982*), führte zur Identifikation von EBNA-2 als wichtigem Regulatorgen für die B-Zellimmortalisierung durch EBV (*Cohen et al., 1989; Hammerschmidt und Sugden, 1989; Kempkes et al., 1995b*). EBNA-2 ist absolut notwendig für die Initiation und Aufrechterhaltung der Transformation. Das Protein wirkt als zentraler Transaktivator sowohl viraler (EBNAs, LMPs) als auch zellulärer Gene. Diese Funktion kann EBNA-2 jedoch nur durch Bindung an zelluläre Transkriptionsfaktoren wie PU.1 oder RBP-J κ ausüben, da es selbst nicht an DNA binden

kann (Grossman et al., 1994; Henkel et al., 1994; Laux et al., 1994; Zimmer-Strobl et al., 1994). In EBV-infizierten B-Zellen induziert EBNA-2 die Expression von LMP-1. LMP-1 ist auch essentiell für die Transformation primärer B-Lymphozyten und ist bislang das einzige EBV-kodierte Protein mit der Fähigkeit, Nagerfibroblasten zu transformieren (Baichwal und Sugden, 1988; Martin und Sugden, 1991; Wang et al., 1985, 1988).

EBNA-LP (Hammerschmidt und Sugden, 1989; Mannick et al., 1991) und LMP-2 (Kim und Yates, 1993; Longnecker et al., 1993a,b) sind nicht absolut notwendig, zeigen jedoch einen Einfluß beim Auswachsen Virus-infizierter Zellen (Übersicht bei Bornkamm und Hammerschmidt 2001; Brielmeier et al., 1996). Die kleinen nukleären RNAs (Swaminathan et al., 1991), die BART-Transkripte (Robertson et al., 1994) und EBNA-3B (Tomkinson et al., 1993) sind für die Immortalisierung nicht essentiell. Eine genaue Funktion der EBER-RNAs ist unbekannt.

2.5 EBNA-2, seine Zielgene und das ER/EB2-5 Zellsystem

EBNA-2 spielt eine zentrale Rolle bei der Immortalisierung von B-Lymphozyten durch EBV. Die Transkription der übrigen Latenzgene (EBNAs, LMPs) und die Expression zellulärer Gene mit zentraler Bedeutung (z.B. *c-myc*) für die Proliferation (Kaiser et al., 1999a; Kempkes et al., 1995b) wird durch EBNA-2 induziert. EBNA-2 ist assoziiert mit nukleoplasmatischen, Chromatin- und nukleären Matrix-Fractionen (Hennessy und Kieff, 1983; Petti und Kieff, 1988). Auch wird EBNA-2 an verschiedenen Serin- und Threonin-Resten phosphoryliert und diversen posttranslationalen Modifikationen unterzogen (Grasser et al., 1991; Petti und Kieff, 1988). Durch EBNA-2 Mutationsanalyse konnten drei essentielle Domänen (Dimerisierungsdomäne, Interaktionsdomäne und saure Transaktivierungsdomäne) für die Immortalisierung durch EBV ermittelt werden (Übersicht bei Kieff und Rickinson, 2001).

Da EBNA-2 mit dem Transkriptionsfaktor RBP-J κ ähnlich interagiert wie der intrazelluläre Teils des zellulären Rezeptors Notch (Notch-IC) (Tamura et al., 1995), kann es als virales Homolog zu Notch verstanden werden (Hsieh et al., 1996; Sakai et al., 1998).

Durch die Interaktion mit zellulären Transkriptionsfaktoren besteht für EBNA-2 die Möglichkeit, seine Zielgene zu aktivieren oder zu deaktivieren (Henkel et al., 1994; Laux et al., 1994). Die Bindung von EBNA-2 an die Promotoren über RBP-J κ ist jedoch nicht ausreichend, um diese auch zu aktivieren. Dazu werden weitere Proteine wie das Ets Protein PU.1 (Spi.1), AUF1 oder andere Transkriptionsfaktoren benötigt (Fuentes-Panana et al., 2000; Laux et al., 1994; Sjöblom et al., 1995, 1998; Wu et al., 1996).

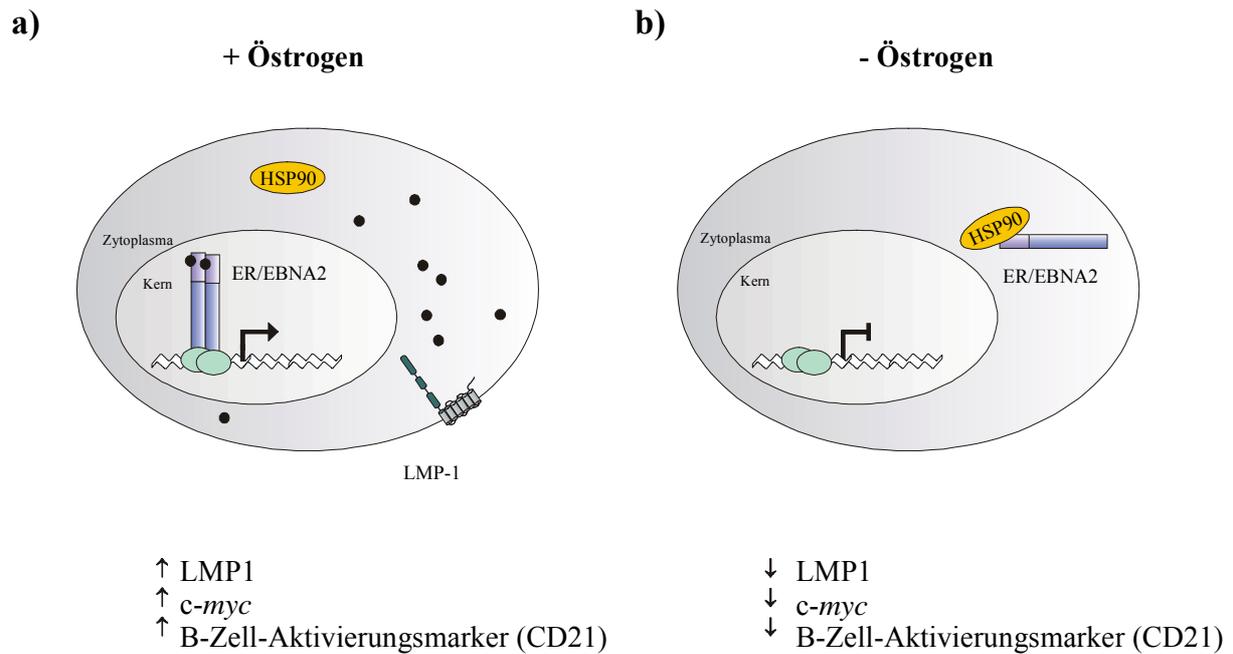


Abbildung 2: Schematische Darstellung der ER/EB Zellen

(a) In Gegenwart von Östrogen (●) befindet sich das ER/EBNA-2 Fusionsprotein (■) im Zellkern, wo es über z.B. RBP-Jκ (●) sowohl virale Zielgene wie LMP-1 (II) als auch zelluläre Zielgene wie den Transkriptionsfaktor *c-myc* oder B-Zellaktivierungsmarker wie CD21 induziert. (b) In Abwesenheit von Östrogen ist das ER/EBNA-2 Fusionsprotein im Zytoplasma lokalisiert und assoziiert mit dem Hitzeschockprotein (HSP90, ●). ER/EBNA-2 ist nicht mehr in der Lage, seine Zielgene zu aktivieren. Mit Östrogen proliferieren ER/EB Zellen, ohne Östrogen hören die Zellen auf zu wachsen und zeigen einen Phänotyp ähnlich ruhenden B-Zellen.

Eine Möglichkeit, EBNA-2 Zielgene zu identifizieren und zu charakterisieren, stellt das konditional-regulierbare ER/EB2-5 System dar (Abb. 2; Kempkes *et al.*, 1995a, b, 1996). Das System besteht aus lymphoblastoiden Zellen, die durch ein rekombinantes EBV immortalisiert wurden, das ein Fusionsgen, aus dem vollständigen ORF von EBNA-2 und der Hormonbindedomäne des Östrogenrezeptors trägt. In der ER/EB2-5 Zelllinie (ER/EB: estrogen receptor/EBNA-2 fusion gene) kann das ER/EBNA-2 Fusionsprotein auf posttranslationale Weise durch Östrogen funktionell reguliert werden. Durch Zugabe von Östrogen dissoziiert das Hitzeschockprotein 90 (Hsp90) vom ER/EBNA-2 Fusionsprotein ab. Daraufhin transloziert das ER/EBNA2 Fusionsprotein in den Zellkern, wo es zur Transaktivierung von viralen und zellulären Zielgenen von EBNA-2 kommt. Unter Östrogenzugabe proliferieren die ER/EB2-5 Zellen und exprimieren die gleichen Oberflächenproteine wie normale LCLs. Nach viertägiger Depletion von Östrogen sind die ER/EB2-5 Zellen in ihrem Wachstum und ihrer Proliferation arretiert und zeigen ein Expressionsmuster ähnlich dem ruhender B-Zellen. Nach längerem Östrogenentzug sterben die ER/EB Zellen. Aber nach Proliferationsarretierung von bis zu vier Tagen läßt sich das ER/EB System durch Zugabe von Östrogen wieder zur Proliferation anregen (Kempkes *et al.*, 1995b). Bei gleichzeitigem Zufügen von Proteinsynthese-Inhibitoren

und Östrogen zu arretierten ER/EB2-5 Zellen können direkt durch EBNA-2 aktivierte Gene identifiziert werden (*Kaiser et al., 1999a, b*).

2.6 Das Latente Membranprotein 1 (LMP-1)

LMP-1 ist ein direktes Zielgen von EBNA-2 und absolut notwendig für die Immortalisierung von B-Lymphozyten durch EBV. In latent infizierten Zellen treibt die konstitutive Expression von LMP-1 die Proliferation und das Überleben der Zellen an (*Kilger et al., 1998; Übersicht bei Mosialos, 2001*). LMP-1 induziert die Transformation verschiedener Nagerfibroblasten-Zelllinien, eingeschlossen Rat-1 und Balb/c 3T3 Zellen (*Baichwal und Sugden, 1988; Moorthy und Thorley-Lawson, 1993; Wang et al., 1985*). Wird LMP-1 unter der Kontrolle des Immunglobulin-schwere-Ketten-Enhancers transgen in Mäusen exprimiert, entwickeln diese Lymphome in einer sehr viel höheren Frequenz als Vergleichsmäuse (*Kulwichit et al., 1998*). LMP-1 inhibiert die Differenzierung etablierter humaner Epithelzelllinien (*Übersicht bei Kieff und Rickinson, 2001*). In ruhenden primären B-Lymphozyten induziert LMP-1 die DNA-Synthese und zwingt die Zelle aus der G₀-Phase in die G₁-Phase überzutreten (*Peng und Lundgren, 1992*).

Das LMP-1 Protein ist 386 Aminosäuren groß und hat ein apparentes Molekulargewicht von 63kDa. Es besteht aus einem 25 Aminosäuren langen intrazellulären arginin- und prolinreichen N-Terminus (AS 1-24), einer Transmembrandomäne mit sechs hydrophoben Membrandurchgängen (AS 25-186) und einem 200 Aminosäuren großen C-terminalen intrazellulären Teil (AS 187-386; *Fennewald et al., 1984; Hennessy et al., 1984; Liebowitz et al., 1986*), der die drei funktionellen Domänen CTAR-1, -2 und -3 (*C-Terminal Activator Region*) enthält (Abb. 3). Die N-terminale Domäne ist für die Verankerung und Stabilität von LMP-1 sowie für die Bindung von LMP-1 an Zytoskelettstrukturen wie Vimentin verantwortlich (*Liebowitz et al., 1987; Mann und Thorley-Lawson, 1987; Martin und Sudgen, 1991*).

LMP-1 Moleküle formen spontan zweidimensionale Aggregate (*Liebowitz et al., 1986*) in der Membran von LCLs und anderen Zellen. Durch intramolekulare Wechselwirkungen zwischen den Transmembrandomänen (*Wang et al., 1988*) bildet LMP-1 nicht-kovalente Komplexe in Glykosphingolipid-reichen Membranmikrodomänen („rafts“; *Clausse et al., 1997*) und vermittelt aufgrund dessen seine konstitutive Signalwirkung (*Floettmann und Rowe, 1997; Gires et al., 1997; Kaye et al., 1993; Wang et al., 1988; Baichwal und Sugden, 1989; Moorthy und Thorley-Lawson, 1993*). LMP-1 agiert als konstitutiv aktives Rezeptor-ähnliches Molekül unabhängig von der Bindung eines Liganden.

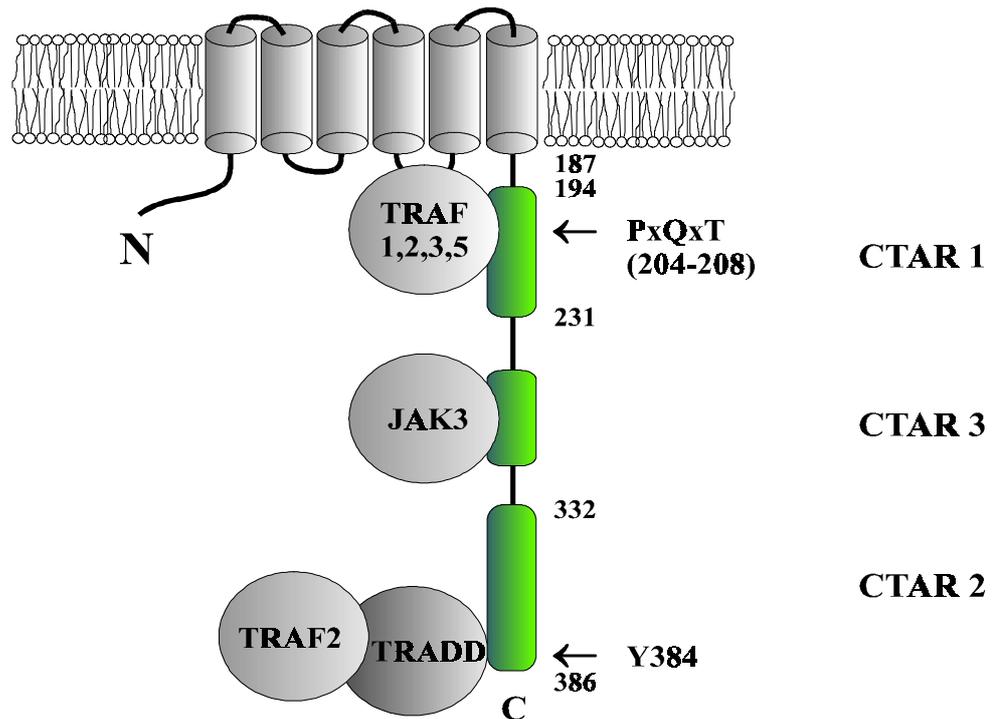


Abbildung 3: Schematische Darstellung von LMP-1

LMP-1 ist ein konstitutiv-aktives Rezeptor-ähnliches Molekül in der Plasmamembran. Es besteht aus einem kurzen intrazellulären N-Terminus (AS 1-24), 6 hydrophoben Transmembran-Durchgängen (AS 25-186) und einem langen intrazellulären C-Terminus (AS 187-386). Der intrazelluläre C-Terminus enthält die Domänen CTAR-1 (AS 191-232), CTAR-2 (AS 332-386) und CTAR-3 (AS 275-307). In der CTAR-1-Region befindet sich ein PxQxT Motiv, welches die einzige Homologie zu Mitgliedern der TNF-R Familie darstellt. Über dieses Motiv kommt es zur Bindung von TRAF-2. Am Tyr₃₈₄ bindet TRADD, jedoch nicht über seine Todesdomäne wie bei der Bindung an den TNF-R1. JAK-3 bindet in der CTAR-3-Region. Die Deletion des intrazellulären C-Terminus führt zur vollständigen Inhibition der Aktivierung von LMP-1 Zielgenen. Werden gleichzeitig Punktmutationen im PxQxT Motiv zu AxAxA und der Aminosäure Tyr₃₈₄ zu Gly₃₈₄ eingeführt, können sowohl NF-κB als auch AP-1 nicht mehr aktiviert werden. Die alleinige Mutation im PxQxT Motiv führt zu einem Verlust der NF-κB-Aktivität um ca. 20-30%, die Mutation an der Position Tyr₃₈₄ führt zum Verlust der NF-κB-Aktivität von etwa 70-80%. Eine Mutation der CTAR-3-Region zeigt keinen Einfluß auf die Transformationsfähigkeit EBV-infizierter B-Zellen.

LMP-1 hat mit keinem bisher bekannten Protein signifikante Homologien (*Übersicht bei Klein, 1989*). Die Aktivierung von LMP-1 Zielgenen erfolgt über Signalwege, die auch von Mitgliedern der Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor Superfamilie benutzt werden (TNF-R; *Devergne et al., 1996; Floettmann und Rowe, 1997; Gires et al., 1997; Hatzivassiliou et al., 1998; Izumi und Kieff, 1997; Kilger et al., 1998; Mosialos et al., 1995; Zimmer-Strobl et al., 1996*). Die einzige signifikante Homologie von LMP-1 zu den TNF-R Mitgliedern ist das PxQxT Sequenzmotiv in der CTAR-1-Domäne. Keines der anderen TNF-R Mitglieder aktiviert exakt dieselben Proteine zur Signalweiterleitung. Chimäre Proteine aus dem TNF-R Familienmitglied CD40 und LMP-1 zeigen, daß CD40 und LMP-1 induzierte Signalwege teil-

weise übereinstimmend sind (*Gires et al., 1997; Hatzivassiliou et al., 1998*), jedoch signalisiert LMP-1 im Gegensatz zu CD40 über TRADD (TNF-R associated Death Domain; *Izumi und Kieff, 1997; Kieser et al., 1999*). An die intrazellulären Bereiche von LMP-1 und CD40 binden größtenteils überlappende Proteine und induzieren dadurch gleiche Transkriptionsfaktoren. LMP-1 kann CD40 bis zu einem gewissen Grad während der B-Zell-Differenzierung ersetzen (*Uchida et al., 1999*). Dabei induziert LMP-1 ebenso wie CD40 Immunglobulin-Klassenwechsel, unterstützt jedoch nicht die Antikörperreifung und die Bildung von Keimzentren, sondern verhindert diese sogar.

2.7 LMP-1 Signalwege und Zielgene

LMP-1 enthält in seinem intrazellulären Teil unter anderem die funktionellen Domänen CTAR-1, CTAR-2 und CTAR-3 (Abb. 3). Die CTAR-1-Region ist am proximalen Ende der Transmembrandomäne im intrazellulären C-Terminus lokalisiert (AS 185-231). Die CTAR-2-Region befindet sich in den letzten 55 C-terminalen Aminosäuren (zwischen AS 331 und 386). Die Deletion der CTAR-1-Region führt zum vollständigen Verlust der Transformationsfähigkeit von EBV in primären B-Zellen, während das Eliminieren der CTAR-2-Region auf die initiale Transformationsfähigkeit keinen Einfluß zeigt, sehr wohl jedoch auf Virustiter und Langzeitwachstumsverhalten (*Übersicht bei Kieff und Rickinson, 2001*). Welche Funktion die zwischen CTAR-1 und CTAR-2 befindliche CTAR-3-Domäne besitzt, ist bislang unklar. Eine LMP-1 Deletionsmutante ohne CTAR-3 zeigt keine Beeinträchtigung in der LMP-1 Transformationsfähigkeit (*Izumi et al., 1999*).

CTAR-1 kann mit TRAF-1, -2, -3 und -5 über sein PxQxT Motiv interagieren (*Brodeur et al., 1997; Devergne et al., 1996, 1998; Mosialos et al., 1995; Sandberg et al., 1997*). Dieses Sequenzmotiv stellt die einzige signifikante Homologie von LMP-1 zu den Mitgliedern der TNF-R Superfamilie dar (CD30, CD40, TNF-R2). Bislang wurden vier verschiedene Signalwege von LMP-1 beschrieben (Abb. 4). Zwei wichtige Signalwege von LMP-1 beziehen die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF- κ B und Jun/Fos ein (*Eliopoulos und Young, 1998; Hammarskjöld und Simurda, 1992; Hatzivassiliou et al., 1998; Huen et al., 1995; Kieser et al., 1997; Mitchell und Sugden, 1995*). Das Rekrutieren von TRAF-2 zur CTAR-1- und CTAR-2-Domäne von LMP-1 setzt eine Signalkaskade zur Aktivierung von NF- κ B in Gang. NF- κ B wird zu 20-30% über die CTAR-1-Domäne und zu 70-80% über die CTAR-2-Domäne aktiviert (*Huen et al., 1995; Mitchell und Sugden, 1995*). Nach Rekrutieren von TRAF-2 bindet das Protein an TRAF-6 (*Schultheiss et al., 2001*). TRAF-6 aktiviert wahrscheinlich

NIK (NF- κ B inducing kinase), die mit IKK α und IKK β (Inhibitor of κ B kinase) im Komplex vorliegt und diese daraufhin phosphoryliert. Im nächsten Schritt wird das Protein I- κ B (*Haskill et al., 1991; Henkel et al., 1992*), das im Zytoplasma im Komplex mit NF- κ B vorliegt, an den Serin-Resten (Ser-32, -36) phosphoryliert. Dies stellt ein Signal für die Degradation von I- κ B dar, es wird ubiquitinyliert und im Proteasom abgebaut. Zusätzlich zu diesen komplexen Schritten wird NF- κ B (bestehend aus einer p50 und p65 Untereinheit) phosphoryliert und erfährt eine Konformationsänderung. Durch die Degradation von I- κ B wird die NLS-Sequenz von NF- κ B frei und NF- κ B wird in den Zellkern transportiert, wo es seine Zielgene aktiviert (Abb. 4; *Übersicht bei Schmitz et al., 2001*). Eine wesentliche Aufgabe von NF- κ B ist, Zellen vor Apoptose zu schützen (*Asso-Bonet et al., 1998; Cahir-McFarland et al., 2000; Feuillard et al., 2000*).

Die CTAR-2-Domäne ist absolut notwendig für die Aktivierung des „c-Jun N-terminal kinase 1 (JNK1)/activator protein 1“ (AP1), die unabhängig von TRAF-2 abzulaufen scheint (*Kieser et al., 1997; 1999*). Gene mit AP-1 Bindestellen binden Komplexe von Mitgliedern der Fos- und Jun-Familie und ihre Aktivierung führt zur Induktion mitogener Signale.

Abzweigend von der Signalkaskade zur NF- κ B- und Jun/Fos-Aktivierung ist LMP-1 über TRAF-2 auch in der Lage, die Streß-aktivierte Kinase p38-MAPK zu phosphorylieren und damit den Transkriptionsfaktor ATF-2 zu aktivieren (Abb. 4; *Eliopoulos et al., 1999*). Die LMP-1 vermittelte Aktivierung von p38-MAPK führt zur Expression von Cytokinen wie IL-6 und IL-8 (*Eliopoulos et al., 1999; Vockerodt et al., 2001a*).

Eine weitere Aktivierungsdomäne befindet sich zwischen CTAR-1 und CTAR-2 und wird als CTAR-3- oder CCTRR- (cytoplasmic carboxyl terminal repeat region) Region bezeichnet. Diese Domäne ist für die Aktivierung des JAK/STAT Signalweges über JAK3 verantwortlich (*Gires et al., 1999*).

LMP-1 aktiviert verschiedene zelluläre Gene wie die Aktivierungs- und Adhäsionsmoleküle CD23, CD39, CD40, CD54 und CD58 (*Wang et al., 1988, 1990*). Ebenso induziert LMP-1 die Expression von MHC-Klasse-I und -II (*Cuomo et al., 1990; de Campos-Lima et al., 1993; Rowe et al., 1995*) und anti-apoptotischen Genen wie Bcl2, Bfl-1, Mcl-1 und das Zinkfingerprotein A20 (*D'Souza et al., 2000; Henderson et al., 1991; Laherty et al., 1992; Wang et al., 1996*). LMP-1 besitzt auch die Möglichkeit, diverse zelluläre Gene abzuschalten, dazu gehören das physiologisch an der Keimzentrumsausbildung beteiligte Gen Bcl-6 (*Carbone et al., 1998*) und das Seneszenz-induzierende Gen p16INK4 (*Yang et al., 2000*). In epithelialen Zellen induziert LMP-1 die Expression der Metalloproteinase MMP-9 (*Takeshita et al., 1999; Yoshizaki et al., 1999*) und des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors EGF-R (*Miller et al.,*

1995, 1997). Die LMP-1 Zielgene machen deutlich, daß LMP-1 eine zentrale Rolle in der B-Zellaktivierung durch EBV einnimmt.

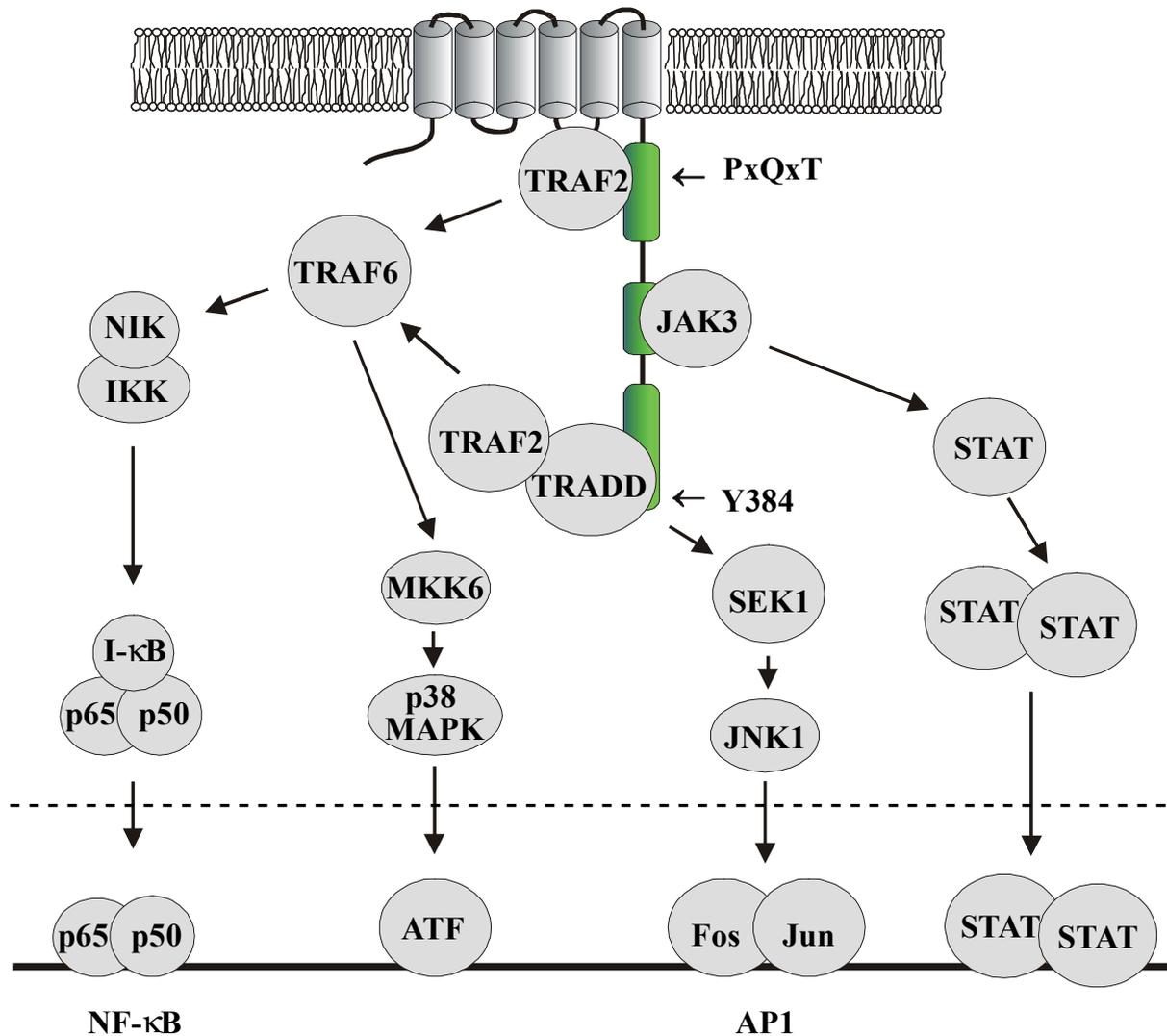


Abbildung 4: Schematische Darstellung der LMP-1 Signalwege

Bislang konnten vier verschiedene Signalwege definiert werden, über die LMP-1 seine Zielgene aktiviert. Die benutzten Signalwege sind teilweise mit Mitgliedern der TNF-R Familie überlappend. LMP-1 aktiviert NF-κB, ATF, AP-1 und STAT Transkriptionsfaktoren, die zur transkriptionellen Aktivierung von Genen mit diesen Transkriptionsfaktorbindestellen führen können. Die durchgezogene Linie stellt schematisch die DNA und die gestrichelte Linie die Kernmembran schematisch dar.

Mit dem ER/EB2-5 Zellsystem kann der Schritt der B-Zellaktivierung rekonstruiert werden. Diese Rekonstruktion ist nicht nur von Interesse für die *in vivo* Situation, der Induktion einer anti-viralen Immunantwort, sondern auch im Hinblick auf mögliche Anwendungen in der Medizin. EBV-immortalisierte Zellen eignen sich auch zur Induktion einer Immunantwort gegen beliebige Antigene, die in den Zellen exprimiert werden. Im ER/EB2-5 System werden

durch Zugabe von Hormon nicht nur die viralen Gene induziert, sondern auch zelluläre Gene, die für die Induktion einer Immunantwort verantwortlich sind wie Adhäsionsmoleküle, co-stimulatorische Moleküle, induzierbare Komponenten des Proteasoms und der Transporter, die Peptide in das endoplasmatische Retikulum zur Beladung von MHC-Molekülen transportieren. Die Antigen-präsentierenden Eigenschaften von EBV-immortalisierten Zellen sind damit von allgemeinem Interesse für die Immunologie. Unter den zellulären Genen, die in ER/EB2-5 Zellen durch Hormon induziert werden, wurde im Rahmen dieser Arbeit auch das CD83-Gen identifiziert. Da CD83 als Reifungsmarker für dendritische Zellen angesehen und ihm eine wichtige Rolle in der Immunantwort zugeschrieben wird, konzentrierte sich das Interesse dieser Arbeit auf das CD83-Molekül.

2.8 CD83

Das CD83-Gen ist auf dem kurzen Arm von Chromosom 6 Bande p23 lokalisiert (Abb. 5; *Berchtold et al., 1999a; Twist et al., 1998*). CD83 ist ein 205 Aminosäuren großes Glykoprotein mit einem apparenten Molekulargewicht von 40-45kD. Aufgrund seiner Struktur wurde CD83 der Immunglobulin-Superfamilie zugeordnet. Das Protein besteht aus einem Signalpeptid, gefolgt von einer V-Typ Immunglobulin-ähnlichen extrazellulären Domäne, einer Transmembrandomäne und einem 39 Aminosäuren intrazellulären C-Terminus (Abb. 5, *Zhou et al., 1992*). Durch Abspaltung des Signalpeptids entsteht ein 186 Aminosäuren großes Protein. Es sind keine weiteren Proteine mit starker Ähnlichkeit zu CD83 bekannt. Zusätzlich befinden sich in der intrazellulären Domäne 5 Ser/Thr-Reste, die möglicherweise bei der Phosphorylierung und Signalübertragung eine Rolle spielen könnten.

CD83 wurde erstmals beim Screening einer cDNA Bank aus humanen Tonsillen durch differentielle Hybridisierung radioaktiv markierter cDNA der Burkitt-Lymphom Zelllinie Raji und der T-Zelllinie H-SB2 identifiziert (*Zhou et al., 1992*) und unabhängig davon durch subtraktive Klonierung einer cDNA Bank von durch *Staphylococcus aureus* Cowan (SAC) aktivierten B-Lymphozyten mit einer B-T subtrahierten B-Zell-spezifischen cDNA-Probe gefunden (*Kozlow et al., 1993*). Das CD83-Gen kodiert für drei verschiedene mRNA Spezies von ~1,7; ~2,0 und ~2,5kB Länge (*Zhou et al., 1992*). Weiterhin wurde gezeigt, daß CD83 vor allem im Gehirn und in der Lunge exprimiert wird (*Kozlow et al., 1993*).

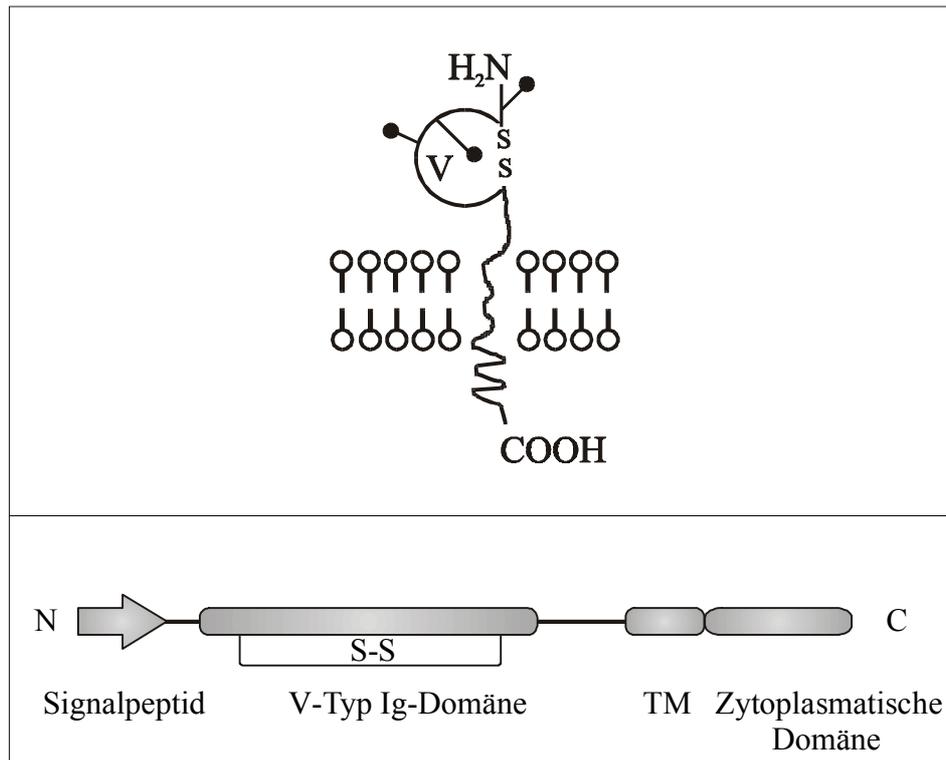


Abbildung 5: Schematische Darstellung von CD83

CD83 besteht aus einer V-Typ Immunglobulin-ähnlichen extrazellulären Domäne, einem Transmembran-Durchgang und einer 39 AS langen intrazellulären Domäne. CD83 ist stark glykosyliert. Die obere Abbildung wurde dem Buch *Leucocyte Typing VI*, 1996 entnommen und teilweise abgeändert.

CD83 stellt einen Oberflächenmarker für reife nicht folliculäre dendritische Zellen dar, zu denen auch interdigitierende Retikulum-Zellen in lymphoiden Geweben, Langerhans'sche Zellen der Haut und dendritische Zellen im Thymus gezählt werden. Außerdem wird CD83 auch in aktivierten B- und T-Lymphozyten sowie auf Hodgkin-Zellen exprimiert (*Sorg et al., 1997; Zhou et al., 1992*). Monozyten des Blutes, Gewebemakrophagen, Cytokin-aktivierte Monozyten, zirkulierende Leukozyten oder NK-Zellen (*Natural Killer cells*) exprimieren CD83 nicht auf ihrer Oberfläche (*Zhou und Tedder, 1995, 1996*). CD83 kann auf peripheren, nicht aktivierten B-Lymphozyten durch Stimulation mit Interleukin 4 (IL-4) oder CD40-Ligand (CD40L) induziert werden. Ebenso ist dies in geringerer Weise auf T-Lymphozyten durch Behandlung mit immobilisiertem anti-CD3 monoklonalem Antikörper oder einer Kombination von PMA (Phorbolmyristataacetat) und Ionomycin, bzw. stärker mit PHA (Phytohämagglutinin) und PMA möglich (*Armitage et al., 1996*). Auf Monozyten, Granulozyten-Vorläuferzellen, Metamyelozyten und Myelozyten kann die CD83-Expression durch Zugabe von hohen Dosen an IL-4, GM-CSF, und TNF- α induziert werden (*Oehler et al, 1998; Zhou und Tedder, 1996*). Kürzlich wurde gezeigt, daß CD83 auch auf der Mehrzahl der mit GM-

CSF und IFN- γ aktivierten polymorphkernigen Neutrophilen (polymorphonuclear neutrophils, PMN) exprimiert ist (*Iking-Konert et al., 2001; Yamashiro et al., 2000*).

Ebenso wie für andere co-stimulatorische Moleküle konnte CD83 in löslicher Form im Überstand aktivierter B- und T-Lymphozyten sowie dendritischer Zellen nachgewiesen werden (*Armitage et al., 1996; Hock et al., 2001*).

Durch S1-Nuklease-Mapping und Primer-Extension-Experimente wurde der Promotor von CD83 identifiziert. Der putative Promotor enthält keine klar definierte TATA-Box, jedoch befindet sich 30bp oberhalb vom Transkriptionsstart eine CATAAAA-Sequenz, die einer TATA-Box sehr nahe kommt. (*Kozlow et al., 1993; McKinsey et al., 2000; Berchtold et al., 2002*). Bekannte cis-Elemente sind eine putative NF- κ B-Bindestelle, die zwischen den Basenpaaren -73 und -62 lokalisiert ist sowie 4 SP1 Bindestellen, die sich in den ersten 220bp vor der Transkriptionsstartstelle befinden (*Berchtold et al., 2002*).

Eine genaue Funktion konnte bislang weder dem extrazellulären noch dem intrazellulären Teil von CD83 zugeordnet werden. Aufgrund der starken Hochregulation auf Antigen-präsentierenden Zellen nach Stimulation wird postuliert, daß CD83 eine Rolle in der Antigen-Präsentation spielt oder zelluläre Interaktionen moduliert, die der Lymphozytenaktivierung folgen (*Zhou et al., 1992*). Das CD83 der Maus zeigt eine 63%-ige Homologie zum menschlichen CD83 (*Kozlow et al., 1993; Twist et al., 1998; Zhou et al., 1992*). Die größte Ähnlichkeit befindet sich in der Transmembrandomäne und im intrazellulären Teil des Proteins.

2.9 Fragestellung der Arbeit

Auf der Suche nach EBNA-2 Zielgenen wurde zu Beginn dieser Arbeit CD83 als ein zelluläres Gen identifiziert, das durch Hormonzugabe in ER/EB2-5 Zellen induziert wird. Von Zhou und Tedder war beschrieben, daß CD83 in der BL-Zelllinie Raji deutlich und in den BL-Linien Daudi und Namalwa abgeschwächt exprimiert ist (*Zhou et al., 1992*). Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Mechanismus der Regulation des CD83-Gens durch EBV untersucht. Ein weiterer zentraler Aspekt war die Analyse der Funktion von CD83 bezüglich der Induktion einer Immunantwort. Dies schloß die Untersuchung einer möglichen co-stimulatorischen Funktion von CD83 für T-Zellen sowie die Suche nach einem potentiellen Liganden für dieses Membranprotein ein.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der CD83-Expression in ER/EB Zellen

3.1.1 CD83-Expression in ER/EB2-5 Zellen nach Induktion mit Östrogen

Der Ausgangspunkt dieser Arbeit war die Untersuchung zur CD83-Expression in ER/EB2-5 Zellen. Diese lymphoblastoide Zelllinie enthält ein Fusionsgen, das aus der Hormonbindedomäne des Östrogenrezeptors und EBNA-2 besteht. Dadurch kann das ER/EBNA2 Fusionsprotein konditional durch Östrogen reguliert werden (*Kempkes et al., 1995b, 1996*). Das Fusionsprotein verhält sich in den ER/EB2-5 Zellen ähnlich einem Steroidhormonrezeptor. In Gegenwart von Östrogen befindet es sich im Zellkern und aktiviert wie Wildtyp EBNA-2 seine Zielgene. In Abwesenheit von Östrogen dagegen transloziert das Fusionsprotein in das Zytoplasma und verliert seine Funktion. Aufgrund der Inaktivierung des ER/EBNA-2 Fusionsproteins kommt es in den Östrogen-depletierten ER/EB2-5 Zellen zu einem Proliferationsarrest. Bei erneuter Zugabe von Östrogen zeigen die ER/EB2-5 Zellen eine synchrone Vorbereitung auf die nächste Zellteilung und beginnen wieder zu proliferieren. Aus diesem Grund läßt sich sehr einheitlich die Kinetik der An- und Abschaltung der durch EBNA-2 beeinflussten Gene untersuchen.

Zur Analyse der CD83-Expression wurden ER/EB2-5 Zellen durch dreimaliges Waschen von Östrogen befreit, 4 Tage ohne Östrogen kultiviert und dann mit Östrogen induziert. Die Zellen wurden in einer Kinetik von 30 Minuten bis zu 2 Tagen sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene untersucht. Das Verhalten der ER/EB2-5 Zellen nach Östrogenentzug wurde jeweils durch MTT-Assays kontrolliert (Daten nicht gezeigt).

Die mRNA von CD83 ist 4 Tage nach Östrogenentzug vollständig abgebaut, bereits 2 Stunden nach Zugabe von Östrogen kann die mRNA im Northern Blot detektiert werden. Nach 6 Stunden ist eine maximale Expression erkennbar und in einem Zeitraum von 12 bis 18 Stunden wird die mRNA von CD83 auf eine Menge reduziert, die der in proliferierenden ER/EB2-5 Zellen entspricht. Gleichzeitig treten zwei weitere alternative CD83 mRNA Varianten auf, die ähnlich reguliert werden (Abb. 6a). Durch FACS™-Analyse konnte gezeigt werden, daß nach nur 6 Stunden die Hälfte der Zellen für die Oberflächenexpression von CD83 positiv war und nach 20 Stunden alle Zellen CD83 auf ihrer Oberfläche exprimierten (Abb. 6b).

In ER/EB2-5 Zellen konnte somit zum ersten Mal gezeigt werden, daß CD83 in Abhängigkeit von EBNA-2 exprimiert und die CD83 mRNA sehr stark reguliert wird. Eine solche Induktionskinetik wurde für EBNA-2 Zielgene bisher nicht beschrieben. Ein ähnliches Expressionsmuster konnte auch in den Zelllinien ER/EB2-1 und ER/EB2-8 beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

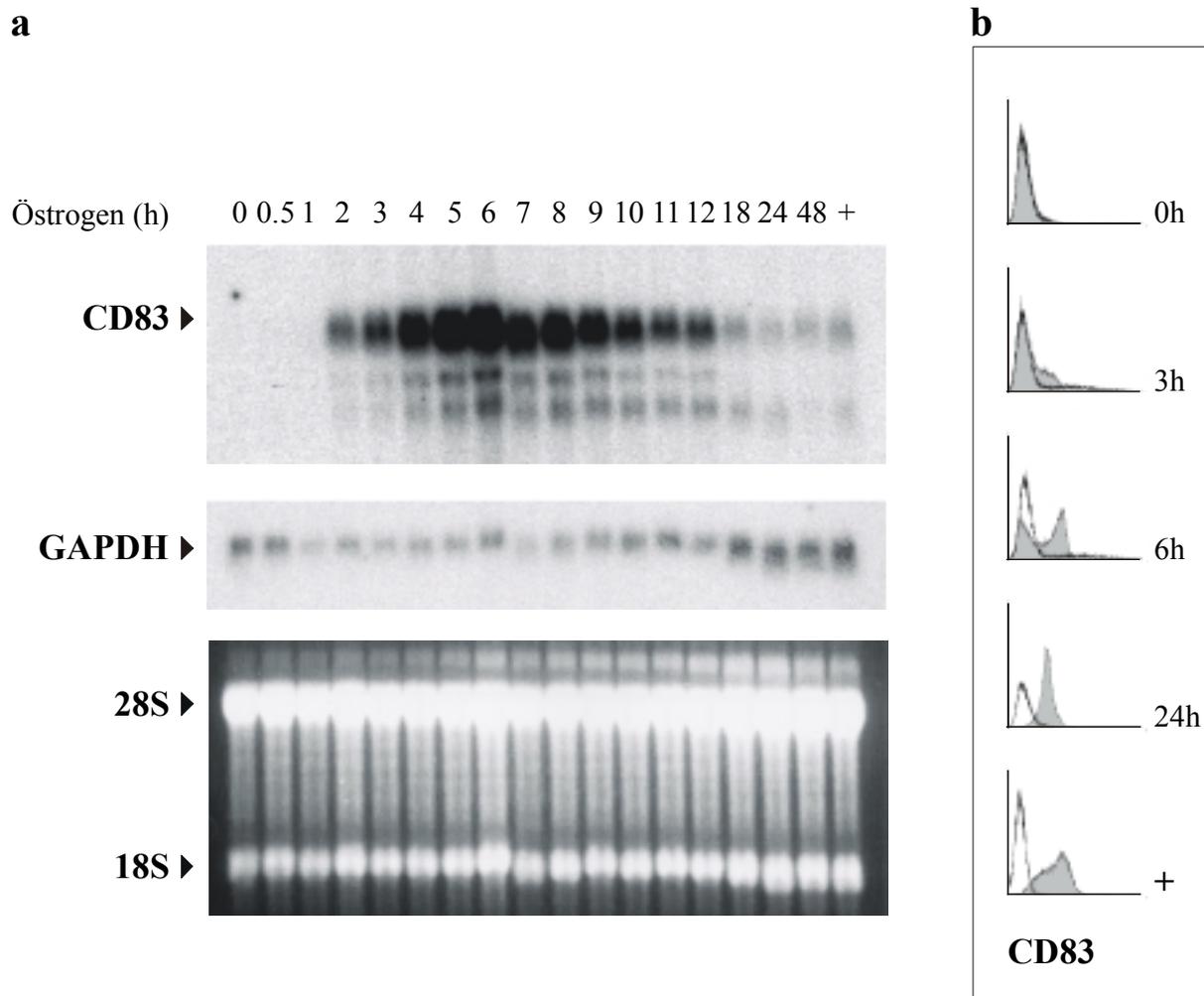


Abbildung 6: Expressionskinetik von CD83 in ER/EB2-5 Zellen

ER/EB2-5 Zellen wurden für 4 Tage ohne Östrogen kultiviert. Anschließend wurde Östrogen für 30min, 1-12, 18, 24 und 48h (a) bzw. 3, 6 und 24h (b) zugegeben, die Zellen geerntet und durch Northern-Blot Analyse auf CD83 RNA-Expression (a) sowie durch FACS™-Analyse auf CD83-Oberflächenexpression (b) untersucht. Als Nullwert dienten ER/EB2-5 Zellen, die nicht re-induziert wurden (0h), als Kontrolle wurden in Östrogen kultivierte ER/EB2-5 Zellen (+) verwendet.

- a) Jeweils 10µg Gesamt-RNA wurden pro Spur auf einem 1%-igen Formaldehyd-Agarose-Gel aufgetragen, elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nylonmembran (Hybond-N⁺) geblottet. Die Detektion erfolgte mit einer radioaktiv-markierten CD83-Sonde. Als Kontrolle wurde der gleiche Northern-Blot mit einer GAPDH-Sonde hybridisiert. Ganz unten dargestellt ist die Beladungskontrolle des mit EtBr-gefärbten Agarose-Gels.
- b) Jeweils 2×10^5 ER/EB2-5 Zellen wurden mit einem anti-CD83-Antikörper (grau, gefüllt), bzw. mit einer Isotypkontrolle (ungefüllt) für 30min auf Eis inkubiert, anschließend der überschüssige Antikörper durch Waschen entfernt und für weitere 20min mit einem DTAF-gekoppelten Sekundäntikörper gefärbt. Dargestellt sind jeweils 2×10^4 als lebend definierte Zellen im Histogramm.

3.1.2 CD83 ist ein indirektes Zielgen von EBNA-2

Mit Hilfe der ER/EB Zelllinie kann geklärt werden, ob Zielgene direkt oder indirekt von EBNA-2 reguliert werden. Dies ist möglich, da EBNA-2 während des 4-tägigen Östrogenzugs stabil im Zytoplasma als Fusionsprotein mit der Östrogenbindedomäne erhalten bleibt.

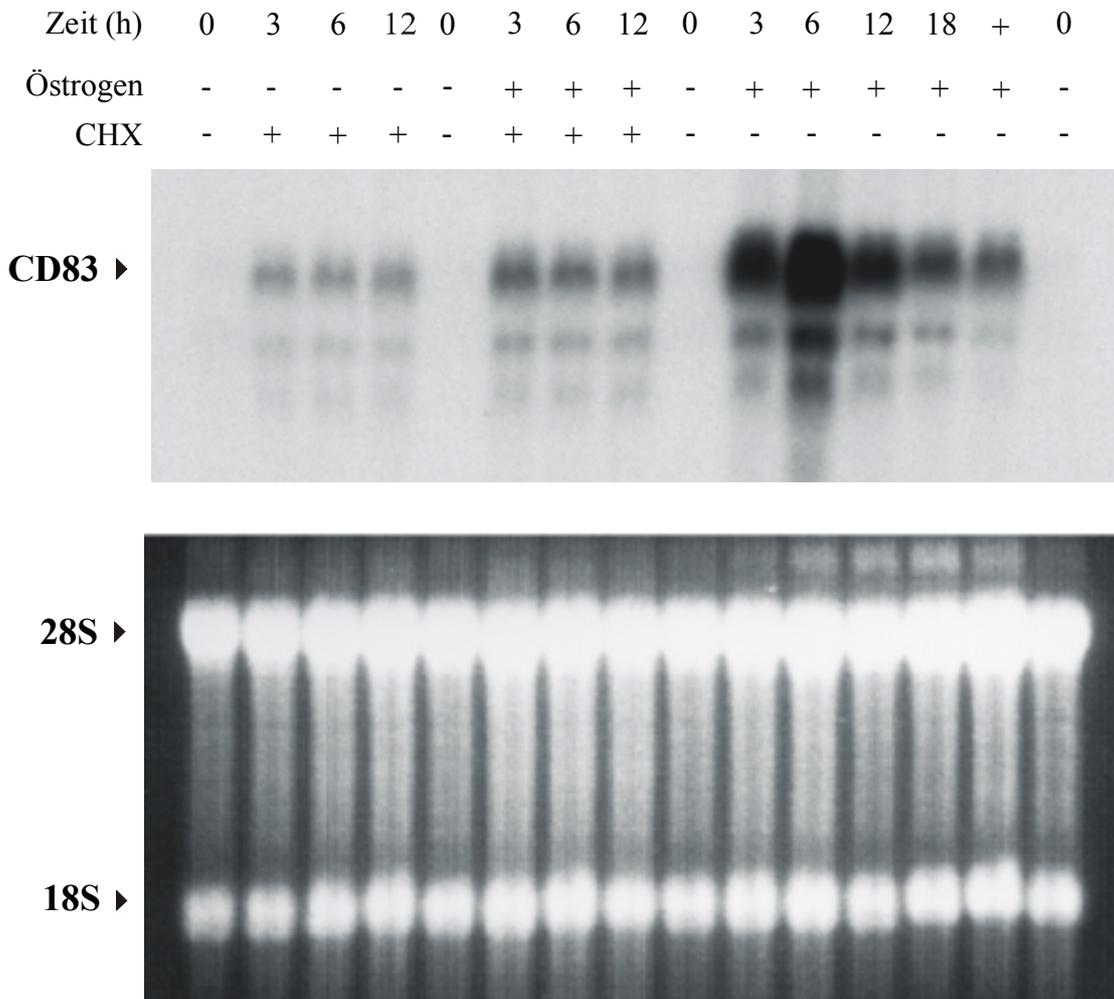


Abbildung 7: CD83 ist kein direkt-aktiviertes Zielgen von EBNA-2

ER/EB2-5 Zellen wurden für 4 Tage ohne Östrogen kultiviert. Anschließend wurde Cycloheximid, Cycloheximid und Östrogen oder Östrogen allein zugegeben. Die Zugabe von 50µg/ml CHX erfolgte eine Stunde vor der Zugabe von Östrogen (0,2µM). Anschließend wurden die Zellen geerntet und Gesamt-RNA isoliert. Als Nullwert dienten ER/EB2-5 Zellen, die nicht re-induziert wurden (0h). Als Kontrolle wurden proliferierende Zellen eingesetzt (+). Jeweils 10µg Gesamt-RNA wurden pro Spur auf einem 1%-igen Formaldehyd-Agarose-Gel aufgetragen, elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nylonmembran (Hybond-N⁺) geblottet. Anschließend wurde die Membran mit einer radioaktiv-markierten CD83-Sonde hybridisiert. Unten dargestellt ist die Beladungskontrolle des mit EtBr-gefärbten Agarose-Gels.

Durch Zugabe von Östrogen wandert das ER/EBNA-2 Fusionsprotein in den Zellkern und aktiviert seine Zielgene. Bei gleichzeitiger Inhibition der Proteinbiosynthese durch Cyclohexi-

mid-Behandlung wird nur die Transkription von direkten Zielgenen von EBNA-2 induziert (*Kaiser et al., 1999a,b; Kempkes et al., 1995b, 1996*).

Ein Nachteil bei der Verwendung von Cycloheximid zur Blockade der Proteinbiosynthese ist seine stabilisierende Wirkung auf zelluläre RNAs, was zu einer Cycloheximid-abhängigen Zunahme der entsprechenden RNA führen kann. Um zu untersuchen, ob es sich im Falle von CD83 um ein direktes Zielgen von EBNA-2 handelt, wurden Östrogen-depletierte ER/EB2-5 Zellen mit Cycloheximid allein, mit Cycloheximid und Östrogen sowie mit Östrogen allein behandelt. Nach 0, 3, 6 und 12 Stunden wurden die Zellen geerntet und Gesamt-RNA gewonnen. Die CD83-Expression wurde mit Hilfe eines Northern-Blots analysiert.

Durch die Cycloheximid-Behandlung kam es zu einer Stabilisierung der CD83 RNA, die bei gleichzeitiger Zugabe von Östrogen um das 2-5-fache verstärkt wurde. Eine wesentlich stärkere Induktion der CD83 RNA wurde jedoch nach Behandlung der Zellen mit Östrogen allein beobachtet (Abb. 7). CD83 wird somit transkriptionell in erster Linie durch EBNA-2 Zielgene und nur zum geringen Teil durch EBNA-2 selbst induziert.

3.1.3 Die Regulation der CD83-Expression erfolgt sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene

In einer weiteren Kinetik wurde die Stabilität von CD83 auf RNA- und Proteinebene nach Entzug von Östrogen in ER/EB2-5 Zellen untersucht. Proliferierenden ER/EB2-5 Zellen wurde durch dreimaliges Waschen Östrogen entzogen und Gesamt-RNAs nach 6, 24, 48, 72 und 96 Stunden isoliert. Parallel wurde die CD83-Oberflächenexpression im FACS untersucht. Bereits 24 Stunden nach Östrogenentzug konnte kaum noch CD83 RNA nachgewiesen werden (Abb. 8a). Ebenso war CD83 auf Proteinebene nach 48 Stunden nicht mehr auf der Oberfläche detektierbar (Abb. 8b), wohingegen die MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression (HLA A,B,C) weitgehend unbeeinflusst von EBNA-2 erschien (Abb. 8c). Auch die Fraktionierung der ER/EB2-5 Zellen in die einzelnen Zellkomponenten Plasmamembran/Kern, Endosomen/Lysosomen, Mikrosomen und Zytoplasma zeigte, daß CD83 als Protein nicht nur von der Oberfläche verschwand, sondern nach 4-tägigem Östrogenentzug vollständig degradiert wurde, während dies für Kontrollproteine wie Lamp-1, HLA A,B,C oder CD86 nicht der Fall war (Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassend läßt sich festhalten, daß in ER/EB2-5 Zellen eine rasche An- und Abschaltung der CD83-Expression sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene erfolgt.

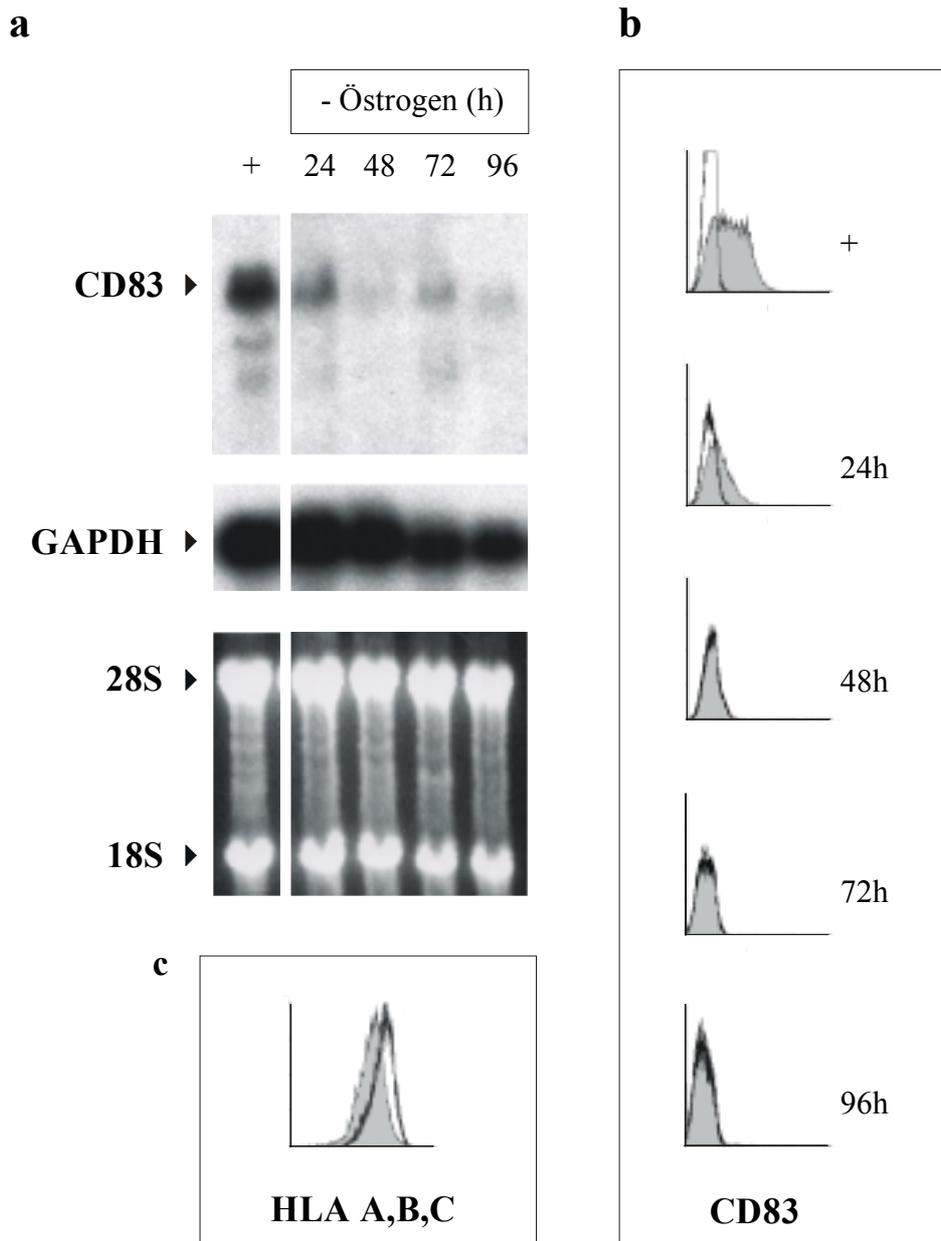


Abbildung 8: Abschaltung der CD83-Expression nach Östrogenentzug in ER/EB2-5 Zellen

ER/EB2-5 Zellen wurden gewaschen, in Östrogen-freiem Medium aufgenommen und die CD83-Expression im Northern-Blot (a), bzw. in der FACST[™]-Analyse (b) nach 24, 48, 72 und 96h untersucht. Der Nullwert entspricht ER/EB2-5 Zellen 96h nach Östrogendepletion. Als Kontrolle wurden proliferierende Zellen eingesetzt (+).

- a) Jeweils 10µg Gesamt-RNA wurden pro Spur auf einem 1%-igen Formaldehyd-Agarose-Gel aufgetragen, elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nylonmembran (Hybond-N⁺) geblottet und anschließend mit einer humanen, radioaktiv-markierten CD83-Sonde hybridisiert. Als Kontrolle wurde der gleiche Northern-Blot mit einer GAPDH-Sonde hybridisiert. Ganz unten dargestellt ist die Beladungskontrolle des mit EtBr-gefärbten Agarose-Gels.
- b) Jeweils 2x10⁵ ER/EB2-5 Zellen wurden mit einem anti-CD83-PE Antikörper (grau, gefüllt), bzw. mit einer Isotypkontrolle (ungefüllt) für 30min auf Eis inkubiert und anschließend der überschüssige Antikörper durch Waschen entfernt. Dargestellt sind jeweils 2x10⁴ als lebend definierte Zellen im Histogramm.
- c) Wie b), jedoch Färbung mit einem FITC-markierten anti-HLA A,B,C Antikörper.

3.2 Charakterisierung der CD83-Expression in verschiedenen Zelllinien

Die vorangegangenen Experimente legten eine Regulation der CD83-Expression durch EBV nahe. Um dies zu bestätigen, wurden verschiedene EBV-negative sowie EBV-positive Burkitt Lymphom Zellen der Typ I und III Latenz auf ihre CD83-Expression untersucht.

3.2.1 CD83-Expression in BL41 Zellen sowie in P3HR1 und B95-8 Virus infizierten BL41 Zellen

Um zu überprüfen, welchen Einfluß EBV auf die CD83-Expression besitzt, wurde diese in dem sogenannten BL41-Triplett untersucht, das aus BL41 Zellen sowie BL41 Zellen, die nachträglich mit dem EBNA-2 defizienten, transformationsdefekten P3HR1 oder dem EBNA-2 tragenden, transformationskompetenten Wildtyp B95-8 EBV-Stamm infiziert worden waren (*Lenoir et al., 1985; Calender et al., 1987*).

BL41, BL41-P3HR1 und BL41-B95-8 Zellen wurden mit Hilfe von FACSTM- und Northern-Blot Analyse auf CD83-Expression untersucht. In Abbildung 9 ist zu erkennen, daß CD83 in BL41 Zellen relativ schwach exprimiert wird. Während die EBNA-2 defizienten BL41-P3HR1 Zellen eine leicht verstärkte Expression zeigen, ist in BL41-B95-8 Zellen die Expression von CD83 deutlich erhöht. Dies bestätigt, daß CD83 durch EBNA-2 indirekt reguliert wird (Abb. 9a, b).

Das gleiche Muster der CD83-Expression zeigte sich auch in EBV-positiven BL-Linien mit Latenztyp I und III, Raji und Mutu-III (Latenz III) waren deutlich in der FACSTM- und Northern-Blot Analyse für CD83 positiv, während EBV-positive BL-Linien mit Latenz I wie Mutu-I oder Akata CD83 nicht oder kaum exprimierten (Daten nicht gezeigt).

3.3 EBNA-2 induziert CD83 über einen Notch-unabhängigen Signalweg

EBNA-2 bindet an den Transkriptionsfaktor RBP-J κ auf ähnliche Weise wie der intrazelluläre Teil des funktionellen EBNA-2 Homologes Notch (*Tamura et al., 1995*). Um zu klären, ob CD83 auch durch Notch aktiviert werden kann, wurden die Zelllinien BL41/P3HR1-Notch-ER und die Zelllinie 1414-3 auf die CD83-Expression auf RNA- und Proteinebene untersucht. In BL41/P3HR1-Notch-ER Zellen ist Notch mit der Hormonbindedomäne des Östrogenrezeptors fusioniert, so daß die Funktion von Notch direkt durch Zugabe von Östrogen reguliert werden kann (*Höfelmayr et al., 2001*). Die Zelllinie 1414-3 ist auf Grundlage der ER/EB2-5

Zellen entstanden, in die ein Tetrazyklin-regulierbares mNotch-IC-Konstrukt stabil transfiziert wurde (mNotch-IC: intrazelluläres Notch der Maus; *Höfelmayr et al., 2001*). Somit kann in diesen Zellen die Expression von Notch und EBNA-2 Zielgenen in 4 verschiedenen Zuständen untersucht werden.

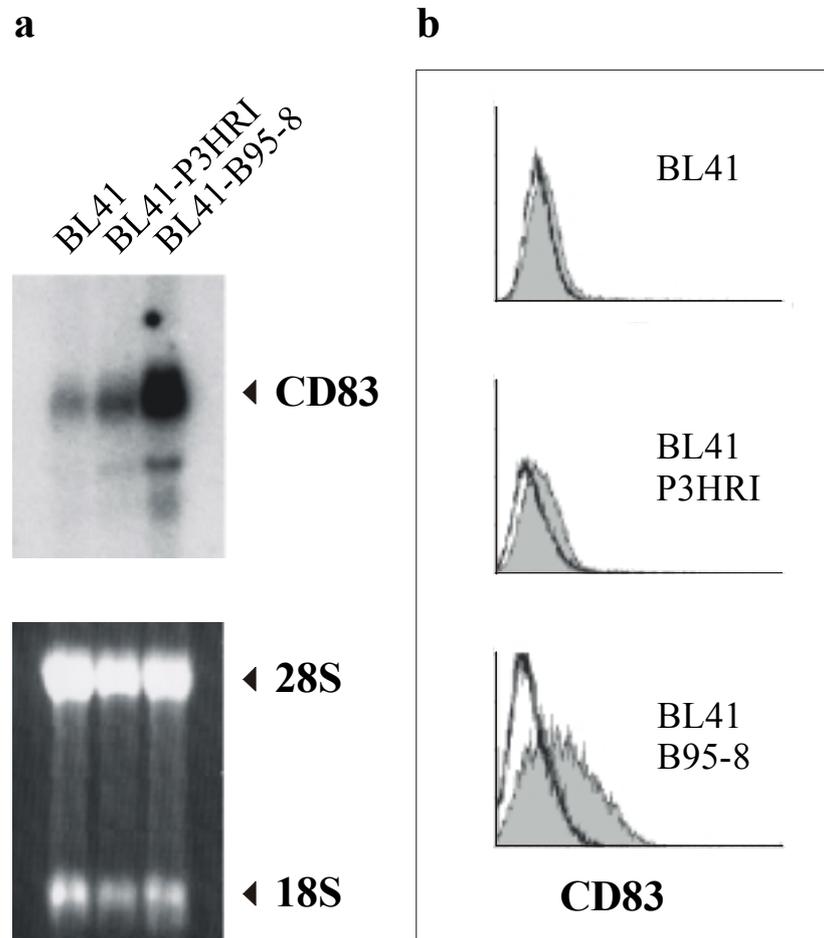


Abbildung 9: CD83 wird in BL41/B95-8 Zellen stark hochreguliert

BL41, BL41-P3HRI und BL41-B95-8 Zellen wurden geerntet und Gesamt-RNA präpariert (a) oder für die FACSTM-Analyse (b) verwendet.

- Jeweils 10 µg Gesamt-RNA wurden pro Spur auf einem 1%-igen Formaldehyd-Agarose-Gel aufgetragen, elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nylonmembran (Hybond-N⁺) geblottet und mit einer humanen, radioaktiv-markierten CD83-Sonde hybridisiert. Unten dargestellt ist die Beladungskontrolle des mit EtBr-gefärbten Agarose-Gels.
- Jeweils 2×10^5 BL41, BL41/P3HRI und BL41/B95-8 Zellen wurden mit einem anti-CD83-Antikörper (grau, gefüllt), bzw. mit einer Isotypkontrolle (ungefüllt) für 30min auf Eis inkubiert, anschließend der überschüssige Antikörper durch Waschen entfernt und für weitere 20min mit einem DTAF-gekoppelten Sekundärintikörper gefärbt. Dargestellt sind jeweils 2×10^4 als lebend definierte Zellen.

In keiner dieser Zelllinien wurde eine Aktivierung von CD83 durch Notch-IC festgestellt (Daten nicht gezeigt). Dies steht in Einklang mit der Beobachtung, daß in der mit Notch-IC

stabil transfizierten Maus-embryonalen Stammzelllinie FDCP-Mix, keine Änderung der Expression von CD83 in Abhängigkeit von Notch gefunden wurde (pers. Mitteilung T. Schroeder). CD83 wird somit in den untersuchten Zelllinien nicht durch Notch aktiviert.

3.4 EBNA-2 induziert die CD83-Expression über LMP-1

Wie aus Abbildung 7 ersichtlich, wird die Expression von CD83 durch Zielgene von EBNA-2 beeinflusst. Die am besten untersuchten Zielgene von EBNA-2 sind das virale Transmembranprotein LMP-1 und der Transkriptionsfaktor *c-myc*, deren mRNAs bereits eine Stunde nach Östrogen-Induktion nachgewiesen werden können (*Kaiser et al., 1999a; Kempkes et al., 1995b*). Um einen Hinweis darauf zu erhalten, ob CD83 durch *c-myc* oder LMP-1 reguliert wird, wurden zwei von ER/EB2-5 abgeleitete Zelllinien untersucht, die stabil mit *c-myc* oder LMP-1 transfiziert worden waren. Die *c-myc* transfizierte Linie wird als P493-6 (*Pajic et al., 2000*) und die LMP-1 transfizierte Linie als 1194-3 (*Zimber-Strobl et al., 1996*) bezeichnet.

3.4.1 CD83-Expression in der P493-6 Zelllinie

Das Proto-Onkogen *c-myc* spielt eine Schlüsselrolle in der Regulation der Proliferation, Differenzierung und Apoptose (*Henriksson und Lüscher, 1996*) sowie des Zellwachstums (*Schuhmacher et al., 1999*). *c-myc* ein direktes Zielgen von EBNA-2 (*Kaiser et al., 1999*).

Die Frage, ob CD83 durch *c-myc* reguliert wird, wurde mit Hilfe der P493-6 Zelllinie untersucht. Die P493-6 Zelllinie ist durch stabile Transfektion der ER/EB2-5 Zelllinie mit dem Expressionskonstrukt *pmyc-tet* entstanden. Auf diesem Konstrukt befindet sich *c-myc* unter der Kontrolle des Tetrazyklin-regulierten Promotors TP-tetO7. Gleichzeitig wird von diesem Plasmid auch der Tet-O7 spezifische Transaktivator tTA (*Gossen und Bujard, 1992*) konstitutiv exprimiert. Die Aktivierung des Promotors kann durch Zugabe von Tetrazyklin unterbunden werden. Die Zugabe von Tetrazyklin induziert eine Konformationsänderung des Transaktivators, der sich von der DNA löst (*Pajic et al., 2000; Polack et al., 1996*). Durch die Überexpression von *c-myc* ist die P493-6 Zelllinie in der Lage, auch ohne EBNA-2 zu proliferieren.

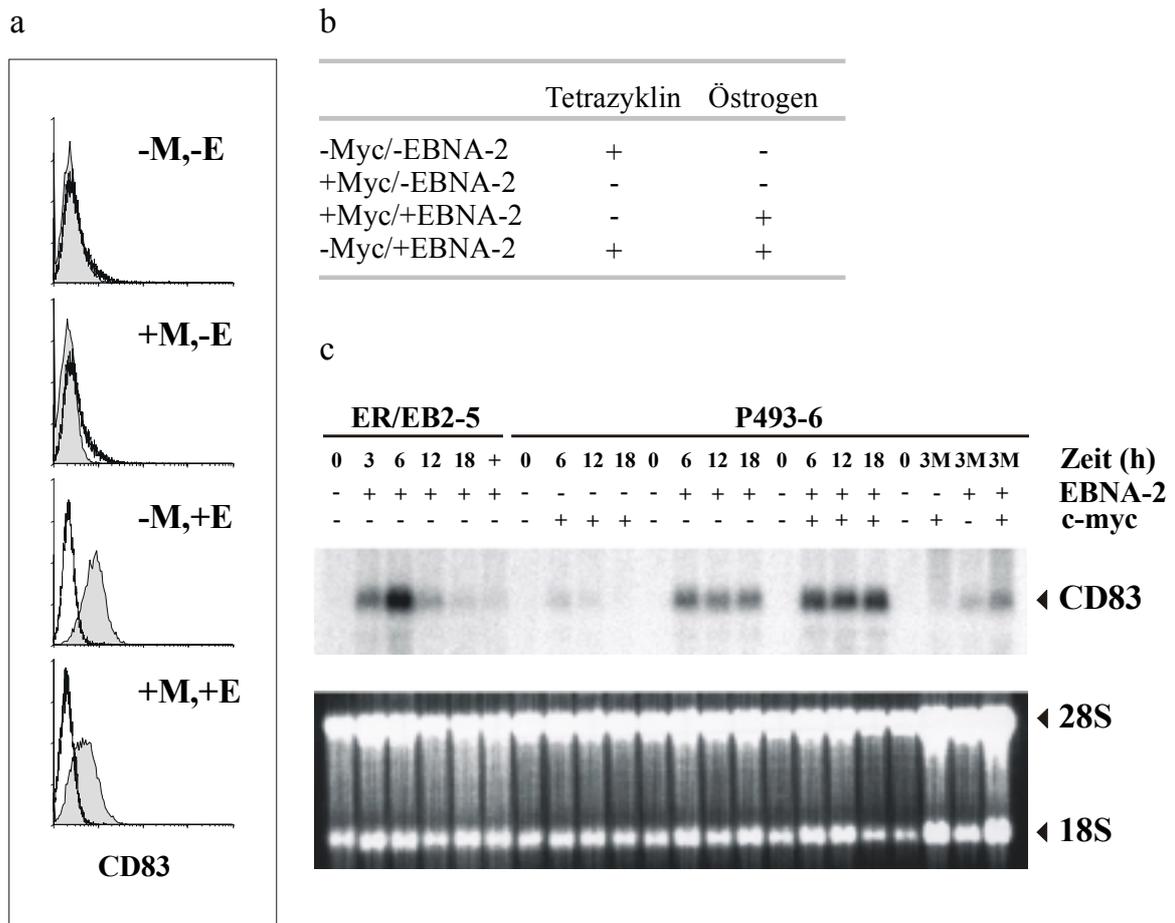


Abbildung 10: CD83 ist kein *c-myc* Zielgen

Unter *c-myc* proliferierende P493-6 Zellen wurden durch Zugabe von Tetrazyklin in ihrer Proliferation arretiert. Nach 4 Tagen Proliferationsarrest wurde der Proliferationsblock durch Auswaschen von Tetrazyklin (+Myc/-EBNA-2), durch Zugabe von Östrogen (-Myc/+EBNA-2) oder durch gleichzeitiges Auswaschen von Tetrazyklin und Zugabe von Östrogen (+Myc/+EBNA-2) aufgehoben. Als Nullwert dienen P493-6 Zellen, denen 4 Tage Tetrazyklin zugesetzt worden war. Zur Überprüfung der CD83-Expression in proliferierenden Zellen wurde 3 Monate nach Umschalten auf *c-myc* und/oder EBNA-2 Gesamt-RNA (3M) gewonnen (c), bzw. Zellen durch FACS™-Analyse auf CD83-Expression überprüft (a).

- Jeweils 2×10^5 P493-6 Zellen wurden mit einem anti-CD83-Antikörper (grau, gefüllt), bzw. mit einer Isotypkontrolle (ungefüllt) für 30min auf Eis inkubiert, anschließend der überschüssige Antikörper durch Waschen entfernt und für weitere 20min mit einem DTAF-gekoppelten Sekundärantikörper gefärbt. Dargestellt sind jeweils 2×10^4 als lebend definierte Zellen im Histogramm.
- Tabellarische Übersicht über die vier möglichen Zustände der Tetrazyklin- und Östrogen-regulierbaren P493-6 Zelllinie.
- Jeweils $10 \mu\text{g}$ Gesamt-RNA wurden pro Spur auf einem 1%-igen Formaldehyd-Agarose-Gel aufgetragen, elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nylonmembran (Hybond-N⁺) geblottet und mit einer radioaktiv-markierten CD83-Sonde hybridisiert. Ganz unten ist die Beladungskontrolle des mit EtBr-gefärbten Agarose-Gels dargestellt.

Die P493-6 Zelllinie kann durch Zugabe von Östrogen und Tetrazyklin in vier verschiedenen Zuständen untersucht werden: +Myc/-EBNA-2; +Myc/+EBNA-2; -Myc/+EBNA-2 und -Myc/-EBNA-2 (Übersicht in Abb. 10b). Dabei proliferieren die Zellen in den ersten drei

Zuständen, können dies jedoch nicht, wenn weder *c-myc* noch EBNA-2 exprimiert, bzw. aktiviert sind. Wird die P493-6 Zelllinie für längere Zeit in Abwesenheit von Hormon nur unter *c-myc* kultiviert, verhalten sich die Zellen wie BL-Zellen der Latenz I, exprimieren typische Oberflächenantigene (CD38⁺, IgM⁺) und proliferieren in Einzelzellsuspension. Werden P493-6 Zellen dagegen in Gegenwart von Östrogen und Tetrazyklin (-Myc/+EBNA-2) kultiviert, verhalten sich die Zellen wie EBV-immortalisierte Zellen, exprimieren Aktivierungsmarker und Adhäsionsmoleküle (CD21⁺, CD23⁺, CD39⁺, CD40⁺, CD58⁺) und wachsen in Zell-Agglomeraten (*Pajic et al., 2001*).

Um festzustellen, ob CD83 ein Myc-Zielgen ist, wurden unter *c-myc* proliferierende P493-6 durch Zugabe von Tetrazyklin arretiert. Nach vier Tagen wurde der Proliferationsblock entweder durch Auswaschen von Tetrazyklin (Myc-Anschaltung) oder durch Zugabe von Östrogen (EBNA-2 Anschaltung) oder durch beides gemeinsam aufgehoben. Nach 3, 6 und 12 Stunden wurde Gesamt-RNA isoliert. Außerdem wurde die Expression von CD83 an der Zelloberfläche proliferierender P493-6 Zellen durch FACSTM-Analyse bestimmt.

In P493-6 Zellen wurde CD83 nur in Anwesenheit von EBNA-2 sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene exprimiert (Abb. 10). In Anwesenheit von *c-myc* und EBNA-2 wurde CD83 auf RNA-Ebene etwas stärker, auf Proteinebene jedoch etwas geringer exprimiert als mit funktionellem EBNA-2 allein. Die minimale Induktion von CD83 mRNA in *c-myc* aktivierten P493-6 Zellen kann auf Serumeffekte zurückgeführt werden, die durch das Auswaschen von Tetrazyklin und die Zugabe von frischem Serum hervorgerufen werden. Zusammenfassend kann festgehalten werden, daß CD83 kein Zielgen von *c-myc* darstellt.

3.4.2 CD83-Expression in der Zelllinie 1194-3

Da LMP-1 ein weiteres, direktes Zielgen von EBNA-2 (*Kaiser et al., 1999a; Kempkes et al., 1995a,b*) ist, stellte sich als nächstes die Frage, ob CD83 ein Zielgen von LMP-1 ist. Um dies zu prüfen wurde die Zelllinie 1194-3 benutzt. Die 1194-3 Zelllinie ist durch stabile Transfektion von ER/EB2-5 Zellen mit einem LMP-1 Expressionsplasmid entstanden, wobei die Expression von LMP-1 vom SV40-Promotor konstitutiv getrieben wird. Wird den 1194-3 Zellen Östrogen entzogen, ist LMP-1 aufgrund seiner konstitutiven Expression dennoch in der Lage, seine eigenen Zielgene zu aktivieren (*Zimber-Strobl et al., 1996*). Mit diesem System ergibt sich die Möglichkeit, LMP-1 Zielgene unabhängig von EBNA-2 genauer zu charakterisieren.

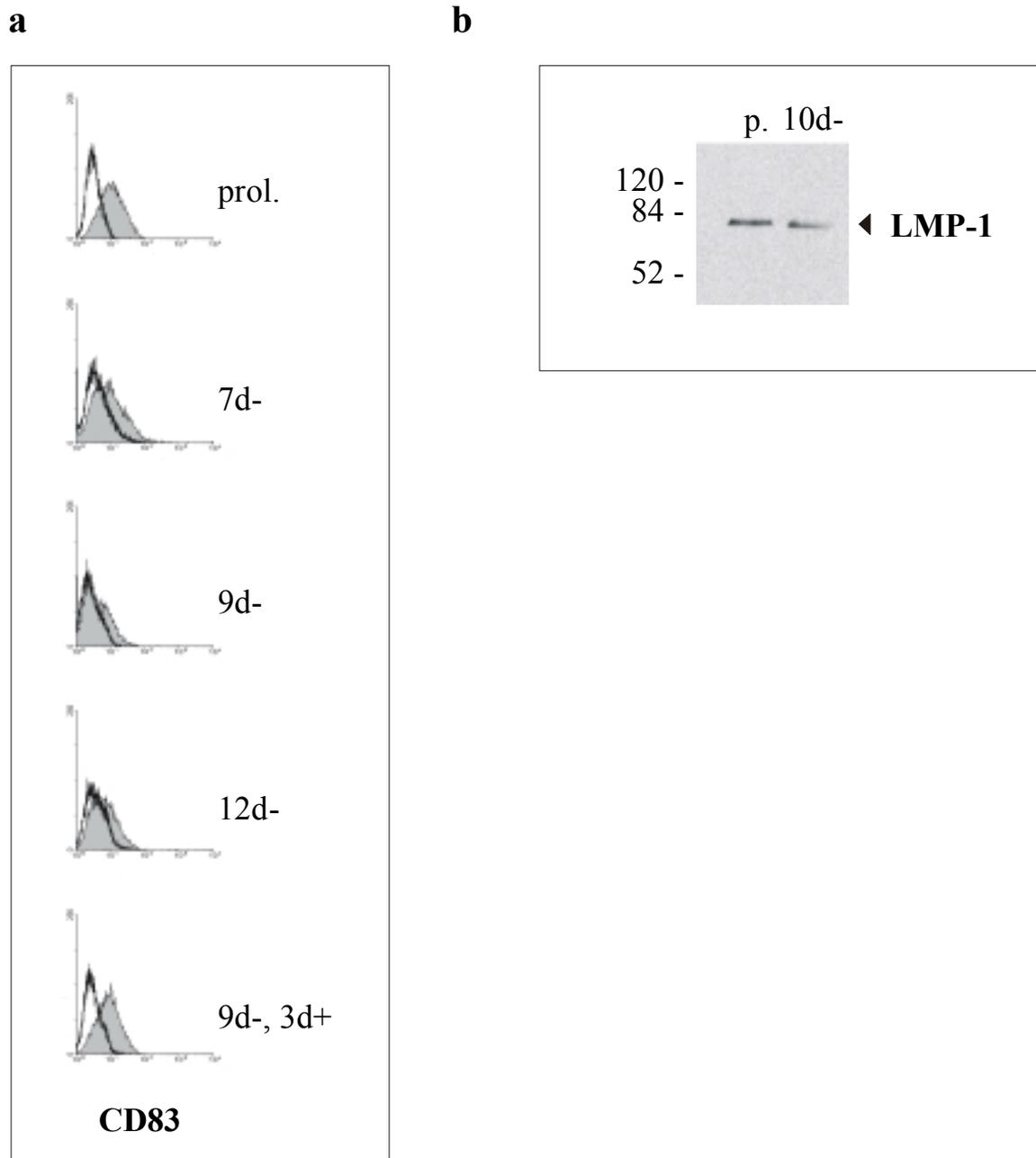


Abbildung 11: CD83 kann in Östrogen-depletierten 1194-3 Zellen nachgewiesen werden

1194-3 Zellen wurden durch Waschen Östrogen-depletiert. Nach 7 (7d-), 9 (9d-) und 12 (12d- und 9d-,3d+) Tagen wurde die CD83-Expression per FACS™-Analyse ermittelt sowie nach 10 Tagen Proteinextrakte präpariert. Als Positivkontrolle wurden unter Östrogen proliferierende 1194-3 Zellen (prol., p.) benutzt.

- Jeweils 2×10^5 1194-3 Zellen wurden mit einem anti-CD83-Antikörper (grau, gefüllt), bzw. mit der Isotypkontrolle (ungefüllt) für 30min auf Eis inkubiert und für weitere 20 Minuten mit dem DTAF-gekoppelten Sekundärintikörper behandelt. Dargestellt sind jeweils 2×10^4 als lebend definierte Zellen im Histogramm.
- Von jeweils 1×10^7 1194-3 Zellen wurden Proteinextrakte gewonnen, je $20 \mu\text{g}$ Protein pro Spur auf ein 10%-iges SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen, elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran (Hybond-P) geblottet. Anschließend wurde LMP-1 mit einem anti-LMP-1-Antikörper nachgewiesen (p.: unter EBNA-2 (Östrogen) proliferierende 1194-3 Zellen; 10d-: für 10 Tage Östrogen-depletierte 1194-3 Zellen).

1194-3 Zellen wurde Östrogen entzogen und die Zellen für 7, 9 und 12 Tage in Östrogenfreiem Medium kultiviert. Die 1194-3 Zellen wurden in ihrem Wachstumsverhalten im MTT-Assay überprüft (Daten nicht gezeigt). Zu den entsprechenden Zeitpunkten wurden Zellen entnommen und die CD83-Oberflächenexpression durch FACSTM-Analyse untersucht. Außerdem wurde in 1194-3 Zellen, die 9 Tage ohne Östrogen gehalten wurden, EBNA-2 durch Zugabe von Östrogen wieder angeschaltet (Abb. 11a).

CD83 wurde in 1194-3 Zellen sehr gut exprimiert. 12 Tage nach Östrogenentzug konnte immer noch CD83 an der Oberfläche nachgewiesen werden (Abb. 11a). Zu diesem Zeitpunkt war die Menge an CD83 jedoch etwas verringert. Das Wiederanschalten von EBNA-2 führte zur erneuten Proliferation und erhöhten Expression von CD83 an der Oberfläche (Abb. 11a). Dies läßt die Vermutung zu, daß EBNA-2 durch Aktivierung des viralen LMP-1 die Aktivierung des CD83-Promotors verstärkt oder anderweitig einen Beitrag zur CD83-Expression beisteuert. Von proliferierenden Zellen sowie von für 10 Tage Östrogen-depletierten 1194-3 Zellen wurden Proteinextrakte gewonnen. Zu beiden Zeitpunkten konnte das LMP-1 Protein durch Western-Blot nachgewiesen werden (Abb. 11b), wobei sich die Expressionsstärke kaum unterschied.

Diese Experimente ergaben einen ersten Hinweis darauf, daß CD83 ein Zielgen von LMP-1 sein könnte. Dies sollte nun in weiteren Experimenten überprüft werden.

3.4.3 CD83-Expression in der Zelllinie B64-19

Die Frage, ob CD83 tatsächlich über den LMP-1 Signalweg aktiviert wird, sollte mit der neu etablierten Zelllinie B64-19 überprüft werden (*Dirmeier et al., Manuskript zur Veröffentlichung eingereicht*). Zur Etablierung dieser Zelllinie wurden B-Zellen aus Nabelschnurblut isoliert und mit einem Maxi-EBV Konstrukt infiziert, das anstelle von LMP-1 ein Fusionsgen enthält, welches aus dem extrazellulären Teil sowie der Transmembrandomäne des NGF-Rezeptors (Nerve-Growth-Factor-Receptor) und der C-terminalen intrazellulären Domäne von LMP-1 besteht. Durch Zugabe von Antikörpern kommt es durch Aggregation zur Aktivierung des Fusionsproteins. Der zugegebene Erstantikörper bindet an den extrazellulären Teils des NGF-R, der Zweitantikörper vermittelt die Aggregation zweier NGF-R/LMP-1 Moleküle. Diese räumliche Nähe reicht aus, damit LMP-1 seine Signalwege aktivieren kann (Übersicht in Abb. 12a). LMP-1 wird in den B64-19 Zellen somit funktionell regulierbar. Der NGF-R wird spezifisch nur in neuronalem Gewebe exprimiert und interferiert damit nicht mit der B-

Zell-Physiologie. Die B64-19 Zellen können nur in Gegenwart einer Feeder-Zelllinie kultiviert werden, was auf die essentielle Bedeutung von LMP-1 bei der Immortalisierung hinweist. B64-19 Zellen (freundlicherweise von U. Dirmeier zur Verfügung gestellt) wurden für eine Woche ohne Feeder-Zellen kultiviert, danach für eine Stunde der Erstantikörper zugesetzt und anschließend der Zweitantikörper für 30 Minuten, 3, 6 und 24 Stunden zugegeben, die Zellen geerntet und Gesamt-RNA isoliert, bzw. Zellen zur FACS™-Analyse mit einem anti-CD83-Antikörper gefärbt.

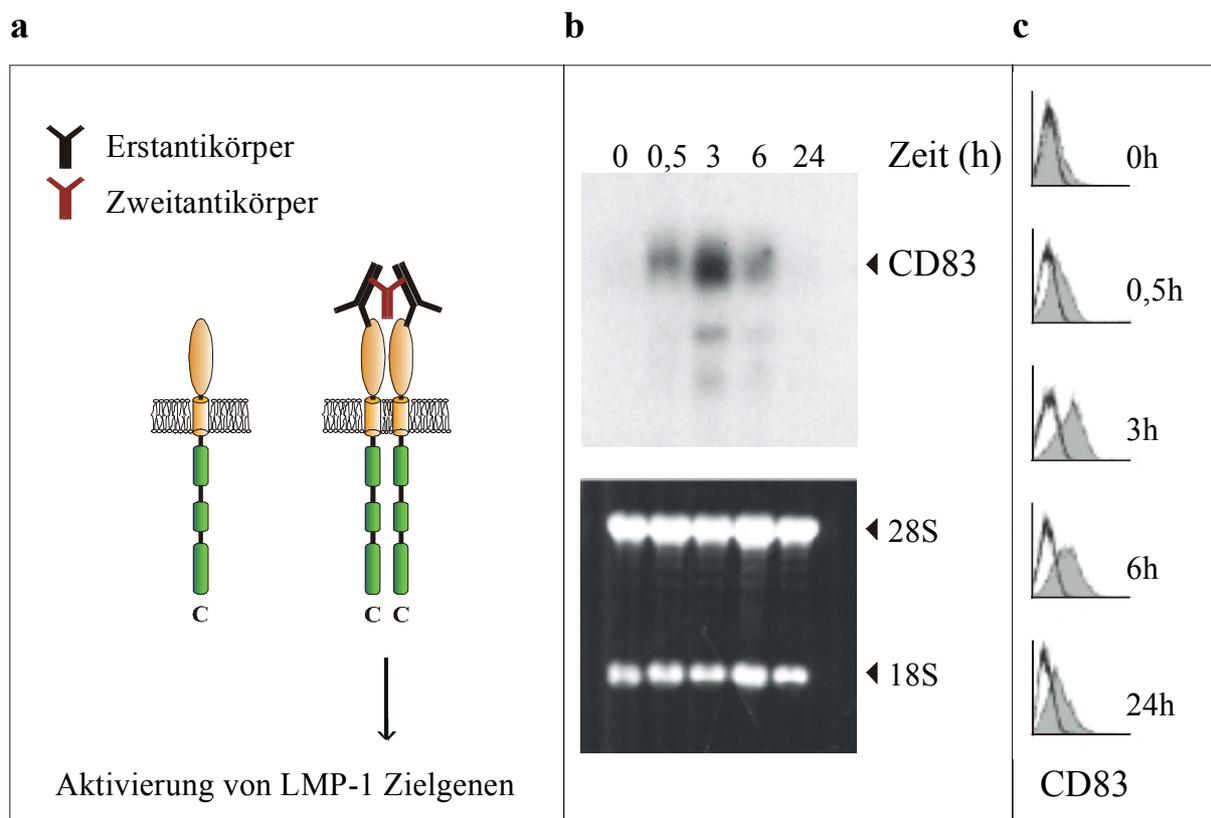


Abbildung 12: CD83 wird durch LMP-1 aktiviert

B64-19 Zellen wurden für eine Woche ohne Feeder-Zellen kultiviert und dann für eine Stunde mit Erst- und für 0,5; 3; 6 und 24 Stunden mit Zweitantikörper behandelt. Die Zellen wurden geerntet und Gesamt-RNA Proben präpariert (b) sowie Zellen zur FACS™-Analyse mit einem anti-CD83-PE-gekoppelten Antikörper gefärbt (c). Als Nullwert dienten Zellen, die nur mit dem Erstantikörper behandelt wurden.

- Schematische Darstellung des Fusionsproteins NGF-R/LMP-1. Der extrazelluläre Teil und die Transmembranomäne des NGF-Rs wurden mit dem intrazellulären C-Terminus (C) von LMP-1 fusioniert und anstelle des nativen LMP-1 in ein Maxi-EBV Konstrukt gesetzt. LMP-1 und seine Signalkaskaden können nur durch Zugabe von Erst- und Zweitantikörper, die den NGF-R binden und zu einer Dimerisierung des Fusionsproteins führen, aktiviert werden.
- Jeweils 10 μ g Gesamt-RNA wurden pro Spur auf einem 1%-igen Formaldehyd-Agarose-Gel aufgetragen, elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nylonmembran (Hybond-N⁺) geblottet und mit einer humanen, radioaktiv-markierten CD83-Sonde hybridisiert. Ganz unten dargestellt ist die Beladungskontrolle.
- Jeweils 2x10⁵ B64-19 Zellen wurden mit einem anti-CD83-PE-Antikörper (grau, gefüllt), bzw. mit einer PE-markierten Isotypkontrolle (ungefüllt) für 30min auf Eis gefärbt. Im Histogramm dargestellt sind jeweils 2x10⁴ als lebend definierte Zellen.

Bereits nach 30 Minuten konnte mRNA und Protein von CD83 an der Oberfläche in B64-19 Zellen nachgewiesen werden. Drei Stunden (RNA, Abb. 12b), bzw. 3-6 Stunden (FACSTM-Analyse, Abb. 18c) nach Induktion war eine maximale Expression von CD83 in diesem System zu erkennen. Nach 24 Stunden war die CD83 RNA nicht mehr nachweisbar (Abb. 12b), die CD83-Oberflächenexpression war jedoch zu diesem Zeitpunkt noch gut zu erkennen (Abb. 12c).

Diese Ergebnisse sowie die Daten aus den 1194-3 Zellen sprechen dafür, daß CD83 ein Zielgen von LMP-1 ist. In B64-19 Zellen werden alle anderen latenten EBV-Antigene und auch EBNA-2 exprimiert. Aufgrund der Tatsache, daß CD83 nicht in uninduzierten B64-19 Zellen nachweisbar ist (Abb. 12b, c), kann ausgeschlossen werden, daß CD83 ein EBNA-2 Zielgen ist.

3.5 Regulation des CD83-Promotors

3.5.1 CD83-Promotormutanten

Zur genaueren Analyse der CD83-Regulation durch LMP-1 wurden von Prof. A. Steinkasserer (Dermatologie, Erlangen) CD83-Promotormutanten (Abb. 13) und von A. Kieser (GSF, Abt. Genvektoren, München), Expressionsplasmide von LMP-1 und der an der LMP-1 Signaltransduktion beteiligten Gene zur Verfügung gestellt.

Der Promotor von CD83 liegt in unmittelbarer Nähe zum Transkriptionsstartpunkt von CD83 (*Kozlow et al., 1993*) und wurde auf vorhandene Transkriptionsfaktorbindestellen analysiert. Ein 3037bp Promotorbereich, der vier SP1-Bindestellen sowie eine NF- κ B-Bindestelle enthält, wurde in den pGL Basic Vektor (Promega) kloniert (Abb. 13; *Berchtold et al., 2002*). Dieser Vektor enthält eine Luziferase-Expressionskassette, mit Hilfe derer es möglich ist, die Aktivität des Promotors durch einen Enzymassay zu messen. Zusätzlich zu dem großen Promotorkonstrukt, wurde ein Stück des CD83-Promotors kloniert, dem alle SP1-Bindestellen fehlten (-3037 Δ SP1, Deletion eines GC-reichen Sequenzabschnittes). Zur genaueren Analyse wurden noch drei Minimalpromotorkonstrukte kloniert. Die Konstrukte enthalten entweder alle vier SP1- sowie die NF- κ B-Bindestelle (-261), nur die NF- κ B-Bindestelle (-123) oder nur die mutierte NF- κ B-Bindestelle (-123mut; *Berchtold et al., 2002*; Abb. 13).

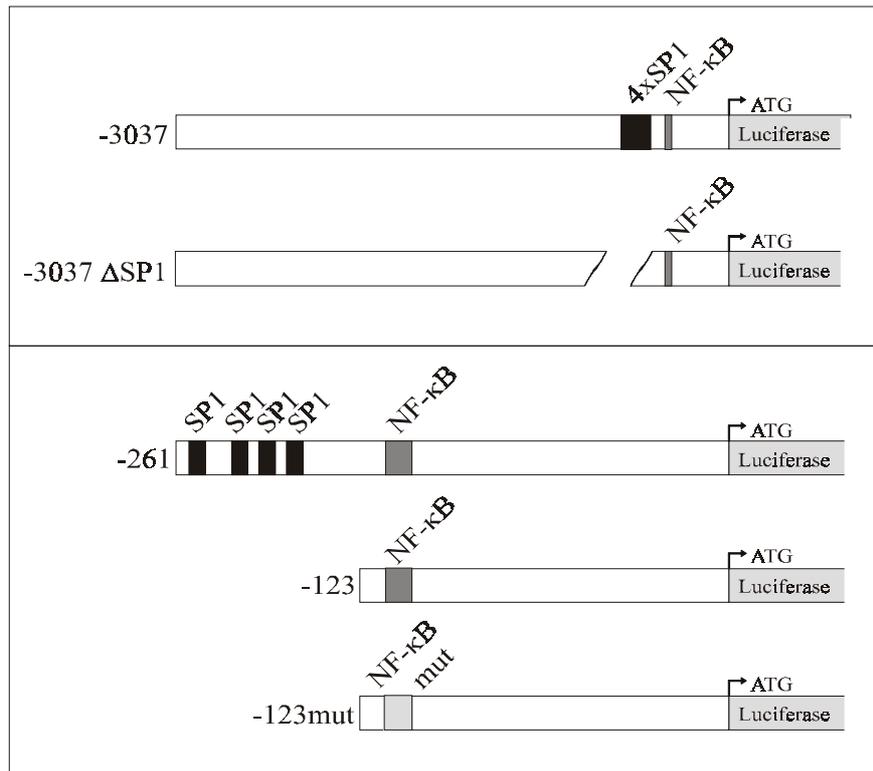


Abbildung 13: Übersicht über die verwendeten CD83-Promotor/Luziferase-Konstrukte

Insgesamt wurden fünf CD83-Promotor-Luziferase-Konstrukte verwendet. Das längste Konstrukt besteht aus 3037bp des CD83-Promotors und enthält vier SP1-Bindesequenzen und eine NF-κB-Erkennungsstelle. Im pGL CD83 (-3037 ΔSP1) Konstrukt sind alle vier SP1-Bindestellen deletiert. Weiterhin wurde eine CD83-Promotor-deletionsmutante verwendet, die bis auf die vier SP1 und die NF-κB-Bindestelle reduziert wurde (pGL CD83 (-261)). Der Minimalpromotor pGL CD83 (-123) besitzt nur die NF-κB-Bindesequenz. Im Konstrukt pGL CD83 (-123mut) wurde die NF-κB-Bindestelle derart mutiert, daß eine Bindung von NF-κB nicht mehr möglich ist.

3.5.2 Die Zelllinie 293-T als System der Wahl zur Untersuchung des CD83-Promotors

Zum Austesten der LMP-1 Wirkung auf den CD83-Promotor wurde eine Zelllinie gesucht, die den Promotor nicht von selbst aktiviert. Dazu wurde die humane embryonale Nierenzelllinie 293-T auf ihre Grundaktivität getestet. Der CD83-Promotor ist in den 293-T Zellen nur gering aktiv (Daten nicht gezeigt). Weiterhin wurde eine CD83-Oberflächenexpression durch FACSTM-Analyse in der 293-T Zelllinie ausgeschlossen, d.h. 293-T Zellen exprimieren kein endogenes CD83 und aktivieren auch nicht den CD83-Promotor (Daten nicht gezeigt). Somit war ein einfach zu handhabendes zelluläres System gefunden, mit dem es möglich war, den CD83-Promotor ohne Hintergrundaktivität zu studieren.

3.5.3 CD83-Promotoraktivierung durch LMP-1

Als erstes wurden 293-T Zellen in einer Verdünnungsreihe mit einem Expressionsplasmid für Wildtyp WT-LMP1 (p581), den CD83-Promotormutanten sowie einem β -Galaktosidase Expressionsplasmid transfiziert. Das Plasmid p581 enthält LMP-1 unter der Kontrolle des SV40 Promotors. Die Transfektionsexperimente ergaben, daß der CD83-Promotor pGL CD83 (-3037) von LMP-1 konzentrationsabhängig aktiviert wird (Abb.14). Die für alle weiteren Versuche eingesetzte Plasmidmenge an Wildtyp LMP-1 (581), bzw. LMP-1-Mutanten (siehe 3.5.4) betrug 0,5 μ g Plasmid-DNA, um zytotoxische Effekte von LMP-1 ausschließen zu können (Floettmann *et al.*, 1996; Gahn und Sugden, 1993; Hammerschmidt *et al.*, 1989).

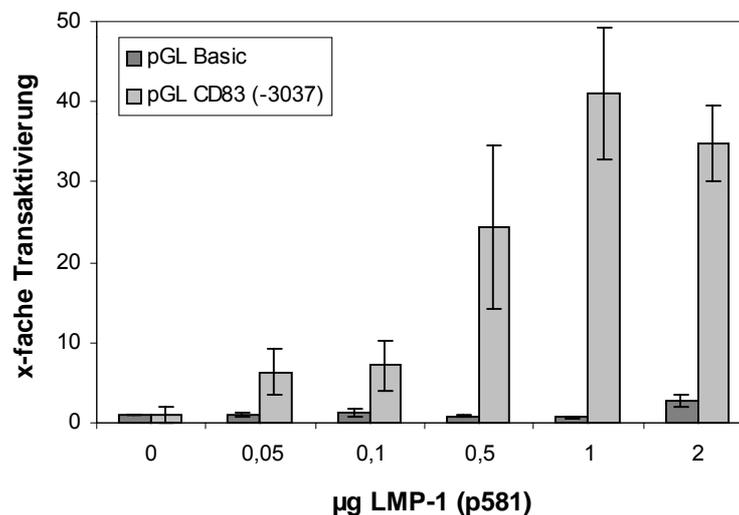


Abbildung 14: Dosisabhängige Transaktivierung des CD83-Promotors durch LMP-1

4x10⁵ 293-T Zellen wurden pro Loch in einer 6-well Platte eingesät und einen Tag später mit 50ng des CD83-Promotor/Luziferase-Konstrukts pGL CD83 (-3037) und 0; 0,05; 0,1; 0,5; 1, bzw. 2 μ g Expressionsplasmid WT-LMP-1 (p581) co-transfiziert. Als Kontrolle für die Transfektionseffizienz wurden 10ng eines PGK- β -Galaktosidase Expressionsplasmids zusätzlich mittransfiziert. Die transfizierten Zellen wurden für 16-20h in DMEM-Medium kultiviert, Proteinextrakte präpariert und der Umsatz von Luziferin durch die Luziferase, bzw. von Galacton durch die β -Galaktosidase photometrisch bestimmt. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert aus drei Zweifach-Experimenten, nach Korrektur auf die Transfektionseffizienz. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung der ermittelten Werte dar.

3.5.4 CD83- und LMP-1-Mutanten

In einem weiteren Experiment sollte geklärt werden, über welchen der bisher vier bekannten Signalwege der CD83-Promotor durch LMP-1 aktiviert wird. Der intrazelluläre C-Terminus von LMP-1 enthält die Regionen CTAR-1, CTAR-2 und CTAR-3 (*C-Terminal Activator Region*). Wichtige Strukturmerkmale sind das PxQxT-Motiv in der CTAR-1 Region und die Aminosäure Tyr₃₈₄ in der CTAR-2 Region. Durch Mutation von PxQxT zu AxAxA (PQT→AAA), bzw. Tyr₃₈₄ zu Gly₃₈₄ (Y₃₈₄→G₃₈₄) wurde festgestellt, daß die Aktivierung von NF-κB um 30, bzw. 70% verringert ist. Sind beide Motive gleichzeitig mutiert (PQT/Y₃₈₄→AAA/G₃₈₄), findet keine NF-κB-Aktivierung mehr statt.

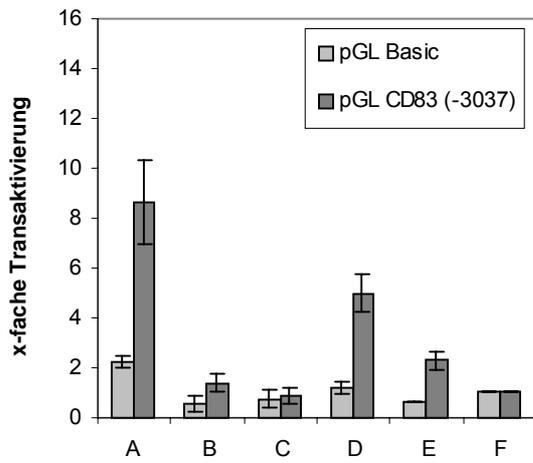
Zur Untersuchung der CD83-Promotorregulation durch LMP-1 wurden neben einem Expressionsplasmid für LMP-1 auch vier LMP-1-Mutanten eingesetzt, die einzelne Aminosäuren (PQT→AAA, Y₃₈₄→G₃₈₄, PQT/Tyr₃₈₄→AAA/G₃₈₄) mutiert oder den kompletten C-Terminus deletiert hatten (LMP-1 ΔC-Terminus). 293-T Zellen wurden transfiziert, nach 16-20 Stunden Proteinextrakte gewonnen und ein Luziferase- sowie ein β-Galaktosidase-Assay durchgeführt. Zur Auswertung wurde die x-fache Transaktivierung berechnet (s. 6.9.5).

Die CD83-Promotormutanten pGL CD83 (-3037), (-3037 ΔSP1), (-261) und (-123) wurden von WT-LMP-1 aktiviert (Abb. 15 a-d), während dies durch die LMP-1 Mutante, ohne intrazellulären C-Terminus (Abb. 15 a-d), nicht möglich war. Im Vergleich zu WT-LMP-1 war die Aktivierung des CD83-Promotors durch die LMP-1 Mutanten (PQT→AAA) und (Y₃₈₄→G₃₈₄) um ca. 30, bzw. 70% reduziert. Eine Aktivierung des CD83-Promotors ohne NF-κB-Bindestelle (pGL CD83 (-123mut)) war weder mit LMP-1 noch mit den LMP-1 Mutanten möglich. Die Aktivierung des CD83-Promotors durch LMP-1 erfolgt somit über den NF-κB-Signaltransduktionsweg.

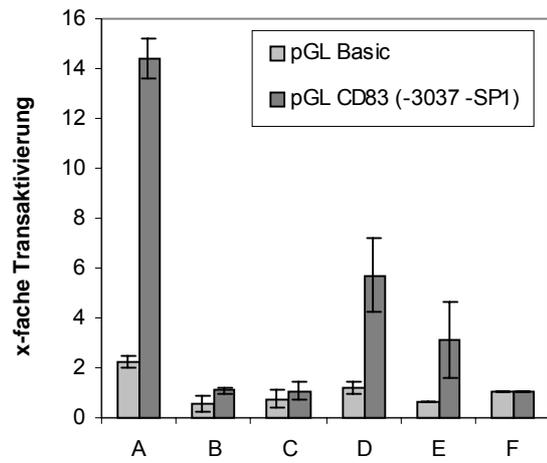
Abbildung 15: LMP-1 reguliert den CD83-Promotor über NF-κB

4x10⁵ 293-T Zellen wurden pro Loch in einer 6-well Platte eingesät und einen Tag später transfiziert mit jeweils 50ng CD83-Promotor/Luziferase-Konstrukten (a: pGL CD83 (-3037), b: pGL CD83 (-3037 ΔSP1), c: pGL CD83 (-261), d: pGL CD83 (-123), e: pGL CD83 (-123mut)) sowie 0,5μg Expressionsplasmid A: WT-LMP-1, bzw. 0,5μg LMP-1-Mutanten (B: ΔC-Terminus, C: PQT/Y₃₈₄→AAA/G₃₈₄, D: PQT→AAA, E: Y₃₈₄→G₃₈₄), bzw. F: zur Kontrolle mit 0,5μg Leervektor. Als Kontrolle der Transfektion wurden 10ng eines PGK-β-Galaktosidase Expressionsplasmids co-transfiziert. Die transfizierten Zellen wurden für 16-20h in DMEM-Medium kultiviert, Proteinextrakte präpariert und der Umsatz von Luziferin durch die Luziferase, bzw. von Galacton durch die β-Galaktosidase photometrisch bestimmt. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert der x-fachen Transaktivierung aus 5 Dreifach-Experimenten, nach Korrektur auf die Transfektionseffizienz. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung der ermittelten Werte dar.

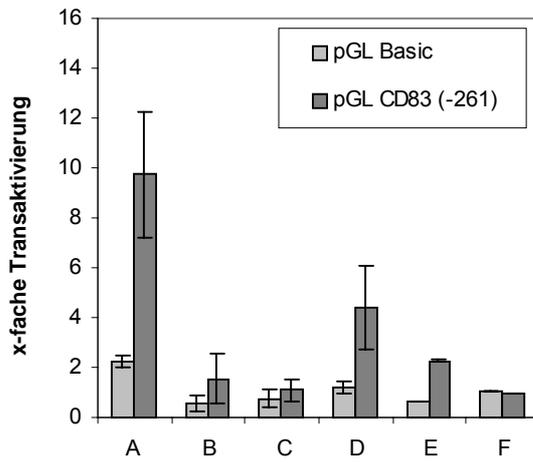
a



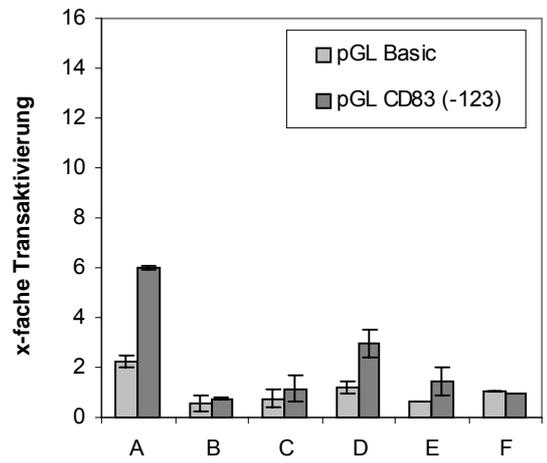
b



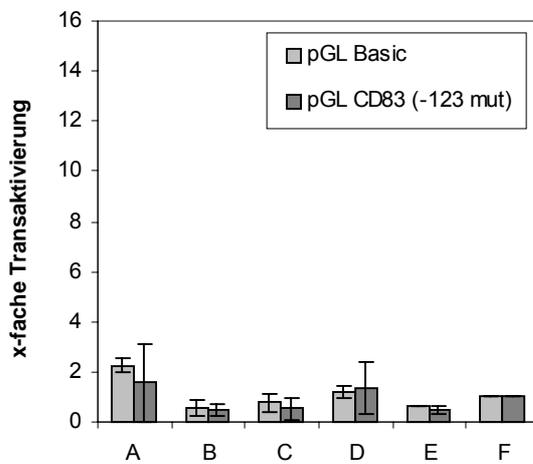
c



d



e



A: LMP-1

B: Δ C-Terminus

C: PQT/Y₃₈₄ \rightarrow AAA/G₃₈₄

D: PQT \rightarrow AAA

E: Y₃₈₄ \rightarrow G₃₈₄

F: Kontrolle

3.5.5 Inhibition der CD83-Promotoraktivierung von LMP-1 durch dominant/negatives I- κ B

Um die Rolle von NF- κ B in der Aktivierung des CD83-Promotors näher zu untersuchen, wurden 293-T Zellen mit den CD83-Promotormutanten, Wildtyp-LMP-1 sowie einem Expressionsplasmid für dominant-negatives I- κ B α (d/n I- κ B) co-transfiziert. Die Aminosäuren Ser 32 und Ser 36 sind im d/n I- κ B jeweils zu Alanin mutiert (*Haskill et al., 1991; Henkel et al., 1992*). Damit kann I- κ B α nicht mehr durch IKK (I- κ B-Kinase, eine Untereinheit des I- κ B-Kinase Multiproteinkomplexes; *Karin et al. 1999*) phosphoryliert werden, was einen entscheidenden Schritt in der NF- κ B-Signalkaskade darstellt. d/n I- κ B wird nicht ubiquitinyliert und proteolytisch im Proteasom abgebaut. Der Komplex aus I- κ B und NF- κ B bleibt stabil im Zytoplasma erhalten, NF- κ B kann nicht in den Zellkern transportiert werden und seine Zielgene aktivieren.

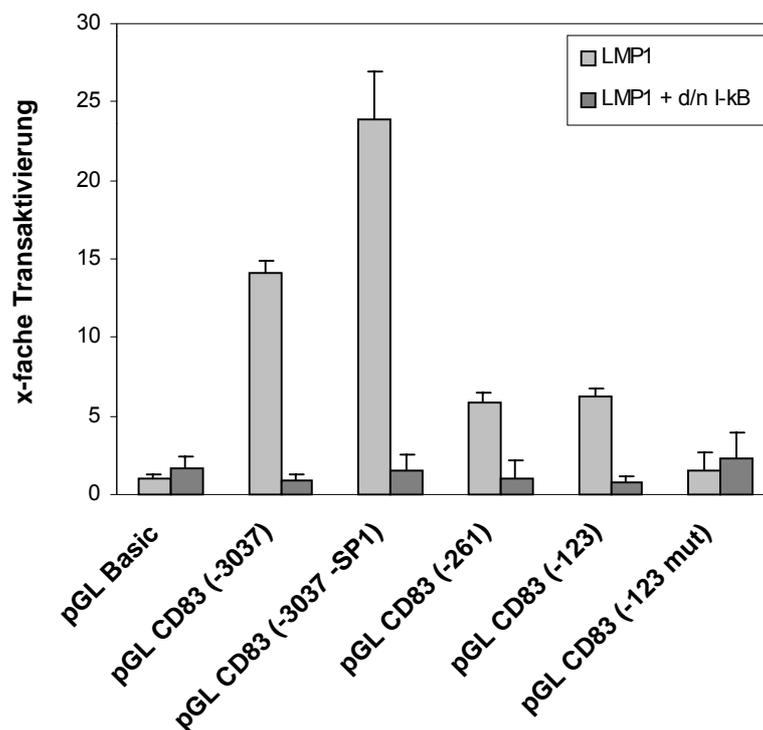


Abbildung 16: Die CD83-Promotoraktivität wird durch d/n I- κ B inhibiert

4×10^5 293-T Zellen wurden pro Loch in einer 6-well Platte eingesät und einen Tag später transfiziert mit jeweils 50ng CD83-Promotor/Luziferase-Konstrukten (pGL CD83 -3037, pGL CD83 -3037 Δ SP1, pGL CD83 -261, pGL CD83 -123, pGL CD83 -123mut) und 0,5 μ g Expressionsplasmid WT-LMP-1 (p581), bzw. zur Kontrolle mit 0,5 μ g Leervektor. Als Kontrolle der Transfektionseffizienz wurden 10ng eines PGK- β -Galaktosidase Expressionsplasmids co-transfiziert. Die transfizierten Zellen wurden für 16-20h in DMEM-Medium kultiviert, Proteinextrakte präpariert und der Umsatz von Luziferin durch die Luziferase, bzw. von Galacton durch die β -Galaktosidase photometrisch bestimmt. Die erhaltenen Werte sind als x-fache Transaktivierung, bezogen auf den Leervektor, angegeben. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert aus drei Dreifach-Experimenten, nach Korrektur auf die Transfektionseffizienz. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung der ermittelten Werte dar.

Während der CD83-Promotor in den Konstrukten pGL CD83 (-3037, -3037 Δ SP1, -261 und -123) durch LMP-1 allein induziert wurde, kam es bei Co-Transfektion von d/n I- κ B (0,5 und 1,5 μ g, Abb. 16 und Daten nicht gezeigt) zu einer nahezu vollständigen Inhibition der Transaktivierung. Mögliche toxische Effekte von d/n I- κ B auf 293-T Zellen konnten mittels Lichtmikroskopie und Trypanblaufärbung eindeutig ausgeschlossen werden (Daten nicht gezeigt).

3.5.6 Untersuchung der Transaktivierung des CD83-Promotors durch Proteine der LMP-1 Signalkaskaden

3.5.6.1 Transaktivierung des CD83-Promotors durch TRAF-2 und TRAF-6

TRAF-1, -2, -3 und -5 können direkt mit dem PxQxT Motiv in der CTAR-1 Region von LMP-1 interagieren (Abb. 4; *Brodeur et al., 1997; Devergne et al., 1996, 1998; Mosialos et al., 1995; Sandberg et al., 1997*). Jedoch wird die NF- κ B-Aktivierung hauptsächlich über TRAF-2 vermittelt (*Devergne et al., 1996; Kaye et al., 1996*). Zusätzlich zur CTAR-1 Region wird auch über die CTAR-2 Region eine Aktivierung von NF- κ B hervorgerufen. Dabei interagiert TRAF-2 indirekt mit dem Tyr₃₈₄ der CTAR-2 Region über TRADD (*Izumi und Kieff, 1997; Kieser et al., 1999*). TRADD stellt ein Adapterprotein dar, von dem beschrieben ist, daß es an den TNF-R1 über seine Todesdomäne bindet und Apoptose induziert. LMP-1 ist bislang das einzige Protein, an das TRADD nicht über seine Todesdomäne bindet (*Kieser et al., 1999*) und dadurch auch keine Apoptose induziert (*Izumi et al., 1999*). Kürzlich konnte gezeigt werden, daß TRAF-6 in der Signaltransduktion von LMP-1 eine kritische Rolle spielt (*Schultheiss et al., 2001*). TRAF-6 agiert unterhalb von TRADD und TRAF-2 und stellt ein Schlüsselprotein des p38-MAPK-Signalweges dar (*Schultheiss et al., 2001*). Es können jedoch auch andere Mitglieder der TNF-R Familie eine Rolle in der Aktivierung von CD83 spielen, so führt z.B. CD40L und TNF- α zur Induktion von CD83 bei der Reifung dendritischer Zellen (*Berchtold et al., 1999; Lyakh et al., 2000*). Deshalb sollte an dieser Stelle getestet werden, ob die in den Signalkaskaden der TNF-R Familie beteiligten Proteine, bei Überexpression eine Aktivierung des CD83-Promotors hervorrufen können.

TRAF-2 oder TRAF-6 wurden zusammen mit den CD83-Promotor/Luziferase-Konstrukten sowie einem β -Galaktosidase Expressionsplasmid co-transfiziert, nach 20 Stunden Proteinextrakte präpariert und die Luziferaseaktivität gemessen (Abb. 17). Es konnte gezeigt werden, daß sowohl TRAF-2 als auch TRAF-6 den CD83-Promotor transaktivieren (Abb. 17). Die in

der NF- κ B-Bindestelle mutierte CD83-Promotormutante pGL CD83 (-123mut) konnte weder durch TRAF-2 noch durch TRAF-6 transaktiviert werden. Die Regulation durch TRAF-2 und TRAF-6 läßt die Schlußfolgerung zu, daß CD83 auch über Mitglieder der TNF-Rezeptorfamilie reguliert werden kann.

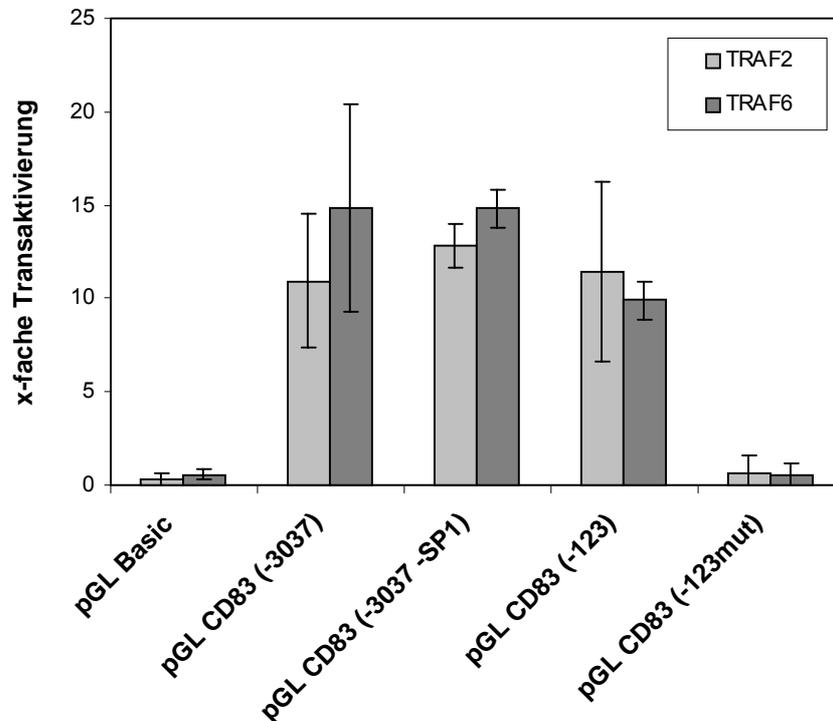


Abbildung 17: TRAF-2 und TRAF-6 aktivieren den CD83-Promotor

4×10^5 293-T Zellen wurden pro Loch in eine 6-Loch Platte eingesät und einen Tag später transfiziert mit jeweils 50ng CD83-Promotor/Luziferase-Konstrukten (pGL CD83 (-3037), pGL CD83 (-3037 Δ SP1), pGL CD83 (-123), pGL CD83 (-123mut)), 0,5 μ g Expressionsplasmid TRAF-2 oder TRAF-6 sowie zur Kontrolle mit 0,5 μ g Leervektor (pRK5 (TRAF2) oder pcDNA3.1 (TRAF6)). Zur Kontrolle der Transfektion wurden 10ng eines PGK- β -Galaktosidase Expressionsplasmids co-transfiziert. Die transfizierten Zellen wurden für 16-20h in DMEM-Medium kultiviert, Proteinextrakte präpariert und der Umsatz von Luziferin durch die Luziferase, bzw. von Galacton durch die β -Galaktosidase photometrisch bestimmt. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert der x-fachen Transaktivierung aus vier Doppel-Experimenten, nach Korrektur auf die Transfektionseffizienz. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung der ermittelten Werte dar.

3.5.6.2 CD83 wird nicht über den STAT-Signalweg reguliert

Die Induktion der Transkriptionsfaktoren NF- κ B (Hammar skjold und Simurda, 1992; Laherty et al, 1992; Mitchell und Sugden, 1995) sowie AP-1 (Kieser et al., 1997; Eliopoulos und Young, 1998) durch LMP-1 scheint für die meisten der zellulären Veränderungen nach EBV-Infektion verantwortlich zu sein. LMP-1 ist zudem in der Lage, den STAT-Signalweg über die Interaktion der Janus Kinase JAK3 mit LMP-1 zu aktivieren (Gires et al., 1999). Um zu

klären, ob CD83 auch über den JAK3/STAT Signalweg induziert werden kann, sollten die LMP-1 Δ 33 Mutante, in der die CTAR-3 Region vollständig deletiert worden war, sowie ein Expressionsplasmid für mJAK3 (Maus JAK3) in 293-T Zellen mit den CD83-Promotormutanten co-transfiziert werden. Die Flag-Epitop fusionierte LMP-1 Δ 33 Mutante ist nicht mehr dazu fähig, JAK3 zu phosphorylieren und damit den Signalweg über STAT zu induzieren (*Gires et al., 1999*).

Nach transienter Transfektion von 293-T Zellen mit einem Expressionsplasmid für JAK3, bzw. der Flag-Epitop fusionierten LMP-1 Δ 33 Mutante (*Gires et al., 1999*) konnte gezeigt werden, daß CD83 (pGL CD83 (-3037)) nicht über JAK3 aktiviert wird und daß die LMP-1 Δ 33 Mutante den CD83-Promotor mindestens genauso gut (oder sogar etwas stärker) transaktiviert wie Flag-Epitop fusioniertes WT-LMP-1. Dieser Versuch wurde insgesamt dreimal durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Damit bleibt festzuhalten, daß LMP-1 CD83 nur durch CTAR-1 und CTAR-2 aktiviert wird und der STAT-Signaltransduktionsweg nicht zur Aktivierung des CD83-Promotors beiträgt, was auch aus der fehlenden Aktivierung durch die LMP-1 Mutante (PQT/Y₃₈₄→AAA/G₃₈₄) hervorgeht.

3.5.6.3 CD83 wird nicht über p38-MAPK aktiviert

TRAF-2 und TRAF-6 sind beide in der Lage, Zielgene sowohl über NF- κ B als auch über p38/ATF zu aktivieren. Eine Aktivierung von Zielgenen durch p38 wird durch den spezifischen Inhibitor SB203580 blockiert. Bei der durch Lipopolysaccharid (LPS) hervorgerufenen Reifung dendritischer Zellen konnte nach Zugabe des SB203580-Inhibitors die CD83-Oberflächenexpression um 75% verringert werden (*Ardeshna et al., 2000*). Deswegen sollte überprüft werden, ob p38 den CD83-Promotor in 293-T Zellen aktivieren kann. Dazu wurden 2 μ g p38-Expressionsplasmid mit den CD83-Promotormutanten und 10ng β -Galaktosidase-Expressionsplasmid co-transfiziert. Zusätzlich wurde der spezifische p38-Inhibitor SB203580 in verschiedenen Konzentrationen (10-80 μ M/l) zugegeben und nach 36 Stunden ein Luziferase-Assay durchgeführt. In 293-T Zellen konnte keine Aktivierung der CD83-Promotormutanten durch p38 festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Der CD83-Promotor bis Position -3037 wird somit nicht durch die p38-MAPK-Signalkaskade in 293-T Zellen aktiviert.

Aufgrund der oben beschriebenen Ergebnisse (*Ardeshna et al., 2000*) sollte die Inhibition der CD83-Expression durch den p38-Inhibitor auch in B-Zellen untersucht werden. Dazu wurden proliferierende und Östrogen-depletierte ER/EB2-5 Zellen mit verschiedenen Konzentrationen des SB203580-Inhibitors behandelt und im Falle von ausgewaschenen ER/EB2-5 Zellen

gleichzeitig mit Östrogen re-induziert. Eine Inhibition der CD83-Expression konnte auch hier nicht beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse deuten auf eine Zelltyp-abhängige Regulation des CD83-Promotors durch die p38-MAPK.

3.5.7 Das LMP-1:CD40-Fusionsgen aktiviert den CD83-Promotor

LMP-1 induziert über seinen intrazellulären C-Terminus ähnliche Signalwege wie CD40 und scheint in der EBV-immortalisierten B-Zelle Funktionen von CD40 nachzuahmen (*Gires et al., 1997; Zimmer-Strobl et al., 1996*). In verschiedenen Publikationen gibt es Hinweise darauf, daß CD83 bei der Stimulation dendritischer Zellen mit CD40L hochreguliert wird (*Caux et al., 1994*). Eine Analyse des CD83-Promotors bezogen auf CD40 lag bis zu diesem Zeitpunkt aber noch nicht vor.

Für die Untersuchung der Frage, ob CD40 den CD83-Promotor aktiviert, wurde auf ein System zurückgegriffen (*Gires et al., 1997*), in dem die intrazelluläre N-terminale Domäne sowie die Transmembrandomäne von LMP-1 mit der intrazellulären Domäne von CD40 fusioniert worden waren (Schema in Abb. 18a). Die Fusion der Transmembrandomäne von LMP-1 an den intrazellulären Teil von CD40 führt zu einer konstitutiven Aktivierung, der an der Signalkaskade von CD40 beteiligten Proteine, da durch Interaktion des LMP-1 Membrananteils in der Plasmamembran das LMP-1:CD40 Fusionsprotein ständig aktiviert wird. Damit ist es möglich, CD40 Zielgene und dessen Signalwege unabhängig von CD40L zu studieren.

Zusammen mit den CD83-Promotormutanten und einem β -Galaktosidase-Expressionsplasmid wurden 0,5 μ g LMP-1:CD40-Expressionsplasmid in 293-T Zellen transfiziert, Proteinextrakte präpariert und die Aktivierung des CD83-Promotors mit Hilfe des Luziferase-Assays analysiert. Das LMP-1:CD40-Fusionsprotein aktiviert alle CD83-Promotormutanten bis auf die pGL CD83 (-123mut) Mutante, in der die NF- κ B-Bindestelle mutiert wurde (Abb. 18b). Weiterhin wurde in Co-Transfektionsstudien aller CD83-Promotor-Luziferase-Konstrukte mit dem LMP-1:CD40-Fusionsprotein und d/n I- κ B, geprüft, ob die LMP-1:CD40 vermittelte Aktivierung des CD83-Promotors über den NF- κ B-Signalweg verläuft. Auch in diesem Falle konnte genauso wie für das WT-LMP-1 Protein eine vollständige Hemmung der Aktivierung durch d/n I- κ B beobachtet werden (Abb. 18b). Diese Ergebnisse zeigen, daß auch CD40 den CD83-Promotor über den NF- κ B-Signalweg aktiviert.

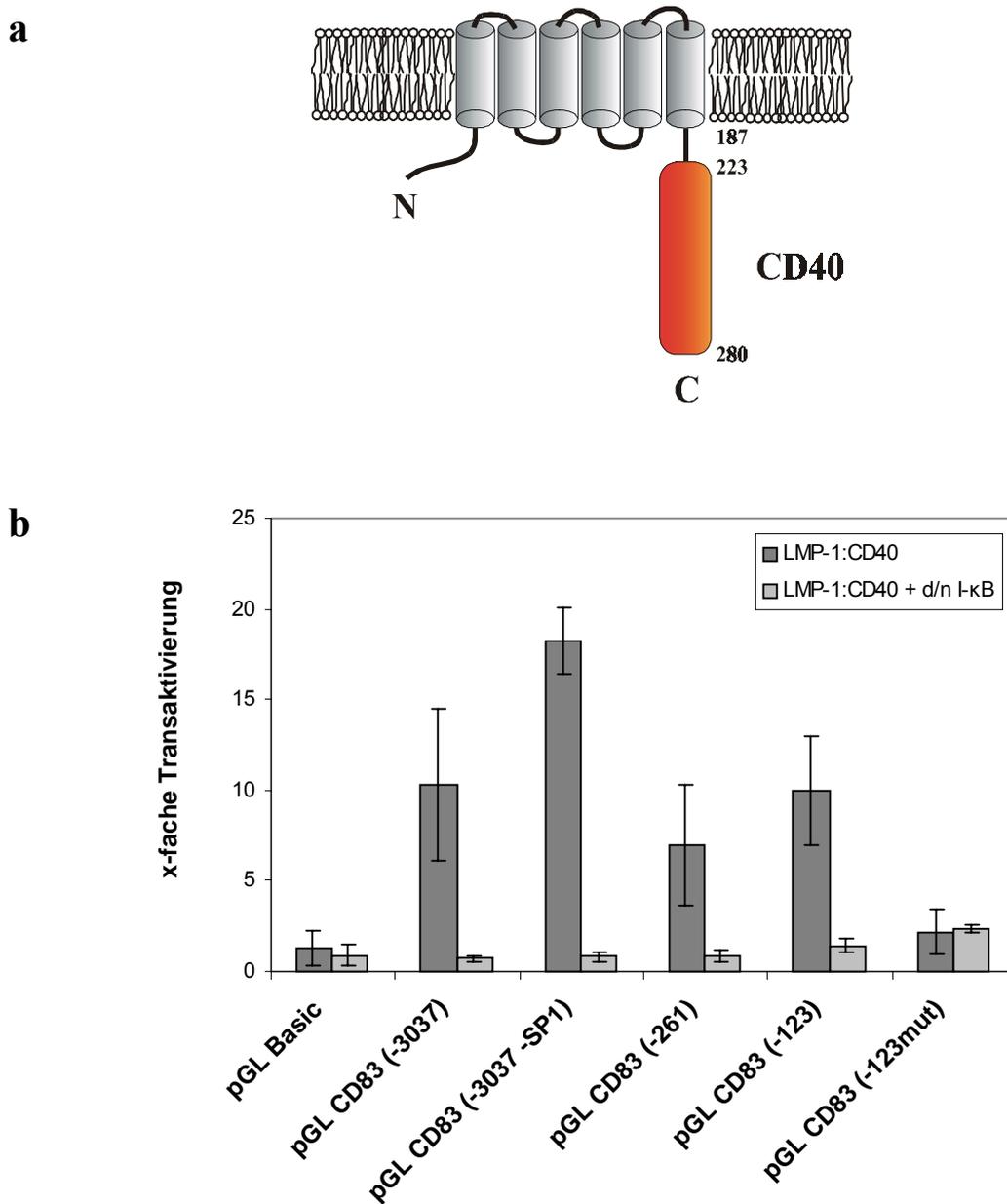


Abbildung 18: CD40 reguliert den CD83-Promotor über den NF-κB-Signalweg

- a) Darstellung des LMP-1:CD40 Fusionsproteins. Der N-terminale C-Terminus und die Transmembrandomäne von LMP-1 wurden mit dem intrazellulären C-Terminus von CD40 fusioniert. CD40 wird damit konstitutiv aktiv.
- b) 4×10^5 293-T Zellen wurden pro Loch in eine 6-Loch Platte eingesät und einen Tag später transfiziert mit jeweils 50ng CD83-Promotor/Luziferase-Konstrukten (pGL CD83 (-3037), pGL CD83 (-3037 ΔSP1), pGL CD83 (-261), pGL CD83 (-123), pGL CD83 (-123mut)), 0,5μg Expressionsplasmid LMP-1:CD40, bzw. zur Kontrolle mit 0,5μg Leervektor (Phebo SV40). Zusätzlich wurde d/n IκB (1,5μg) mittransfiziert. Als Kontrolle der Transfektion wurden 10ng eines PGK-β-Galaktosidase Expressionsplasmids co-transfiziert. Die transfizierten Zellen wurden für 16-20h in DMEM-Medium kultiviert, Proteinextrakte präpariert und der Umsatz von Luziferin durch die Luziferase, bzw. von Galacton durch die β-Galaktosidase photometrisch bestimmt. Die erhaltenen Werte wurden aufeinander abgeglichen und die x-fache Transaktivierung, bezogen auf den Leervektor, berechnet. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert aus drei Doppel-Experimenten, nach Korrektur auf die Transfektionseffizienz. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung der ermittelten Werte dar.

3.5.8 LMP-1:TNF-R1 und LMP-1:TNF-R2 Fusionsgene aktivieren den CD83-Promotor

In der Literatur wurde beschrieben, daß auf dendritischen Zellen die CD83-Expression durch Zugabe von TNF- α induziert werden kann (Lyakh *et al.*, 2000; Sallusto und Lanzavecchia, 1994). Auch andere co-stimulatorische Moleküle wie CD80 und CD86 (Arrighi *et al.*, 2001) scheinen durch TNF- α stimuliert zu werden.

Durch O. Gires und die Gruppe von A. Kieser wurden LMP-1:TNF-R1 und LMP-1:TNF-R2 Fusionsgene generiert, mit deren Hilfe die TNF-Rezeptor-Signalkaskade durch Transfektion untersucht werden kann. Diese Systeme sind von großem Vorteil, da sie unabhängig von der Zugabe von TNF- α funktionieren und eine gezielte Untersuchung von Promotoren zulassen.

Zu diesem Zwecke wurden die CD83-Promotormutanten zusammen mit den LMP-1:TNF-R1, bzw. LMP-1:TNF-R2 Fusionsgenen oder dem Leervektor zusammen mit dem antiapoptotischen p35 Expressionsplasmid co-transfiziert und 24 Stunden später die Luziferaseaktivität bestimmt. Das p35 Protein ist ein allgemeiner Caspase-Inhibitor aus dem Baculovirus „*Autographa californica nuclear polyhedrosis virus*“ (AcMNPV) und blockiert die über den TNF-R1 induzierte Apoptose (Clem *et al.*, 1991; Seshagiri und Miller, 1997; Xue und Horwitz, 1995). Zur Transfektionskontrolle wurde in jedem Ansatz das Expressionsplasmid der unter dem PGK-Promotor stehenden β -Galaktosidase mittransfiziert. Außerdem wurde mittels Western-Blot verifiziert, ob das mit einem HA-Epitop fusionierte LMP-1:TNF-R1 Fusionsprotein in Co-Transfektionen mit den CD83-Promotormutanten pGL CD83 (-123) und pGL CD83 (-123mut) gleich stark exprimiert ist (Abb. 19c). Die LMP-1:TNF-R1 und LMP-1:TNF-R2 Fusionsproteine aktivieren beide den CD83-Promotor, nicht jedoch die NF- κ B-Mutante pGL CD83 (-123mut) (Abb. 19a, b). Dadurch konnte gezeigt werden, daß die Transaktivierung des CD83-Promotors durch die TNF-Rezeptoren über NF- κ B reguliert wird.

Aufgrund der vorangegangenen Experimente konnte eindeutig gezeigt werden, daß die wichtigsten Familienmitglieder der TNF-R Familie (TNF-R1, TNF-R2, CD40) und das virale LMP-1 Protein den CD83-Promotor über den NF- κ B-Signaltransduktionsweg transkriptionell aktivieren. Weiterhin liefern die Ergebnisse einen Hinweis auf die Rolle von CD83 in Aktivierungsprozessen in der Zelle. Der NF- κ B-Signalweg ist einer der wichtigsten, wenn nicht der wichtigste Weg, mit dem die Zelle schnell und effektiv auf verschiedenste äußere als auch innere Faktoren reagieren kann. Diese Befunde unterstreichen die Notwendigkeit mehr über

die Funktion von CD83 im Rahmen der Immunantwort und der B-Zell-Immortalisierung zu lernen.

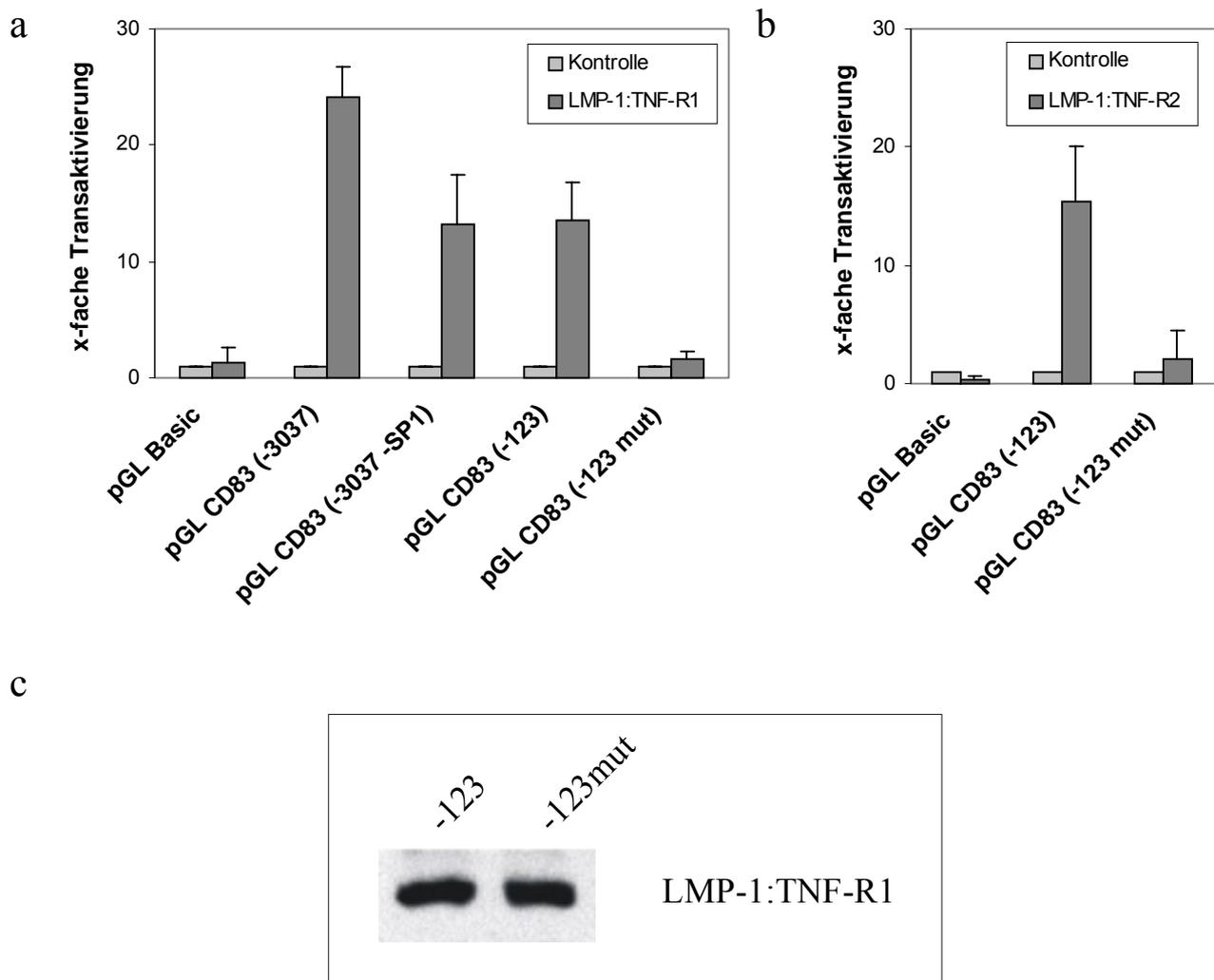


Abbildung 19: Transaktivierung des CD83-Promotors durch LMP-1:TNF-R1 und -R2

- a, b) 4×10^5 293-T Zellen wurden pro Loch in eine 6-Loch Platte eingesät und einen Tag später transfiziert mit jeweils 50ng CD83-Promotor/Luziferase-Konstrukten (pGL CD83 (-3037), pGL CD83 (-3037 Δ SP1), pGL CD83 (-123), pGL CD83 (-123mut)), 0,5 μ g Expressionsplasmid LMP-1:TNF-R1 oder -R2, bzw. zur Kontrolle mit 0,5 μ g Leervektor. In allen Transfektionsansätzen wurde das anti-apoptotische p35 Expressionsplasmid (1,5 μ g) co-transfiziert. Als Kontrolle der Transfektion wurden 10ng eines PGK- β -Galaktosidase Expressionsplasmids mittransfiziert. Die transfizierten Zellen wurden für 16-20h in DMEM-Medium kultiviert, Proteinextrakte präpariert und der Umsatz von Luziferin durch die Luziferase, bzw. von Galacton durch die β -Galaktosidase photometrisch bestimmt. Von den erhaltenen Werten wurde die x-fache Transaktivierung, bezogen auf den Leervektor, berechnet. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert aus drei Zweifach-Experimenten, nach Korrektur auf die Transfektionseffizienz. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung der ermittelten Werte dar.
- c) 4×10^5 293-T Zellen wurden in 6-Lochplatten eingesät, am nächsten Tag mit 0,5 μ g LMP-1/TNF-R1 Expressionsplasmid, 1,5 μ g p35 Expressionsplasmid, 10ng β -Galaktosidase, 50ng pGL CD83 (-123), bzw. pGL CD83 (-123mut) transfiziert und 24h später Proteinextrakte mit einem SDS- β -ME Puffer hergestellt. Die Proteine wurden sonifiziert, jeweils gleiche Proteinmengen auf ein 10%-iges SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen, elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran (Hybond-P) geblottet und mit einem anti-HA-Antikörper detektiert.

3.6 Alternatives Spleißen von CD83

Die zellulären co-stimulatorischen Moleküle CD80, CD86, CTLA-4 oder CD28 werden aufgrund ihrer Sequenzhomologien in den extrazellulären C-Typ und V-Typ Immunglobulin-ähnlichen Domänen der Immunglobulin-Supergen Familie (IgSF) zugeordnet (Azuma *et al.*, 1993; Bajorath *et al.*, 1994; Brunet *et al.*, 1987; Freeman *et al.*, 1989, 1993; Linsley *et al.*, 1992, 1994, 1995). Von all diesen co-stimulatorischen Faktoren wurden verschiedene alternative Spleißvarianten beschrieben (Lee *et al.*, 1990; Guo *et al.*, 1995; Magistrelli *et al.*, 1999, 2001; Jeannin *et al.*, 2000; Inobe *et al.*, 1994; 1996). Einige dieser Spleißprodukte zeigen inhibitorische Wirkung (wie im Falle von CTLA-4; Oaks *et al.*, 2000) oder aktivierende co-stimulatorische Wirkung (wie im Falle von CD86; Jeannin *et al.*, 2000) auf das Proliferationsverhalten von peripheren Blut-Monocyten (PBMCs) und T-Zellen. Auch CD83 ist ein Mitglied dieser Ig-Supergen Familie und besitzt eine Ig-ähnliche Domäne vom V-Typ (Zhou *et al.*, 1992). Im Hinblick auf die anderen Mitglieder der Immunglobulin-Supergen Familie war es naheliegend zu prüfen, ob auch CD83 einer Regulation durch alternatives Spleißen unterliegt.

3.6.1 Spleißvarianten in ER/EB2-5, BL41-Triplett und anderen Zelllinien

Zunächst sollten die CD83-positiven ER/EB 2-5 Zellen auf Expression von alternativen CD83-Varianten überprüft werden. Dazu wurden Gesamt-RNAs von für 0 und 6 Stunden induzierten sowie proliferierenden ER/EB2-5 Zellen in cDNA umgeschrieben und eine RT-PCR mit CD83-Primern durchgeführt, die die kodierende Region von CD83 umspannen.

Falls es keine alternativen Spleißprodukte gäbe, sollte die amplifizierte Bande eine Größe von 618bp ohne Primersequenzen zeigen. Wie in Abbildung 20 zu erkennen ist, konnte aus ER/EB2-5 Zellen, denen 4 Tage Östrogen entzogen wurde, keine cDNA amplifiziert werden, was sehr gut mit den bis dahin gewonnenen Daten (vergleiche Abb. 6) korrelierte. Nach 6 Stunden Induktionszeit wurden insgesamt drei verschiedene Produkte nachgewiesen, in kontinuierlich proliferierenden ER/EB2-5 Zellen nur noch zwei. Die erhaltenen Banden wurden als CD83-TM, CD83-a, und CD83-b bezeichnet. Die etwaigen Größen der erhaltenen Produkte sind für CD83-a 598 und für CD83-b 388 Basenpaare ohne Primersequenzen.

Gleichzeitig wurde dieser Versuch auch am BL41-Triplett durchgeführt. Dabei wurde festgestellt, daß in allen drei Zelllinien CD83 als Transmembranform exprimiert wird, die Stärke des Signals jedoch von BL41 über BL41/P3HR1 hin zu BL41/B95-8 Zellen zunahm. Außerdem

konnte in allen drei Zelllinien die CD83-b Spleißvariante und in BL41-B95-8 zusätzlich die CD83-a Spleißform detektiert werden (Abb. 20).

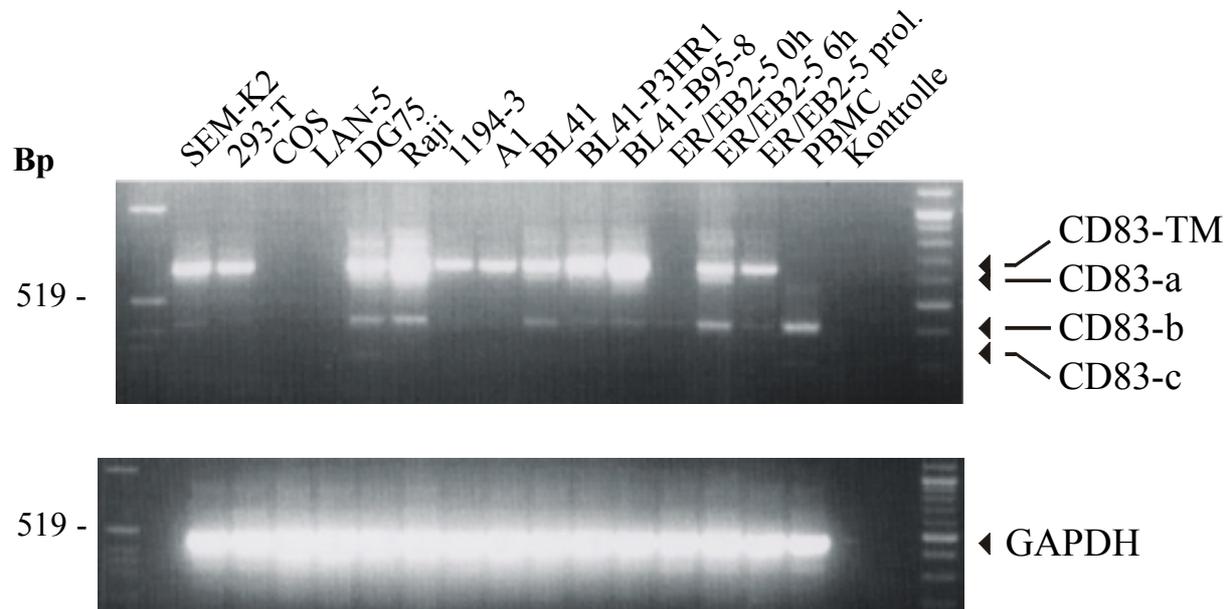


Abbildung 20: Alternatives Spleißen von CD83 in verschiedenen Zelllinien

Von jeweils 5 µg Gesamt-RNA wurde cDNA synthetisiert und eine RT-PCR mit CD83-Primern (oben), die den gesamten ORF umspannen (CD83 5.9 von Position nt1, CD83 3.17 von Position nt618), bzw. GAPDH-Primern (unten) durchgeführt. 5 µl des PCR-Ansatzes wurden mit DNA-Ladepuffer versetzt, auf ein 2%-iges EtBr-haltiges TAE-Agarose-Gel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Abschließend wurde das Gel unter UV photographiert. Die PCR-Produkte, die die Spleißvarianten von CD83 repräsentieren, wurden als CD83-a, CD83-b und CD83-c bezeichnet, während CD83-TM das komplette Produkt darstellt.

In den Zelllinien A1 (nähere Beschreibung unter 3.8.1.2) und der frühen B-Zelllinie SEM-K2, die in der FACSTM-Analyse und im Northern-Blot negativ für CD83 sind (Daten nicht gezeigt), konnte die CD83-TM Variante durch RT-PCR nachgewiesen werden. Die Zelllinie Raji und DG75 exprimierten die CD83-Spleißvarianten (Abb. 20) sehr stark. In COS und LAN-5 Zellen konnte keine CD83 mRNA nachgewiesen werden. Zur Kontrolle wurden alle cDNAs mit GAPDH-Primern amplifiziert und ein Produkt nachgewiesen. In der cDNA unstimulierter, frisch isolierter PBMCs wurde CD83 fast nicht als TM-ständige Form detektiert, dafür trat in diesen Zellen eine weitere ca. 281bp (ohne Primersequenzen) große CD83-Spleißvariante auf, die an dieser Stelle als CD83-c mRNA definiert wurde. Diese Variante konnte auch in DG75 Zellen beobachtet werden.

3.6.2 Verifikation der Spleißvarianten

Die erhaltenen Spleißprodukte wurden sowohl aus ER/EB2-5 als auch aus PBMCs isoliert, in den Vektor pcDNA3.1 kloniert, sequenziert und in der Datenbank sowohl mit der genomischen als auch mit der mRNA Sequenz von CD83 verglichen. Dabei wurde bestätigt, daß die größte ca. 618bp auftretende Bande die „full length“ CD83-Form mit der Transmembrandomäne, CD83-TM, darstellt (Abb. 21). Die drei kürzeren Formen sind trunke RNA-Varianten von CD83, denen Teile eines Exons oder gesamte Exons fehlen. Abbildung 21 gibt einen Überblick über die Spleißvarianten von CD83.

Die 598bp Form zeigt eine Deletion von Basenpaar 364-382 (CD83-a, Abb. 21), begonnen vom Translations-Initiations-Codon ATG aus gesehen. Dieses Produkt wird nur in sehr geringen Konzentrationen produziert und konnte nur zweimal kloniert werden. Die 388bp Spleißvariante zeigt eine Deletion zwischen Basenpaar 154 und 382 (CD83-b, Abb. 21). Diese Form scheint unter den Spleißvarianten die dominierende zu sein. Das kleinste der erhaltenen Fragmente repräsentiert eine Deletion zwischen den Basenpaaren 154 und 489 (CD83-c, Abb. 21). Der Vergleich mit der genomischen Sequenz und das Hinzuziehen von bekannten Akzeptor- und Donor-Spleißstellen (Datenbanken) bestätigte, daß die kürzeren cDNAs durch alternatives Spleißen erzeugt werden können. Im Falle von CD83-a wird eine alternative Spleißdonorstelle in Exon 3 (Position 363) benutzt, während in CD83-b, bzw. CD83-c das Exon 3, bzw. die Exons 3 und 4 komplett herausgespleißt werden (Abb. 21). Exon 3 kodiert für den größten Teil der V-Typ Ig-ähnlichen Domäne und Exon 4 für die Transmembrandomäne von CD83.

Aufgrund der Deletionen in den Spleißvarianten CD83-a und CD83-b ändert sich der Leserahmen dieser Moleküle, derart, daß keine Transmembran-Struktur in der Aminosäuresequenz mehr vorhanden ist. Letztendlich führt die Änderung des Leserahmens zu einem verfrühten Abbruch in der Sequenz durch Auftreten eines Stop-Codons, in beiden Fällen an Position nt467 vom Translations-Initiations-Codon ATG beginnend. Im Falle des kleinsten Spleißproduktes ohne Exon 3 und 4 (CD83-c) ändert sich der Leserahmen in der zytoplasmatischen Domäne im Vergleich zur „full length“ CD83 mRNA nicht. Die CD83-c Variante verliert damit sowohl den größten Anteil der V-Typ Ig-ähnlichen Domäne sowie die gesamte Transmembrandomäne. Die Spleißvarianten CD83-b und CD83-c konnten mehrfach aus verschiedenen RNA-Präparationen kloniert und durch Sequenzanalyse verifiziert werden. Der Vergleich der Sequenzen mit der genomischen Sequenz der Datenbank zeigte, daß das Intron zwischen Exon 3 und 4 1900bp und das Intron zwischen Exon 4 und 5 1352bp groß ist. Somit konnte

bewiesen werden, daß CD83 alternativ gespleißt wird. Die daraus resultierenden Proteine weisen keine Transmembrandomäne mehr auf und könnten somit lösliche Formen von CD83 darstellen.

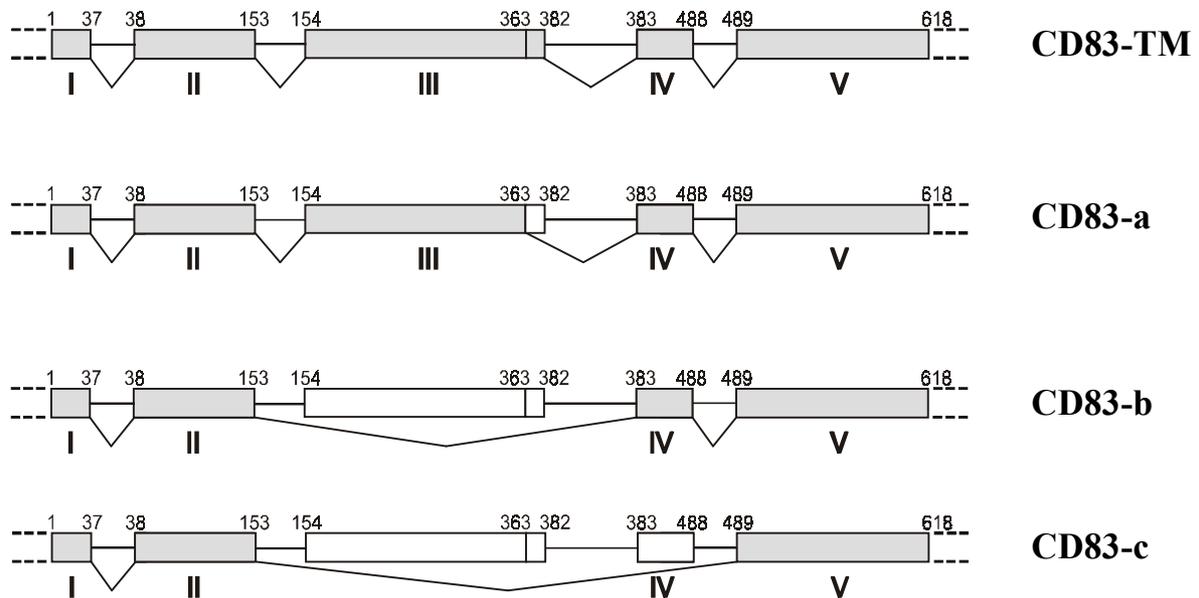


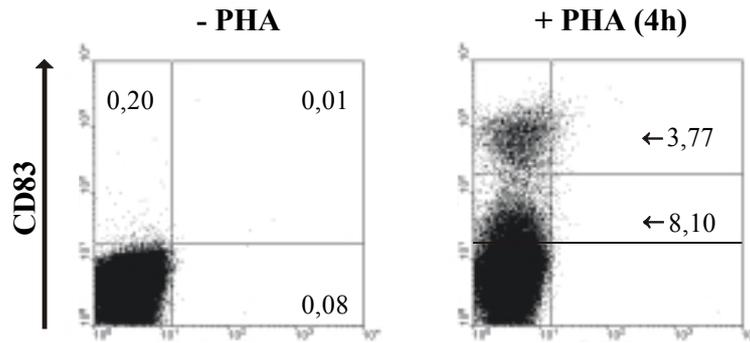
Abbildung 21: Schema der verschiedenen CD83-Spleißvarianten

Der Leserahmen von CD83 setzt sich aus 5 Exons und 4 Introns zusammen. Exon 1 enthält die nt1-37 des ORF, Exon 2 nt38-153, Exon 3 nt154-382, Exon 4 nt383-488 und Exon 5 nt489-618. Das Signalpeptid von CD83 befindet sich in Exon 1 und einem kurzen Teil von Exon 2. Die extrazelluläre Domäne wird von dem größten Teil von Exon 2 und dem gesamten Exon 3 kodiert. Exon 4 enthält die CD83-Transmembrandomäne und Exon 5 den intrazellulären Teil von CD83. Schematisch dargestellt sind die CD83-Varianten CD83-TM, CD83-a, CD83-b und CD83-c. Die Spleißvariante CD83-a zeichnet sich durch ein internes alternatives Spleißen im Exon 3 aus. In der Spleißvariante CD83-b fehlt das gesamte Exon 3. In der Spleißvariante CD83-a und CD83-b führt das alternative Spleißen zu einer Änderung des Leserahmens an Position 383 (entsprechend CD83-TM) und damit zu einem verfrühten Abbruch der Proteinsequenz an Position nt467 (entsprechend CD83-TM). Durch die Änderung des Leserahmens wird die Sequenz der Transmembrandomäne in eine Sequenz umgewandelt, der jegliche Homologie zu anderen Proteinen fehlt. Die Spleißvariante CD83-c enthält nur Exon 1, 2 und 5. Der Leserahmen bleibt der gleiche wie von CD83-TM. Auch in dieser Variante gibt es keine TM-Domäne mehr.

3.6.3 Lösliche CD83-Varianten sind nur in unstimulierten PBMCs exprimiert

Aufgrund der Tatsache, daß in unstimulierten PBMCs die Transmembranform kaum detektiert werden konnte, sollte überprüft werden, ob CD83 nach Aktivierung an der Oberfläche nachweisbar wird und ob sich das Spleißmuster der CD83 mRNA-Varianten ändert.

a



b

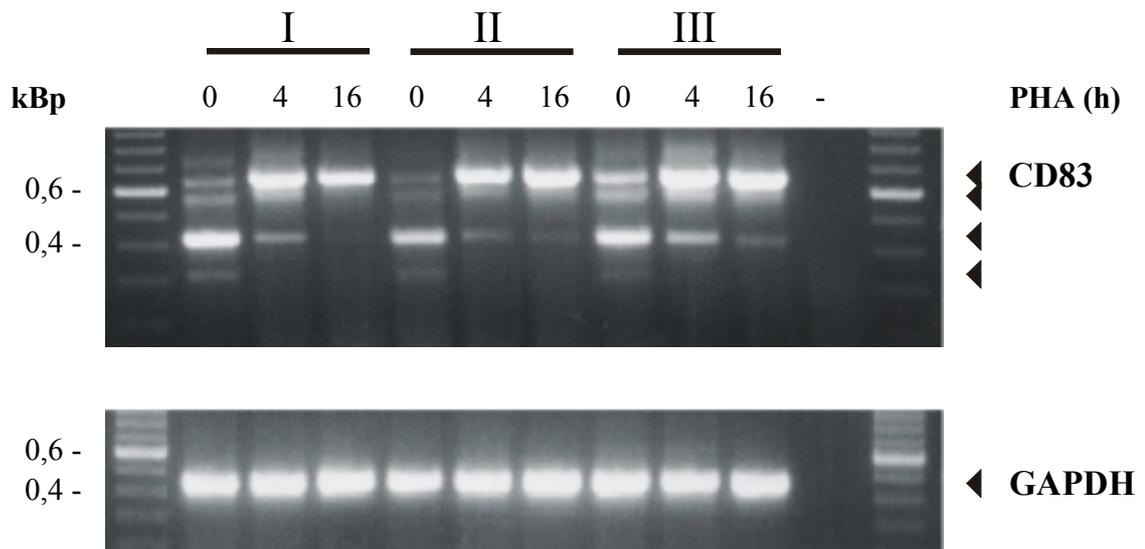


Abbildung 22: Expression von löslichem und Transmembran-ständigem CD83 in PBMCs

PBMCs wurden aus Buffy Coats oder aus Frischblut über Ficoll aufgereinigt. Die Zellen wurden anschließend für 0, 4 und 16h mit PHA bei 37°C inkubiert, danach Gesamt-RNA präpariert oder die Zellen durch FACS™-Analyse auf CD83-Färbung untersucht.

- Jeweils 1×10^7 PBMCs wurden mit einem anti-CD83-PE-markierten Antikörper, bzw. mit der Isotypkontrolle (nicht gezeigt) für 30min auf Eis gefärbt. Nach letztmaligem Waschen wurde Propidiumjodid zu den Proben zugegeben, um tote Zellen bei der Analyse auszuschließen. Im Dot-Blot dargestellt sind jeweils 2×10^6 lebende Zellen. Dieser Versuch wurde dreimal mit verschiedenen gesunden Spendern und inhaltlich identischen Ergebnissen wiederholt.
- Von jeweils 5µg Gesamt-RNA wurde cDNA synthetisiert und eine RT-PCR mit CD83-Primern (oben), die den gesamten ORF umspannen, bzw. GAPDH-Primern (unten) durchgeführt. 1/10 des PCR-Ansatzes wurden mit DNA-Ladepuffer versetzt, auf ein 2%-iges EtBr-haltiges TAE-Agarose-Gel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Abschließend wurde das Gel unter UV photographiert. I, II, III entspricht drei verschiedenen PBMC-Spendern. Insgesamt wurden 6 verschiedene gesunde Spender auf differentielles Spleißen von CD83 untersucht.

PBMCs (insgesamt 6 gesunde Spender) wurden mit Phytohämagglutinin (PHA) für 0, 4 und 16 Stunden behandelt. Die Zellen wurden zur FACSTM-Analyse sowie zur Präparation von Gesamt-RNA verwendet. Anschließend wurde die RNA in cDNA umgeschrieben und eine RT-PCR mit Primern, die den gesamten ORF umspannen, durchgeführt. Die Induktion der PBMCs mit PHA zeigte eine Verstärkung der Transmembran-ständigen Form von CD83 nach 4 und 16 Stunden. Dabei konnte festgestellt werden, daß 16 Stunden nach Induktion nahezu keine mRNA Varianten mehr nachweisbar waren (Abb. 22 b), die für lösliches CD83 kodieren könnten. In unstimulierten PBMCs konnte CD83 nicht an der Oberfläche detektiert werden. Nach 4-stündiger Aktivierung der PBMCs mit PHA traten zwei unterschiedlich stark CD83-exprimierende Zellpopulationen mit 3,8 (stark CD83-positiv) und 8,1% (weniger CD83-positiv) in der PBMC-Population auf (Abb. 22a).

Diese Experimente zeigen, daß die mRNA Varianten, die für lösliches CD83 kodieren, nach Aktivierung durch PHA herunterreguliert werden, während die mRNA für membranständiges CD83 heraufreguliert wird.

3.6.4 Analyse der Spleißvarianten im Northern-Blot

Die gleichen RNAs, isoliert aus unstimulierten und mit PHA-stimulierten PBMCs, wurden im Northern-Blot auf ihre Spleißvarianten analysiert. Überraschenderweise konnten in unstimulierten PBMCs nur geringe Mengen an CD83 mRNA gefunden werden, dabei handelte es sich jedoch eher um die membranständige „full length“ CD83 mRNA. 4 Stunden nach Behandlung mit PHA traten drei erkennbare Formen von CD83 auf, wobei die CD83-TM Form stark dominierte. 16 Stunden nach Induktion konnten keine kürzeren Varianten von CD83 nachgewiesen werden. Zur Überprüfung, welche der kürzeren Varianten welchem Spleißprodukt zugeordnet werden kann, wurde der gleiche Northern-Blot, der zuvor mit einer Gesamt-CD83 Sonde hybridisiert worden war, nun mit einer Sonde, die nur die Transmembrandomäne von CD83 beinhaltete (Exon 4), zur Hybridisierung eingesetzt. In dem zweiten Northern-Blot konnte die kleinste Form nicht nachgewiesen werden. Diese stellt demnach das Spleißprodukt CD83-c ohne Exon 3 und 4 dar, die mittlere erkennbare Bande blieb in ihrer Expressionsstärke gleich und wurde nicht beeinflusst, da sie noch Exon 4 trägt (Abb. 23).

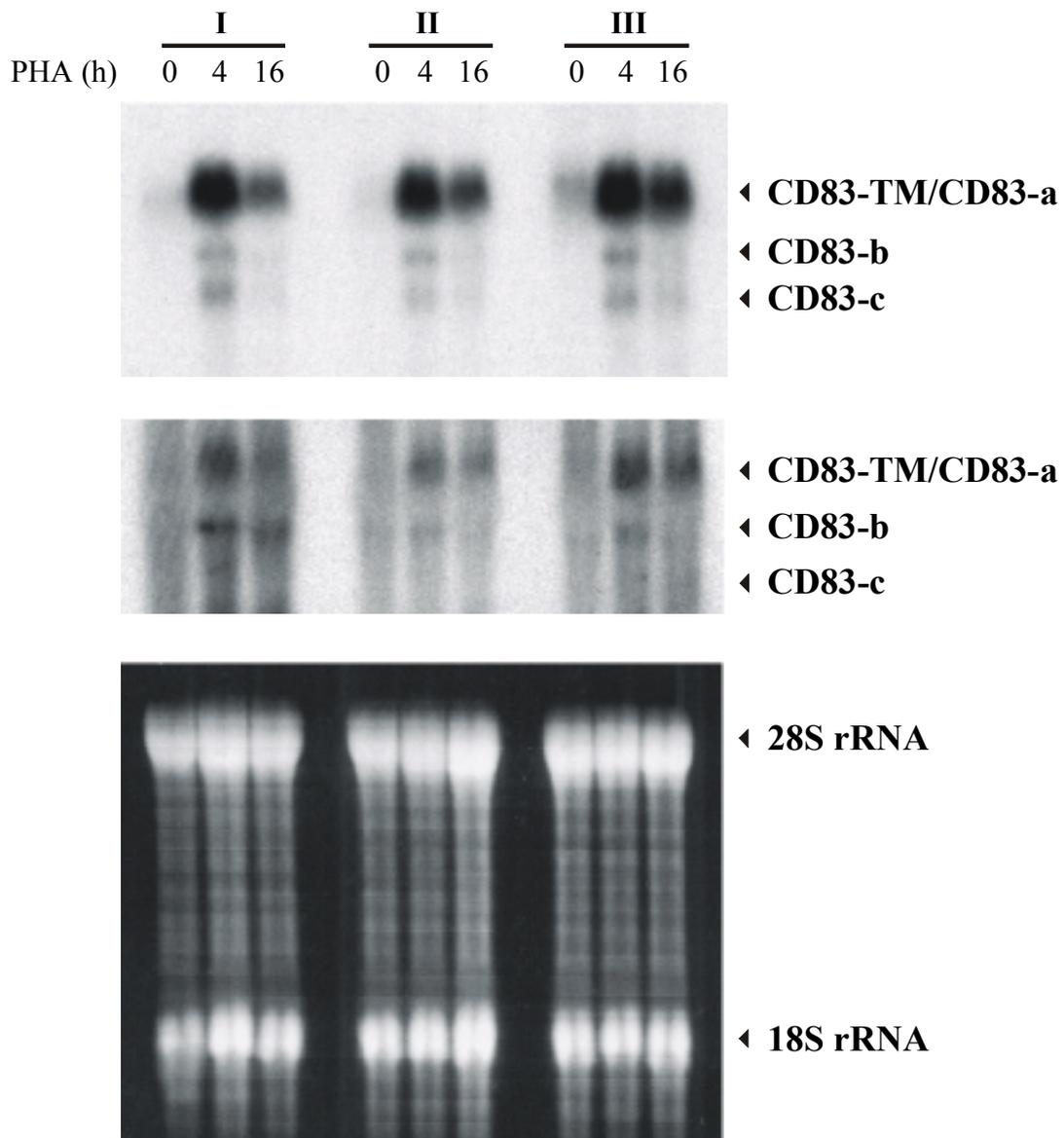


Abbildung 23: Zuordnung der verschiedenen mRNA Formen im Northern-Blot

Jeweils 10µg Gesamt-RNA unstimulierter, bzw. für 4 und 16h mit PHA stimulierter PBMCs, wurden pro Spur auf einem 1%-igen Formaldehyd-Agarose-Gel aufgetragen, elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nylonmembran (Hybond-N⁺) geblottet, ein UV-Cross Link durchgeführt und über Nacht mit einer humanen, radioaktivmarkierten CD83-Sonde (oben), bzw. mit einer Exon 4 CD83-Sonde (Mitte) hybridisiert. Ganz unten dargestellt ist die Beladungskontrolle, des mit EtBr-gefärbten Agarose-Gels. Der Versuch wurde zweimal mit inhaltlich identischen Ergebnissen wiederholt.

3.6.5 Gewebeverteilung

Um nachzuweisen, in welchen Geweben CD83 vorkommt und wo alternative Spleißvarianten exprimiert werden, wurde RNA aus verschiedenen gepoolten Geweben isoliert, in cDNA umgeschrieben und RT-PCRs, mit Primern, die den gesamten ORF von CD83 umspannen, durchgeführt. Die cDNAs wurden freundlicherweise von Dr. U. Behrends zur Verfügung gestellt.

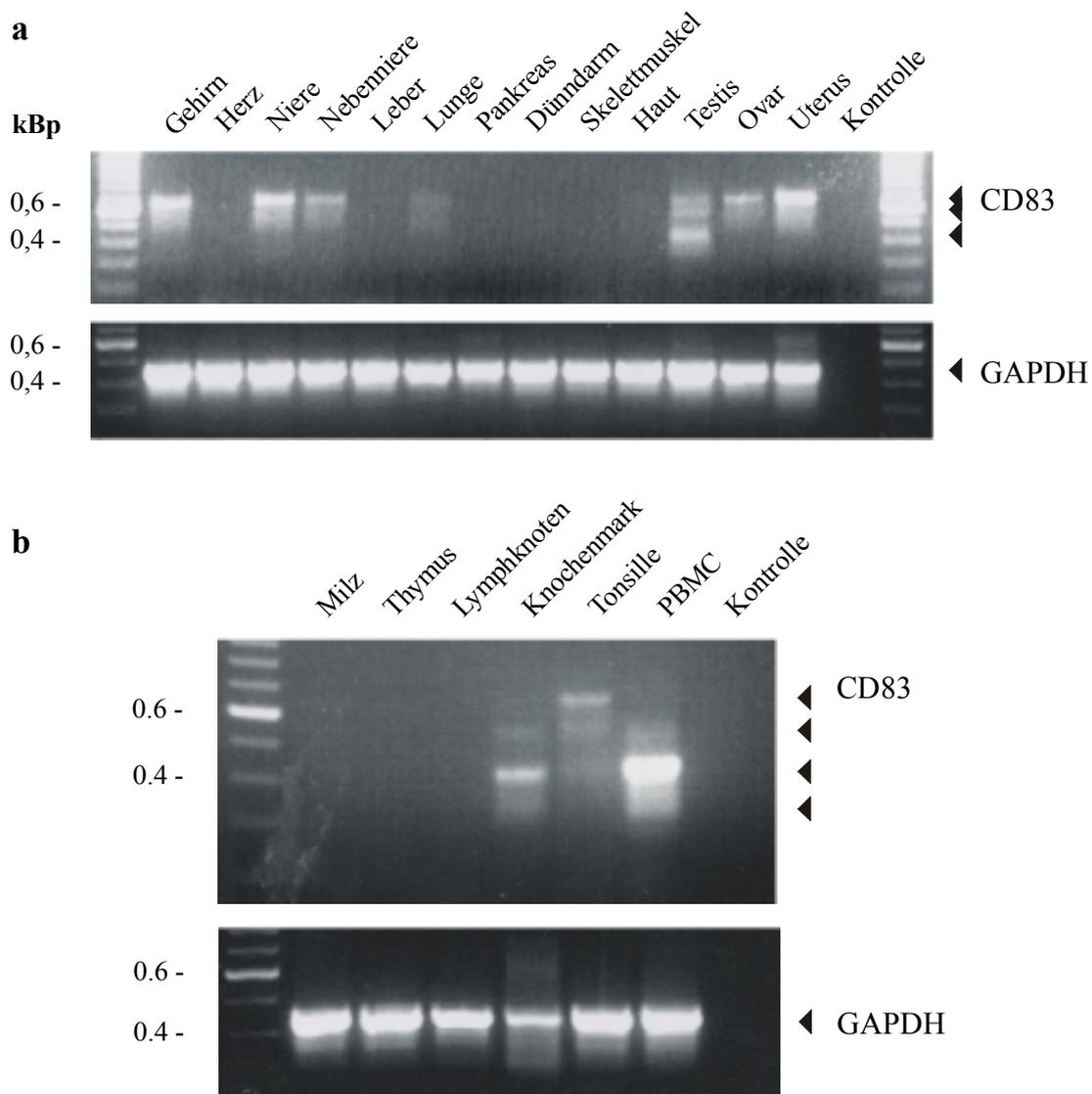


Abbildung 24: CD83 und CD83-Spleißvarianten in verschiedenen Geweben

Gesamt-RNAs aus gepoolten Geweben und Zellen wurden in cDNA umgeschrieben und eine RT-PCR mit den ORF von CD83 umspannenden Primern durchgeführt. cDNA nicht stimulierter PBMCs wurde zur Verifikation der CD83-Spleißvarianten mitgeführt (b). Als Kontrolle wurde GAPDH aus allen Gewebe- und Zellproben amplifiziert. Zur Kontrolle der PCR wurde statt cDNA Wasser eingesetzt, um Kontaminationen auszuschließen. Jeweils 1/10 des PCR-Ansatzes wurden auf einem 2%-igen TAE-Agarose-Gel aufgetrennt. Abschließend wurde das Gel unter UV photographiert.

Sowohl die Transmembran-ständige als auch die löslichen Formen konnten gut in Tonsillen, Testis und in geringen Mengen in der Milz detektiert werden. In Knochenmark wurden nur lösliche Formen von CD83 gefunden. In Gehirn, Niere, Nebenniere, Lunge, Ovar und Uterus sowie in geringen Mengen in Haut und Dünndarm konnte nur die Transmembran-ständige CD83-TM Variante detektiert werden. Keine Expression wurde in Herz, Leber, Pankreas und Skelettmuskel beobachtet. GAPDH wurde zur Kontrolle aus allen Proben amplifiziert (Abb. 24).

3.6.6 Rekombinant hergestelltes lösliches CD83

Für die späteren Untersuchungen zur Funktion der Spleißprodukte wurde die klonierten PCR-Produkte mit einem His-Tag re-amplifiziert. Damit können die von den Spleißvarianten kodierten Produkte angereichert und aufgereinigt werden. Die Primer wurden derart gewählt, daß sie das His-Tag genau vor dem Stop-Codon enthielten. Nach Reamplifikation, Klonierung und Sequenzierung der His-getaggten Spleißprodukte wurden 293-T Zellen transfiziert und die Überstände nach 7 Tagen geerntet. Zu den Überständen wurden NiNTA-Beads zugegeben und die Partikel mit den daran gebundenen Proteinen in SDS-Ladepuffer aufgenommen.

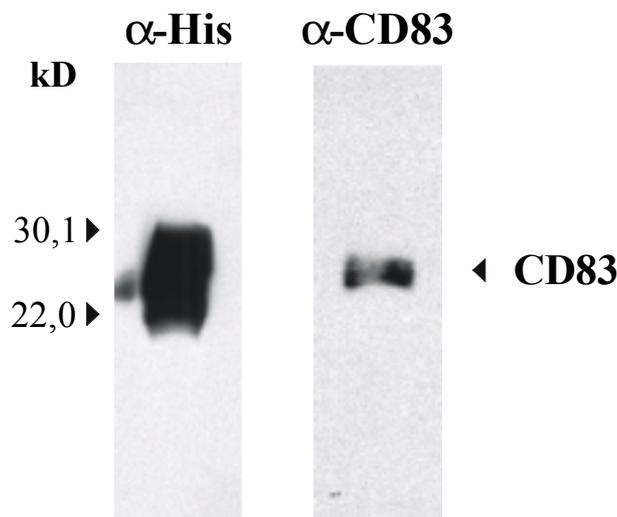


Abbildung 25: Rekombinant hergestelltes lösliches CD83

293-T Zellen wurden auf einer 13cm-Zellkulturschale so ausgebracht, daß sie am nächsten Tag zu 70-80% konfluent waren, um sie mit der Spleißvariante CD83-c im pcDNA3.1 Vektor zu transfizieren. Die Zellen wurden nach Transfektion für 7 Tage in Serum-freien Medium kultiviert, die Überstände abgenommen, über NiNTA CD83-c angereichert und die Partikel in DTT-haltigen Probenpuffer aufgenommen. Anschließend wurden gleiche Proteinmengen auf ein 10%-iges SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen, elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran (Hybond-P) geblotet. Lösliches CD83-c wurde mit einem anti-His- (links), bzw. mit einem anti-CD83-Antikörper (rechts) detektiert. Dieser Versuch wurde dreimal mit inhaltlich identischen Ergebnissen wiederholt.

Durch Western-Blot Analyse wurde sowohl mit einem anti-His als auch mit einem anti-CD83-Antikörper überprüft, ob von den klonierten PCR-Produkten auch Protein hergestellt wurde.

Trotz der Tatsache, daß die Spleißvarianten CD83-a, CD83-b und CD83-c korrekt mit einer His-Tag kodierten Sequenz versehen kloniert waren, gelang es auch nach mehrmaligem Transfizieren und Aufreinigen nicht, die Proteine CD83-a und CD83-b nachzuweisen. Dagegen konnte das kleinste CD83-c Spleißprodukt gut sowohl mit einem anti-His, als auch mit einem anti-CD83-Antikörper nachgewiesen werden (Abb. 25).

3.7 Funktionelle Rolle von CD83 bei der Immunantwort

Professionell Antigen-präsentierende Zellen wie dendritische Zellen nehmen Antigen effizient durch Endozytose auf. Im Gegensatz dazu binden B-Zellen lösliche Moleküle über ihre Immunglobulinmoleküle. Antigene werden aufgenommen zerlegt und Peptide im Peptid:MHC-II-Komplex auf der Oberfläche präsentiert. Aufgrund dieser Eigenschaft können antigenspezifische CD4⁺ T-Zellen aktiviert werden und gezielt die Differenzierung von B-Zellen vorantreiben. B-Zellen exprimieren co-stimulatorische Moleküle nicht konstitutiv, sondern aktivieren diese erst nach Kontakt mit Antigen oder mikrobiellen Bestandteilen. Die wichtigsten der bisher identifizierten co-stimulatorischen Moleküle sind CD80 (B7.1) und CD86 (B7.2). Beide Moleküle sind in der Lage, die T-Zell-spezifischen Moleküle CD28 und CTLA-4 zu binden, wodurch gemeinsam mit dem Signal vom T-Zellrezeptor eine spezifische T-Zellantwort ausgelöst wird (*Linsley et al., 1994; van der Merwe et al., 1997*).

CD83 wird auf reifen dendritischen Zellen und auf aktivierten B-Zellen exprimiert. (*Zhou et al., 1992*). Aufgrund dieser Tatsache und aufgrund der Einordnung in die Immunglobulin-Supergen Familie wird angenommen, daß CD83 co-stimulatorische Funktionen bei der Aktivierung von T-Zellen besitzt. Ein Ligand von CD83 konnte bislang nicht identifiziert werden.

Um einen ersten Hinweis auf die Funktion von CD83 bei der Immunantwort zu erhalten, sollten verschiedene Systeme getestet werden, in denen Aktivierung und Proliferation von T-Zellen als auch die Proliferation von PBMCs nach Stimulation mit CD83-positiven Zellen gemessen werden kann.

3.7.1 Untersuchungen der Aktivierung CD4⁺ T-Zellen

3.7.1.1 Untersuchung der Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen durch unterschiedlich stark CD83-exprimierende LCLs

Als erstes stellte sich die Frage, ob EBV-infizierte B-Zellen (LCLs) bezüglich ihrer CD83-Expression besser oder schlechter von T-Zellen erkannt werden. Deshalb wurden diverse LCL-Zelllinien zunächst auf das Ausmaß ihrer CD83-Expression überprüft und anschließend in einem T-Zell-Assay die Aktivierung von humanen CD4⁺ T-Zellen gemessen. Dazu wurden verschiedene LCL-Zellen zur FACSTM-Analyse mit einem anti-CD83-Antikörper gefärbt. Die Zelllinien LCL 4, LCL 6, LCL 1.11, LCL 3.3, LCL 1.5, LCL UB, LCL JM und LCL SM, waren stark positiv für CD83. Weniger CD83 exprimierten die Zelllinien LCL 1, LCL 1.13, LCL 1.22 und LCL 1.24, LCL 1.26. Eine Expression von CD83 auf den Zelllinien LCL 2, LCL 1.9, LCL 1.27, LCL 1.28 und der LCL Kunert konnte nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Für eine vergleichende Analyse wurden die Zelllinien LCL 1.11, LCL 1.24, LCL 1.26 und LCL 1.27 ausgewählt, die eine sehr hohe bis keine Expression von CD83 zeigten (Abb. 26 a).

Zur Detektion der Antigenpräsentation im Kontext von MHC-Klasse-II wurden die CD4⁺ T-Zellklone 20-4/A4 und Clone-1 von J. Mautner zur Verfügung gestellt (KMOLBI, GSF-München). Der T-Zellklon 20-4/A4 erkennt ein Peptid des bakteriellen Proteins Neomycin-Phosphotransferase (NeoR), der T-Zellklon Clone-1 erkennt ein Peptid des Influenza-Hämagglutininproteins (HA). Die Präsentation des NeoR-Peptids erfolgt im Kontext von HLA-DP3 auf der Zelloberfläche der Zelllinien LCL 1.11 und LCL 1.24, während HA-Peptid im Kontext von HLA-DR1 auf der Oberfläche von LCL 1.26 und LCL 1.27 Zellen präsentiert wird. Bei Aktivierung CD4⁺ T-Zellen kommt es zur Sekretion verschiedener Zytokine wie IL-2, TNF- α und GM-CSF, die mittels ELISA nachgewiesen werden können. LCLs wurden mit Protein für 24 Stunden inkubiert, gewaschen und anschließend mit den T-Zellklonen für weitere 24 Stunden co-kultiviert. Anschließend wurde die GM-CSF Freisetzung mittels ELISA gemessen.

Alle analysierten LCLs regten die GM-CSF Produktion der T-Zellklone an. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der stark CD83-exprimierenden Zelllinie LCL 1.11 und der CD83-negativen Zelllinie LCL 1.27 festgestellt werden (Abb. 26b). Alle diese Zelllinien exprimieren die co-stimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 sehr stark auf ihrer Oberfläche (Daten nicht gezeigt). Damit läßt sich an dieser Stelle festhalten, daß CD83 als co-stimulatorisches Molekül eher eine untergeordnete Rolle in der Antigenpräsentation spielt, zumin-

dest solange andere co-stimulatorische Moleküle die Funktion der T-Zellaktivierung übernehmen können.

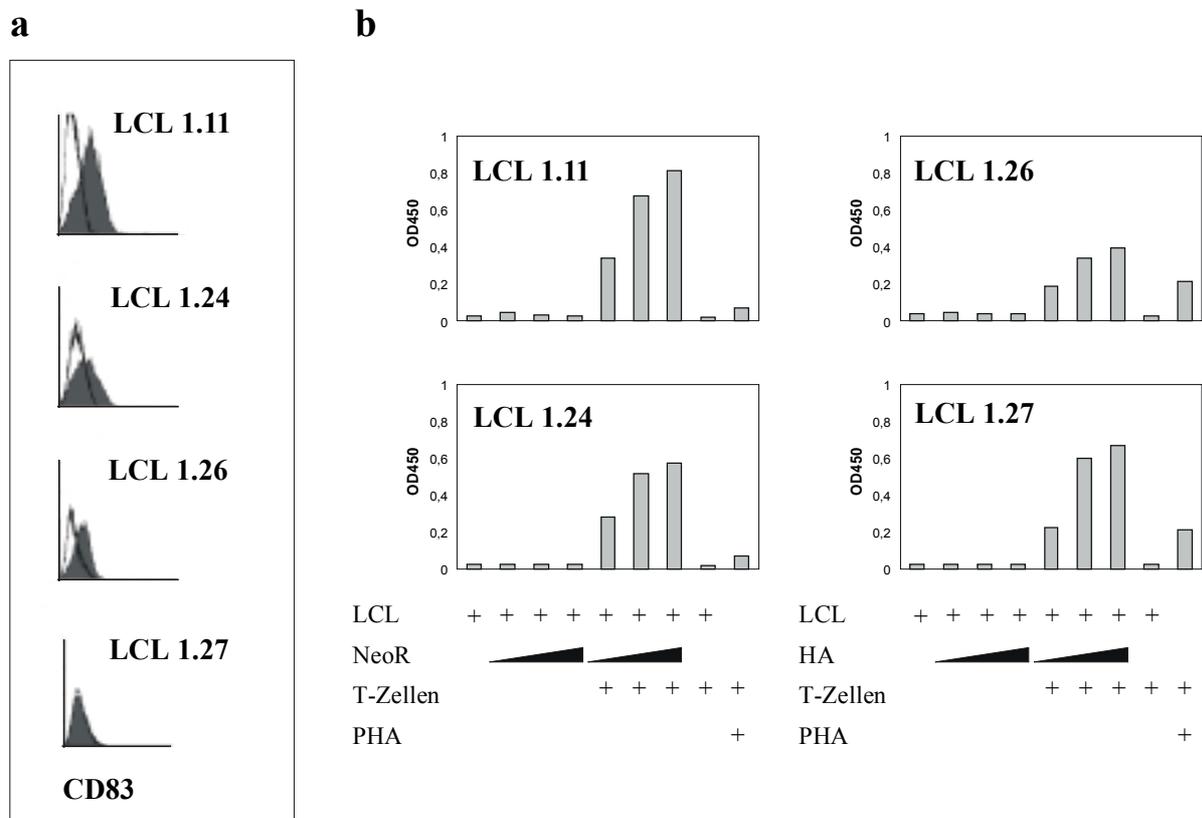


Abbildung 26: T-Zell-Stimulation in Abhängigkeit von der CD83-Expression

- a) Jeweils 2×10^5 LCL 1.11, LCL 1.24, LCL 1.26 und LCL 1.27 wurden mit einem anti-CD83-Antikörper (grau, gefüllt), bzw. mit einer Isotypkontrolle (ungefüllt) für 30min auf Eis inkubiert, anschließend ungebundener Antikörper durch Waschen entfernt und für weitere 20min mit dem DTAF-gekoppelten Sekundärantikörper gefärbt. Im Histogramm dargestellt wurden 2×10^4 als lebend definierte Zellen.
- b) LCL 1.11 und LCL 1.24 wurden in Gegenwart von steigenden Konzentrationen an exogenem NeoR Protein (10, 50, 100ng/ml), die Zelllinien LCL 1.26 und LCL 1.27 in Gegenwart von steigenden Konzentrationen an exogenem HA Protein (10, 50, 100ng/ml) für 24 Stunden kultiviert. Danach wurden die Zellen viermal mit Medium ohne NeoR und HA gewaschen und mit dem T-Zellklon 20-4/A4, bzw. Clone-1 co-kultiviert. Als Positivkontrolle wurde den T-Zellen PHA zugesetzt. Die GM-CSF Sekretion wurde mit einem GM-CSF ELISA ermittelt.

3.7.1.2 Untersuchung der Funktion von CD83 in A1 Zellen

Die Zelllinie A1 leitet sich von der ER/EB2-5 Zelllinie ab und wurde durch stabile Transfektion eines episomalen konstitutiven *c-myc/Igκ* Expressionsplasmids in ER/EB2-5 Zellen hergestellt (Polack *et al.*, 1996). A1 Zellen wachsen in Einzelzellsuspension und tragen kaum Adhäsionsmoleküle und Aktivierungsmarker (Pajic *et al.*, 2001; Polack *et al.*, 1996). Im Vergleich zu ER/EB2-5 Zellen sind MHC-Klasse-I- und MHC-Klasse-II-Moleküle herunterreguliert.

liert (*Staeger et al., 2002*). Dadurch verhalten sich A1 Zellen in Abwesenheit von Östrogen wie BL-Zellen der Latenz I. Der Vergleich der stimulatorischen Aktivität von A1 Zellen und ER/EB2-5 Zellen in einer allogenen gemischten Lymphozytenkultur (mixed lymphocyte reaction, MLR) zeigte, daß A1 Zellen eine weit geringere Proliferation von PBMCs hervorrufen als ER/EB2-5 Zellen (*Staeger et al., 2002*).

Da in Vorversuchen gezeigt werden konnte, daß A1 Zellen kein CD83 exprimieren, sollten die A1 Zellen stabil mit CD83 transfiziert, bzw. retroviral transduziert werden. Aufgrund der Tatsache, daß A1 Zellen eine nur geringe Aktivierung von PBMCs zeigen, sollte der Einfluß der CD83-Expression auf die Stimulation Antigen-spezifischer CD4⁺ T-Zellklone sowie die Proliferation von PBMCs in einer MLR untersucht werden.

Um die Funktion von CD83 in den A1 Zellen studieren zu können, wurde der ORF von CD83 in den retroviralen Vektor pINCO kloniert und A1 Zellen damit transfiziert. Durch Puromycinselektion (0,5-1µg/ml Puromycin) wurde nach 4-6 Wochen ein stabiler CD83-positiver A1-Klon erhalten (Abb. 27b).

Gleichzeitig kann der retrovirale Vektor pINCO auch dazu benutzt werden, Retroviren zu produzieren. Dazu wurde das Plasmid in die Verpackungszelllinie Phoenix transfiziert. Als Kontrollen wurden pINCO/CD80 und pINCO/GFP verwendet. 2-3 Tage später wurde der Überstand abgenommen, von groben Bestandteilen durch Zentrifugation befreit und sterilfiltriert. Anschließend wurden A1 Zellen mit pINCO/CD83, bzw. zur Kontrolle mit pINCO/CD80 oder pINCO/GFP infiziert (FACS, Abb. 27c und Daten nicht gezeigt). Sowohl transfizierte als auch infizierte A1 Zellen wurden im T-Zell-Assay, bzw. in der MLR eingesetzt.

Für den T-Zell-Assay stand der CD4⁺ T-Zell-Klon 2B3 zur Verfügung (zur Verfügung gestellt von J. Mautner), der TPB (Tryptose Phosphate Broth) erkennt. Die A1 und die CD83-positiven A1 Zellen wurden über Nacht mit TPB inkubiert, anschließend gewaschen und mit dem T-Zell-Klon 2B3 über Nacht co-kultiviert.

Die Überstände wurden auf GM-CSF Ausschüttung im ELISA untersucht. Die stabil mit CD83 transfizierten oder mit retroviralem CD83 infizierten Zellen zeigten im T-Zell-Assay keine höhere Aktivierung der T-Zellen im Gegensatz zu normalen A1 Zellen (Abb. 28 und Daten nicht gezeigt).

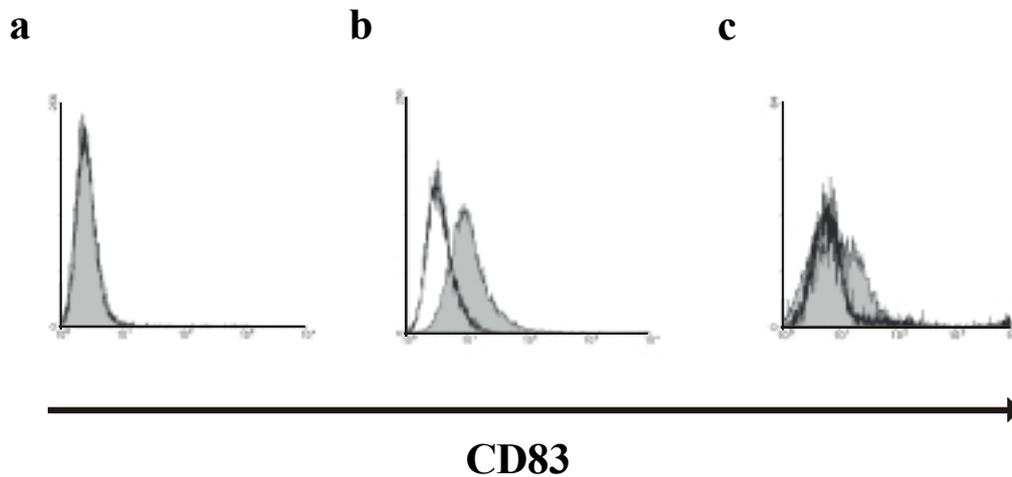


Abbildung 27: CD83-Expression der pINCO/CD83 transfizierten und infizierten A1 Zellen

A1 Zellen wurden mit pINCO/CD83 transfiziert (b) oder retroviral infiziert (c) und anschließend die CD83 Oberflächenexpression durch FACSTM-Analyse überprüft. Zur Kontrolle wurden CD83-negative A1 Zellen dargestellt (a). Jeweils 2×10^5 (a, b), bzw. 1×10^4 (c) A1 Zellen wurden mit einem anti-CD83-Antikörper (grau, gefüllt), bzw. mit einer Isotypkontrolle (ungefüllt) für 30min auf Eis inkubiert, anschließend der überschüssige Antikörper durch Waschen entfernt und für weitere 20min mit einem DTAF-gekoppelten Sekundäntikörper gefärbt. Dargestellt sind jeweils 2×10^4 (a, b), bzw. 5×10^3 (c) als lebend definierte Zellen.

In einem weiteren Experiment sollte überprüft werden, ob CD83-positive A1 Zellen im Vergleich zu normalen A1 Zellen eine bessere Stimulation von PBMCs in einer allogenen MLR-Reaktion zeigen. Dazu wurden jeweils 1×10^5 A1, bzw. A1/CD83 Zellen pro Loch einer 96-Loch-Platte eingesät, bestrahlt und anschließend die gleiche Menge an frisch isolierten PBMCs zugefügt. Nach 5 Tagen wurde ³H-Thymidin zugegeben und einen Tag später geerntet. Als Positivkontrolle wurden mit PHA stimulierte PBMCs verwendet.

Leider konnte keine Veränderung im Proliferationsverhalten der PBMCs beobachtet werden, die zu den mit pINCO/CD83 infizierten A1 Zellen zugegeben wurden im Vergleich zu uninfizierten, bzw. mit pINCO/CD80 oder pINCO/GFP infizierten A1 Zellen (Daten nicht gezeigt).

Sowohl bei der Stimulation des CD4⁺-T-Zellklons 2B3 als auch in der MLR-Reaktion konnte festgestellt werden, daß A1 Zellen noch eine gewisse Grundaktivierung von T-Zellen sowohl hinsichtlich der Antigen-spezifischen GM-CSF Sekretion als auch hinsichtlich der Proliferation von PBMCs hervorrufen. Deswegen sollten in einem letzten Ansatz zur Überprüfung der co-stimulatorischen Aktivität von CD83 nicht-professionell Antigen-präsentierende Zellen zum Einsatz kommen.

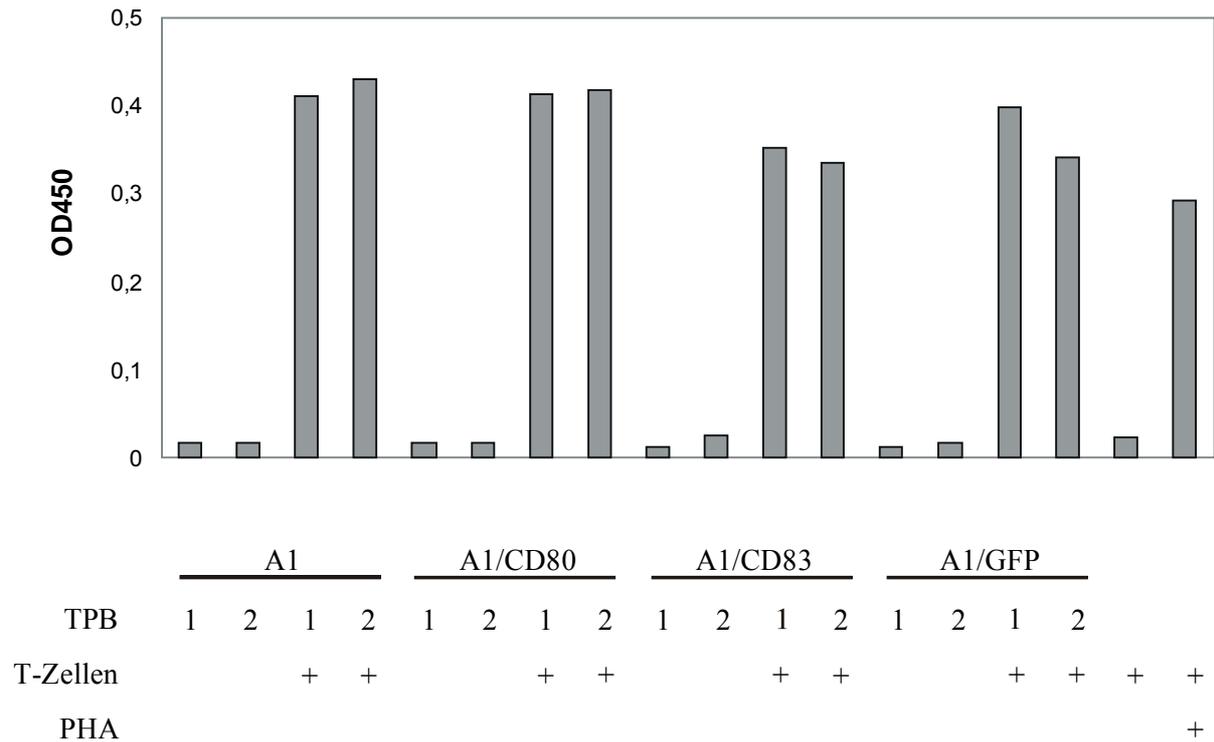


Abbildung 28: Mit pINCO/CD83 infizierte A1 Zellen zeigen im Vergleich zu CD83-negativen A1 Zellen keine erhöhte co-stimulatorische Aktivität im T-Zell-Assay

Jeweils 1×10^5 A1 Zellen, bzw. mit pINCO/CD83 retroviral infizierte A1 Zellen wurden in Gegenwart von exogenem TPB Protein (1=10ng/ml, 2=50ng/ml) für 24 Stunden kultiviert. Danach wurden die Zellen viermal mit Medium ohne Antibiotikum (Hygromycin B, Puromycin) gewaschen und mit 1×10^5 T-Zellen des T-Zellklons 2B3 co-kultiviert. Als Positivkontrolle wurde den T-Zellen PHA zugesetzt. Die GM-CSF Sekretion wurde mit einem GM-CSF ELISA ermittelt.

3.7.1.3 Co-stimulatorische Funktion von CD83 auf nicht-professionellen APCs

Im Gegensatz zu professionellen APCs exprimieren nicht-professionell Antigen-präsentierende Zellen (npAPCs) wie die Nierenkarzinomzelllinie RCC p18.S MHC-Klasse-II-Moleküle nicht konstitutiv, sondern erst nach Induktion mit $\text{IFN}\gamma$ auf ihrer Oberfläche. Darüber hinaus exprimieren npAPCs wenig oder gar keine co-stimulatorischen Moleküle, was sie für die Untersuchung der Funktion von CD83 besonders geeignet macht.

Zunächst sollte überprüft werden, ob die RCC p18.S Zellen auch nach $\text{IFN}\gamma$ Gabe tatsächlich keine der dominierenden co-stimulatorischen Moleküle exprimieren. Gleichzeitig sollte auch die MHC-Klasse-I- und MHC-Klasse-II-Expression analysiert werden. RCC p18.S Zellen wurden mit oder ohne $\text{IFN}\gamma$ für 48 Stunden inkubiert, geerntet, die Zellen mit Antikörpern gegen CD80, CD83, CD86, MHC-Klasse-I (HLA A,B,C) und MHC-Klasse-II (HLA DR, DP, DQ und HLA DP) gefärbt und anschließend im FACS analysiert.

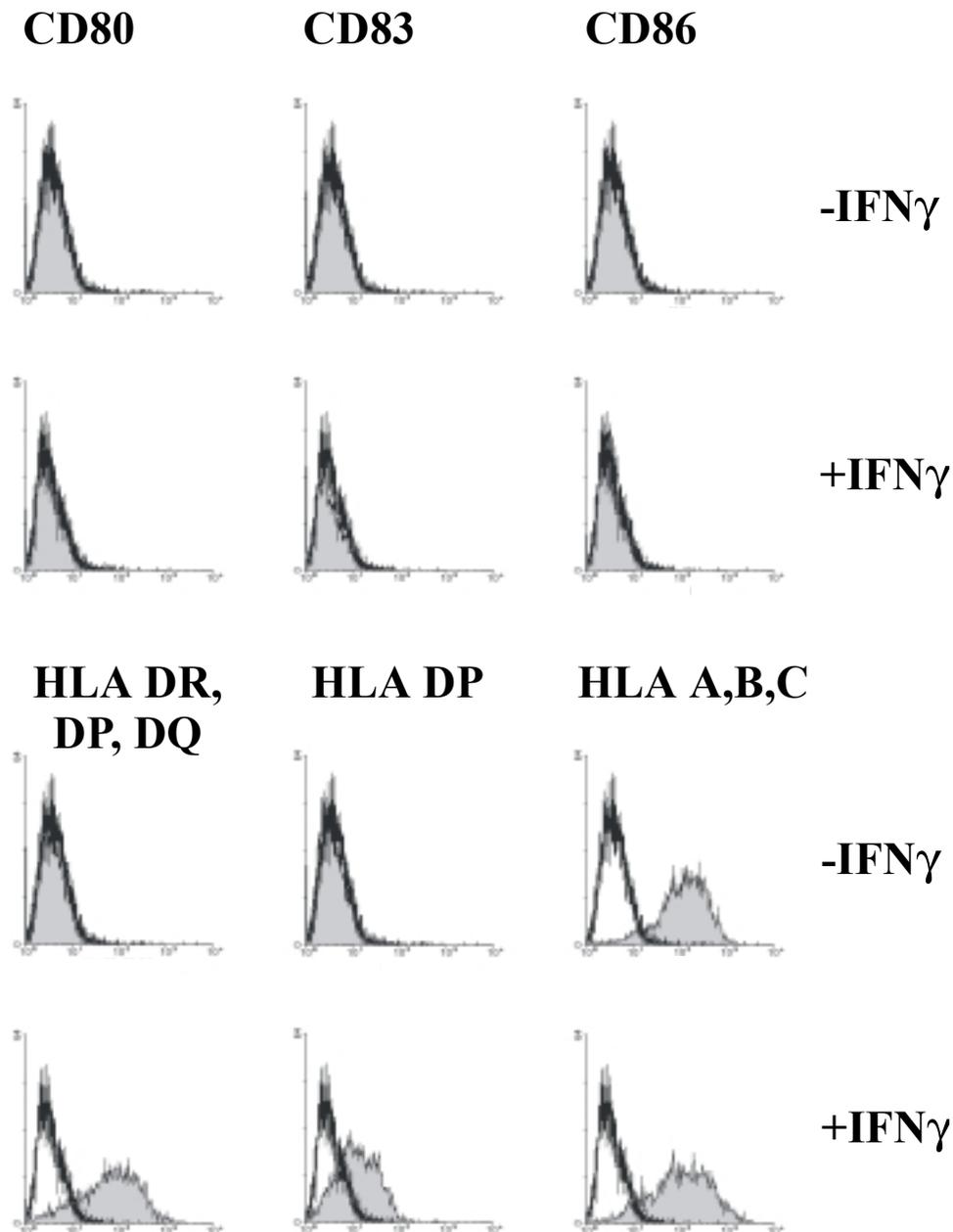


Abbildung 29: RCC p18.S exprimieren keine co-stimulatorischen Moleküle

Jeweils 2×10^5 RCC p18.S Zellen, die mit IFN γ behandelt (+IFN γ) oder nicht behandelt (-IFN γ) worden waren, wurden mit einem anti CD80, CD83, CD86, HLA A,B,C und HLA DR, DP, DQ und HLA DP Antikörper (grau, gefüllt), bzw. mit den entsprechenden Isotypkontrollen (ungefüllt) für 30min auf Eis inkubiert, anschließend der überschüssige Antikörper durch Waschen entfernt und im Falle von CD80, CD83, CD86 und HLA DR, DP, DQ für weitere 20min mit einem DTAF-gekoppelten Sekundärantikörper gefärbt. Nach letztmaligem Waschen wurde Propidiumjodid zu den Proben zugegeben, um tote Zellen bei der Analyse auszuschließen. Im Histogramm dargestellt sind jeweils 2×10^4 als lebend definierte Zellen.

Die RCC p18.S Zellen verhalten sich wie nicht professionell Antigen-präsentierende Zellen, d.h. MHC-Klasse-II Moleküle werden nach IFN γ Inkubation hochreguliert, aber keine der dominierenden co-stimulatorischen Moleküle induziert. Die konstitutive MHC-Klasse-I-Expression bleibt von der Behandlung mit IFN γ unbeeinflusst (Abb. 29).

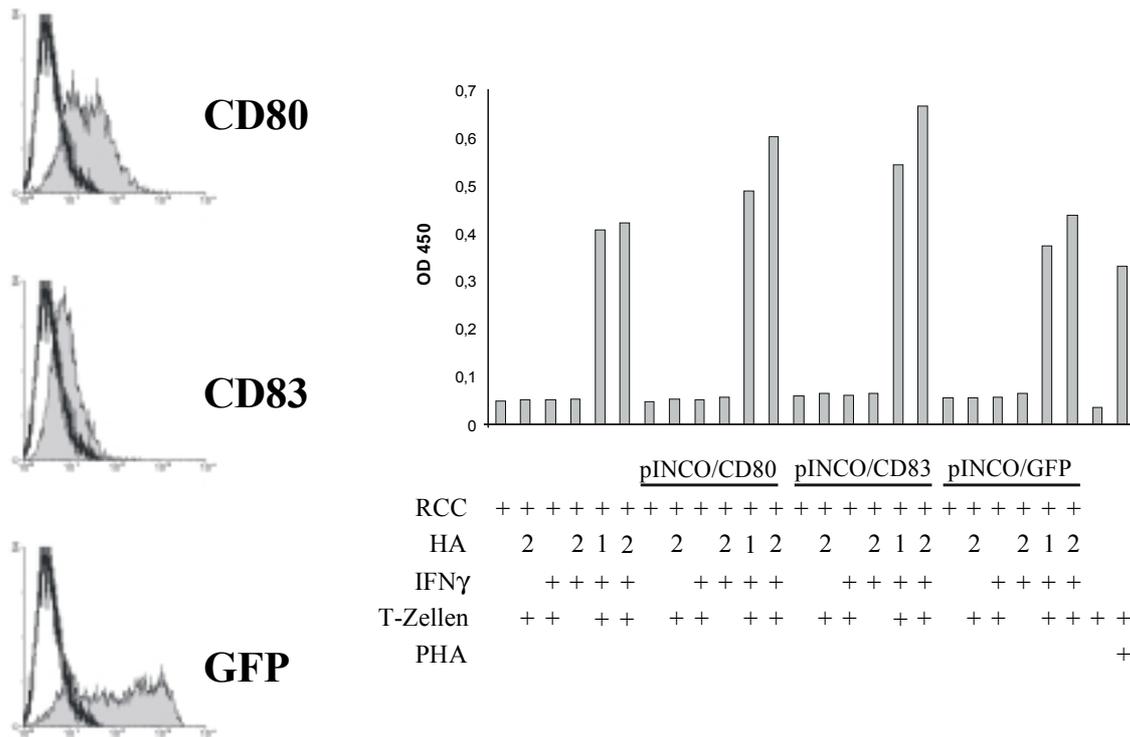


Abbildung 30: Co-stimulatorische Aktivität von CD83 auf CD4⁺ T-Zellen

2,5x10³ p18.S RCC-Zellen wurden pro Loch einer 96-Loch-Platte eingesät, einen Tag später mit Retrovirusüberstand von mit pINCO/CD83, pINCO/CD80 und pINCO/GFP transfizierter Phoenix-Zellen über Nacht infiziert und das Medium am nächsten Morgen gewechselt. Am gleichen Tag abends wurde IFN γ zur Hochregulation von MHC-Klasse-II zugegeben. Die Transfektionseffizienz der Zellen wurde durch FACSTTM-Analyse überprüft (linke Seite). Am Tag 2 nach der Retrovirusinfektion wurde Hämagglutinin zugegeben (1=100ng/ml, 2=200ng/ml). Anschließend wurden die Zellen in Paraformaldehyd fixiert und die Zellen mit dem T-Zellklon Clone-1 co-kultiviert. Als Positivkontrolle wurde den T-Zellen PHA zugesetzt. Die GM-CSF Sekretion wurde mit einem ELISA ermittelt.

Zur Charakterisierung der Funktion von CD83 wurden RCC-Zellen mit retroviralem CD83, CD80, bzw. GFP über Nacht infiziert, 8 Stunden später mit 50U/ml IFN γ für 48 Stunden inkubiert und während der letzten 24 Stunden zusätzlich Influenza-Hämagglutinin (HA) zugegeben. Anschließend wurden die Zellen mit 0,5% Paraformaldehyd fixiert und für 20 Stunden mit dem T-Zellklon Clone-1, der die RCC p18.S Zellen im Kontext von MHC-Klasse-II Molekül DR1 erkennt, co-kultiviert. Die Überstände wurden dann auf GM-CSF Ausschüttung mittels ELISA untersucht (Abb. 30). Mit pINCO/CD83 infizierte RCC p18.S Zellen zeigen im T-Zell-Assay eine um 52% höhere stimulatorische Aktivierung des CD4⁺-T-Zellklons Clone-1 als die zur Kontrolle mit pINCO/ GFP (100% gesetzt) infizierten, bzw. nicht infizierten RCC-Zellen. Im Vergleich dazu riefen RCC-Zellen, die mit pINCO/CD80 infiziert wurden, eine um 37,5% höhere Aktivierung des T-Zellklons hervor (Abb. 30). Mit

diesem Ergebnis konnte gezeigt werden, daß CD83 auf der nicht-professionellen Antigen-präsentierenden Zelllinie p18.S RCC eine co-stimulatorische Rolle in der Aktivierung des CD4⁺ T-Zellklons Clone-1 ausübt.

3.8 Suche nach dem CD83-Liganden

Die Struktur von CD83 als Mitglied der Immunglobulin-Supergeen Familie legt nahe, daß es sich bei CD83 um einen Rezeptor mit noch unbekanntem Liganden handelt. Um die Rolle von CD83 bei der Immunantwort aufklären zu können, ist es von außerordentlicher Relevanz, den Liganden von CD83 zu identifizieren. Voraussetzung hierfür ist, ein geeignetes Werkzeug in Händen zu halten, mit dem Zellpopulationen, die den Liganden exprimieren, eindeutig identifiziert werden können. Zur Identifikation einer für den CD83-Liganden positiven Population wurde im Rahmen dieser Arbeit zum einen ein CD83-Ig-Fusionsprotein und zum anderen ein CD83-Tetramer hergestellt.

3.8.1 Suche nach dem CD83-Liganden mit einem CD83-Ig Fusionsprotein

Ein wichtiges Werkzeug für die Suche und Identifikation zellgebundener Liganden sind lösliche Rezeptoren, die aus der extrazellulären Domäne und dem Fc-Teil eines Immunglobulins bestehen. Diese Fusion hat einerseits den Vorteil, daß das Fusionsprotein in den Überstand sekretiert wird (Signalpeptid und Fc-Anteil), andererseits ist es möglich, das Fusionsprotein sehr schnell und einfach über den Fc-Teil aufzureinigen. Bekannte Beispiele für solche Fusionsproteine und das erfolgreiche Auffinden eines Interaktionspartners sind unter anderem CD28, CD80 und CD86 (*Aruffo und Seed, 1987; Linsley et al., 1994*). Dabei spielt es keine Rolle, ob der Ig-Teil aus Mensch oder Maus ist. Im Fall von Ig-Fusionsproteinen mit menschlichen Immunglobulinanteilen werden IgG1 und IgG2a bevorzugt, da sich diese Moleküle besser aufreinigen lassen. Ig-Fusionsproteine können sowohl in der FACSTM-Analyse, zur Färbung von Geweben, als auch in funktionellen Assays als Inhibitoren Verwendung finden. Für CD83 sollte ein CD83-Ig Fusionsprotein hergestellt werden, um die Funktion von CD83 untersuchen zu können.

3.8.1.1 Produktion des CD83-Ig Fusionsproteins

Im vorliegenden Fall wurde die extrazelluläre Domäne von CD83 von Position nt1 bis Position nt391 (=CD83-S-Ig, S=small), bzw. bis Position nt427 (=CD83-L-Ig, L=large) vom Translationsstartpunkt aus gesehen durch PCR amplifiziert. Dabei enthielt der 5' Primer eine *XhoI* und der 3' Primer eine *BglII* Schnittstelle. Das PCR-Produkt wurde in die *XhoI* und *BamHI* Schnittstelle des CDM7 Vektors kloniert (zur Verfügung gestellt von Dr. W. Kolanus, Genzentrum, München), der die genomische Sequenz des humanen Fc-Teils von IgG1 enthält (Abb. 31).

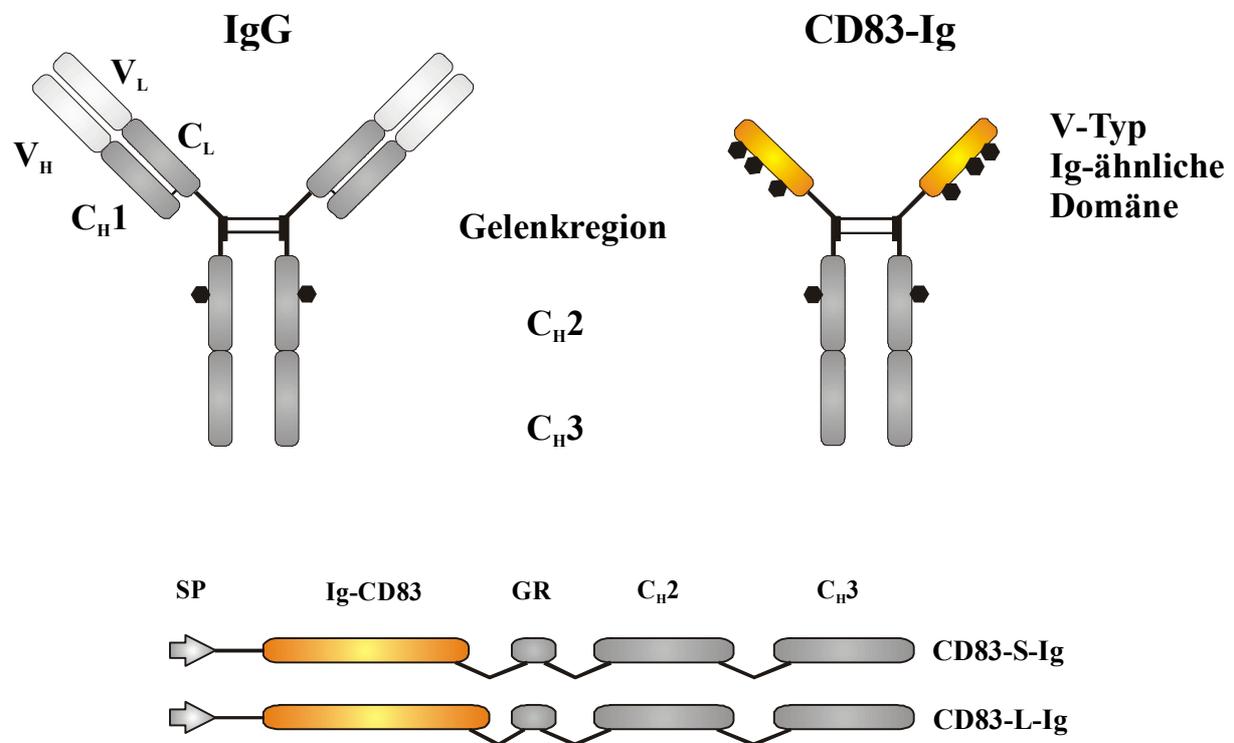


Abbildung 31: Übersicht über die CD83-Ig Fusionsproteine

Im Schema dargestellt sind das IgG-Protein (links oben) und zum Vergleich das CD83-Ig Fusionsprotein (rechts oben). Die extrazelluläre Domäne von CD83 wurde anstelle der konstanten (C_{H1}) und variablen Domäne der schweren Kette an die Gelenkregion (GR) von IgG1 fusioniert. Dabei wurde das Signalpeptid (SP) von CD83 für den Transport des CD83-Ig Fusionsproteins beibehalten. Insgesamt wurden zwei verschieden lange extrazelluläre Sequenzabschnitte von CD83 (CD83-S-Ig mit kürzerer CD83 Sequenz, CD83-L-Ig mit längerer CD83-Sequenz) zur Herstellung des CD83-Ig Fusionsproteins verwendet.

Zur Expression der Fusionsproteine wurden 293-T Zellen durch Lipofectamin™ transient mit den CD83-Konstrukten transfiziert. Die Zellen wurden dann in 293-Serum-freien Medium (293-SFMII Medium™, Life Technologies™) für 4 Tage kultiviert und die Überstände geern-

tet. 10µl der Überstände wurden auf ein 10% SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen und CD83-Ig sowohl mit einem anti-CD83 als auch mit einem anti-human-IgG-Antikörper nachgewiesen (Abb. 32a, Daten nicht gezeigt). Beide CD83-Ig Formen konnten gut sowohl als Monomer als auch als funktionelles Dimer (Probenpuffer ohne DTT) nachgewiesen werden (Abb. 32a). Außerdem wurde eine Verdünnungsreihe von 20, 10, 5, 2 und 0,5µl Überstand im Vergleich zu einer BSA-Verdünnungskurve im Coomassie-Gel analysiert. Dadurch konnte eine ungefähre Proteinkonzentration der Überstände von 1µg/µl abgeschätzt werden (Daten nicht gezeigt).

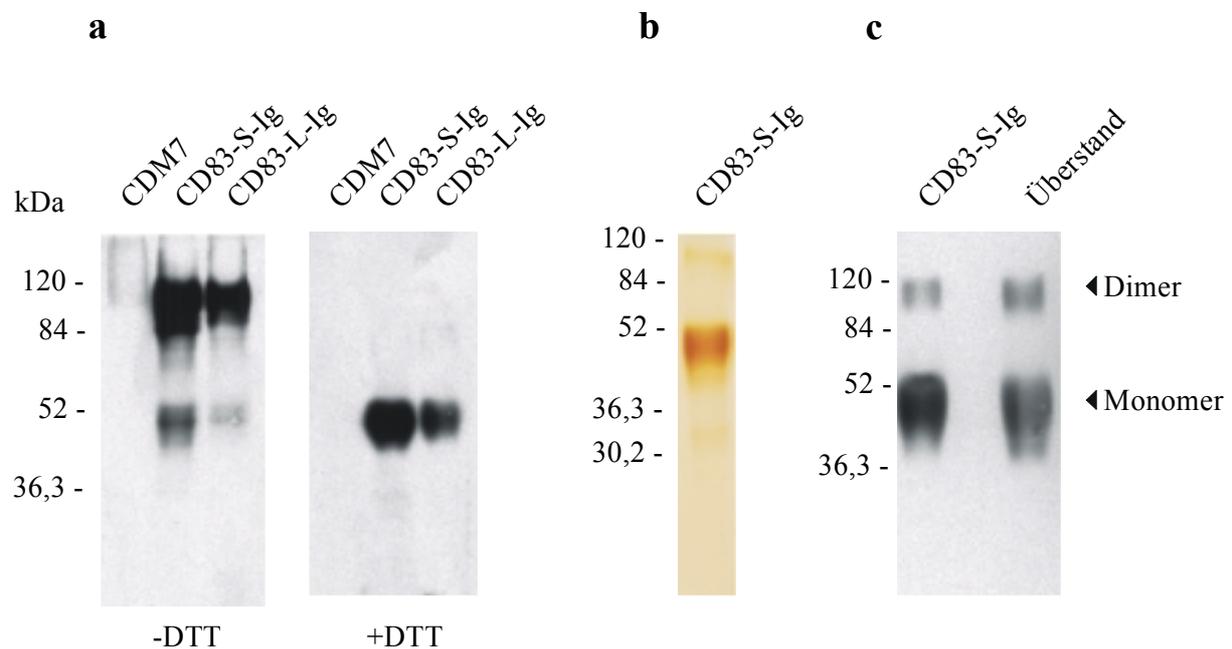


Abbildung 32: Nachweis des CD83-S-Ig Fusionsproteins

- Jeweils 10µl der CD83-Ig Überstände wurden auf ein 10%-iges SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Dabei wurde ein Teil der Proben mit einem DTT-haltigen, ein anderer Teil mit einem Probenpuffer ohne DTT aufgenommen. Die Proteine wurden elektrophoretisch getrennt, auf eine PVDF-Membran (Hybond-P) transferiert und anschließend mit Primäntikörper (Maus-anti-hCD83) inkubiert. Danach wurden die Membranen gewaschen und für eine Stunde mit Sekundäntikörper (Ziege-anti-Maus) bei Raumtemperatur inkubiert. Die Detektion erfolgte mit dem ECL-Detektionssystem.
- Jeweils 1µg aufgereinigtes CD83-S-Ig auf ein 15%-iges in einem DTT-haltigen Probenpuffer aufgetragen. Die Proteine wurden elektrophoretisch getrennt und eine Silberfärbung durchgeführt.
- Jeweils 1µg aufgereinigtes CD83-S-Ig, bzw. zum Vergleich 10µl Überstand wurden auf ein 10%-iges SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Alle Proben wurden mit einem DTT-haltigen Probenpuffer versetzt. Die Proteine wurden elektrophoretisch getrennt und wie unter a) beschrieben weiterverfahen.

Zum Auffinden des Liganden sollten große Mengen an CD83-Ig produziert und aufgereinigt werden. Es wurde entschieden, nur CD83-S-Ig aufzureinigen. 293-T Zellen wurden dazu mit der Ca^{2+} -Phosphat-Methode transient transfiziert. Auf diese Weise lassen sich sehr schnell große Mengen an Protein herstellen. Eine stabile Transfektion der 293-T Zellen mit dem CDM7 Vektor ist aufgrund einer fehlenden Resistenzkassette nicht möglich. 293-T Zellen wurden in 13 cm große Zellkulturschalen eingesät und transient transfiziert. 9 Stunden nach Transfektion wurde das Medium abgenommen und die Schalen mit 20ml Serum-freien Medium überschichtet. 10 Tage später wurden die Überstände geerntet, durch Zentrifugation von groben Bestandteilen befreit, sterilfiltriert und mit Natriumazid und Protease-Inhibitoren versetzt.

In Zusammenarbeit mit E. Kremmer (Institut für Immunologie, GSF, München) wurden zweimal insgesamt 1,5 Liter auf diese Art gewonnener Zellkulturüberstand über Protein A aufgereinigt. Eluiert wurde CD83-Ig mit einem Citratpuffer bei einem pH von 4 und 2,7. Dabei wurde eine Gesamtmenge von 12mg CD83-S-Ig Protein gewonnen.

Das aufgereinigte Protein wurde im Western-Blot mit einem anti-CD83-Antikörper und im Silbergel nachgewiesen (Abb. 32b, c). Anschließend wurde CD83-Ig mit FITC markiert und stand nun für FACSTM-Analysen zur Verfügung.

3.8.1.2 FACS mit CD83-Ig

Zunächst sollte das CD83-Ig Fusionsprotein zur Detektion des CD83-Liganden in verschiedenen Zelllinien eingesetzt werden. Zelllinien haben gegenüber primären Zellen den Vorteil, daß es sich um weitgehend homogene Populationen handelt, in denen alle Zellen den möglichen Liganden exprimieren sollten. Aufgrund der Expression von CD83 auf verschiedenen APCs wurde ein möglicher CD83-Ligand v.a. auf T-Zellen vermutet. Deswegen wurden mit dem löslichen CD83-Ig Molekül zunächst Zellen aus primären Antigen-stimulierten T-Zellkulturen (T-Zell-Mischpopulationen), CD4^+ , bzw. CD8^+ T-Zellklone (von J. Mautner zur Verfügung gestellt, KKG Pädiatrische Tumorummunologie, GSF, München) und die T-Zelllinie Jurkat (zur Verfügung gestellt von W. Kolanus) auf einen möglichen membranständigen Liganden untersucht.

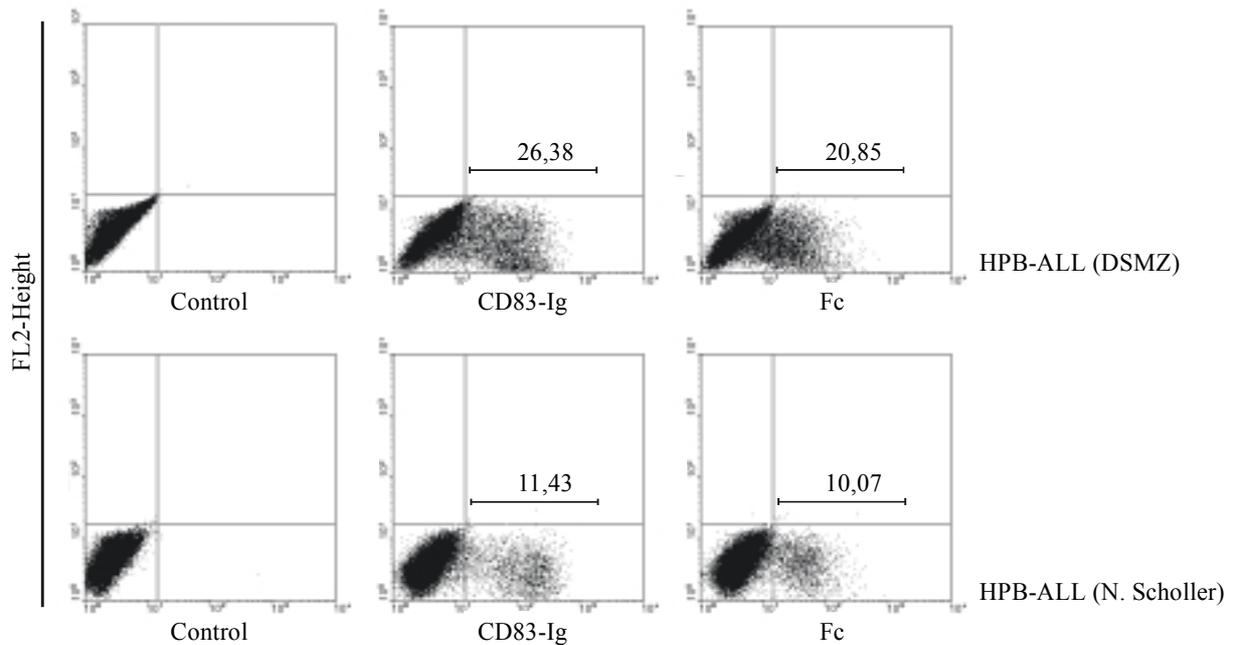


Abbildung 33: Färbung der Zelllinie HPB-ALL mit dem CD83-Ig Fusionsprotein

Jeweils 2×10^5 HPB-ALL Zellen der DSMZ (Braunschweig, oben), bzw. von N. Scholler (unten) wurden 1:1 mit unverdünnten anti-CD16 und anti-CD32 Antikörper (Fc-Block) für 30min auf Eis inkubiert (Kontrolle ohne Antikörper) und anschließend mit FITC-markiertem CD83-Ig Fusionsprotein, bzw. FITC-markiertem Fc-Protein (Dianova, Hamburg) für weitere 30min auf Eis gefärbt. Dargestellt sind jeweils 2×10^4 als lebend definierte Zellen (Zahlenangaben in den Dot-Blots in Prozent).

Mit dem CD83-Ig Fusionsprotein ließen sich weder die T-Zelllinien B12, F8, M1, 3M, P4, P19 und Hermann (p2) noch der T-Zellklon 20-4/A4 anfärben (Daten nicht gezeigt). Als Kontrolle diente FITC-markiertes Fc-Protein (IgG-Fc, Dianova). Die Zelllinie Jurkat zeigte zwar mit dem CD83-Ig Molekül eine Bindung, die FITC-markierte Fc-Kontrolle tat dies jedoch im gleichen Ausmaß.

Weiterhin wurde auch die T-Zelllinie HPB-ALL auf die Expression des CD83-Liganden hin überprüft. Während die eigene Suche nach dem CD83-Liganden in Gang war, wurde von dieser Linie publiziert, daß sie einen CD83-Liganden exprimiere (*Scholler et al., 2001*). Für die Färbung wurde sowohl die HPB-ALL Zelllinie, die in der Publikation verwendet worden war (von N. Scholler zur Verfügung gestellt) als auch die HPB-ALL Zelllinie aus der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) auf die Interaktion des CD83-Ig Fusionsproteins mit einem möglichen Liganden untersucht (Abb. 33).

Dabei wurde festgestellt, daß CD83-Ig mit der HPB-ALL Zelllinie aus beiden Quellen eine gewisse Interaktion zeigte. Diese Interaktion war jedoch nicht spezifisch, da Fc-FITC als Kontrolle die beiden Zelllinien im gleichen Ausmaß färbte wie CD83-Ig (Abb. 33). Zusätzlich

soll erwähnt werden, daß sich beide Zelllinien in Zellkultur unterschiedlich verhielten. Die Linie von N. Scholler wuchs nicht adhärent in Einzelzellsuspension, während die von der DSMZ stammende Linie in Einzelzellsuspension wuchs und an den Boden der Kulturflasche adhärierte.

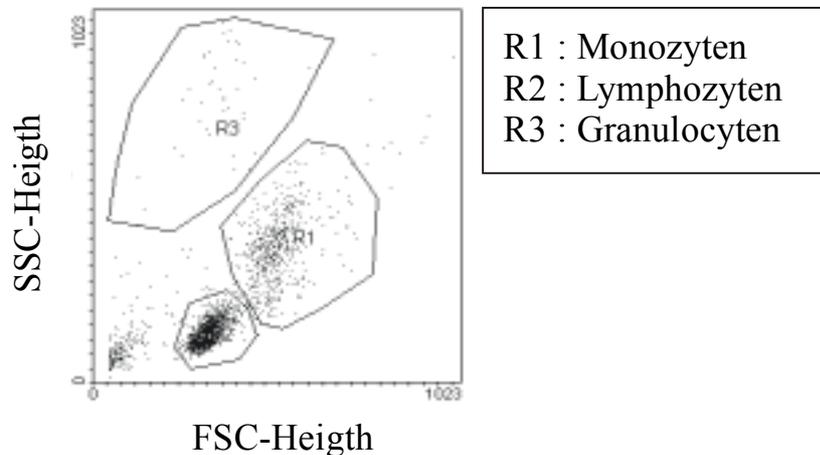


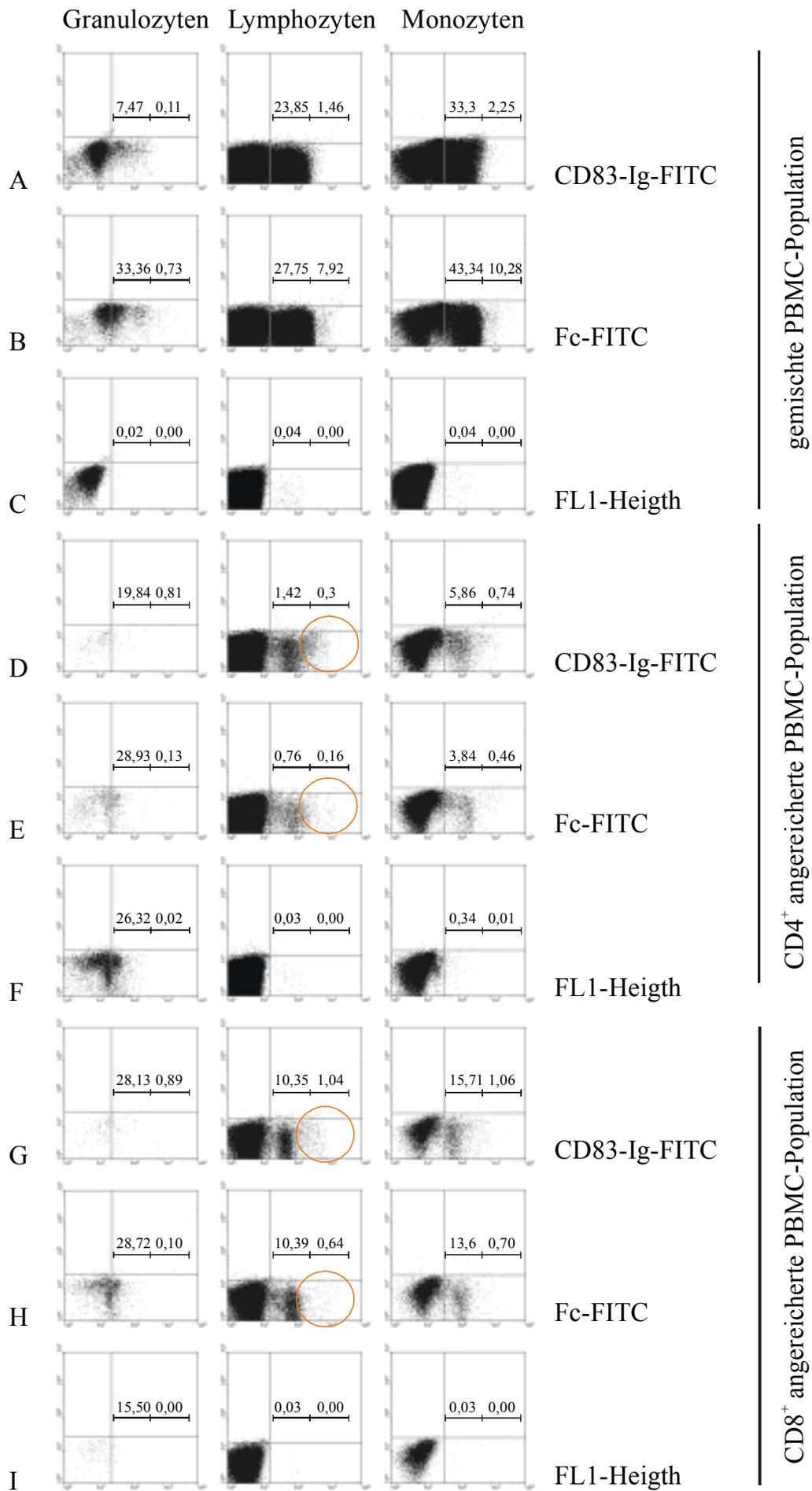
Abbildung 34: Unterteilung der aufgereinigten PBMCs nach Größe und Granularität in Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten

PBMCs enthalten ein Gemisch an verschiedenen Zellpopulationen. In der FACS™-Analyse werden Zellen nach Granularität und Zellgröße unterschieden. Granulozyten befinden sich in der Region R3. Lymphozyten sind nicht granulär und sehr klein (R2), Monozyten (R1) sind sehr groß und weniger granulär als Granulozyten, jedoch stärker granulär als Lymphozyten.

Als nächstes wurden periphere mononukleäre Blutzellen (PBMC) untersucht. Eine Übersicht über die in aufgereinigten PBMCs enthaltenen Zellpopulationen gibt Abbildung 34. PBMCs wurden isoliert und nach CD4- und CD8-positiven Zellen durch MACS-Sortierung (magnetic cell sorting) getrennt. Das CD83-Ig Fusionsprotein wurde sowohl zur Färbung frisch isolierter PBMCs, CD4⁺ und CD8⁺ Lymphozyten (Abb. 35), als auch zur Färbung von PBMCs eingesetzt, die 4, bzw. 24 Stunden mit PHA stimuliert worden waren (Daten nicht gezeigt).

Abbildung 35: Färbung von PBMCs mit dem CD83-Ig Fusionsprotein

Jeweils 2×10^7 unstimulierte PBMCs der unseparierten Gesamtpopulation (Zeilen A-C), bzw. der auf CD4⁺ (Zeile D-F) oder CD8⁺ (Zeile G-I) separierten Population wurden mit anti-CD16 und anti-CD32 vorinkubiert und anschließend mit FITC-markiertem CD83-Ig oder FITC-Fc-Protein gefärbt. Zur weiteren Darstellung und Einstellung der Zellen wurden ungefärbte Zellen verwendet. Dargestellt sind jeweils 1×10^7 als lebend definierte Zellen unterteilt in Granulozyten (Spalte 1), Lymphozyten (Spalte 2) und Monozyten (Spalte 3). Zeile A, D und G stellen Färbungen mit dem CD83-Ig Fusionsprotein dar. Die Zellen in Zeile B, E und H sind Färbungen mit der FITC-markierten Fc-Kontrolle und in den FACS™-Analysen der Zeilen C, F und I wurde kein Antikörper zur Färbung eingesetzt (FL1-Height). Dieser Versuch wurde insgesamt fünfmal mit verschiedenen Spendern wiederholt.



Dabei wurde eine starke Bindung des CD83-Ig Moleküls auf allen Zellen beobachtet. Diese Bindung erwies sich jedoch als unspezifisch, da wiederum die FITC-markierte Fc-Kontrolle die gleiche Bindung aufwies. Durch Zugabe von unverdünntem anti-CD16 und anti-CD32 Antikörpern, die an Fc-Rezeptoren binden und dadurch eine unspezifische Bindung über den Fc-Teil verhindern sollen, ließ sich die unspezifische Bindung sowohl des CD83-Ig Fusionsproteins als auch des Kontroll-Fc-Proteins zwar reduzieren, aber nie komplett unterbinden. In allen Fällen war der Anteil an CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen, die sich mit dem CD83-Ig-FITC färben ließen, eindeutig höher als nach Färbung mit der Fc-FITC Kontrolle. Dies läßt vermuten, daß es eine CD83-Ligand-positive Population innerhalb der T-Zellpopulation gibt. Der Hintergrund der Färbung war aber zu hoch, um mit diesem Reagenz weiter nach dem Liganden zu suchen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde deshalb ein synthetisches CD83-Tetramer-Konstrukt, das nicht an Fc-Rezeptoren bindet und das außerdem zur Identifikation eines Liganden eine höhere Bindungsspezifität als das CD83-Ig-Fusionsprotein aufweisen sollte, hergestellt.

3.8.2 Suche nach dem CD83-Liganden mit einem CD83-Tetramer

Aufgrund der hohen Hintergrundfärbung des CD83-Ig Fusionsproteins sollte ein CD83-Tetramer hergestellt werden. Die Technologie der Tetramerisierung führte zur erfolgreichen Darstellung der Peptid/MHC-TCR-Interaktion (major histocompatibility complex and T-cell receptor, *Altman et al., 1996; Dunbar et al., 1998; Gallimore et al., 1998, Tissot et al., 1999*). Gegenüber dem CD83-Ig Fusionsprotein besitzt ein CD83-Tetramer zwei weitere Bindestellen, was die Affinität des Moleküls zu seinem Interaktionspartner sehr deutlich erhöhen sollte (Abb. 36, *Altman et al., 1996*). Zum anderen enthält das CD83-Tetramer keine Ig-Anteile, mit dem es unspezifisch an Fc-Rezeptoren binden kann. Falls es einen Membran-ständigen Interaktionspartner gibt, sollte es mit dem CD83-Tetramer möglich sein, diese Zellen zu identifizieren.

3.8.2.1 Klonierung des CD83-Tetramers

Zur Klonierung des Monomers wurde von D. Busch (Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, TU-München, München) ein Vektor mit einer Biotinylierungssequenz zur Verfügung gestellt. Insgesamt wurden 3 Varianten von CD83-Monomeren kloniert (6.14.3), die sich einerseits in den internen Klonierstellen und andererseits in der Länge der extrazellulären Domäne

von CD83 unterscheiden. Der Einfachheit halber werden die Monomere an dieser Stelle mit CD83 101, 102 und 103 bezeichnet (Übersicht in Abb. 36).

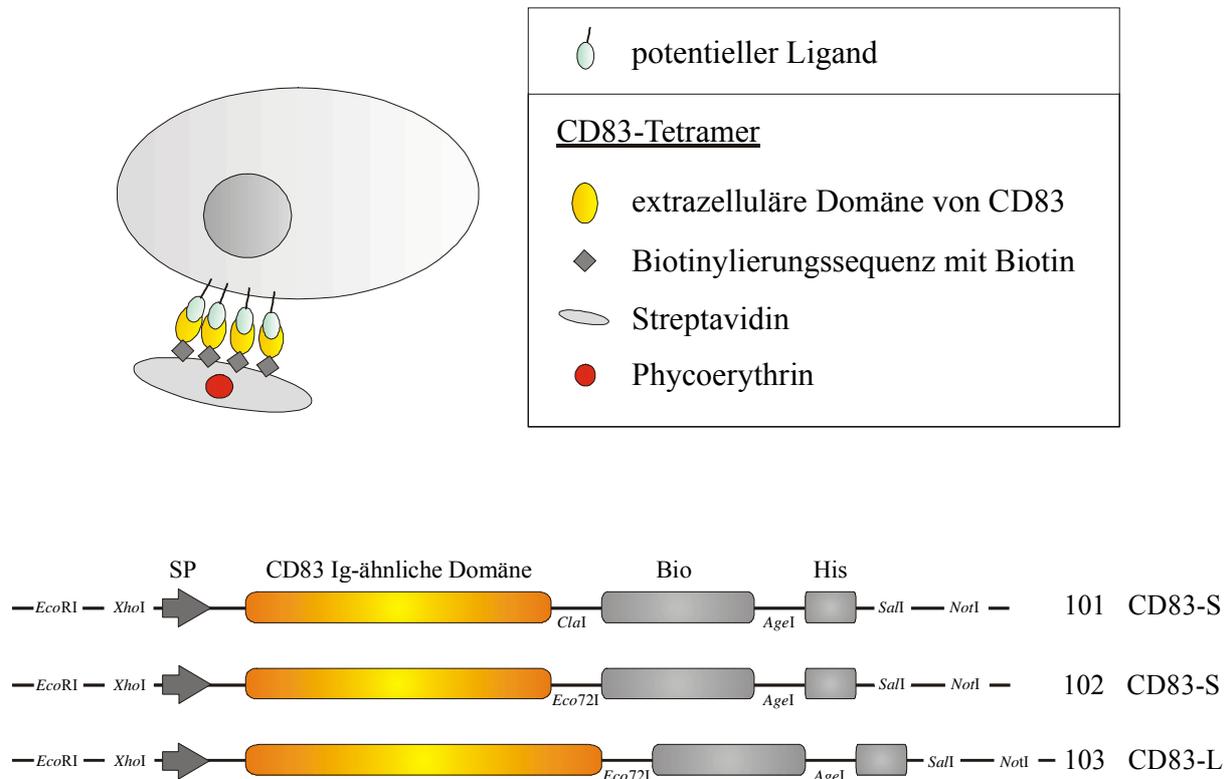


Abbildung 36: Schematische Übersicht über die CD83-Tetramere

Oben: Schematische Darstellung der Bindung des CD83-Tetramers an seinen Liganden. Unten: Die extrazelluläre Domäne von CD83 wurde in drei Varianten an eine Biotinylierungssequenz fusioniert. Im Falle des CD83-Monomers 101 erfolgte die Fusion durch Klonierung über *ClaI* und im Falle der Monomere 102 und 103 durch *Eco72I*. Die extrazelluläre Domäne von CD83 in den Monomeren 101 und 102 ist genauso lang wie im CD83-S-Ig Fusionsprotein, während das CD83-Monomer 103 der längeren CD83-L-Ig Variante entspricht. Das Signalpeptid (SP) von CD83 wurde zur Sekretierung der Monomere in den Überstand beibehalten. Zugegebenes Biotin wird durch die BirA Ligase an das Lysin der Biotinylierungssequenz (Bio) angehängt. Zur Aufreinigung der CD83-Monomere befindet sich C-terminal ein 6xHis-Epitop. Streptavidin besitzt vier Bindestellen für Biotin und verknüpft somit vier Monomere zu einem Tetramer.

Zu Beginn der Versuche wurden die Konstrukte in 293-T Zellen (auf 10cm Zellkulturschalen) mit Lipofectamin transfiziert, die Zellen für 4 Tage in 4ml Serum-freien 293 Medium kultiviert, die Überstände geerntet, sterilfiltriert und mit Protease-Inhibitoren sowie Natriumazid versetzt. Anschließend wurden die CD83-Monomere mit NiNTA-Agarose über Nacht inkubiert, die Partikel gewaschen und in 20µl Proteinprobenpuffer mit DTT aufgenommen. Die Proteine wurden in einem 12,5%-igen SDS-Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch aufgetrennt, geblottet und sowohl mit einem anti-His- als auch mit einem anti-CD83-Antikörper nachgewiesen (Daten nicht gezeigt).

3.8.2.2 Produktion und Aufreinigung der CD83-Monomere

Die Expressionsplasmide für die CD83-Monomere 101, 102, 103 wurden mit Hilfe der Ca^{2+} -Phosphat Transfektions-Methode transient in 293-T Zellen transfiziert (in 13cm Schalen), nach 9 Stunden das Medium gewechselt und mit 20ml Serum-freien 293-Medium überschichtet. 10 Tage später wurde das Medium abgenommen, von groben Bestandteilen durch Zentrifugation befreit, sterilfiltriert, mit Protease-Inhibitoren versetzt und bis zur weiteren Verarbeitung bei 4°C aufbewahrt. Insgesamt wurden auf diese Art ca. drei Liter CD83-Monomer 101, und je 2 Liter CD83-Monomer 102 und 103 produziert (das entspricht in etwa jeweils 150-200 transfizierten 13cm-Schalen).

Anschließend wurden die Überstände zusammen mit D. Busch weiterverarbeitet. Zunächst erfolgte eine Verringerung des Volumens und Anreicherung des Proteins in einer Tangential-flow-Maschine. Nach einer Reduktion des Volumens auf 250ml wurden ca. 5ml NiNTA-Agarose zugegeben und über Nacht bei 4°C rotiert. Anschließend wurden die Partikel mehrmals in 4°C kaltem PBS gewaschen, auf eine Säule aufgezogen, die Proteine durch Imidazol von der NiNTA-Agarose eluiert und mittels FPLC aufgetrennt (Abb. 37a). Proteinhaltige Fraktionen wurden vereinigt. Danach wurden die Proteine mehrfach in PBS gewaschen und über Gelfiltrationssäulen angereichert.

In einem nächsten Schritt wurden die Monomere spezifisch durch Zugabe von BirA Ligase, ATP und d-Biotin am Lysinrest der Biotinylierungssequenz über Nacht biotinyliert. Anschließend wurden die biotinylierten Proteine über eine Gelfiltrationssäule von überschüssigem Enzym und d-Biotin befreit, das bei der Tetramerisierung interferieren würde (Abb. 37b). Die CD83-Monomer-haltigen Fraktionen wurden vereinigt, über Mikro-Spin Säulen gewaschen, auf ein Volumen von 500-1000µl konzentriert und mit Protease-Inhibitoren versetzt. Die Proteinkonzentration wurde ermittelt und auf 1µg/µl eingestellt.

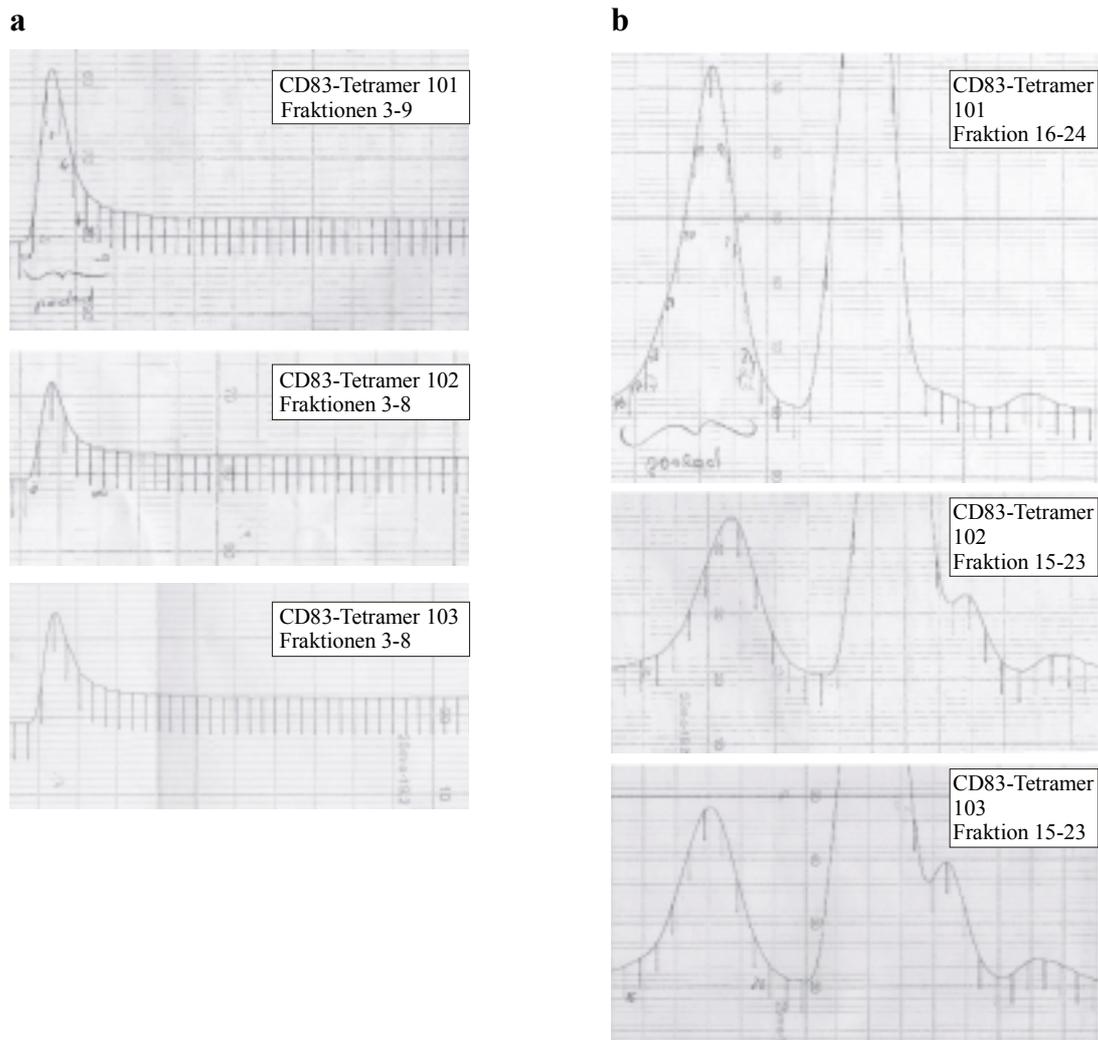


Abbildung 37: Elution der an NiNTA gebundenen CD83-Monomere und Aufreinigung der biotinylierten CD83-Monomere

- a) Die über Nacht mit NiNTA versetzten CD83-Monomer Überstände wurden in PBS gewaschen und die Beads auf eine Pharmacia-Säule aufgetragen. Anschließend wurden die Proteine durch Behandlung mit 200mM Imidazol von den Partikeln eluiert, die Proteinelution über einen UV-Detektor bei OD₂₈₀ verfolgt und die Proteine in 1,5ml Fraktionen aufgefangen. Dargestellt sind die Elutionskurven der CD83-Monomere 101, 102, 103. Jeder Teilstrich entspricht einem Fraktionsschritt.
- b) Die biotinylierten CD83-Monomere (101, 102, 103) wurden auf eine 200HR Superdexsäule aufgetragen, in der FPLC mit Tris/HCl, NaCl-haltigem FPLC-Puffer eine Gelfiltration durchgeführt und in 500µl Fraktionen aufgefangen. Die Proteinelution wurde mittels eines UV-Detektors bei einem OD₂₈₀ verfolgt und als Verlaufskurve aufgezeichnet. Ein Teilstrich entspricht einer Fraktionierungseinheit.

3.8.2.3 Streptavidin-Shift-Assay

Für eine optimale Tetramerisierung ist es wichtig, die Effizienz der *in vitro* Biotinylierung nach dem letzten Aufreinigungsschritt zu testen. Deswegen wurde ein sogenannter Streptavidin-Shift-Assay durchgeführt. In diesem Versuch macht man sich die sehr hohe Affinität der Biotin/Streptavidin Interaktion (10^{-14} M) zunutze, die auch unter SDS-

Bedingungen stabil erhalten bleibt. Mit Streptavidin bilden sich dann CD83-Tetramere, die in einem SDS-Gel mit einer höheren Proteingröße erscheinen.

Von den konzentrierten Proteinen wurden jeweils 15µl Aliquots mit entweder 5µl unkonjugiertem Streptavidin oder 5µl PBS versetzt. Als Kontrolle wurde unkonjugiertes Streptavidin (5µl) mit PBS (15µl) gemischt, über Nacht bei 4°C inkubiert und anschließend auf ein 10%-iges SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Dabei wurde einerseits eine Coomassie-Färbung (Daten nicht gezeigt) und andererseits ein Western-Blot durchgeführt, auf dem tetramerisiertes CD83-Protein mit anti-CD83, bzw. mit einem anti-His-Antikörper detektiert wurde (Abb.38).

Wie in Abbildung 38 zu erkennen, konnten sowohl monomerisierte, dimerisierte als auch tetramerisierte CD83-Formen detektiert werden. Der Großteil lag jedoch als CD83-Tetramer vor. Weiterhin zeugen die starken Schmierbanden der nachgewiesenen CD83-Proteine davon, daß die starke Glykosylierung von CD83 trotz der vielen Aufreinigungsschritte erhalten geblieben ist. Damit konnte nachgewiesen werden, daß die Biotinylierungssequenz in der Fusion mit der extrazellulären Domäne von CD83 benutzt wird und Tetramere ausgebildet werden.

Um Tetramere in der FACS-Färbung zu verwenden, wurde PE-markiertes Streptavidin in verschiedenen kleinen Portionen zu den CD83-Tetrameren zugegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Tetramere wurden in 100kDa Mikro-Spin Tubes von Monomeren getrennt, gewaschen, in einem Endvolumen von 250µl aufgenommen und mit Protease-Inhibitoren versetzt. Streptavidin-PE wurde ausgewählt, da es sich aufgrund seiner starken Intensität besonders gut für die spätere FACS™-Analyse eignet. Damit standen nun drei (101, 102, 103) verschiedene PE-markierte CD83-Tetramere zur FACS™-Analyse zur Verfügung.

3.8.2.4 FACS von PBMCs mit CD83-Tetrameren

Um einen möglichen Liganden für CD83 zu identifizieren, sollten die Streptavidin-PE markierten Tetramere zunächst zur Färbung von frisch aufgereinigten PBMCs verwendet werden. PBMCs wurden über Ficoll separiert, in Serum-freien Medium gewaschen und in Standardmedium mit FCS aufgenommen. Die Zellen wurden für 0, 4, 20, 36 und 48 Stunden mit PHA stimuliert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und mit einer 1mg/ml Lösung von Streptavidin auf Eis inkubiert, einmal gewaschen und mit dem Tetramer, bzw. mit Streptavidin-PE (SAPE) für weitere 30 Minuten auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden gewaschen und sofort zur FACS™-Analyse verwendet.

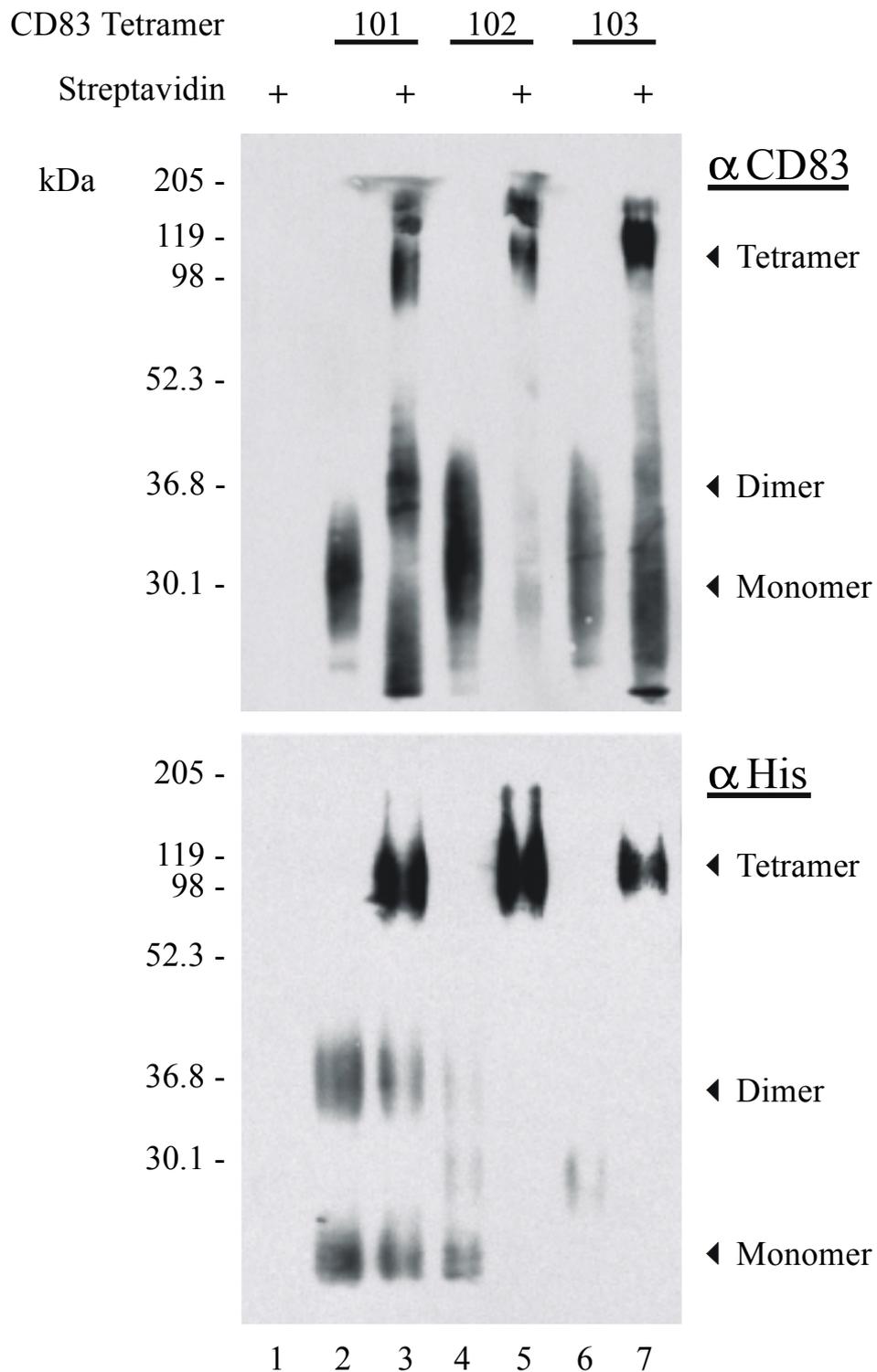


Abbildung 38: Streptavidin-Shift-Assay der CD83-Tetramere

Für den Shift-Assay wurden entweder 5 μ l Streptavidin mit 15 μ l PBS (Reihe 1), bzw. 15 μ l Monomer 101, 102, 103 mit 5 μ l PBS (Reihe 2, 4, 6) oder 15 μ l Monomer 101, 102, 103 mit 5 μ l Streptavidin (Reihe 3, 5, 7) versetzt und ü/N bei 4°C inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden Aliquots von 1 μ l pro Spur auf ein 10%-iges SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen. CD83-Monomere, -Dimere und -Tetramere wurden auf einem Western-Blot mittels anti-CD83-Antikörper (oben) und anti-His-Antikörper (unten) sichtbar gemacht.

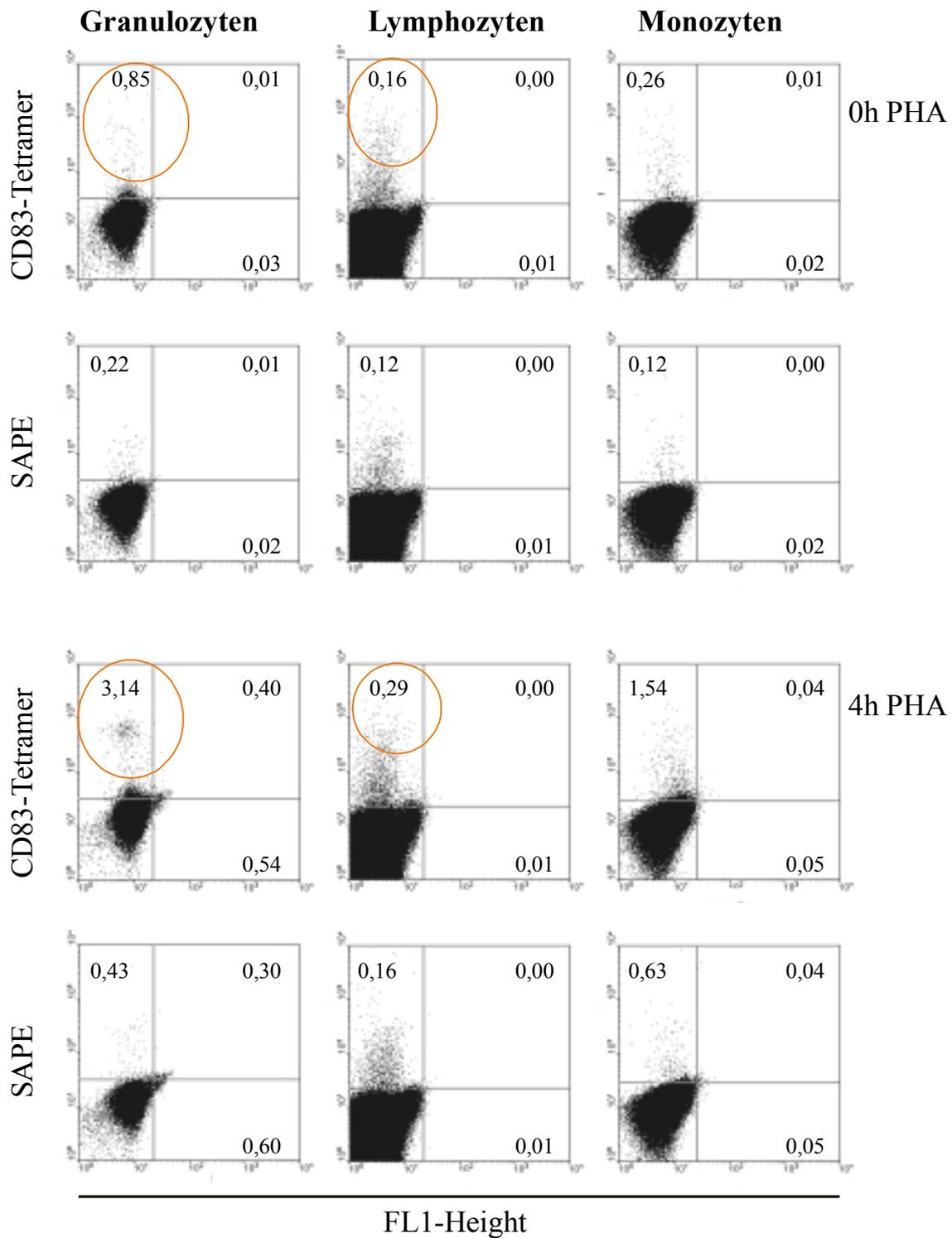


Abbildung 39: Bindung des CD83-Tetramers auf aktivierten Granulozyten und Lymphozyten

PBMCs wurden isoliert und für 0, bzw. 4h mit PHA stimuliert. Anschließend wurden die Zellen für 30min mit Streptavidin präinkubiert, einmal gewaschen und entweder mit PE-markiertem CD83-Tetramer oder Streptavidin-Phycoerythrin (SAPE) allein inkubiert. Jeweils 1×10^6 als lebend definierte Zellen wurden bei der FACS™-Analyse verwendet und anschließend in Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten unterteilt. Mit CD83-Tetramer gefärbte Zellen sind mit einem roten Ring hervorgehoben. Dieser Versuch wurde insgesamt fünfmal mit jeweils verschiedenen Spendern und den drei Tetrameren wiederholt. In dieser Abb. wurde das CD83-Tetramer 101 verwendet.

Die PBMCs wurden wie in der in Abbildung 34 dargestellten Grafik in Lymphozyten, Granulozyten und Monozyten unterteilt. Sowohl in der Granulozyten- als auch in der Lymphozyten-Fraktion konnte eine Färbung von einigen Zellen mit dem CD83-Tetramer festgestellt werden (Abb. 39). 20-48 Stunden nach Stimulation konnte nur noch eine schwache Bindung, bzw. keine Bindung mit dem CD83-Tetramer erhalten werden (Daten nicht gezeigt). Diese Experimente gaben einen ersten Hinweis auf einen möglichen CD83-Liganden in einer kleinen Granulozyten und Lymphozyten-Population und legten darüber hinaus nahe, daß der CD83-Ligand einer strengen Regulation unterliegt. Der Versuch wurde mehrmals mit allen drei Tetrameren durchgeführt.

3.8.2.5 Bindungsstudien mit den CD83-Tetrameren auf CD4⁺ und CD8⁺ Zellen

Da ein CD83-Ligand besonders auch auf T-Zellen erwartet wurde, wurden T-Zellen einer genaueren Analyse mit CD83-Tetrameren unterzogen. PBMCs wurden aufgereinigt und in Standardmedium aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen nicht oder für 4 und 20 Stunden mit PHA stimuliert und die Zellen mit anti-CD4, bzw. anti-CD8 Antikörpern, die an magnetische Partikel gekoppelt waren, auf Eis inkubiert und über MACS-Sortierung in CD4- und CD8-positive Zellen aufgetrennt. Danach wurden die Zellen zunächst mit ungekoppeltem Streptavidin präinkubiert und später mit dem PE-markiertem CD83-Tetramer und als Kontrolle mit Streptavidin-PE (SAPE) gefärbt. Außerdem wurden Doppelfärbungen mit anti-CD4 und anti-CD8 durchgeführt. Bei der Färbung der Zellen konnte eine Färbung mit CD83-Tetramer sowohl auf CD4, als auch auf CD8 positiven Zellen festgestellt werden (Abb. 40a, b), jedoch war der Anteil CD83-Tetramer bindender Zellen in der CD8-Fraktion eindeutig höher als in der CD4-Fraktion (Abb. 40b).

3.8.2.6 Bindung des CD83-Tetramers an der T-Zellkultur KS

Nachdem eine Bindung des CD83-Tetramers auf PBMCs festgestellt worden war, sollte versucht werden, evtl. eine T-Zellkultur, eine T-Zelllinie oder einen T-Zellklon zu identifizieren, auf dem eine Expression des CD83-Liganden eindeutig nachgewiesen werden kann. CD83-Tetramer bindende Zellen sollen für eine spätere Klonierung des CD83-Liganden verwendet werden.

a

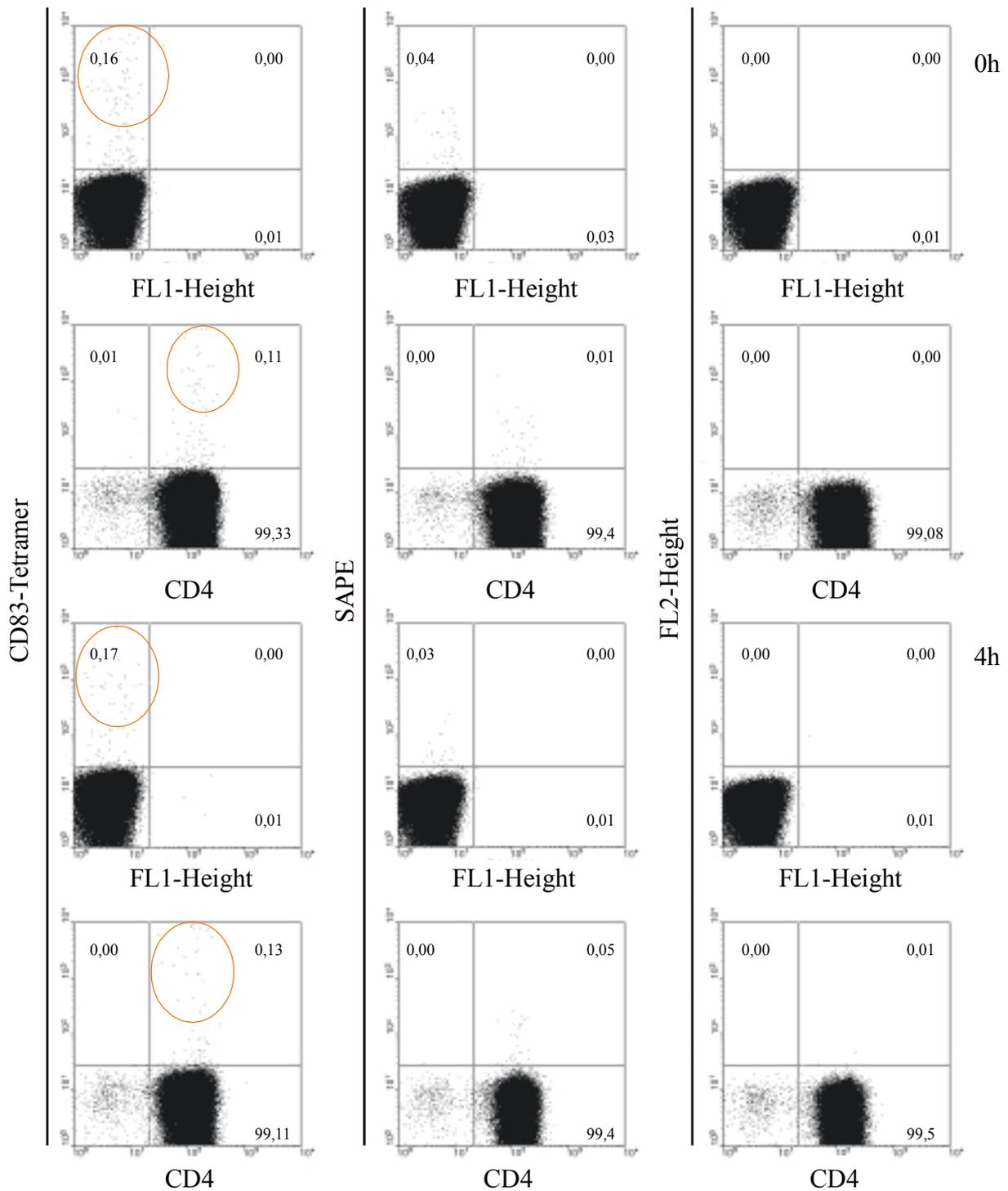
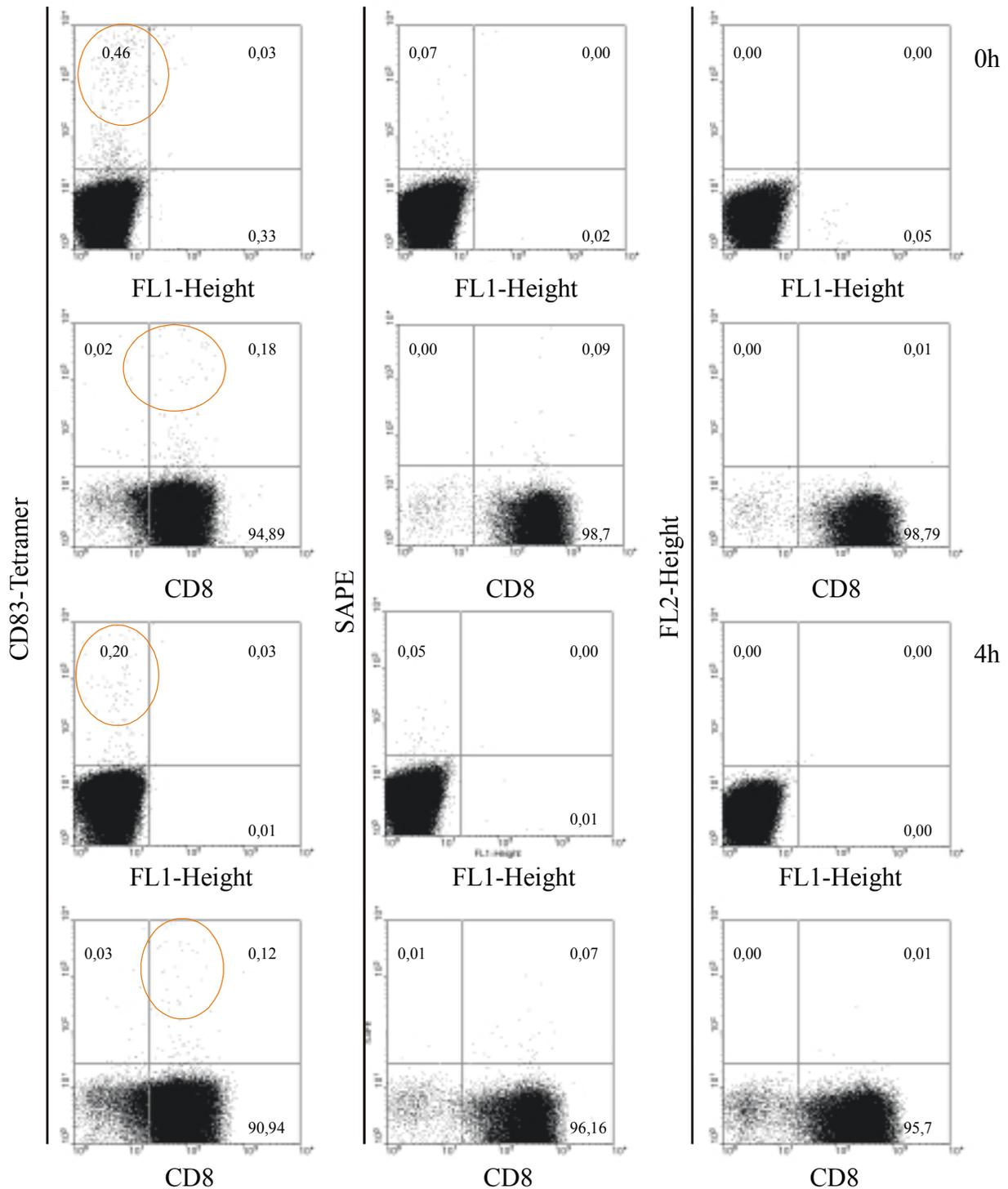


Abbildung 40: Bindungsstudien des CD83-Tetramers auf isolierten CD4- und CD8-positiven Lymphozyten

Dargestellt sind jeweils 1×10^6 CD4⁺ (a), bzw. CD8⁺ (b) unstimulierte oder für 4 Stunden mit PHA stimulierte PBMCs, die mit dem PE-markierten CD83-Tetramer und zur Kontrolle mit Streptavidin-PE (SAPE) gefärbt wurden. Zur weiteren Darstellung und Einstellung der Zellen wurden ungefärbte Zellen verwendet. Mit CD83-Tetramer gefärbte Zellen sind mit einem roten Ring hervorgehoben. Dieser Versuch wurde insgesamt fünfmal mit verschiedenen Spendern wiederholt.

b



Dazu wurden die T-Zelllinien T6, T7, KS, H1 und Atabay 3 Tage nach Stimulation mit dem CD83-Tetramer untersucht. Außerdem wurden auch die Zelllinien HPB-ALL und Jurkat verwendet. Die T-Zelllinien wurden mit ungekoppeltem Streptavidin präinkubiert und anschließend mit FITC-markiertem anti-CD4, bzw. mit anti-CD8 Antikörper und PE-markiertem CD83-Tetramer oder Streptavidin-PE inkubiert und im FACS analysiert.

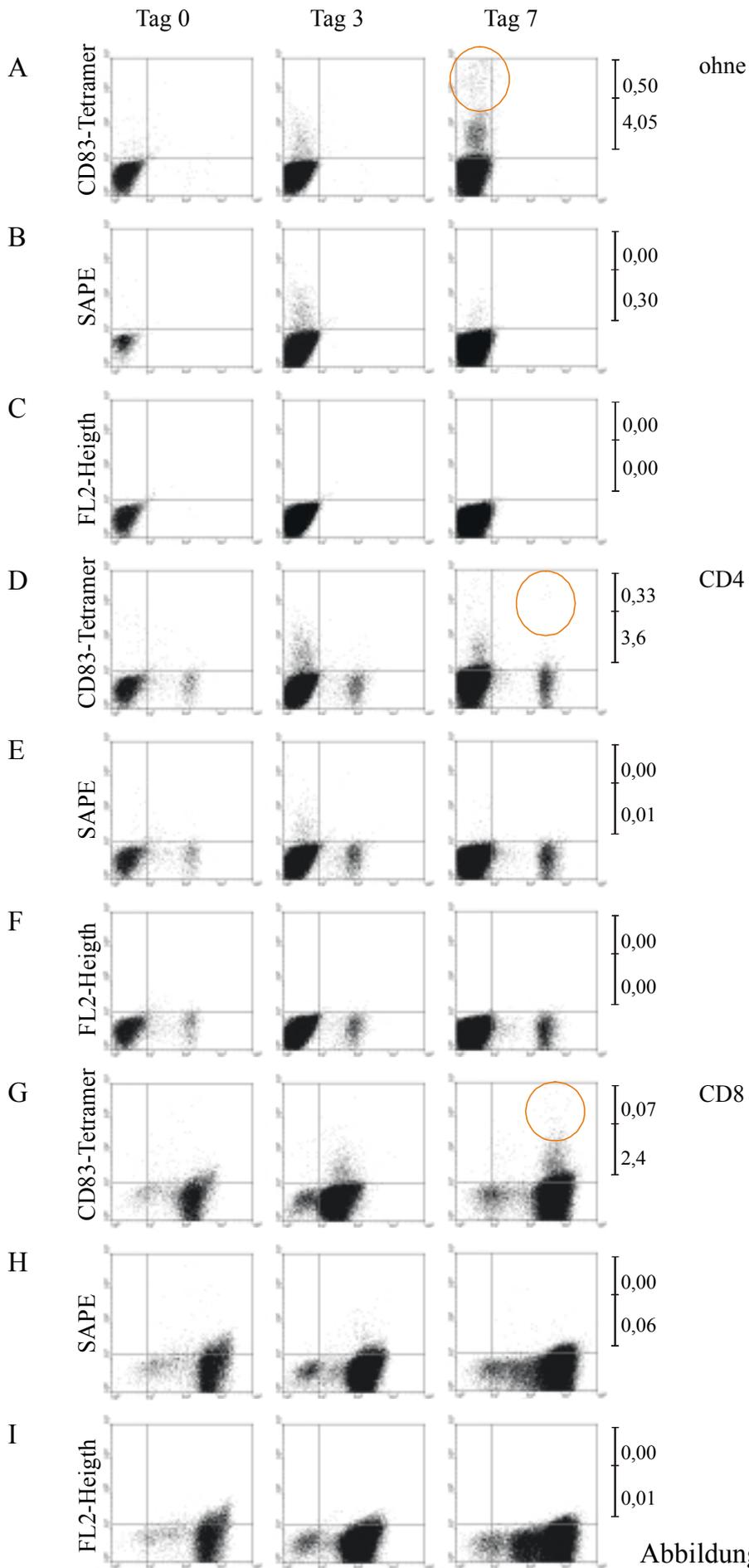


Abbildung 41 (b)

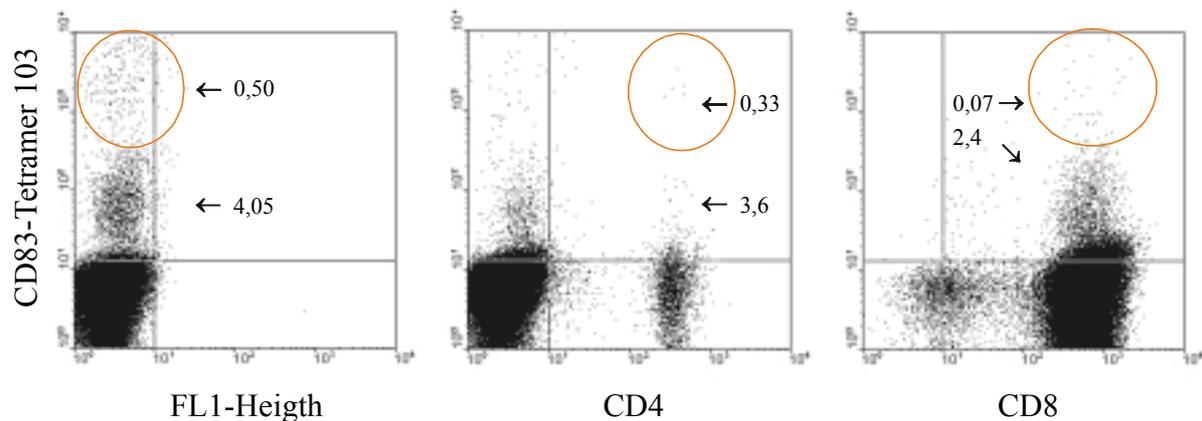


Abbildung 41: Bindung des CD83-Tetramers auf aktivierten CD8⁺ T-Zellen der T-Zelllinie KS

- a) Seite 78: Jeweils 1×10^6 Zellen der T-Zelllinie KS wurden am Tag 0, 3 und 7 nach Stimulation mit Streptavidin präinkubiert, einmal gewaschen und anschließend mit PE-markiertem CD83-Tetramer 103 (Zeilen A, D, G) oder Streptavidin-PE (SAPE, Zeilen B, E, H) inkubiert. Gleichzeitig wurden die Zellen mit einem FITC-markierten anti-CD4- (Zeilen D-F) oder anti-CD8-Antikörper (Zeilen G-I) gefärbt. Zur Einstellung der Zellen wurden ungefärbte Zellen verwendet (Zeile C). CD83-Ligand-positive KS-Zellen wurden mit einem roten Ring hervorgehoben. Die angegebenen Zahlenwerte sind Prozent gefärbte Zellen und beziehen sich auf Tag 7 (Reihe A-C bezogen auf Gesamtpopulation; Reihe D-F bezogen auf CD4⁺ KS-Zellen; Reihe G-I bezogen auf CD8⁺ KS-Zellen). Dargestellt sind jeweils 5×10^5 als lebend definierte Zellen.
- b) Seite 79: KS-Zellen am 7.Tag nach Stimulation aus den Reihen A, D, G der Abbildung 41 a) vergrößert dargestellt. Die angegebenen Zahlenwerte sind Prozent CD83-Tetramer-positive KS-Zellen. CD83-Ligand-positive KS-Zellen wurden mit einem roten Ring hervorgehoben.

Bis auf die T-Zelllinien T6 und KS konnte entweder keine oder nur eine sehr schwache Bindung der Tetramere festgestellt werden. Zur weiteren Analyse wurde die T-Zelllinie KS über mehrere Passagen (5, 7, 8, 11 und 12) und zu verschiedenen Zeitpunkten nach Stimulation auf die Expression des Liganden untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, daß die KS-Zellen der Passage 5 v.a. auf den CD8⁺ T-Zellen 7 Tage nach Stimulation eine starke Expression des CD83-Liganden aufwiesen (Abb. 41). Diese starke Expression schien auf die frühen Passagen beschränkt zu sein, da in den Passagen 11 und 12 kaum noch Bindung erkennbar war. In diesen Passagen sind die T-Zelllinien jedoch stark mit CD4⁺ T-Zellen angereichert und enthalten kaum noch CD8⁺ T-Zellen. Hierzu kann also in der *in vitro* Kultur eine CD83-Ligand-positive Population, v.a. innerhalb der CD8⁺ T-Zellen beschrieben werden.

4 Diskussion

Das V-Typ-Immunglobulin-ähnliche Oberflächenprotein CD83 wird vor allem auf reifen dendritischen Zellen exprimiert (Zhou und Tedder, 1995) und dient als Marker des Reifungsstatus und der Reinheit dendritischer Zellen. Weiterhin wurde eine CD83-Oberflächenexpression auch auf aktivierten B- und T-Lymphozyten (Kozlow *et al.*, 1993; Zhou *et al.*, 1992) sowie auf aktivierten polymorph-nukleären Neutrophilen (Iking-Konert *et al.*, 2001) gefunden. Über die Funktion von CD83 ist bisher sehr wenig bekannt. Ihm wird jedoch aufgrund seines Expressionsmusters eine wichtige Rolle in der Antigenpräsentation und/oder in den zellulären Interaktionen, die der Lymphozytenaktivierung folgen, zugesprochen (Zhou *et al.*, 1992). In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression von CD83 in EBV immortalisierten B-Zellen untersucht und gezeigt, daß CD83 über die von LMP-1 aktivierte NF- κ B Signalkaskade induziert wird. Neben der Analyse der Regulation im EBV-System wurden in dieser Arbeit die Grundlagen für die Identifizierung eines CD83-Liganden gelegt, um später die funktionelle Rolle von CD83 sowohl im Kontext von EBV als auch im Rahmen der Immunantwort studieren zu können.

4.1 Induktion und Regulation von CD83 in ER/EB2-5 und anderen Zelllinien

Zu Beginn dieser Arbeit war eine Regulation der CD83-Expression durch EBV noch nicht beschrieben. Zhou und Tedder konnten in der BL-Zelllinie Raji eine starke, in den BL-Linien Daudi und Namalwa eine schwache und in der pre-B-Zelllinie NALM-6 keine mRNA Expression von CD83 nachweisen. Zu einer ersten Analyse der CD83-Expression in EBV-infizierten Zellen wurde die Zelllinie ER/EB2-5 gewählt. In dieser lymphoblastoiden Zelllinie ist das Epstein-Barr Virus nukleäre Antigen EBNA-2 durch Fusion an die Hormonbindedomäne des Östrogenrezeptors durch Östrogen konditional-regulierbar. In Abwesenheit von Östrogen arretieren diese Zellen und regulieren die Expression von B-Zellaktivierungsmarkern wie CD21 oder Adhäsionsmolekülen wie CD44 und CD58 herunter (Kempkes *et al.*, 1995b). Die arretierten ER/EB2-5 Zellen gleichen ruhenden B-Zellen, den Zielzellen des Epstein-Barr Virus. Durch Zugabe von Östrogen wird das ER/EBNA2 Fusionsprotein funktionell aktiviert, die genannten Oberflächenproteine werden exprimiert und die Zellen beginnen wieder zu proliferieren. Da die posttranslationale Aktivierung von EBNA-2 auch ohne *de novo* Proteinbiosynthese durchgeführt werden kann, ist es möglich, direkte EBNA-2 Zielgene durch gleich-

zeitige Zugabe von Östrogen und Proteinsynthese-Inhibitoren in Östrogen-depletierten ER/EB Zellen zu identifizieren und von nachgeschalteten Genprodukten zu unterscheiden (*Kaiser et al., 1999*). FACSTM-Analysen zeigten, daß CD83 auf proliferierenden ER/EB2-5 Zellen detektiert werden kann (Abb. 6b). Es stellte sich die Frage, ob CD83 in Abhängigkeit von funktionellem EBNA-2 in diesen Zellen exprimiert wird. Northern-Blot Analysen demonstrierten die Induktion von CD83 durch EBNA-2 eindrucksvoll (Abb. 6a). Es kam zu einer schnellen transienten Induktion mit einem Maximum 6 Stunden nach EBNA-2 Aktivierung. Nach 18 Stunden wurde die CD83 mRNA auf ein niedrigeres Niveau herunterreguliert, das aber noch deutlich höher lag als in uninduzierten Zellen. Diese starke transiente Induktion wurde bisher bei keinem der direkten und indirekten Zielgene von EBNA-2 festgestellt. Bei den meisten untersuchten EBNA-2 Zielgenen (wie *c-myc*, CD21, EBI 1, LMP-1) wurde eine kontinuierliche Steigerung über 15 Stunden und eine leichte Reduzierung nach 24 Stunden beobachtet (*Kaiser, Dissertation, 1999*). Auf Proteinebene konnte CD83 in ER/EB2-5 Zellen nach drei Stunden auf der Oberfläche nachgewiesen werden und zeigte ein Expressionsmaximum nach ca. 12-20 Stunden, das in proliferierenden ER/EB2-5 Zellen gehalten wurde (Abb. 6b). Nach Hormonentzug war CD83 in FACSTM-Analysen innerhalb von 24 bis 48 Stunden nicht mehr auf der Oberfläche detektierbar (Abb. 8b). Ebenso wurde bei Entzug von Östrogen in ER/EB2-5 Zellen die CD83 mRNA innerhalb von 12-24 Stunden herunterreguliert (Abb. 8a). Nach Östrogenentzug wurde CD83 vollständig in kurzer Zeit degradiert (Daten nicht gezeigt), während andere Oberflächenmoleküle wie CD86 und MHC-Klasse-I nur gering davon beeinflusst wurden. Im Gegensatz dazu wurde bei Infektion reifer dendritischer Zellen mit Herpes-Simplex-Virus 1 (HSV-1), einem α -Herpesvirus, der typische Reifungsmarker CD83 herunterreguliert. Die Moleküle CD25, CD40, CD80, CD86, CD95 sowie MHC-Klasse-I und -II waren durch diese Infektion nicht beeinflusst (*Kruse et al., 2000b*).

Neben den ER/EB2-5 Zellen wurden auch andere EBV-negative und EBV-positive B-Zelllinien untersucht. Dabei konnte in der EBV-negativen BL-Zelllinie BL41 sowie deren Konvertanten BL41-P3HR1 (BL41-Zellen, die mit dem EBNA-2 defizienten transformationsin-kompetenten, aber replikationskompetenten EBV-Virus P3HR1 infiziert sind) und BL41-B95-8 (BL41-Zellen, die mit dem EBV-Prototyp B95-8 infiziert sind) eine Korrelation der CD83-Expression mit der EBNA-2 Expression beobachtet werden (Abb. 9). In der EBV-negativen Zelllinie BL41 und der EBNA-2 defizienten Zelllinie BL41-P3HR1 wurde nur eine minimale Expression von CD83 sowohl auf RNA als auch auf Proteinebene beobachtet. In BL41-B95-8 Zellen, in denen das gesamte Repertoire der latenten EBV-Antigene exprimiert wird, wurde CD83 dagegen stark exprimiert. Die Analyse weiterer BL-Zelllinien mit Latenztyp I und III

ergab, daß CD83 stark auf BL-Zellen mit Latenztyp III und wenig bis gar nicht auf den BL-Zellen mit Latenztyp I exprimiert wurde (Daten nicht gezeigt). Keine Expression von CD83 war auf den EBV-negativen pre-B Zellen Nalm-6 und SEM-K2 zu finden.

Die bisherigen Ergebnisse ließen vermuten, daß EBNA-2 und/oder EBNA-2 Zielgene eine wichtige Rolle für die Induktion von CD83 in den EBV-immortalisierten LCLs spielen. Deshalb wurde mit Hilfe des Proteinsynthese-Inhibitors Cycloheximid und gleichzeitiger Zugabe von Östrogen zu Hormon-depletierten ER/EB2-5 Zellen untersucht, ob CD83 ein direktes Zielgen von EBNA-2 ist. Die Zugabe von Cycloheximid allein führte bereits zu einer gewissen Anreicherung der CD83 mRNA (Abb. 7). Demgegenüber erschien die CD83-Expression durch gleichzeitige Zugabe von Östrogen und Cycloheximid etwas verstärkt, was auf einen gewissen Einfluß von EBNA-2 schließen läßt. Durch Sequenzvergleiche des CD83-Promotors und seiner Intronsequenzen konnte keine RBP-J κ Bindestelle gefunden werden. Ein Einfluß von EBNA-2 auf die CD83-Expression sollte also vermutlich über einen RBP-J κ unabhängigen Signalweg erfolgen. Zur Bestätigung, daß RBP-J κ für die CD83-Expression keine Rolle spielt, wurde überprüft, ob das zelluläre Notch die Expression von CD83 beeinflusst. Dazu wurden verschiedene Notch-IC (entspricht intrazellulärem Notch) exprimierende Zelllinien untersucht, die Notch-IC entweder unter Kontrolle eines Tetrazyklin-induzierbaren Promotors in ER/EB2-5 Zellen (Zelllinie 1414-3) oder ein Östrogen regulierbares Notch-IC in BL41 Zellen (BL41-mNotch-IC) exprimierten. In beiden Zelllinien konnte unter aktiviertem Notch weder auf RNA- noch auf Proteinebene eine Induktion einer CD83-Expression beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, daß die CD83-Expression nicht über eine RBP-J κ vermittelte Aktivierung induziert wird. Deshalb wurden EBNA-2 induzierte Gene wie *c-myc* und LMP-1 als mögliche Induktoren von CD83 näher untersucht.

4.2 Suche nach dem Transaktivator von CD83

Nachdem gezeigt werden konnte, daß die CD83-Expression durch EBV beeinflusst wird, EBNA-2 selbst jedoch eine indirekte Rolle bei der Aktivierung des CD83-Promotors spielt, wurde untersucht, welches EBNA-2 nachgeschaltete Gen als Induktor von CD83 in Frage kommt. Dazu wurde die CD83-Expression zunächst in den Zelllinien P493-6 und 1194-3 untersucht.

P493-6 Zellen sind ER/EB2-5 Zellen, in die stabil ein durch Tetrazyklin regulierbares *c-myc* Gen eingebracht wurde (*Pajic et al. 2000, 2001; Schuhmacher et al., 1999*). Das Proto-Onko-

gen *c-myc* ist ein direktes Zielgen von EBNA-2 (*Kaiser et al., 1999*) und besitzt eine Funktion in der Regulation der Proliferation, Differenzierung und Apoptose (*Henriksson und Lüscher, 1996*) sowie des Zellwachstums (*Schuhmacher et al., 1999*). In P493-6 Zellen besteht durch Zufügen oder Wegnehmen von Tetrazyklin und/oder Östrogen die Möglichkeit, EBNA-2 und Myc gemeinsam oder getrennt an- oder abzuschalten. P493-6 Zellen können auch in Abwesenheit von EBNA-2 nur unter Myc proliferieren. Als Ergebnis der Untersuchungen dieser Zelllinie konnte gezeigt werden, daß die CD83-Expression von der Myc-Expression unabhängig ist (Abb. 10a, b). CD83 ist somit kein Zielgen von *c-myc*.

Um zu testen, ob CD83 ein LMP-1 Zielgen ist, wurde die Zelllinie 1194-3 auf die CD83-Expression analysiert. 1194-3 Zellen sind ER/EB2-5 Zellen, die zusätzlich mit einem Plasmid transfiziert wurden, das eine konstitutive Expression von LMP-1 in diesen Zellen ermöglicht. Dies macht die LMP-1 Expression unabhängig von EBNA-2. Trotzdem proliferieren diese Zellen nur unter Zugabe von Östrogen, d.h. unter funktionell aktivem EBNA-2. Das bedeutet, daß LMP-1 in diesen Zellen die Funktion von EBNA-2 nicht ersetzen kann, wenn auch unter Östrogenentzug eine längere Überlebensdauer als bei ER/EB2-5 Zellen beobachtet werden kann. Ohne Östrogen sind 1194-3 Zellen bis zu einer beobachteten Dauer von 14 Tagen lebensfähig (Daten nicht gezeigt). Der Entzug von Östrogen hatte auf die Expression von CD83 in den ersten 5-7 Tagen kaum einen Effekt (Daten nicht gezeigt und Abb. 11a). LMP-1 kann also die Expression von CD83 nach Östrogenentzug (d.h. ohne EBNA-2) aufrechterhalten. Erst zu einem späteren Zeitpunkt war eine gewisse Abnahme der CD83-Expression zu beobachten, was auf eine zusätzliche Beteiligung von EBNA-2 an der CD83-Regulation schließen läßt (Abb. 11a). Ein klares Ergebnis aus diesen Experimenten ist jedoch, daß LMP-1 einen positiven regulatorischen Einfluß auf die Expression von CD83 in den 1194-3 Zellen besitzt.

Im Gegensatz zu den 1194-3 Zellen, die ein konstitutives LMP-1 Gen tragen, ist in die neu etablierte Zelllinie B64-19 (*Dirmeier et al., Manuskript zur Veröffentlichung eingereicht*) ein regulierbares LMP-1 eingebracht worden. Die intrazelluläre C-terminale Domäne von LMP-1 ist dabei an die extrazelluläre Domäne des NGF-Rezeptors fusioniert. Erst durch Zugabe von Primärantikörper, der gegen den NGF-R gerichtet ist und späterem Cross-Link mit einem Sekundärantikörper, der gegen den Primärantikörper gerichtet ist, kann LMP-1 auf Proteinebene funktionell aktiviert und seine Signalwege bedient werden (Abb. 12a). Die Antikörper vermittelte Aggregation von LMP-1 imitiert dabei den Mechanismus der konstitutiven Aktivierung durch das virale LMP-1 Protein in Sphingolipid-haltigen Membrankomplexen. CD83 wurde nach Induktion des Systems innerhalb von 30 Minuten als mRNA

exprimiert, zeigte nach drei Stunden bereits die maximale Expressionshöhe und wurde danach auf ein nicht nachweisbares Maß reduziert (Abb. 12b). Auch CD83-Protein war innerhalb kürzester Zeit (30 Minuten) auf der Oberfläche der B64-19 Zellen nachweisbar, drei Stunden nach Induktion zeigte sich eine maximale Expression von CD83 auf der Oberfläche dieser Zellen (Abb. 12c). Mit diesem Zellsystem konnte eindeutig gezeigt werden, daß LMP-1 für die Aktivierung von CD83 verantwortlich ist.

4.3 Regulation des CD83-Promotors

Nachdem CD83 als LMP-1 Zielgen identifiziert worden war, sollte versucht werden, diese Regulation auf Promotorebene genauer zu analysieren. Dazu konnte auf die freundlicherweise von A. Steinkasserer (Uni Erlangen-Nürnberg, Dermatologie, Erlangen) zur Verfügung gestellten CD83-Promotorkonstrukte zurückgegriffen werden (*Berchtold et al., 2002*). Im CD83-Promotor befinden sich eine NF- κ B Bindestelle und vier SP1 Bindestellen (Abb. 13; *Berchtold et al., 2002*). Insgesamt wurden fünf verschiedenen CD83-Promotor-Luziferase-Konstrukte auf ihre Aktivierbarkeit untersucht. Das pGL CD83 (-3037bp) Konstrukt stellt die ersten 3037 Basenpaare des CD83-Promotors dar. Außerdem wurde ein Stück des CD83-Promotors kloniert, dem ein stark GC-reicher Sequenzabschnitt direkt vor dem Transkriptionsstartpunkt fehlt, auf dem sich alle vier SP1-Bindestellen befinden (-3037 Δ SP1). Zusätzlich zu diesen beiden Konstrukten wurden Minimalpromotoren verwendet, die auf die vier SP1- und NF- κ B-Bindestellen, bzw. auf die NF- κ B-Bindestelle reduziert sind. In der CD83-Promotormutante pGL CD83 (-123mut) wurde die NF- κ B-Bindestelle vollständig durch Mutation zerstört, so daß eine Bindung von NF- κ B nicht mehr möglich ist, was durch Gelretardationsanalysen verifiziert wurde (*Berchtold et al., 2002*).

Zunächst wurde die Grundaktivität des pGL CD83 (-3037bp) CD83-Promotor-Luziferase-Konstruktes durch Transfektion in verschiedenen Zelllinien getestet (Daten nicht gezeigt). Dabei zeigte sich, daß Zelllinien wie ER/EB2-5, Raji oder BL41-B95-8, den CD83-Promotor sehr gut aktivierten. Eine Ausnahme bildete die Zelllinie BL41, die trotz geringer endogener CD83-Expression eine starke Transaktivierung des CD83-Promotorkonstruktes aufwies. Die Konvertante BL41-B95-8 zeigte gegenüber BL41 Zellen eine ca. doppelt so hohe Transaktivierung des CD83-Promotors. SEM-K2, A1 und P493-6 Zellen, die unter *c-myc* proliferierten, konnten den CD83-Promotor nicht aktivieren. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit den RNA-Daten und der Oberflächenfärbung für CD83 (Daten nicht gezeigt) dieser Zellen. A1 Zellen sind abgeleitete ER/EB2-5 Zellen, in die ein konstitutiv aktives *c-myc* Gen stabil trans-

fiziert wurde. Sie proliferieren in Abwesenheit von Östrogen und ähneln in Wachstumsverhalten und Phänotyp, EBV positiven BL-Zellen mit Latenz I (*Staege et al., 2002*).

LMP-1 benutzt zur Aktivierung seiner Zielgene vier bislang identifizierte zelluläre Signalwege. Dabei werden die zellulären Transkriptionsfaktoren NF- κ B, ATF-2, Jun/Fos oder STAT funktionell aktiviert, die dann ihre Zielgene transkriptionell aktivieren (Übersicht in Abb. 3, 4). Tatsächlich konnte in 293-T Zellen mit LMP-1 Expressionsplasmiden unter Verwendung des pGL CD83 (-3037bp) CD83-Promotor-Luziferase-Konstruktes eine Regulation des CD83-Promotors durch LMP-1 gezeigt werden (Abb. 14). Als nächstes galt es zu klären, über welchen Signalweg LMP-1 den CD83-Promotor aktiviert. Dazu wurden Mutanten von LMP-1 benutzt, die von A. Kieser zur Verfügung gestellt wurden. Diese Deletions- und Punktmutanten von LMP-1 sind im intrazellulären C-terminalen Bereich von LMP-1 wie unter 2.7 und 2.8 beschrieben verändert. Die Ergebnisse der Co-Transfektionsexperimente zeigten, daß der CD83-Promotor über LMP-1 aktiviert wird und eine Transaktivierung nicht mehr möglich ist, wenn der intrazelluläre C-Terminus von LMP-1 fehlt, bzw. wenn die für die Transaktivierung von zellulären Zielgenen notwendigen Sequenzmotive PxQxT und Tyr₃₈₄ mutiert sind. Dies gilt für alle benutzten CD83-Promotorkonstrukte. Das Promotorkonstrukt pGL CD83 (-123) war im Vergleich zu den längeren Promotorkonstrukten pGL CD83 (-3037), pGL CD83 (-3037 Δ SP1) und pGL CD83 (-261) um etwa die Hälfte in seiner Aktivierbarkeit durch LMP-1 reduziert. LMP-1 Mutanten in denen nur das PxQxT Motiv (PQT \rightarrow AAA) oder Tyr₃₈₄ zu Gly₃₈₄ mutiert waren, behielten bei Verwendung der Promotorkonstrukte pGL CD83 (-3037), (-3037 Δ SP1), (-261) und (-123) ca. 70%, bzw. 30% der Aktivität von Wildtyp LMP-1. Allein das CD83-Promotor-Luziferase-Konstrukt, in dem die NF- κ B-Bindestelle durch Mutation vollständig zerstört worden war, konnte weder durch LMP-1 noch durch eine der LMP-1 Mutanten transaktiviert werden (Abb. 15). Diese Ergebnisse deuten auf eine Regulation von LMP-1 über den NF- κ B-Signalweg hin. TRAF-2 bindet über das PxQxT-Motiv in der CTAR-1-Region an LMP-1 und kann anschließend TRAF-6 aktivieren (*Schultheiss et al., 2001*), welches den NF- κ B-Signalweg über Phosphorylierung und Degradation von dem im Komplex mit NF- κ B befindlichen I- κ B anschaltet. Schließlich wird NF- κ B freigesetzt, das nach Transport in den Zellkern seine Zielgene aktiviert. Andererseits bindet an das Tyr₃₈₄ in der CTAR-2-Region TRADD, jedoch mit einer von der Todesdomäne unterschiedlichen Sequenz. TRADD wiederum aktiviert TRAF-2, welches dann über TRAF-6 NF- κ B aktiviert. Die Bindung von TRADD an CTAR-2 ist nicht nur für die Aktivierung von NF- κ B, sondern auch des p38-Signalweges verantwortlich.

Um die Transaktivierung von CD83 über NF- κ B genauer zu studieren, wurde LMP-1 zusammen mit einer dominant-negativen Form von I- κ B und den CD83-Promotor-Luziferase-Konstrukten transient in 293-T Zellen transfiziert. Die Aktivierung des CD83-Promotors wurde dabei vollständig inhibiert (s. Vergleich der CD83-Promotormutante pGL CD83 (-123mut) mit dem Promotorkonstrukt pGL CD83 (-123), Abb. 16).

Außerdem wurde untersucht, ob der CD83-Promotor auch über den STAT-Signalweg von LMP-1 aktiviert werden kann. STAT wird über JAK3 aktiviert, welches an ein Sequenzmotiv in der CTAR-3 Region des C-Terminus von LMP-1 bindet (*Gires et al., 1999*). Die CTAR-3-Region ist für die Transformation nicht essentiell. In den Experimenten wurde ein mit einem Flag-Epitop modifiziertes LMP-1 Expressionsplasmid, eine Δ 33 LMP1 Mutante, der die CTAR-3-Region vollständig fehlte oder ein JAK3 Expressionsplasmid (Maus JAK3) mit der CD83-Promotormutante -3037 in 293-T Zellen transient transfiziert. Beide LMP-1 Expressionsplasmide führten dabei zur Transaktivierung des CD83-Promotors, JAK3 allein zeigte jedoch keine Wirkung (Daten nicht gezeigt). Damit konnte eine Regulation des CD83-Promotors durch den STAT-Signalweg ausgeschlossen werden. Außerdem wurde die Transaktivierung über Jun/Fos ausgeschlossen, da im Promotor bis an Position -3037 keine AP-1 Bindemotive gefunden wurden. Neben diesen beiden Signaltransduktionswegen wurde weiterhin der Signalweg, der zur Aktivierung von p38 und dem Transkriptionsfaktor ATF-2 führt, untersucht. Dabei konnte keine Transaktivierung des CD83-Promotorkonstrukts pGL CD83 (-3037) festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Ebenso wurde auf dem CD83-Promotor keine ATF-2 Bindesequenz gefunden. Im Gegensatz hierzu kooperieren der p38- und der NF- κ B-Signalweg bei der Induktion von CD83 durch LPS oder TNF- α im Prozeß der Reifung dendritischer Zellen. In diesem Zellsystem kann die Induktion von CD83 erst durch gleichzeitige Blockade beider Signalwege inhibiert werden (*Ardeshna et al., 2000*).

Die CD83-Promotoren wurden auch auf ihre Transaktivierbarkeit durch Expressionsplasmide für TRAF-2 und TRAF-6 getestet. Beide Moleküle aktivierten den CD83-Promotor unterschiedlich stark. Wiederum zeigte die CD83-Promotormutante mit mutiertem NF- κ B weder über TRAF-2 noch über TRAF-6 irgendeine Transaktivierbarkeit (Abb. 17).

Wie bereits angedeutet, kann die CD83-Expression auf Monozyten, dendritischen Zellen, Granulozyten-Vorläuferzellen, Metamyelozyten und Myelozyten je nach Zelltyp durch Zugabe von TNF- α , LPS, IL-4, IFN- γ , GM-CSF oder CD40-L positiv beeinflusst werden (*Ardeshna et al., 2000; Armitage et al., 1996; Lyakh et al., 2000; Palucka et al., 1998; Romani et al., 1998; Sallusto und Lanciavercchia, 1994; Yamashiro et al., 2000; Zhou et al., 1992, 1996*). Alle bis dahin veröffentlichten Daten bezogen sich rein auf die Oberflächenexpression von

CD83 auf dendritischen Zellen. Da gezeigt wurde, daß der CD83-Promotor über TRAF-2 und TRAF-6 transaktiviert werden kann, sollte überprüft werden, ob das dem LMP-1 in seiner Funktion und der Aktivierung zelluläre Signalwege sehr ähnliche Molekül CD40 einen Einfluß auf die Regulation des CD83-Promotors besitzt. Diese Frage wurde mit Hilfe des Fusionsmoleküls LMP-1:CD40 untersucht (Gires *et al.*, 1997). Normalerweise wird die Signalkaskade von CD40 durch Bindung des CD40-Liganden an die extrazelluläre Domäne und die darauffolgende Oligomerisierung der intrazellulären Domäne aktiviert. Durch Fusion der Membrandomäne von LMP-1 mit dem intrazellulären Teil von CD40 (Abb. 18a) wird der CD40-Signalweg konstitutiv aktiviert, ohne daß der CD40-L benötigt wird. Wie in den Reporterassays gezeigt, aktiviert das LMP-1:CD40 Fusionsprotein den CD83-Promotor, so lange die NF- κ B Bindesequenz intakt ist. In der CD83-Promotormutante mit mutierter NF- κ B-Bindestelle war eine Aktivierung nicht mehr möglich (Abb. 18b). Co-Transfektionsergebnisse mit dem Expressionsplasmid für LMP-1:CD40 und dem d/n I- κ B führten zur gleichen Schlußfolgerung (Abb. 18b).

Die Expression von CD83 an der Zelloberfläche dendritischer Zellen ist durch Zugabe von TNF- α induzierbar (Lyakh *et al.*, 2000; Zhou *et al.*, 1996). Neben einem LMP-1:TNF-R2 Fusionsgen (Gires *et al.*, 1997) wurde kürzlich auch ein LMP-1:TNF-R1 Konstrukt fertiggestellt (AG Kieser, nicht veröffentlicht). Mit Hilfe dieser Konstrukte konnte die Frage beantwortet werden, ob TNF- α über den TNF-R1, den TNF-R2 oder über beide den CD83-Promotor aktiviert. Beide Konstrukte zeigten eine aktivierende Wirkung auf den CD83-Promotor (Abb. 19a, b). Zusammenfassend kann festgehalten werden, daß die CD83-Expression hauptsächlich über NF- κ B reguliert wird und daß LMP-1 die CD83-Expression über die gleichen zellulären Signalwege wie die Mitglieder der TNF-R Familie (CD40, TNF-R1 oder TNF-R2) induziert.

4.4 Alternatives Spleißen von CD83

Zelloberflächenmoleküle wie CD28, CD80, CD86 oder CTLA-4 werden sowohl als Transmembranprotein als auch in löslicher Form exprimiert. Alle diese co-stimulatorischen Moleküle werden in die Immunglobulin-Supergen Familie eingeordnet und haben als Gemeinsamkeit, daß ihre löslichen Varianten durch alternatives Spleißen entstehen. Die löslichen Moleküle können sowohl inhibitorische als auch stimulatorische Wirkungen auf das Proliferationsverhalten von PBMCs besitzen (Guo *et al.*, 1995; Inobe *et al.*, 1994, 1996; Jeannin *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 1990; Magistrelli *et al.*, 1999a, b, 2001; Thompson und Allison, 1997; Übersicht bei Oosterwegel *et al.*, 1999). Da CD83 ebenfalls ein Mitglied der Immunglobulin-

Supergen Familie ist, wurde untersucht, ob CD83 alternativ gespleißt wird und eine lösliche Form existiert. Einen Hinweis auf alternatives Spleißen ergab sich aus der Northern-Blot Analyse, wo regelmäßig drei Banden von ~1,7, ~2,0 und ~2,5kB beobachtet wurden (*Zhou et al., 1992*).

Zum Nachweis von CD83-Spleißprodukten wurde cDNA von verschiedenen aktivierten ER/EB2-5 Zellen sowie von unstimulierten PBMCs verwendet. Mit den eingesetzten Primern, die den ORF von CD83 flankierten, konnten drei verschiedene PCR-Produkte in Östrogen-depletierten und restimulierten ER/EB2-5 Zellen sowie ein weiteres in unstimulierten PBMCs detektiert werden (Abb. 20). Die anschließende Klonierung und Sequenzanalyse zeigte, daß der ORF von CD83 aus insgesamt fünf Exons zusammengesetzt ist (Übersicht in Abb. 21). In Exon 1 und einem Teil von Exon 2 befindet sich das Signalpeptid, das für den Transport von CD83 an die Oberfläche verantwortlich ist. Auf dem zweiten Teil von Exon 2 und auf dem gesamten Exon 3 ist die extrazelluläre V-Typ Immunglobulin-ähnliche Domäne lokalisiert. Daß die Kodierung der Ig-Domäne über zwei verschiedene Exons erfolgt, wurde auch von den Ig-Supergen Familienmitgliedern Po (*Lemke et al., 1988*), CD4 (*Littman und Gettner, 1987*) und N-CAM (*Owens et al., 1987*) gezeigt. Exon 4 kodiert für die einfache Transmembrandomäne und Exon 5 stellt den intrazellulären C-Terminus dar. Die vier identifizierten PCR-Produkte wurden mit CD83-TM, CD83-a, CD83-b und CD83-c bezeichnet. CD83-TM besteht aus dem gesamten ORF von CD83 mit 618nt, der auch die Transmembrandomäne (Exon 4) enthält (Abb. 21). Das Produkt CD83-a hat eine Größe von 598nt. Hier wird ein intrinsischer Spleißdonor in Exon 3 verwendet, der zur Deletion eines 19nt großen Sequenzabschnittes aus dem 3' gelegenen Teil von Exon 3 (Deletion von nt364-382) führt (Abb. 21). Durch diese Deletion wird der Leserahmen von CD83 verschoben, so daß die zum Exon 4 gespleißte Sequenz nicht mehr die Transmembrandomäne kodiert, sondern eine Sequenz ohne Homologie zu bisher bekannten Proteinsequenzen. Ein ähnliches Spleißmuster ist auch in CD28 RNAs beobachtet worden, wo die Benutzung einer internen Spleißstelle in Exon 2 zur Änderung des Leserahmens führt (*Magistrelli et al., 1999*). In der 388nt großen Spleißvariante CD83-b ist Exon 3 vollständig verloren gegangen (Deletion von nt194-423). Dabei wird beim Übergang von Exon 2 zu Exon 4 der Leserahmen des CD83-Proteins verlassen und der gleiche Leserahmen wie in CD83-a benutzt. Sowohl in CD83-a als auch CD83-b wird durch die Änderung des Leserahmens ein neues STOP-Codon eingeführt, was zu einem verfrühten Kettenabbruch führt. Das kleinste Spleißprodukt CD83-c hat eine Größe von etwa 280nt (Deletion von nt154-489). In der CD83-c Variante fehlen Exon 3 und Exon 4 vollständig (Abb. 21). Der Leserahmen ist in dieser alternativen Spleißvariante nicht gestört. Das heißt

CD83-c besteht somit nur aus einem kurzen Anteil der extrazellulären Domäne, enthält keine Transmembrandomäne und besitzt denselben C-Terminus wie Wildtyp CD83. Allen drei Spleißprodukten ist gemeinsam, daß sie aufgrund einer fehlenden Transmembrandomäne in den Überstand sekretiert werden müßten. Ob diese Spleißvarianten zur Bildung unterschiedlicher Isoformen von CD83 auf Proteinebene führen, ist noch unbekannt. Nach Klonierung aller dieser alternativen Spleißprodukte in einen Expressionsvektor und Transfektion in 293-T Zellen konnte bislang jedoch nur die mit einem His-Epitop versehene CD83-c Spleißvariante im Überstand detektiert werden (Abb. 25). Unter Umständen sind die gebildeten Produkte aus den Spleißvarianten auch zu kurzlebig, um nachgewiesen werden zu können.

Für die Bildung neuer Isoformen von CD83 kommt neben dem hier beschriebenen alternativen Spleißen auch eine proteolytische Abspaltung der extrazellulären Domäne in Betracht. Von Hock et al. (2001) wurde in der Tat lösliches CD83 im Serum gesunder Erwachsener beobachtet und mit proteolytischer Abspaltung in Zusammenhang gebracht. Zusammenfassend wurden im Rahmen dieser Arbeit erstmals alternative Spleißprodukte der CD83 mRNA beschrieben. Ob in den alternativen Spleißprodukten *in vivo* neue stabile Isoformen von CD83 mit neuen biologischen Eigenschaften gebildet werden, ist eine interessante Frage, die aber nicht im Zentrum dieser Arbeit stand und späteren Untersuchungen vorbehalten bleibt.

4.5 Co-stimulatorische Funktion von CD83

Die Aktivierung naiver T-Zellen erfolgt über die Bindung des TCR mit einem Peptid-beladenen MHC-Protein. Diese Interaktion bewirkt die Antigen-spezifität einer T-Zellantwort, da nur die T-Zellen aktiviert werden, die den passenden TCR für den Peptid/MHC-Komplex exprimieren. Normalerweise werden zusätzlich zur Interaktion von T-Zellen mit Antigen-präsentierenden Zellen weitere co-stimulatorische Moleküle zum Auslösen einer T-Zellantwort benötigt. Auf Seite der ruhenden T-Zellen ist CD28 der wichtigste Rezeptor für co-stimulatorische Signale. CD28 interagiert mit seinen Liganden CD80 oder CD86, die beide auf einer Antigen-präsentierenden Zelle exprimiert werden. Durch diese Interaktion wird auch die T-Zelle zu Proliferation und Cytokinproduktion angeregt (*Übersicht bei Thompson und Allison, 1997*). Zusätzlich wird nach Aktivierung der T-Zelle das dem CD28 homologe Protein CTLA-4 (CD152) nach ca. 24 Stunden auf der Oberfläche der T-Zelle exprimiert. CTLA-4 bindet ebenso wie CD28 an die Liganden CD80 oder CD86. Dabei hat CTLA-4 eine 10-fach höhere Affinität und eine 100-fach höhere Avidität gegenüber CD28 mit CD80 oder CD86 zu interagieren. Die Aktivierung von CTLA-4 führt im Gegensatz zur Aktivierung von CD28 zur

Inhibition der T-Zellantwort (*Übersicht bei Chambers und Allison 1999*). Alle an der Aktivierung ruhender T-Zellen beteiligte Moleküle (CD28, CD80, CD86, CTLA-4) gehören der Immunglobulin-Superfamilie an (IgSF). Zu Beginn dieser Arbeit war nichts über die Funktion von CD83 bekannt. Da es stark auf reifen dendritischen Zellen, den effektivsten Antigen-präsentierenden Zellen überhaupt, exprimiert wird, wurde schon früh nach der Identifikation des CD83-Moleküls postuliert, daß es co-stimulatorische Funktionen ausüben könnte (*Zhou et al., 1992*). Da auch CD83 in die Familie der Immunglobulin-ähnlichen Moleküle gehört, sollte geprüft werden, ob CD83 eine co-stimulatorische Wirkung bei der Induktion einer T-Zellantwort ausübt.

Zunächst wurden professionell Antigen-präsentierende Zellen in Form von verschiedenen LCLs untersucht. Dabei wurde geprüft, ob die LCLs, die CD83 stärker exprimieren, CD4⁺ T-Zellklone besser stimulieren können als schwächer CD83-exprimierende LCLs. Deswegen wurden verschiedene LCL-Zelllinien auf ihre CD83-Expression untersucht und vier Zelllinien (LCL 1.11, LCL 1.24, LCL 1.26 und LCL 1.27) mit unterschiedlich starker CD83-Expression für die T-Zell-Assays ausgewählt (Abb. 26a). Diese LCLs exprimieren die relevanten MHC-Moleküle auf ihrer Oberfläche, die T-Zellen nach Aufnahme und Prozessierung eines exogenen Antigens (Hämagglutinin oder Neomycin-Phosphotransferase) in ihrer Peptidtasche präsentieren und von zwei spezifischen CD4⁺ T-Zellklonen (20-4/A-4 und Clone-1) erkannt werden können. Die Inkubation von T-Zellen mit Peptid-beladenen LCLs führt zur Aktivierung der T-Zellen. Die CD83-negative LCL 1.27 zeigte eine ebenso gute Stimulation wie die stark CD83-positive LCL 1.11 (Abb. 26b). Diese Experimente brachten keinen Hinweis auf eine co-stimulatorische Wirkung von CD83 und zeigten, daß CD83 in diesem experimentellen System (gleichzeitig hohe CD80- und CD86-Expression) höchstens eine untergeordnete Rolle spielen kann.

In einem weiteren Experiment wurde die Zelllinie A1 untersucht. Diese Zelllinie ist eine ER/EB2-5 Zelllinie, in der das *c-myc* Gen konstitutiv exprimiert ist. A1 Zellen tragen kaum Aktivierungsmarker und Adhäsionsmoleküle auf ihrer Oberfläche. Sie sind z.B. negativ für CD80 und ICAM-1 und besitzen nur ein sehr geringes allostimulatorisches Potential für naive T-Zellen in einer gemischten Lymphozytenkultur (*Staeger et al., 2002*). CD83 wurde einerseits über stabile Transfektion und andererseits über retrovirale Transduktion in A1 Zellen eingebracht (Abb. 27). Die CD83 exprimierenden A1 Zellen wurden daraufhin auf ihre Fähigkeit zur Präsentation eines Antigens aus Tryptose Phosphate Broth (TPB) und auf ihre allostimulatorische Fähigkeit in einer MLR untersucht. Auch in diesem experimentellen System

ergab sich kein sichtbarer Hinweis auf eine co-stimulatorisch wichtige Rolle von CD83 (Abb. 28).

Neben den professionell Antigen-präsentierenden Zellen, die immer auch andere co-stimulatorische Moleküle, wenn auch nur in geringer Menge wie im Falle der A1-Zellen, exprimieren, wurde für die Analyse der Funktion von CD83 die nicht professionell Antigen-stimulierende Zelllinie RCC p18.S ausgewählt. Diese Zellen exprimieren die co-stimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 nicht auf ihrer Oberfläche und sind auch für MHC-Klasse-II negativ (Abb. 29). MHC-Klasse-II wird in diesen Zellen durch Zugabe von INF- γ hochreguliert. Diese Aktivierung beeinflusst die co-stimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 nicht (Abb. 29). In diesem Modell kann nach Aktivierung von MHC-Klasse-II und der Zugabe von extrazellulärem HA-Protein die co-stimulatorische Funktion eingebrachter Moleküle für einen, das HA-Epitop erkennenden, CD4⁺ T-Zellklon (Clone-1) untersucht werden. RCC-Zellen wurden mit CD80, CD83 und GFP retroviral transduziert und die co-stimulatorische Funktion von CD83 im T-Zell-Assay untersucht. In diesem Zellsystem zeigte CD83 eine geringe, über dem Hintergrund liegende, co-stimulatorische Aktivität (Abb. 30). Ob die schwache co-stimulatorische Wirkung in diesem Zellmodell von Relevanz ist, müssen zukünftige Experimente zeigen.

In jüngster Zeit erschienen mehrere Publikationen, die die Rolle von CD83 als co-stimulatorisches Molekül zum Thema hatten. Als erstes berichteten Kruse et al. (2000a), daß die spezifische Inhibition der CD83-Expression zu einer dramatischen Reduktion der DC-vermittelten T-Zellstimulation führt. In diesen Experimenten wurde die Expression von CD83 auf der Ebene des RNA-Transports durch Inhibition der Hypusinylierung des Kerntransportfaktors eIF-5A blockiert. Eigene Untersuchungen zeigten, daß sich die CD83-Expression in ER/EB2-5 Zellen mit den Inhibitoren der Hypusinylierung Diaminoheptan und GC7 nicht blockieren ließ (Daten nicht gezeigt), was auch für die Regulation von CD83 auf T-Zellen zutrifft (persönliche Mitteilung D. Bevec). Als zweites wurde von Lechman et al. (2001) beschrieben, daß ein lösliches CD83-Ig Fusionsprotein eine inhibitorische Wirkung auf die Zellstimulation in einer allogenen gemischten Lymphozytenkultur hat. Schließlich erschien ein Bericht (Scholler et al., 2002), demzufolge das CD83-Ig Fusionsprotein immunsuppressiv für das Tumorwachstum in einem Maus-Mastozytom Transplantationsmodell ist und daß umgekehrt die Expression von CD83 auf Tumorzellen die Immunogenität der Zellen erhöht und eine anti-tumorale Immunantwort induziert. In der gleichen Arbeit wurde berichtet, daß die Immobilisierung von CD83-Ig gemeinsam mit anti-CD3 auf einer Plastik Kulturschale die Proliferation von CD8⁺ T-Zellen erhöht und daß die Expression von CD83 in der lymphoblastoi-

den Linie T51 eine allogene T-Zellantwort auslöst. Diese Daten sprechen dafür, daß die Ausgangshypothese dieser Arbeit richtig war und CD83 in der Tat als co-stimulatorisches Molekül fungieren kann. Ob die fehlende Stimulation der gemischten Lymphozytenpopulation an der niedrigen Expressionshöhe von CD83 liegt und erst die unphysiologisch hohe Überexpression von CD83 seine co-stimulatorische Funktion erkennen läßt, kann im Moment nicht beantwortet werden. Möglicherweise kommt die co-stimulatorische Wirkung von CD83 auch erst nach Immobilisierung von CD83-Ig gemeinsam mit anti-CD3-Antikörpern zum Tragen, wobei vermutlich unter diesen Bedingungen eine besonders hohe lokale Konzentration an CD83 erzielt wird. So bleibt festzuhalten, daß es erstens schwierig ist, die richtigen Bedingungen zu finden, die co-stimulatorische Wirkung von CD83 experimentell zu verifizieren und daß zweitens das Niveau der CD83-Expression von ausschlaggebender Bedeutung für die co-stimulatorische Wirkung sein könnte. Zukünftige Experimente werden dem quantitativen Aspekt der CD83-Expression stärker Rechnung tragen müssen.

4.6 Identifikation einer CD83-Ligand-positiven Population

Ein großes Interesse dieser Arbeit galt dem Auffinden eines CD83-Liganden. CD83 ist ein Mitglied der Immunglobulin-Supergen Familie (IgSF). Diese Familie umfaßt Proteine aus allen funktionellen Bereichen (*Übersicht bei Halaby und Mornon, 1998*). So sind nicht nur co-stimulatorische Moleküle wie CD80, CD86, CD28 oder CTLA-4 Mitglieder dieser Familie, sondern auch MHC-Klasse-I und -II, Fc-Rezeptoren oder auch der Transkriptionsfaktor NF- κ B (p50), das Apoptose-induzierende Protein PD-1 (Programmed Death 1) und viele andere. Die Immunglobulin-ähnlichen Moleküle wurden aufgrund ihrer Struktur und Sequenzhomologien zu den Immunglobulinen (schwere Kette, κ und λ leichte Ketten) in die Gruppe der Immunglobulin-ähnlichen Moleküle zusammengefaßt. Die Mitglieder dieser Familie enthalten eine (CD8, Po, antibiotische Proteine), zwei (einige Cytokin-Rezeptoren und bakterielle Proteine) oder mehrere Ig-Domänen (Adhäsionsmoleküle, große Proteine), die sich aus zwei Grundtypen zusammensetzen können: einer konstanten Region (C-Typ), aus 7 β -Faltblättern und einer variablen Region (V-Typ), die aus 8 bis 10 β -Faltblättern bestehen kann. Liganden der IgSF sind äußerst divers und können aus sehr kleinen Molekülen wie Antigenen oder Chromophoren, aus Hormonen (Wachstumshormone, Interferone, Prolaktin, etc.) oder aus sehr großen Molekülen bestehen. Die Ligand/Ig-ähnliche Interaktionsdomäne kann homophil (z.B. N-CAM) oder heterophil sein, wobei im Falle von CD2 und LFA3 die Partner ebenfalls Mitglieder der IgSF sind (CD2/LFA3). Das Partnermolekül kann aber auch

aus einem anderen Bereich wie der extrazellulären Matrix stammen. Die Bindungsstellen des Liganden befinden sich entweder in der Loop-Region, den am stärksten variablen Bereichen oder in den β -Faltblattstrukturen (*Übersicht bei Halaby und Mornon, 1998*).

Wie bereits angedeutet, können Liganden der IgSF aus allen Bereichen kommen und entweder löslich oder Membran-ständig sein. Auf der Suche nach dem CD83-Liganden wurde von der Hypothese ausgegangen, daß der Ligand in der Transmembrandomäne verankert ist. In dieser Arbeit wurden sowohl ein lösliches CD83-Ig Molekül (Abschnitt 3.8.1) als auch drei CD83-Tetramere (Abschnitt 3.8.2) hergestellt. Beide Molekültypen tragen die extrazelluläre Domäne von CD83 und sind im Falle von CD83-Ig an den Fc-Teil des IgG1-Moleküls (Übersicht in Abb. 31) oder im Falle des CD83-Tetramers an eine Biotinylierungssequenz und ein His-Tag fusioniert (Übersicht in Abb. 36). Durch Expression beider Typen von Fusionsproteinen in 293-T Zellen sollte eine ausreichende Glykosylierung von CD83 erzielt werden, da vermutet wurde, daß die Glykosylierung von CD83 entscheidend zur Bindung des Liganden beitragen könnte. Das CD83-Ig Molekül bildet über seine vorhandenen Cysteine in der Gelenkregion Cysteinbrücken aus, so daß sich aufgrund dieser Dimerstruktur die Affinität gegenüber einfachem CD83 verdoppelt. Zur Herstellung der CD83-Tetramere wurden zunächst die CD83-Monomere in 293-T Zellen exprimiert und anschließend durch Anlagerung von Biotin und Zugabe von Streptavidin, das von sich aus vier freie Bindungsmöglichkeiten trägt, vier monomere extrazelluläre CD83-Domänen zu einem Tetramer verbunden (MHC-I-Tetramere: *Altman et al., 1996*). Der große Vorteil eines solchen Tetramer-Fusionsproteins ist, daß es vier Bindestellen für den Liganden enthält und die Affinität eines solchen Moleküls um ein Vielfaches erhöht ist (*Altman et al., 1996; Tissot et al., 1999*). Gleichzeitig tritt in Vergleich zu Fusionsproteinen mit einem Ig-Fc Teil kaum Hintergrund beim Analysieren gefärbter Zellen in der FACSTM-Analyse auf. Der Hintergrund beim Arbeiten mit Ig-Fusionsproteinen kommt durch Bindung des Fusionsproteins an Fc-Rezeptoren zustande und kann die Analyse erheblich erschweren. Nach Klonierung, Transfektion und Aufreinigung des CD83-Ig Fusionsproteins (Abb. 32), wurde es FITC-markiert, um es in FACSTM-Analysen einsetzen zu können. Die zunächst untersuchten T-Zelllinien, v.a. CD4⁺/CD8⁺ Mischpopulationen, zeigten alle eine Bindung des CD83-Ig Fusionsproteins, aber auch die Bindung der Fc-Kontrolle (Daten nicht gezeigt). Weiterhin wurde die Zelllinie HPB-ALL (zur Verfügung gestellt von N. Scholler) in die Analyse einbezogen, da gerade von diesen Zellen behauptet worden war, daß sie positiv für den CD83-Liganden seien (*Scholler et al., 2001*). Mit dem eigenen CD83-Ig Fusionsprotein wurden diese Zellen ebenso gefärbt wie mit der eingesetzten Fc-Kontrolle (Abb. 33). Zusätzlich wurden die gleichen Zellen auch von der Deutschen Sammlung für

Mikroorganismen bezogen und gleiche Ergebnisse erhalten (Abb. 33). Keine dieser beiden T-Zelllinien war positiv für CD4 oder CD8 (Daten nicht gezeigt). Der Versuch mit dem CD83-Ig Fusionsprotein, PBMCs zu färben, wurde schnell aufgegeben, weil das CD83-Ig Fusionsprotein einen Großteil der PBMCs ebenso wie die Fc-Kontrolle über den Fc-Anteil färbte (Abb. 35). Diese Bindung konnte teilweise durch Zugabe von Antikörpern gegen die Fc-Rezeptoren CD16 und CD32 reduziert werden. Trotz der starken Hintergrundfärbung schien jedoch die Lymphozytenpopulation eine leicht erhöhte Bindung des CD83-Ig Fusionsproteins im Vergleich zur Fc-Kontrolle aufzuweisen (Abb. 35). Dennoch erbrachten die Ergebnisse nicht die gewünschte Eindeutigkeit. Etwa zum Zeitpunkt, als wir uns für die CD83-Tetramere als die bessere Alternative entschieden, erschienen zwei Veröffentlichungen, in denen CD83-Ig Fusionsproteine beschrieben und auch PBMCs gefärbt wurden. In beiden Publikationen wurde das CD83-Ig Fusionsprotein jedoch ohne Kontrollfärbung verwendet (*Cramer et al., 2000; Scholler et al., 2001*). Scholler et al. verwendeten aber ein Fusionsprotein mit Austausch zweier Aminosäuren im Fc-Teil (Val₂₃₁ → Pro₂₃₁ und Pro₅₃₁ → Ser₅₃₁), durch die die Bindung der Fc-Domäne an Fc-Rezeptoren stark eingeschränkt wird. Zusätzlich wurde die Gelenkregion des Ig-Anteils deletiert. Die Autoren Cramer et al. machten keine speziellen Angaben über den Fc-Teil des Maus CD83-hIgG1 Fusionsproteins. In den HPB-ALL Zellen wurde nach Inkubation der Zellen bei einem pH von 6,5 statt einem pH von 7,0 eine von 10% auf 44% erhöhte Expression des CD83-Liganden beobachtet (*Scholler et al., 2001*). Auch innerhalb der T-Zelllinie Jurkat war eine CD83-Ligand-positive Population nach Induktion der Apoptose in diesen Zellen mit einem anti-Fas-Antikörper zu beobachten. Die in dieser Arbeit untersuchten Jurkat-Zellen zeigten keine Färbung mit dem CD83-Ig Fusionsprotein (Daten nicht gezeigt), sie wurden allerdings auch nicht nach Induktion der Apoptose untersucht. Die Suche nach einem Maus CD83-Liganden mit dem mCD83-Ig Fusionsprotein ergab, daß B220⁺ Milzzellen normaler BALB/c Mäuse und die Milzzellen von XID-Mäusen, die keine B1 B-Zellen haben, aber nicht die Milzzellen von μ MT Mäusen für den CD83-Liganden positiv sind (*Cramer et al., 2000*). μ MT Mäuse sind durch Fehlen von B-Zellen charakterisiert. Das CD80-Ig Fusionsprotein zeigte in diesen Experimenten keine Bindung auf den Milzzellen der XID-Mäuse und μ MT^{-/-} Mäuse, während das CTLA-4-Ig Fusionsprotein die gleiche Färbung wie das CD83-Ig Fusionsprotein aufwies. Eine nähere Charakterisierung der CD83-Ligand-positiven Zellpopulation der Maus und eine Identifizierung des CD83-Liganden stehen jedoch noch aus.

Obwohl das in dieser Arbeit hergestellte CD83-Ig Fusionsprotein nicht in FACSTTM-Analysen zur Identifikation von CD83-Ligand-positiven Zellpopulationen zum Einsatz kommen wird,

hat es sich für funktionelle Analysen als sehr brauchbar erwiesen. So konnte eine inhibitorische Wirkung dieses CD83-Ig Moleküls auf die durch dendritische Zellen bewirkte Proliferation autologer T-Zellen gezeigt werden (*Lechmann et al., 2001*).

Um die Probleme mit der Spezifität der Färbung zu umgehen, wurde in dieser Arbeit ein CD83-Tetramer hergestellt. Die CD83-Monomere wurden nach Klonierung, Transfektion und Aufreinigung mit der BirA Ligase an der Biotinylierungssequenz biotinyliert und anschließend mit Streptavidin zum Tetramer verknüpft (Abb. 36-39, *Altman et al., 1996; Tissot et al., 1999*). Durch Veränderungen des Molekulargewichts im Streptavidin-Shift-Assay konnte gezeigt werden, daß CD83-Tetramere ausgebildet wurden und die starke Glykosylierung von CD83 erhalten geblieben ist (Abb. 39). Die Verknüpfung der biotinylierten Monomer-Grundstrukturen mit einem PE-markierten Streptavidinmolekül ermöglicht die Detektion der Tetramere in FACSTM-Analysen (*Altman et al., 1996; Dunbar et al., 1998, Gallimore et al., 1998*). Aufgrund des Fehlens von Fc-Anteilen ist der entscheidende Vorteil dieser CD83-Tetramere eine fehlende Bindung an Fc-Rezeptoren und damit eine fehlende Hintergrundfärbung. Zunächst wurden die CD83-Tetramere zur Färbung von unstimulierten oder für verschiedene Zeiten mit PHA stimulierten PBMCs eingesetzt. Als Kontrolle wurde PE-markiertes Streptavidin (SAPE) verwendet. In der FACSTM-Analyse konnte nach PHA-Stimulation von PBMCs für vier Stunden eine kleine Population CD83-Tetramer bindender Zellen sowohl in der Population der Granulozyten als auch in den Lymphozyten festgestellt werden (Abb. 40). Nachdem eine positive CD83-Tetramer-Färbung in der Lymphozyten-Population ausgemacht worden war, sollte geklärt werden, ob sich präferentiell die CD4⁺ oder die CD8⁺ Population mit dem CD83-Tetramer färben läßt. Dazu wurden die aufgereinigten PBMCs durch Magnetic Cell Sorting nach CD4⁺ und CD8⁺ Zellen getrennt und anschließend mit dem CD83-Tetramer gefärbt. Dabei konnte gezeigt werden, daß ein etwas größerer Teil CD8⁺ (Abb. 41b) Zellen als CD4⁺ Zellen (Abb. 41a) das CD83-Tetramer bindet. Daß auf CD8⁺ PBMCs eventuell der CD83-Ligand exprimiert sein könnte, würde in Einklang mit den Daten von Scholler et al. (2000, 2001) stehen, die mit einem CD83-Ig Fusionsprotein erhoben wurden. Außerdem wurden eine Reihe CD4⁺ und CD8⁺ T-Zelllinien sowie die Zelllinien Jurkat und HPB-ALL mit dem CD83-Tetramer getestet. Dabei konnte keine Bindung des CD83-Tetramers auf Jurkat und den beiden HBP-ALL Zellen festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Bei den Untersuchungen fielen jedoch zwei T-Zellklone auf (T6, Daten nicht gezeigt und KS, Abb. 42), in denen nach Aktivierung eine CD83-Ligand-positive Population, vornehmlich auf den CD8⁺ T-Zellen, eindeutig hervortrat. Diese Befunde legten nahe, daß der CD83-Ligand

auf aktivierten T-Zellen und zwar präferentiell auf CD8⁺ T-Zellen exprimiert ist. Die Befunde bestätigen auch die Annahme, daß der CD83-Ligand membranständig ist.

Unter Verwendung eines CD83-Ig Fusionsproteins zeigten Scholler et al. (2001), daß die CD83/CD83-Ligand Interaktion möglicherweise von der Sialylierung der CD83/CD83-Ligandbindestelle abhängig ist, da eine Inkubation des CD83-Ig Moleküls mit Neuraminidase, eine Inhibition der Bindung des CD83-Ig Moleküls bewirkte. Die humane embryonale Nierenkarzinomzelllinie 293 wird häufig, wie auch in dieser Arbeit, zur Expression rekombinanter eukaryontischer Proteine benutzt, um eine ausreichende Glykosylierung und richtige Faltung des Zielproteins zu gewährleisten. Der Beweis, daß die Stabilisierung der rekombinanten Proteine in 293-T Zellen wirklich vollständig und ausreichend für die Bindung an den Liganden ist, steht noch aus. Untersuchungen an Modellproteinen legen nahe, daß in 293 Zellen exprimierte Proteine eher untersialyliert sind. Außerdem besitzen 293 Zellen nur eine α -2,3-Sialyltransferase und keine α -2,6-Sialyltransferase. Gerade in Zellen des Immunsystems findet man jedoch häufig α -2,6-Sialylierungen und das ausgewogene Verhältnis von α -2,3- und α -2,6-Sialylierung kann von großer Bedeutung für die Eigenschaften, speziell die Bindungseigenschaften eines Proteins sein (Jassal et al., 2001). Die Deletion des α -2,6-Sialyltransferase-Gens führt zu einem immunsuppressiven Phänotyp in der Maus (Hennet et al., 1998). In Zukunft wird zu prüfen sein, ob eine zusätzliche α -2,6-Sialylierung die CD83/CD83-Ligand Interaktion beeinflusst.

4.7 Ausblick

Die nächste Aufgabe wird die genauere Charakterisierung der CD83-Ligand-positiven Zellpopulation sein. Vor allem müssen die Bedingungen identifiziert werden, die zur Expression des CD83-Liganden führen. Anschließend wird die Population CD83-Ligand-positiver Zellen durch FACS-Sortierung zu reinigen sein, um mRNA für eine Expressionsklonierung des Liganden zu gewinnen. Voraussetzung für die Expressionsklonierung ist, wie oben erwähnt, die Kenntnis der Bedeutung der Sialylierung für die CD83/CD83-Ligand Interaktion. Wenn das CD83/CD83-Ligandsystem eine wesentliche Rolle für die Regulation einer Immunantwort spielt, wie durch das Expressionsmuster von CD83 nahe gelegt wird, dann werden sich nach molekularer Identifizierung der beteiligten Moleküle auch vielfältige Ansatzpunkte bieten, am CD83-CD83-Ligandsystem therapeutisch positiv oder negativ modulierend ins Immungeschehen einzugreifen.

5 Material

Materialien und Reagenzien wurden soweit nicht anders angegeben von nachfolgenden Firmen bezogen: Amersham/Pharmacia Bioscience (Freiburg), Applied Biosystems (Weiterstadt), Becton Dickinson/Pharmingen (Heidelberg), BioRad (München), Calbiochem/Novabiochem (Beeston, Nottingham, UK), Costar (Bodenheim), Dianova (Hamburg), Difco (Difco Laboratories, Detroit, Michigan; USA), Eppendorf (Hamburg), GLW (Würzburg), Greiner (Frickhausen, Nürtlingen), ICN (ICN Biomedicals GmbH, Eschwege), Integra (Integra Biosciences GmbH, Fernwald), Kodak (Eastman Kodak Company; Rochester, N.Y., USA), Labor Schubert & Weiß GmbH (München), Laborsystem Osvath (Geretsried), Laborteam K+K (München), Life Technologies/Invitrogen (Karlsruhe), LVL (Laborbedarf von Lueder, Crailsheim), MBI-Fermentas (St. Leon-Roth; Vilnius, Lettland), Merck (E. Merck AG, Darmstadt), Millipore (Millipore Corporation, Bedford, MA, USA), NEB (Schwalbach), neolab (Heidelberg), Nunc (Wiesbaden), Packard Instruments (Karlsruhe), Perkin Elmer/Applied Biosystems (Weiterstadt), Promega (Mannheim), Qiagen (Hilden), Roche/Boehringer (Roche Diagnostics, Mannheim), Roth (Karlsruhe), Sartorius (Sartorius GmbH, Göttingen), Sigma (Taufkirchen-München), Stratagene (Amsterdam).

5.1 Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung
ER/EB	Lymphoblastoide Zelllinien (LCL), d.h. primäre B-Zellen wurden mit dem transformationsinkompetenten, aber replikationskompetenten EBNA-2 negativen EBV Virusstamm P3HR1 und gleichzeitig mit einem Mini-EBV Plasmid infiziert, das ein Fusionsgen, bestehend aus der Hormonbindedomäne des Östrogenrezeptors und EBNA-2 trägt. Die resultierenden Zelllinien wurden ER/EB genannt (<i>Kempkes et al., 1995b</i>). Mini-EBV ist ein Plasmid, das alle EBV-Genomsequenzen trägt, die für die Replikation und Verpackung in virale Partikel durch eine Helferzelllinie benötigt werden (<i>Hammerschmidt und Sugden, 1989</i>). Durch die Fusion von EBNA-2 mit der Hormonbindedomäne des Östrogenrezeptors ist EBNA-2 nur in der Anwesenheit von Östrogen aktiv. Die in dieser Arbeit verwendeten ER/EB Linien waren ER/EB2-1, ER/EB2-5 und ER/EB2-8 und wurden von B. Kempkes und B.

-
- Adler zur Verfügung gestellt.
- P493-6** Diese Zelllinie wurde durch stabile Transfektion der ER/EB2-5 Zelllinie mit einem Expressionsplasmid erzeugt, das die genomische Sequenz des *c-myc* Gens unter der Kontrolle eines Tetrazyklin-regulierten Promotors TP1-tetO7 trägt. Zudem enthält es eine Expressionskassette für den Transaktivator tTA (*Gossen und Bujard, 1992*), der die Expression des *c-myc* Gens treibt, aber bei Zugabe von Tetrazyklin vom TP1-tetO7 Promotor dissoziiert und damit die Expression von *c-myc* einstellt (*Pajic et al., 2000*). Die P493-6 Zellen können auf 4 verschiedene Wachstumszustände eingestellt werden (+M/-E [-Tet/-Ö], +M/+E [-Tet/+Ö], -M/+Ö [+Tet/+Ö], -M/-E [+Tet/-Ö]; M=*c-myc*; E=EBNA-2; Tet=Tetrazyklin; Ö=Östrogen). Die Zellen proliferieren unter allen Bedingungen, außer wenn weder EBNA-2 noch *c-myc* aktiv sind.
- 1414** ist eine ER/EB2-5 Zelllinie, die mit einem tetrazyklin-induzierbaren Notch-IC (tet-notchIC) infiziert wurde (*Höfelmayr et al., 2001*).
- 1194-3** ist eine ER/EB2-5 Zelllinie, die zusätzlich mit einem LMP-1 Expressionsplasmid stabil transfiziert wurde. LMP-1 steht unter Kontrolle des SV40 Promotors und wird konstitutiv exprimiert (*Zimber-Strobl et al., 1996*).
- A1** ist eine ER/EB2-5 Zelllinie, die zusätzlich mit einem Expressionsplasmid für *c-myc* transfiziert worden war. Dabei wird *c-myc* unter Kontrolle seines eigenen Promotors und von Ig-Enhancer-Elementen des κ -Locus konstitutiv überexprimiert (*Polack et al., 1996*). Die Zelle proliferiert auch ohne EBNA-2 Expression. Im Laufe der Zeit ging die Expression von EBNA-2 jedoch verloren.
- B64-19** Primäre B-Zellen wurden mit einem Maxi-EBV Konstrukt infiziert, das anstelle von LMP-1 ein Fusionsgen aus der extrazellulären Domäne und der Transmembrandomäne (ein Durchgang) des NGF-R (Nerve growth factor-receptor) und dem intrazellulären C-Terminus von LMP-1 enthält. LMP-1 kann in diesen Zellen induziert werden, durch Cross-Link des extrazellulären NGF-R Anteils mit Antikörpern gegen den NGF-R. Die Kultivierung der Zellen erfolgt in Gegenwart von Feeder Zellen. Diese Zelllinie wurde von U. Dirmeier etabliert (*Dirmeier et al., Dissertation*).
- BL41** EBV-negative BL-Zelllinie (*Lenoir et al., 1985; Cohen et al., 1987*).
- BL41-P3HR1** BL41/P3HR1 Konvertante; BL41 Zellen, die mit dem transformations-in-kompetenten, aber replikations-kompetenten EBNA-2 negativen EBV Virus-

- stamm P3HR1 infiziert worden waren (*Lenoir et al., 1985; Calender et al., 1987*).
- BL41-B95-8** BL41/B95-8 Konvertante; BL41 Zellen, die mit dem EBV-I Virusstamm B95-8 infiziert wurden, von G.W. Bornkamm zur Verfügung gestellt (*Lenoir et al., 1985; Calender et al., 1987; Miller und Lipman, 1973*).
- BL41-P3HR1-Notch** BL41/P3HR1 Zellen wurden stabil mit einem Expressionsplasmid transfiziert, das ein Fusionsgen aus der Hormonbindedomäne des Östrogenrezeptors und Notch-IC enthält (*Strobl et al., 2000*).
- Akata** BL-Zelllinie, von G.W. Bornkamm zur Verfügung gestellt (*Takada et al., 1991*).
- DG75** EBV-negative B-Zelllinie (*Ben-Bassat et al., 1977*), von G.W. Bornkamm zur Verfügung gestellt.
- Mutu-I** EBV-positive BL-Zelllinie, von G.W. Bornkamm zur Verfügung gestellt.
- Mutu-III** EBV-positive BL-Zelllinie, von G.W. Bornkamm zur Verfügung gestellt. (*Rowe et al., 1987*).
- Nalm-6** ist eine Pre B-Zelllinie (*Hurwitz et al., 1979*).
- Raji** EBV-positive BL-Zelllinie von G.W. Bornkamm zur Verfügung gestellt (*Pulvertaft et al., 1964*).
- SEM-K2** Pre B-Zelllinie mit t(4;11) Translokation, wurde aus einer kindlichen ALL (Akute Lymphoblastoide Leukemie) von Dr. Greil etabliert und zur Verfügung gestellt (*Marschalek et al., 1995*).
- Verschiedene LCLs** Lymphoblastoide Zelllinien (LCL) von J. Mautner, S. Milosevic und F. Nimmerjahn zur Verfügung gestellt.
- Jurkat** T-Zell-Leukämie Zelllinie, von W. Kolanus zur Verfügung gestellt (*Schneider et al., 1977*)
- HPB-ALL** T-Zelllinie, von N. Scholler zur Verfügung gestellt (*Scholler et al., 2001*)
- HPB-ALL 293** T-Zelllinie, von der DSMZ (Braunschweig) erworben
- 293** Humane embryonale Nierenepithelzelllinie, die durch Einführung der E1a und E1b Gene von Adenovirus Typ 5 transformiert wurden (*Graham et al., 1977*), wird auch als HEK (human embryonal kidney cells) bezeichnet.
- 293-T** 293 Zellen wurden zusätzlich mit dem Wildtyp T-Antigen von SV40 transfiziert und von J. Mautner zur Verfügung gestellt.
- Phoenix** ist eine retrovirale Verpackungszelllinie auf Grundlage der 293 Zellen, von J. Mautner zur Verfügung gestellt

COS	ist eine CV-1 Affennieren-Zelllinie (<i>Gluzman, 1981</i>).
LAN-5	Nervenzelllinie, wurde von M. Üffing zur Verfügung gestellt
RCC p18.S	Renal cell carcinoma line, von J. Mautner zur Verfügung gestellt.
neo (20-4/A4)	CD4 ⁺ T-Zellklon, erkennt ein Peptid des bakteriellen Proteins Neomycin-Phosphotransferase (NeoR) im Kontext von HLA-DP3, von J. Mautner zur Verfügung gestellt.
HA (Clone-1)	CD4 ⁺ T-Zellklon, erkennt ein Peptid des Influenza-Hämagglutininproteins (HA) im Kontext von HLA-DR1, von J. Mautner zur Verfügung gestellt.
2B3	CD4 ⁺ T-Zellklon, erkennt ein Peptid des Tryptose-Phosphate-Broth, von J. Mautner zur Verfügung gestellt .
Verschiedene T-Zelllinien	Heterogene T-Zellmischpopulationen, die durch Stimulation mit PHA oder bestrahlten LCLs kultiviert werden, von J. Mautner und S. Milosevic zur Verfügung gestellt.

5.2 Material für die Zellkultur

5.2.1 Seren

Zur Kultivierung aller herkömmlichen Zelllinien wurde soweit nicht anders angegeben fötales Kälberserum (FKS) der Firmen PAN (Aidenbach) und Dynamics (Heidelberg) verwendet. Die Kultivierung der Zelllinien und die Etablierung der Zelllinie A1/CD83 erfolgte in fötalem Kälberserum der Firma Biochrom (Berlin). T-Zellen wurden in selbst aufbereiteten humanen Serum kultiviert und von J. Mautner und S. Milosevic zur Verfügung gestellt.

5.2.2 Medien und Zusätze

RPMI 1640 mit L-Glutamin	Life Technologies/Invitrogen
DMEM 4500 Glukose	Life Technologies/Invitrogen
DMEM 1000 Glukose	Life Technologies/Invitrogen
293 SFM-II, Serum-frei	Life Technologies/Invitrogen
L-Glutamin 200mM (100x)	Life Technologies/Invitrogen
L-Pyruvat	Life Technologies/Invitrogen
Trypsin/EDTA	Life Technologies/Invitrogen
Dimethylsulfoxid	Merck

β-Estradiol (Östrogen) 20mM (2000x)	Merck
PBS	Merck
Cycloheximid	Sigma-Aldrich

5.2.3 Verbrauchsmaterial

Zellschaber	Greiner, Merck
Gewebekulturflaschen (50, 250, 600ml)	Costar, Greiner, Nunc
Gewebekulturplatten (Ø 6, 10, 13cm)	Costar, Greiner, Nunc
6, 24, 48, 96 Loch-Platten	Costar, Greiner, Nunc
Plastikpipetten 2, 5, 10, 25, 50ml	Costar, Greiner
Cryo-Tubes (Einfrierampullen)	Nunc (Wiesbaden)
Elektroporationsküvetten	BioRad (München)

5.2.4 Antibiotika

Antibiotikum	eingesetzte Konzentration	Firma
G418/Neomycin	400-900 µg/ml	Sigma-Aldrich
Hygromycin B	75-150 µg/ml	Life Technologies/Invitrogen
Penicillin	100 U/ml	Life Technologies/Invitrogen
Puromycin	0,7-2 µg/ml	Sigma-Aldrich
Streptomycin	100 µg/ml	Life Technologies/Invitrogen
Tetrazyklin	0,1-1 µg/ml	Merck, Darmstadt

5.3 Material für die Bakterienkultur

5.3.1 Bakterien

Bakterien	Genotyp
XL-1 blue:	F ['] ::Tu10 proA ⁺ B ⁺ lacI ^q D (lacZ) M15/recA1 end A1 gyr A96 (Nal ^r) thi hsd R17 (r _k ⁻ m _k ⁺) glu V44 rel A1 lac. Der Originalbakterienstamm wurde über die Firma Stratagene bezogen, von G. Laux zur Verfügung gestellt.
MC1061-P3:	F- ara D139 D (ara-leu) 7696 gal E15 gal K16 D (lac) X74 rpsL (Str ^r) hsd R2 (r _k ⁻ m _k ⁺) mcrA mcrB1. Der Originalbakterienstamm ist über die Firma ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, USA) erhältlich. Dieser Bakterienstamm wurde von W. Kolanus (Genzentrum, München) bereit gestellt.

5.3.2 Antibiotika

Antibiotikum	eingesetzte Konzentration	Firma
Ampicillin	200µg/ml	(Merck, Darmstadt)
Tetrazyklin	200-300µg/ml	(Merck, Darmstadt)

5.3.3 Medium

Yeast Extract, Bacto-Agar, Bacto-Trypton wurden von GibcoBRL bezogen.

5.3.4 Verbrauchsmaterial

Bakterienkulturplatten	Greiner
Zentrifugenröhrchen	Falkon
Cryo-Tubes (Einfrierampullen)	Nunc (Wiesbaden)

5.4 Plasmide

5.4.1 CD83-Promotor und Promotormutanten

Die nachfolgend aufgeführten CD83-Promotor-Luziferase-Reporterplasmide wurden von A. Steinkasserer (Dermatologie, Erlangen) zur Verfügung gestellt. Mittels PCR wurden Deletionsmutanten des CD83-Promotors amplifiziert und über die im Primer vorhandenen Restriktionsschnittstellen *Asp718* und *XhoI* in den Vektor pGL Basic (Originalvektor von Promega (Mannheim)) kloniert (*Berchtold et al., 2002*). Die daraus resultierenden Promotorabschnitte wurden entsprechend ihrer Größe, beginnend vom Translationsstartpunkt aus gesehen, bezeichnet und heißen pGL CD83 (-3037), pGL CD83 (-3037 Δ SP1), pGL CD83 (-261), pGL CD83 (-123), pGL CD83 (-123mut). In der CD83-Promotordeletionsmutante pGL CD83 (-123mut) wurde die sich an Position -115/-106 befindende NF- κ B-Bindestelle mutiert. In der Promotormutante pGL CD83 (-3037 Δ SP1) fehlen 4 SP1-Bindestellen.

5.4.2 Expressionsplasmide für LMP-1, LMP-1 Mutanten, LMP-1 Fusionsproteine und Proteine der LMP-1 Signalkaskade

Die nachfolgend aufgeführten LMP-1 Expressionsplasmide wurden von A. Kieser (GSF, Abt. Genvektoren, München) zur Verfügung gestellt.

Plasmid	Beschreibung
581	pSV-LMP1, pHEBO-Vektor (<i>Kieser et al., 1997</i>)
2131	pSV-LMP1 (PQT-AAA/Y384G), pHEBO-Vektor (<i>Kieser et al., 1999</i>)
2133	pSV-LMP1 Δ 194-386, pHEBO-Vektor (<i>Kieser et al., 1999</i>)
2134	pSV-LMP1 (PQT-AAA), pHEBO-Vektor (<i>Kieser et al., 1999</i>)
2178	pSV-LMP1 (Y384G), pHEBO-Vektor (<i>Kieser et al., 1999</i>)
p38	pCMV-Hap38 (<i>Baud et al., 1999</i>)
TRAF2	pRK-TRAF2 (<i>Hsu et al., 1996</i>)
TRAF6	pcDNA3.1-TRAF6 (<i>Schultheiss et al., 2001</i>)
d/n TRAF2	pRK-TRAF2 (<i>Hsu et al., 1996</i>)
d/n TRAF6	pcDNA3.1-TRAF6 (<i>Schultheiss et al., 2001</i>)
d/n I κ B	Eine dominant negative Mutante von I- κ B α (MAD-3) wurde durch Muta-

genese von 2 Serinresten zu Alanin 32, bzw. Isoleucin 36 hergestellt. Dominant/negatives I- κ B α wurde in den Vektor pRC/CMV (Invitrogen, Karlsruhe) kloniert (*Haskill et al., 1991; Henkel et al., 1992; Zabel et al., 1993*)

JAK3	pRK5-JAK3 (<i>Gires et al., 1999</i>)
Flag LMP-1	Flag:LMP1tm in pCMV2 (Kodak), (<i>Gires et al., 1999</i>)
Flag LMP1 (Δ CTAR-3)	Flag :LMP1 Δ 33bp, Δ CTAR3 (<i>Gires et al., 1999</i>)
LMP-1:CD40	pSVLMP1:CD40, in den pHEBO Vektor wurde ein Fusionsgen kloniert, bestehend aus der Transmembrandomäne von LMP-1 und dem intrazellulären Teil von CD40 (<i>Gires et al., 1997</i>).
LMP-1:TNF-R1	pSV-LMP1:TNF-R1, in den pHEBO Vektor wurde ein Fusionsgen kloniert, bestehend aus der Transmembrandomäne von LMP-1 und dem intrazellulären Teil des TNF-RI welcher N-terminal mit einem HA-Tag versehen wurde (unveröffentlicht).
LMP-1:TNF-R2	pSV-LMP1:TNF-R2, in den pHEBO Vektor wurde ein Fusionsgen kloniert, bestehend aus der Transmembrandomäne von LMP-1 und dem intrazellulären Teil des TNF-RII (<i>Gires et al., 1997</i>).
p35	pcDNA3.1-p35 (<i>Seshagiri und Miller, 1997</i>), ursprünglich aus dem Baculovirus „Autographa californica nuclear polyhedrosis virus“ (AcMNPV) isoliert, allgemeiner Caspase-Inhibitor mit antiapoptotischer Funktion (<i>Bump et al., 1995; Xue et al., 1995; Bertin et al., 1996</i>)

5.4.3 Weitere Plasmide

Plasmid	Beschreibung
pcDNA3.1 (+)	Invitrogen (Karlsruhe), von A. Kieser zur Verfügung gestellt
pRK5	CMV Expressionsplasmid (<i>Schall et al., 1990</i>) von B. Neuhierl zur Verfügung gestellt
pCR2	Invitrogen (Karlsruhe), von A. Kieser zur Verfügung gestellt
pCMV-Flag	Flag:CMV (pCMV, Kodak), (<i>Gires et al., 1997, 1999</i>), von A. Kieser zur Verfügung gestellt
pHEBO	Expressionsplasmid (<i>Sugden et al., 1985</i>), von G. Laux zur Verfügung gestellt

Si225	pCMV Expressionsplasmid, von G. Laux zur Verfügung gestellt
β-Gal	PGK β-Galaktosidase-Expressionsplasmid, von A. Kieser zur Verfügung gestellt
pcDNA3.1/CD83	In den pcDNA3.1 Vektor wurde der vollständige ORF von CD83 über HindIII und EcoRI kloniert (zur Verfügung gestellt von J. Hauber, Heinrich-Pette-Institut, Hamburg)
pINCO	Expressionsplasmid für retrovirale Verpackung mit Puromycinresistenzgen, von P.G. Pelici, Milano zur Verfügung gestellt

5.4.4 Klonierte Vektoren

Nachfolgende Plasmide wurden teilweise über verschiedene Zwischenschritte kloniert (s. Abschnitt 6.14): pcDNA3.1/CD83-a, pcDNA3.1/CD83-b, pcDNA3.1/CD83-c, pINCO/CD80, pcDNA3.1/CD83-S-Tetramer, pcDNA3.1/CD83-L-Tetramer, CD83-S-Ig, CD83-L-Ig

5.5 Antikörper

5.5.1 FACS

Zur Oberflächenfärbung wurden die monoklonalen Maus-Antikörper gegen humanes CD8, CD80, CD83-PE, CD83-FITC, CD86 (Becton Dickenson/Pharmingen, Heidelberg), CD83, CD83-PE (Immunotech, Marseille), MHC-Klasse-I (HLA A,B,C = W6/32, Sigma-Aldrich, Taufkirchen), CD4, CD14 (Dianova, Hamburg), verwendet. Als Isotypkontrollen dienten IgG1, IgG2a, IgG2b Antikörper der Maus (Immunotech, Marseille; Becton Dickenson/Pharmingen, Heidelberg). Zum Blockieren der Fc-Rezeptoren wurden die monoklonalen Maus-Antikörper gegen humanes CD16 und CD32 (Dianova, Hamburg) auf die Zellen gegeben. Als Sekundärantikörper wurden DTAF- oder PE-gekoppelte Antikörper der Ziege gegen Maus von Dianova (Hamburg) eingesetzt (DTAF, PE labelled goat anti mouse, IgG and IgM Fab-Fragment).

5.5.2 Aufreinigung

Zur Aufreinigung CD4 und CD8 positiver T-Zellpopulationen wurden monoklonale Maus Antikörper gegen humanes CD4 und CD8 gekoppelt mit magnetischen Partikeln der Firma Milteny (Milteny Biotech GmbH, Bergisch-Gladbach) verwendet.

5.5.3 B64-19 Induktion

Als Erstantikörper wurde der monoklonale Antikörper aus der Maus gegen den humanen extrazellulären Teil des NGF-Rezeptors verwendet. Als Zweit- und damit Aktivierungsantikörper wurde der Antikörper aus der Ziege gerichtet gegen Maus (Fab Fragment) verwendet.

5.6 Kits

Boehringer DNA labelling Kit	Roche Diagnostics, Penzberg
ECL und ECL-Plus Kit (Enhanced Chemoluminescence Detection System)	Amersham Pharmacia Biotech,
Jet Star 2.0 Plasmid Purification Kit	Genomed, Bad Oeyenhausen
QIAgen Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAgen PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
QIAgen Plasmid DNA-Präparationskit (Mini 50)	Qiagen, Hilden
QIAgen RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
QIAgen RNeasy Midi Kit	Qiagen, Hilden
Random Primed DNA labelling Kit	Amersham Pharmacia Biotech,

5.7 Oligonukleotide (Primer)

Primer	Sequenz
CD80 3.1	5'CCCCGGGCGGCCGCTTATACAGGGCGTACACTTTCCCTTC -3'
CD80 5.1	5'GCGGGGAATTCATGGGCCACACACGGAGGCAGGG -3'
CD83 3.1	5'CCCCGGAGATCTGCAGGGCATCCTGTCACTCTCA-3'
CD83 3.2	5'GCGGCGAGATCTGCTCTGTATTTCTTAAAAGTC-3'
CD83 3.13	5'CCCCGGACCGTTTTATGCCACTCTATTTTTGGGCCCTCGAAAATGTCATTAAG ATCGATTGCAGGGCATCCTGTCACTCTC-3'
CD83 3.15	5'CCCCGGCACGTGTGCAGGGCATCCTGTCACTCTCAAGATCAC-3'
CD83 3.16	5'CCCCGGCACGTGCGCTCTGTATTTCTTAAAAGTCTCTTCTTTACGC-3'
CD83 3.17	5'CCCCGGGCGGCCGCTCATACCAGTTCTGTCTTGTGAGGAGTC-3'

CD83 3.24	5'CCCCGGGCGGCCGCACAAGTGAAAATGATGAGTGTT-3'
CD83 5.1	5'GCGGGGCTCGAGGCCACCATGTTCGCGCGGCCTCCAGCTTCTGC-3'
CD83 5.9	5'GCGGGGGAATTCCTCGAGATGTTCGCGCGGCCTCCAGCTTC-3'
CD83 5.12	5'GCGGGGGAATTCGATGCCCTGCACAGCGTAAAG-3'
3.EXN-Linker	5'GGCCGCGTCGACTCAGTGATGGTGATGGTGATGACCGGTCTCGAGG-3'
5.EXN-Linker	5'AATTCCTCGAGACCGGTCATCACCATCACCATCACTGAGTCGACGC-3'
3.EXEBN-Linker	5'CCGTTTCATGCCACTCTATTTTTGGGCCTCGAAAATGTCATTAAGCACGTGCTCGAGG-3'
5.EXEBN-Linker	5'AATTCCTCGAGCACGTGCTTAATGACATTTTCGAGGCCCAAAAAATAGAGTGGCATGAAA-3'
3.GAPDH	5'ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC-3'
5.GAPDH	5'TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA-3'

Die Oligonukleotidsynthese erfolgte bei der Firma Metabion (Martinsried).

5.8 Radioaktive Isotope

$[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ -dCTP 3000Ci/mmol

wurde von der Firma Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg) bezogen.

5.9 Enzyme

Soweit nicht anders vermerkt, wurden alle Restriktionsenzyme sowie die T4-DNA-Polymerase, T4-DNA-Ligase und die dazugehörigen Puffer von New England Biolabs (Schwalbach) und MBI Fermentas (Vilnius, Lettland) bezogen. Die für die PCR benötigten Polymerasen (Taq und Pfu) sowie dazugehörigen Reaktionspuffer (10x) stammten von Promega (Mannheim).

Reverse Transkriptase (Superscript) wurde von der Firma Life Technologies/Invitrogen bezogen, Alkalische Phosphatase von der Firma Roche Diagnostics (Mannheim).

5.10 Molekulare Größenmarker

DNA	100Bp ladder, Life Technologies /Invitrogen (Karlsruhe)
	1kbp, Life Technologies /Invitrogen (Karlsruhe)
Protein	Prestained SDS Page Standards, Broad Range, BioRad (München)
RNA	RNA-Ladder 0.24-9.5kb, Life Technologies /Invitrogen (Karlsruhe)

5.11 Software

Für das Einscannen von belichteten Filmen und Photographien wurde die Adobe Photoshop 4.0 Software und für die FACS™-Auswertung die Cell Quest Software (Becton-Dickinson) und WinMDI benutzt. Die weitere Bearbeitung von Bildern und FACS™-Daten erfolgte mit Hilfe von Corel Draw und Photopaint 7, 8 und 10. Primer wurden mit Hilfe des Primerprogramms ausgesucht. Die Vektorkarten wurden mit dem Clone Manager 6.0 Programm (Scientific and Educational Software) erstellt, die ELISA Messungen mit dem ELISA-Reader der Firma Tecan vermessen und die CD83-Promotorstudien mit dem Programm WinGlow im Luminometer gemessen sowie mit Microsoft Exel 2000 (Microsoft, USA) ausgewertet.

6 Methoden

Nachfolgend angeführte Methoden der Molekularbiologie wurden nach den Standardprotokollen von Sambrook, Fritsch und Maniatis (1989) und Ausubel et al., (1993) durchgeführt: Plasmid-Minipräparationen aus *E.coli* (STET-Minipräparation), Restriktionsverdau, Phenolextraktion und Ethanol-fällung von DNA, Agarose-Gelelektrophorese und SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen. Nach einem Protokoll von Saunders und Burke (1990) wurden Plasmid-Minipräparationen aus *E.coli* mit alkalischer Lyse durchgeführt. Weitere Standardmethoden wurden mit Hilfe von Kits und entsprechend der Angaben des Herstellers durchgeführt: Plasmid-Maxipräparationen (JetStar, Genomed, Bad Oeyenhausen), Plasmid-Minipräparationen (Plasmid-Mini-Kit, Qiagen, Hilden), Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen (Gel-Extraktionskit, Qiagen, Hilden), Aufreinigung von PCR-Fragmenten (PCR-Purification-Kit, Qiagen, Hilden), Präparation von Gesamt-RNA (RNeasy-Mini- und -Midi-Kit, Qiagen, Hilden), radioaktives Markieren von cDNA Sonden mit dem Rediprime DNA-Labeling Kit (Amersham/Pharmacia, Freiburg) oder dem Random Primed DNA-Labeling Kit (Roche/Boehringer, Penzberg), die Anreicherung CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zellen mit magnetic cell sorting-MACS (Milteny Biotech GmbH, Bergisch Gladbach) und die Entwicklung von Western-Blots mit dem ECL- und ECL-plus Kit (Enhanced Chemiluminescence Detection System, Amersham/Pharmacia, Freiburg).

6.1 Kultivierung eukaryontischer Zellen

Alle Zellen wurden im Brutschrank (Hereaus-Instruments, BB6060C4, Hanau), bei 37°C, 5-6% CO₂-Partialdruck und 90% relativer Luftfeuchtigkeit kultiviert.

6.1.1 Humane B-Zellen

Soweit nicht anders angegeben wurden B-Zelllinien in RPMI-1640 Medium (Standardmedium) mit 10% FKS, 2mM L-Glutamin, 100U/ml Penicillin, 100µg/ml Streptomycin und 1mM Natriumpyruvat stehend oder liegend in Gewebekulturflaschen kultiviert. Die Zellen wurden alle 4 Tage in einer Dichte von 3x10⁵ Zellen pro Milliliter (ml) mit frischem Zellkulturmedium neu ausgebracht. Die Zelldichte wurde zwischen 1x10⁵ und 8x10⁵ Zellen/ml, im Falle für SEM-K2 Zellen nicht unter 1x10⁶ Zellen/ml gehalten. ER/EB2-5, 1194-3 und

BL41/P3HR1-Notch-ER Zellen wurden in Gegenwart von 2 μ M Östrogen (β -Estradiol), P493-6 und 1414-3 Zellen in Gegenwart von 0,1-1 μ g/ml Tetrazyklin kultiviert und je nach Experiment in Gegenwart von 2 μ M Östrogen und 0,1-1 μ g/ml Tetrazyklin oder nur in Gegenwart von Östrogen gehalten.

6.1.1.1 Entzug von Östrogen, bzw. Tetrazyklin

Tags zuvor im Verhältnis 1:1 mit frischem Östrogen-haltigen Medium versetzte ER/EB2-5, BL41/Notch-ER, bzw. 1194-3 Zellen wurden bei 1500Upm, 5min, RT abzentrifugiert und das Medium verworfen. Die Zellen wurden gut in PBS, versetzt mit 10% FKS, resuspendiert und wiederum abzentrifugiert. Dieser Vorgang wurde insgesamt dreimal wiederholt. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurden die Zellen in RPMI-1640 Medium mit 10% FKS, 2mM L-Glutamin, 100U/ml Penicillin, 100 μ g/ml Streptomycin und 1mM Natriumpyruvat aufgenommen, gezählt und in einer Dichte von 3x10⁵ Zellen/ml ausgebracht. ER/EB2-5 und BL41/Notch-ER Zellen wurden, wenn nicht anders angegeben, für 3-4 Tage, 1194-3 Zellen für 5-12 Tage ohne Östrogen kultiviert und anschließend für den in den Versuchen angegebenen Zeitraum mit Östrogen re-induziert.

P493-6 Zellen wurden unter *c-myc* in Tetrazyklin- und Östrogen-freiem Medium kultiviert. Das Abschalten von *c-myc* erfolgte von tags zuvor im Verhältnis 1:1 mit frischem Medium versetzten P493-6 Zellen durch Zugabe von Tetrazyklin für 4 Tage. Dann wurden die Zellen wie oben beschrieben zur Induktion der Zustände +Myc/-EBNA-2, +Myc/+EBNA-2 von Tetrazyklin durch dreimaliges Waschen befreit und die Zellen in einer Dichte von 3x10⁵ Zellen/ml in RPMI-1640 Standardmedium oder in Medium versetzt mit 2 μ M Östrogen aufgenommen. Für den Zustand -Myc/+EBNA-2 wurden die für 4 Tage mit Tetrazyklin versetzten Zellen nicht ausgewaschen und 2 μ M Östrogen für den in den Versuchen angegebenen Zeitraum zugegeben.

6.1.1.2 Kultivierung und Induktion der Zelllinie B64-19

Die Zelllinie B64-19 wurde auf Feeder in RPMI-1640 Medium versetzt mit 10% FKS, 2mM L-Glutamin, 100U/ml Penicillin, 100 μ g/ml Streptomycin und 1mM Natriumpyruvat kultiviert. Zur Induktion des NGF-R/LMP-1 Fusionsproteins wurden die Zellen für 1 Woche vom Feeder genommen und anschließend zunächst für eine Stunde mit anti-NGF-R Antikörper (2,5ml/100ml Medium, Konzentration des Überstands: 25 μ g/ml) und danach mit einem

Ziege-anti-Maus Sekundärantikörper (280µl/100ml Medium, Konzentration des AK: 1,8mg/ml) für die in den Versuchen angegebenen Zeiten bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

6.1.2 T-Zellen

T-Zellen wurden in RPMI, versetzt mit 2mM L-Glutamin, 100U/ml Penicillin, 100µg/ml Streptomycin, 1mM Natriumpyruvat, 10mM Hepes in 10% selbst aufbereitetem humanen Serum (freiwillige Spender) kultiviert, alle 10 Tage entweder mit PHA oder bestrahlten LCLs stimuliert und zur Verfügung gestellt von J. Mautner und S. Milosevic.

6.1.3 Adhärente Zellen

Die Nierenkarzinomzelllinie RCC p18.S wächst adhärent und wurde in RPMI-1640 Medium mit 20% FKS, 1% Tryptose-Phosphate-Broth, 1% NEAA (non-essential aminoacids), 2mM L-Glutamin, 1mM Natriumpyruvat, 100U/ml Penicillin und 0,1mg/ml Streptomycin kultiviert und alle 2 Tage 1:5 mit frischem Zellkulturmedium versorgt. Die Nervenzelllinie LAN-5 wurde in RPMI-1640 Medium mit 10% FKS, 2mM L-Glutamin, 1mM Natriumpyruvat, 100U/ml Penicillin und 0,1mg/ml Streptomycin kultiviert und alle 3-4 Tage im Verhältnis 1:8-1:10 in frischem Medium ausgebracht. 293, 293-T und COS Zellen wurden alle 3-4 Tage im Verhältnis 1:8-1:10 in frischem Dulbeccos Modified Eagle's Medium mit 10% FKS, 1mM Natriumpyruvat, 100U/ml Penicillin und 0,1mg/ml Streptomycin aufgenommen.

6.1.4 Aufbewahrung und Wiederaufnahme

1×10^7 Zellen wurden abzentrifugiert (1500Upm, 5min, 4°C; Varifuge 3.0 RS (Heraeus)), das Medium verworfen und in 1ml kaltem Einfriermedium aufgenommen. Nach der Überführung in Einfrierampullen (1,8 ml Cryo-Tube, Nunc, Wiesbaden) wurden die Zellen schrittweise auf -80°C abgekühlt und nach 2 Tagen in flüssigen Stickstoff transferiert. Um die eingelagerten Zellen wieder in Kultur zu nehmen, wurden die Ampullen bei 37°C im Wasserbad aufgetaut, sofort in 10ml frisches Zellkulturmedium überführt und abzentrifugiert (1500Upm, 5min, 4°C). Schließlich erfolgte die Aufnahme der Zellen in einer Dichte von 1×10^6 /ml in Zellkulturmedium und Inkubation im Brutschrank.

Einfriermedium: Kulturmedium mit 10% DMSO und 50% FKS

6.1.5 Bestimmung der Lebendzellzahl

Nach Resuspension der Zellen wurden 10µl der Kultur entnommen, mit 10µl einer 0,5%-igen Trypanblau-Lösung versetzt, und in einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Tote Zellen können durch die Aufnahme des blauen Farbstoffes im Lichtmikroskop von lebenden Zellen unterschieden werden. Die Zelldichte wurde ausschließlich aus der Zahl der lebenden Zellen berechnet.

6.1.6 MTT-Assay

Die Konversion des Substrats MTT durch ein mitochondrielles Enzym dient als Maß für die Anzahl vitaler Zellen: Der MTT-Assay wurde nach Anleitung durchgeführt (*Mosmann et al., 1983*).

6.2 Transfektion

6.2.1 Transiente Transfektion von 293-T Zellen mit LipofectAMIN™

293-T Zellen wurden in Kulturmedium in entsprechender Zellkulturschale ausgebracht und über Nacht im Brutschrank kultiviert. Die transiente Transfektion mit LipofectAMIN™ wurde nach Angaben des Herstellers (Life Technologies-Invitrogen, Karlsruhe) durchgeführt.

6.2.2 Transiente Transfektion von 293-T Zellen mit der Ca²⁺ Phosphat-Methode

Für die transiente Transfektion der 293-T Zellen mit der Ca²⁺ Phosphat-Transfektionsmethode wurden die Zellen am Vortag so auf 10, bzw. 13cm Zellkulturschalen ausgebracht, daß am Tag der Transfektion eine Konfluenz von ca. 70-80% erreicht war. Am nächsten Tag wurde das Medium abgenommen und die Zellen mit 8, bzw. 24ml frischem Kulturmedium versetzt. In 50ml Falkons wurden 1ml, bzw. 3ml 2xHBS-Puffer vorgelegt. In einem weiteren Falcon wurden 20, bzw. 60µg Plasmid-DNA in 875, bzw. 2650µl steriles H₂O pipettiert, mit 5, bzw. 15µl 100mM Chloroquin (Endkonzentration: 50-100µM) versetzt und am Ende 100, bzw. 300µl 2,5M CaCl₂ zugegeben. Die Lösung wurde durch Auf- und Abpipettieren gemischt. Um möglichst kleine und gleichmäßige Ca/DNA Präzipitate zu erhalten, wurde die HBS-Lösung während der Zugabe durch konstante Zufuhr von Luftblasen gemischt. Nach einer weite-

ren Minute Durchmischung wurde das DNA/Ca²⁺ Phosphat-Gemisch vorsichtig auf die Zellen getropft und für 9 Stunden im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde die Chloroquin-haltige Lösung abgenommen und frisches Kultur- oder Serum-freies 293 Medium (SFMI-293) für die angegebene Zeit zugegeben.

2xHBS-Puffer: 280mM NaCl; 1,5mM Na₂HPO₄; 50mM HEPES; Lösung auf pH 7,05 einstellen

6.2.3 Stabile Transfektion von A1 Zellen

Die A1 Zellen wurden bei 1500Upm, 5min, RT in einer Zentrifuge abzentrifugiert, einmal in RPMI-1640 Medium (ohne Zusätze) gewaschen und anschließend in einer Konzentration von 4×10^7 Zellen/ml kaltem RPMI-1640 Medium (ohne Zusätze) aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen mit 20µg pINCO/CD83 bzw. pINCO/GFP in eine 0,4cm Elektroporationsküvette (BioRAD, München) vorgelegt, mit 250µl Zellen (entsprechend 1×10^7 Zellen) gemischt und bei 1mF, $\infty \Omega$ und 230V elektroporiert (Gene Pulser, BioRAD, München). Die elektroporierten Zellen wurden mit 500µl kaltem FKS resuspendiert und sofort in 10ml 37°C vorgewärmtes RPMI-1640 Medium mit 15% FKS, 2mM L-Glutamin, 1mM Natriumpyruvat, 100U/ml Penicillin und 0,1mg/ml Streptomycin überführt. Drei Tage danach wurden die Zellen gefüttert und mit 0,5µg/ml Puromycin zu selektionieren begonnen. Eine Woche später wurde die Puromycinkonzentration auf 1µg/ml angehoben. Die stabile Mischpopulation wurde auf CD83-Expression durch FACSTM-Analyse, bzw. Fluoreszenzmikroskopie überprüft. Zusätzlich zu Puromycin wurden die A1 Zellen konstant mit 150µg/ml Hygromycin B kultiviert.

6.3 Virale Infektion mit pINCO

6.3.1 Produktion retroviraler Überstände

Für die transiente Transfektion der Phoenixzellen wurden die Zellen am Vortag so auf 10, bzw. 13cm Zellkulturschalen ausgebracht, daß am Tag der Transfektion eine Konfluenz von ca. 70-80 % erreicht war. Am nächsten Tag wurden die Phoenixzellen mit 20, bzw. 60µg pINCO/CD80, pINCO/CD83 oder pINCO/GFP mittels der Ca²⁺-Phosphat-Transfektionsmethode (6.2.1) transfiziert. Nach 9 Stunden wurde das Medium gewechselt und die Phoenixzellen mit RCC oder B-Zellmedium (8ml, bzw. 20ml) überschichtet. Drei Tage später wurden

die Überstände abgenommen, bei 1500Upm, 5min, RT von groben Bestandteilen befreit und in 2-3ml Portionen bei -80°C weggefroren.

6.3.2 Infektion von B-Zellen

1×10^6 A1 Zellen wurden bei 500g, 5min, RT in einer Eppendorf-Tischzentrifuge in einem 1,5ml Eppendorf-Reaktionsgefäß abzentrifugiert, in 1ml retroviralem Überstand (s. 6.4.1) und 0,6µl Polybren (5mg/ml in PBS (Sigma, Taufkirchen)) resuspendiert und in eine Vertiefung einer 24-Loch Platte überführt. Anschließend wurden die Zellen für 20min, bei RT und 1800Upm (Rotanta PRC, Hettich, Tuttlingen) zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und die Zellen ein zweites Mal mit 2ml retroviralem Überstand und 1,2µl Polybren für 20min, 1800Upm, RT zentrifugiert. Die Zellen wurden über Nacht mit den aufzentrifugierten Retroviren im Zellkulturinkubator kultiviert. Am nächsten Morgen wurde das Medium abgenommen und frisches Zellkulturmedium ohne Hygromycin B zugegeben.

6.3.3 Infektion von RCC-Zellen

$2,5 \times 10^3$ RCC p18.S, bzw. 4×10^3 RCC p77 Zellen wurden pro Vertiefung einer 96-Loch Platte pipettiert und über Nacht in Kulturmedium kultiviert. Am darauffolgenden Tag wurde das RCC-Medium abgenommen und jeweils 100µl Polybren-haltiger retroviraler Überstand (0,6µl Polybren/ml Retrovirus-Überstand, in RCC-Medium) über Nacht zugegeben. Am nächsten Morgen wurde das Medium abgenommen und die Zellen einmal in RCC-Medium gewaschen und anschließend in 100µl Kulturmedium bis zur weiteren Verwendung weiterkultiviert.

6.4 T-Zell-Assay

6.4.1 LCL

1×10^6 LCL-Zellen (LCL 1.11, LCL 1.24, LCL 1.26, LCL 1.27) wurden für 20-24 Stunden mit Hämagglutinin-Protein, bzw. NeoR-Protein in unterschiedlichen Konzentrationen (HA: 100-200ng/ml NeoR: 100-200ng/ml zur Verfügung gestellt von J. Mautner) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal in RPMI-1640 (ohne Zusätze) gewaschen und in einer Konzentration von 1×10^5 Zellen/100µl pro Vertiefung einer 96-Loch Zellkulturschale ausge-

bracht. Für 20 Stunden wurden die LCL-Zellen mit 1×10^5 T-Zellen des T-Zellklons (Clone-1), bzw. des T-Zellklons 20-4/A4 co-kultiviert.

6.4.2 A1 Zellen

1×10^6 A1 Zellen, bzw. mit retroviralen Überständen infizierte A1 Zellen (6.3.2) wurden für 20-24 Stunden mit 0,5-5 μ l/100 μ l Tryptose Phosphate Broth (Life Technologies-Invitrogen, Karlsruhe) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 3x in RPMI-1640 (ohne Zusätze) gewaschen und in einer Konzentration von 1×10^5 Zellen/100 μ l pro Loch einer 96-Loch Zellkulturschale ausgebracht. Für 20 Stunden wurden die A1 Zellen mit 1×10^5 T-Zellen des T-Zellklons 2B3 co-kultiviert.

6.4.3 RCC-Zellen

$2,5 \times 10^3$ RCC p18.S Zellen wurden pro Vertiefung einer 96-Loch Zellkulturschale in einem Volumen von 100 μ l eingesät, für 24 Stunden kultiviert, mit pINCO/ CD80, pINCO/CD83 oder mit pINCO/GFP retroviralen Überständen über Nacht infiziert (6.3.3) und am nächsten Morgen gewaschen. 6-8 Stunden später wurde das Kulturmedium abgenommen und 200 μ l frisches Kulturmedium, bzw. Kulturmedium versetzt mit 50U/ml IFN γ für 60 Stunden zugegeben. In den letzten 24 Stunden wurde bakteriell produziertes, mehrfach aufgereinigtes Hämagglutinin-Protein (HA, zur Verfügung gestellt von J. Mautner) in verschiedenen Konzentrationen (0,1-1 μ g/ml) in das Medium der RCC-Zellen pipettiert.

Nach Inkubation mit HA-Protein wurden die RCC-Zellen fixiert. Dazu wurden die Überstände abgenommen und jeweils 100 μ l der Fixierlösung für 10min, RT zugegeben. Anschließend wurde insgesamt viermal in RPMI-1640 Medium ohne Zusätze gewaschen und die Zellen in 100 μ l RPMI-1640 Medium mit 10% FKS, 2mM L-Glutamin, 1mM Natriumpyruvat, 100U/ml Penicillin und 0,1mg/ml Streptomycin überschichtet. Anschließend wurden zu den RCC-Zellen 1×10^5 T-Zellen von Clone-1 in 100 μ l T-Zell-Medium für 20 Stunden zugegeben.

Fixierlösung: 0,5% Paraformaldehyd (1%-ige Stammlösung in PBS) in RPMI-1640 Medium (ohne Zusätze)

6.4.4 ELISA

Der ELISA wurde nach Herstellerangaben (R&D Systems, Wiesbaden) durchgeführt. Nachgewiesen wurde GM-CSF mit einem im Kit mitgelieferten anti-GM-CSF Antikörper. Im ELISA-Reader (Tecan, Crailsheim) wurde die umgesetzte Farbreaktion bei einer Wellenlänge von 450nm (Referenzwellenlänge 650nm) vermessen.

6.5 Aufreinigung von PBMCs

„Buffy Coats“ (versetzt mit Heparin) oder 120ml Blut (à 60ml, versetzt mit je 1ml 0,5M EDTA pH 8,0) wurde in einem Ficoll-Gradienten aufgetrennt. Dazu wurden 20ml Blut in ein 50ml Falcon überführt und 14ml Ficoll/Paque (Amersham/Pharmacia, Freiburg) am Boden des Falkons langsam zugegeben. Das Blut wurde für 30min bei 2000Upm, RT zentrifugiert und ohne Bremse abgestoppt. Die Leukozyten wurden vorsichtig zusammen mit der Fettlösung aus dem gebildeten Gradienten abgezogen und in ein frisches Falcon überführt, mit RPMI-1640 Medium (ohne Zusätze) auf 50ml aufgefüllt und bei 1800Upm, 10min, RT zentrifugiert. Der gesamte Überstand wurde verworfen, ein letztes Mal in RPMI-1640 Medium gewaschen und die Zellen gezählt.

6.6 FACSTM-Analyse

$3-5 \times 10^5$ Zellen wurden in FACS-Röhrchen (Becton-Dickinson/Pharmingen, Heidelberg) sedimentiert (5min, 1500Upm, 4°C), in 50-100µl FACS-Puffer resuspendiert und mit dem Primärantikörper (Verdünnung: 1:50) für 30min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen dreimal mit 1ml FACS-Puffer gewaschen und für 20min mit einem DTAF-gekoppelten Sekundärantikörper auf Eis inkubiert (Volumen: 100µl, Antikörperverdünnung: 1:50, dunkel). Nach drei Waschschrritten erfolgte die Aufnahme in 200-500µl FACS-Puffer mit 2µg/ml Propidiumjodid. Im Falle direkt gekoppelter Antikörper wurden die Zellen nach Inkubation gewaschen und anschließend mit Propidiumjodid versetzt. Die Analyse wurde in einem FACS-Scan Gerät mit Cell Quest Software (Becton-Dickinson) durchgeführt.

FACS-Puffer 1: 2% FKS in PBS

6.7 RNA-Methoden

6.7.1 Isolierung von RNA

Suspensionszellen wurden tags zuvor 1:1 gesplittet und adhärenente Zellen in einer Verdünnung von 1:3 in frischem Zellkulturmedium ausgebracht. Adhärenente Zellen wurden mit einem Zellschaber von den Platten gelöst und einmal in PBS gewaschen, Suspensionszellen wurden abzentrifugiert und anschließend einmal in PBS gewaschen. Gesamt-RNA von ca. $0,5 \times 10^6$ - 1×10^7 , bzw. 1×10^7 - 1×10^8 Zellen wurde nach Anleitung präpariert (RNeasy-Mini-Kit, RNeasy-Midi-Kit, Qiagen, Hilden). Anschließend wurde die RNA in RNase-freiem Wasser aufgenommen und in Aliquots bei -70°C gelagert.

6.7.2 Northern-Blot und Hybridisierung

Jeweils $10\mu\text{g}$ Gesamt-RNA wurden in der Speed Vac (SpeedVac Concentrator SVC100H, Savant Instruments NC, Farmingdale; N.Y., USA) lyophilisiert, in $15\mu\text{l}$ Ladepuffer resuspendiert, bei 70°C für 10min denaturiert, auf Eis abgekühlt, kurz abzentrifugiert und bis zum Auftragen auf Eis belassen. Die RNA sowie $3\mu\text{l}$ RNA-Standard wurden auf ein großes 1%-iges Formaldehyd-Agarose-Gel (400ml) aufgetragen und über Nacht bei 40V in 1xMOPS-Puffer elektrophoretisch aufgetrennt. Der Northern-Blot wurde nach Anleitung durchgeführt (Sambrook *et al.*, 1989). 16-20 Stunden nach dem Kapillartransfer wurde die Membran kurz in 5xSSC geschwenkt, getrocknet und die RNA von beiden Seiten kovalent an die Membran gebunden (UV-Stratalinker 1800, Stratagene, Auto-Cross-Link Modus). Anschließend wurde die Membran für 10min in Waschpuffer gewaschen und in 15-20ml Church-Puffer für mind. 3 Stunden bei 65°C in einer Hybridisieröhre im Hybridisierofen (MWG-Biotech, Ebersberg) prähybridisiert. Danach wurde die radioaktive Sonde (6.7.3) in frischem Churchpuffer gegen den Prähyb-Puffer ausgetauscht und über Nacht bei 65°C hybridisiert. Am nächsten Tag wurde die Membran in einer Glaswanne in 60°C warmen Waschpuffer für 10-45min gewaschen und mit Verstärkerfolie autoradiografiert. Die Dauer der Exposition richtete sich nach der Intensität der radioaktiven Strahlung.

RNA-Ladepuffer: 10ml Formamid (50%); 3ml Formaldehyd (15%); 2ml 10xMOPS (10%); 500 μl Bromphenolblau (1%-ige Lösung); ad 20ml mit H_2O auffüllen, in 1ml Aliquots bei -20°C aufbewahren

	5µl Ethidiumbromid (1%-ige Stammlösung Merck, Darmstadt) pro ml Lade- puffer frisch zugeben
DEPC-Wasser:	1ml DEPC-Lösung (Merck, Darmstadt) pro Liter MQ-Wasser, mehrfach schwenken, über Nacht mit nicht zugeschraubten Deckel unter dem Abzug inkubieren, autoklavieren
10xMOPS:	0,2M Morphpropan Sulfonsäure (MOPS); 0,05M Natriumacetat; 0,01M EDTA (pH 8,0); mit NaOH auf pH 7,0 einstellen, ad 1l H ₂ O
Formaldehyd-Agarose-Gel:	4g Agarose in 300ml DEPC-Wasser aufgekochen, auf 50°C abgekühlen, dazu 40ml 10xMOPS und 67ml 37% Formaldehyd
0,4N HCl Lösung:	48,2mlkonzentrierte HCl in 500ml H ₂ O
20xSSC:	3M NaCl, 0,3M Natriumcitrat-Dihydrat, mit wenig HCl auf pH 7,0 einstellen, ad 1l H ₂ O
Church-Puffer:	400mM Na ₂ HPO ₄ mit 100mM NaH ₂ PO ₄ auf pH 7,2 einstellen; 350ml 20%- ige SDS-Lösung, 2ml 500mM EDTA pH 8,0; ad 1l H ₂ O (<i>Church und Gilbert, 1984</i>)
Waschpuffer:	0,1xSSC; 1% SDS

6.7.3 Radioaktive Markierung und Northern-Blot Sonden

Ca. 30-50ng DNA wurden nach Herstellerangaben (RedyPrime Kit, Amersham/Pharmacia, Freiburg) mit 5µl $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP für 30min bei 37°C radioaktiv markiert und danach über Sephadex-Säulen gereinigt (Amersham/Pharmacia, Freiburg) und in 3 Fraktionen mit 400, 400 und 100µl TE-Puffer aufgefangenen. Die inkorporierte Radioaktivität wurde im Benchtop Radioisotope Counter (Bioscan, Washington D.C., USA) nach Angaben des Herstellers vermessen. $2\text{-}3 \times 10^7$ dpm aus Fraktion 2 wurden für 10min bei 100°C aufgekocht, auf Eis abgekühlt, abzentrifugiert und in 15-20ml Churchpuffer zur prähybridisierten Membran zugegeben (6.7.2).

Sonde	Herstellung
CD83	<i>HindIII/EcoRI</i> -Fragment aus dem Vektor pcDNA3.1/CD83 (zur Verfügung gestellt von Prof. J. Hauber, Heinrich-Pette-Institut, Hamburg)
CD83-Exon 4	PCR-Fragment amplifiziert mit den Primern CD83 3.24 und CD83 5.12
GAPDH	PCR-Fragment, amplifiziert mit den Primern 3.GAPDH und 5.GAPDH

6.7.4 cDNA-Synthese und PCR

Jeweils 5µg Gesamt-RNA wurden nach Herstellerangaben (Life Technologies-Invitrogen, Karlsruhe) mit der Reversen Transkriptase SuperScript™ synthetisiert. Die cDNA wurde bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Je 1µl cDNA wurden mit je 1µl des Hin- (5'-Primer; 100pmol/µl) und Rückprimers (3'-Primer; 100pmol/µl), 2,5µl DMSO, 1µl Pfu-Polymerase, 5µl Reaktionspuffer (10x) und 5µl dNTPs (1:10 Verdünnung eines Gemisches zu gleichen Teilen dATP, dCTP, dGTP, dTTP, Roche Diagnostics, Mannheim) vermischt und mit H₂O auf 50µl aufgefüllt. Das verwendete PCR-Programm richtete sich nach der Schmelztemperatur der jeweiligen Primer und der Länge der erwarteten PCR-Produkte (ca. 1min/1kb, Perkin Elmer GenAmp 9600 PCR-Maschine).

6.8 Proteinmethoden

6.8.1 Probengewinnung mit β-Mercaptoethanol-Puffer

Tags zuvor transfizierte 293-T Zellen (4×10^5) wurden aus den 6-Loch Schalen mit einem Zellschaber (Greiner) abgekratzt, bei 6000Upm in einer Eppendorf-Tischzentrifuge für 5min sedimentiert, einmal in PBS (ca. 1ml) gewaschen und anschließend in 100µl β-Mercaptoethanol (βME)-Probenpuffer aufgenommen. Danach wurden die Proben sonifiziert, bei 100°C für 10min aufgeköcht, auf Eis gestellt und abzentrifugiert. Jeweils gleiche Proteinmengen wurden auf ein 10%-iges SDS-Polyacrylamid-Gel (10µl/Spur) aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt.

β-ME Probenpuffer: 6ml 10%-ige SDS-Lösung; 2,5ml 0,5M Tris/HCl (pH6,8); 1ml β-Mercaptoethanol (Merck); 1ml 87%-ige Glycerol-Lösung (ICN) 125µl Bromphenolblau (1%-ige Lösung)

6.8.2 Auftrennung von Proteinen durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Proteine (10-20µg) oder 20µl Überstände, 1:4 mit Ladebuffer (+/- DTT) versetzt, wurden auf 10-15%-igen SDS-Polyacrylamid-Gelen elektrophoretisch in einer Mighty Small Elektrophorese-Kammer (Höfer, Amersham/Pharmacia, Freiburg) aufgetrennt und die Trenngele

danach für Western-Blot, Coomassie oder Silberfärbung weiterverwendet. Auf jedem Gel wurden 5µl eines aufgekochten Proteinstandards (BioRAD, München) aufgetragen.

Trenngel für 60ml:	10%: 20ml Acrylamid (30%); 0,5ml 500mM EDTA (pH8,0); 10ml 2M Tris/HCl (pH 8,8); SDS (10%); 29,5ml H ₂ O 15%: entsprechend 30ml Acrylamid (30%) und 19,5ml H ₂ O zuletzt 300µl APS (10%), 30µl TEMED
Sammelgel für 100ml:	76,75ml H ₂ O; 15ml Acrylamid (30%); 6,25ml 2M Tris/HCl (pH 6,8) 1ml SDS (10%); 1ml 500mM EDTA (pH 8,0) Pro Minigel wurden 2ml Sammelgel mit 14µl APS (10%) und 4µl TEMED gemischt
4 x Ladepuffer:	1,25ml 0,5M Tris/HCl (pH 6,8); 4ml SDS (10%); 4ml Glycerol (99,5%), 200µl Bromphenolblau (1%), 0,62g DTT; 4µl 500mM EDTA (pH 8,0); ad 10ml H ₂ O
Laufpuffer:	6g Tris; 28g Glycin; 20ml SDS (10%); ad 2l H ₂ O

6.8.3 Silberfärbung

Das Polyacrylamid-Gel wurde zweimal für 20min in Fixierlösung geschwenkt, dann für 10min in 50% Ethanol und für weitere 10min in 30% Ethanol weitergeschwenkt. Anschließend wurde das Gel für ca. 5-10sek. in Natriumthiosulfatlösung (0,2g/l Na₂S₂O₃ in H₂O) gegeben und danach dreimal für je 20sek. mit Wasser gespült. Anschließend erfolgte eine 10-15-minütige Inkubation des Gels mit einer Silbernitrat/Formaldehydlösung. Das Gel wurde zweimal für 20sek. mit Wasser gespült und bis zum Erkennen der Proteinbanden in Entwicklerlösung eingelegt. Die Reaktion wurde mit Stopplösung für 5min abgestoppt. Zuletzt wurde das Gel zweimal für 10min mit Wasser gespült und in einer Glycerin/EtOH Lösung für weitere 30min geschwenkt. Abschließend wurde das Gel im Geltrockner (BioRAD, München) für 2 Stunden bei 80°C getrocknet.

Fixierlösung:	50% Methanol; 12% Essigsäure; 50µl Formaldehyd (37%) ad 100ml H ₂ O
Silbernitrat/Formaldehydlösung:	0,1% Silbernitrat; 75µl Formaldehyd (37%) ad 100ml H ₂ O
Entwicklerlösung:	6% Na ₂ CO ₃ (wasserfrei); 50µl Formaldehyd (37%); 200µl Natriumthiosulfat (0,2g/l in H ₂ O) ad 100ml H ₂ O
Stopplösung:	5% Essigsäure
Glycerin/EtOH-Lösung:	20% Ethanol in 500ml H ₂ O, versetzt mit 12,5ml 80%-iger Glycerinlösung

6.8.4 Western-Blot

Die Trenngele wurden in einer Feuchtkammer (Höfer, Amersham/Pharmacia, Freiburg) auf eine PVDF-Membran (Hybond-P) nach Anleitung für eine Stunde bei 70V auf Eis transferiert (Amersham/Pharmacia, Freiburg). Danach wurde die Membran in Blockierlösung transferiert und für mind. 30min bei RT geschwenkt. Anschließend wurde der Erstantikörper 1:100-1:1000 in 3%-iger Milch-TBST-Lösung über Nacht bei 4°C in einem 50ml Falkon auf einem Roller (CAT RM5, M. Zipperer GmbH, Staufen) gerollt. Am nächsten Tag wurde die Membran 3-5x in Waschlösung kräftig gewaschen und für ca. 1-2 Stunden bei RT in einem Falkon mit dem gegen den Erstantikörper gerichteten Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper (1:100-1:10000 in Hybridisierlösung) gerollt. Danach wurde die Membran wiederum 3-5x gewaschen, gut abgetrocknet und nach Anleitung mit dem „Enhanced chemoluminescence-System“ entwickelt (Amersham/Pharmacia, Freiburg). Hybridisierte Membranen wurden zur Wiederverwendung für mind. 2 Stunden unter ständigem Austausch der Stripplösung gewaschen und anschließend mit Blockierlösung (s.o.) blockiert.

Tabelle 1: Übersicht über die im Western-Blot eingesetzte Antikörper und deren Verdünnungen

Anti-körper	Verwendete Antikörper	Firma	Verdünnung
1. AK	Maus-anti-hCD83	Immunotech, Marseille	1:500-1:1000
	Maus-anti-hCD86	Becton Dickinson/Pharmingen, Heidelberg	1:500-1:1000
	Ratte-anti-HA	von E. Kremmer zur Verfügung gestellt	1:500-1:1000
	Maus-anti-His	Roche, Penzberg	1:500
	Ratte-anti-hLamp1	Transduction Laboratories, Lexington	1:500
	Maus-anti-LMP-1	DAKO, Glostrup, Dänemark	1:400
	Maus-anti-HLA	Sigma, Taufkirchen	1:500
	ABC (W6/32)		
2. AK	Ziege-anti-Maus	IgG und IgM, Fab-Fragment, Dianova, Hamburg	1:5000-1:10000
	Ziege-anti-Ratte	IgG und IgM, Fab-Fragment, Dianova, Hamburg	1:5000-1:10000

Transferpuffer:	6g Tris; 28g Glycin ad 1600ml mit H ₂ O auffüllen, lösen lassen; dann 400ml Methanol
Blockierlösung:	5% Magermilch (Merck) in TBST
Milch-TBST/Waschpuffer:	3% Magermilch (Merck) in TBST
TBST:	20ml 5M NaCl; 10ml 1M Tris/HCl (pH 7,5); 1ml Tween 20 (0,1%) ad 1l H ₂ O
Stripp-Lösung:	20ml 5M NaCl; 10mM 1M Tris/HCl (pH 7,5); 2ml Tween 20 (0,2%) ad 1l H ₂ O

6.9 Luziferase-Assay

6.9.1 Transfektion

4x10⁵ 293-T Zellen wurden pro Vertiefung einer 6-Loch-Platte in Kulturmedium tags zuvor ausgebracht. Für die CD83-Promotorstudien wurden 36µl OptiMEM™-Medium mit 10ng β-Galaktosidase-Expressionsplasmid, 50ng CD83-Promotor/Luziferase-Konstrukt (pGL Basic als Kontrolle; pGL CD83 (-3037); pGL CD83 (-3037 ΔSP1); pGL CD83 (-261); pGL CD83 (-123); pGL CD83 (-123mut)), und variierend 0,5µg Expressionsplasmid-I mit 1,5µg entsprechendem Leervektor, bzw. 1,5µg Expressionsplasmid-II versetzt oder als Kontrolle 0,5µg Kontrollplasmid-I mit 1,5µg Kontrollplasmid-II, bzw. 2µg Kontrollplasmid verwendet und abschließend ein Gemisch aus 6µl LipofectAMIN und 36µl OptiMEM™-Medium zugegeben und mit der transienten Transfektion wie in Abschnitt 6.2.2 weiter verfahren.

6.9.2 Proteinextrakte

Wenn nicht anders angegeben wurden die Zellen 24 Stunden später mit einem Zellschaber von den Platten abgeschabt, das Medium-Zell-Gemisch in ein 2ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, bei 6000Upm und 4°C für 5min in einer Zentrifuge zentrifugiert, der Überstand abgezogen, die Zellen in ca. 1ml kaltem PBS gewaschen und nochmals sedimentiert. Anschließend wurde das Zellpellet in 100µl Extraktionspuffer resuspendiert, für 15min bei 15300Upm und 4°C zentrifugiert und der Überstand in ein frisches Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die Proteinextrakte wurden dann entweder bei -70°C weggefroren oder auf Eis bis zur weiteren Verwendung stehen gelassen.

Extraktionspuffer:	50% (w/v) Glycerin; 5% (w/v) Triton X-100; 10mM EDTA (pH 8,0); 125mM Tris/HCl (pH 7,8)
---------------------------	--

6.9.3 Luziferase-Assay

Für den Luziferase-Assay wurden pro Proteinextrakt je 10µl in 2 Vertiefungen einer 96-Loch Platte (Opaque Plate, Costar, Bodenheim) pipettiert (Luc). Zur Ermittlung des Leerwerts (Luc Leer) wurden je 10µl des Extraktionspuffers in 6 Vertiefungen pipettiert und anschließend der Mittelwert gebildet. Die Biolumineszenz wurde in Relative Light Units (RLU; Relativen Lichteinheiten) durch Zugabe von 50µl Luziferase-Assay Puffer mit dem MikroLumat LB96P (Berthold, Wildbad) mit dem Programm WinGlow unter Verwendung des Parameters Luc-enh.ipt gemessen.

Luziferase-Assay-Puffer: 20mM Tricin; 1,07mM $4(\text{MgCO}_3) \times \text{Mg}(\text{OH})_2 \times 5\text{H}_2\text{O}$; 2,67mM MgSO_4 ; 0,1mM EDTA; 33,3mM DTT; 270µM Acetyl-Coenzym A (Roche); 470µM Luziferin (Roche); 530µM ATP (Roche)

6.9.4 β-Galaktosidase-Assay

Jeweils 100µl des Reaktionspuffers A wurden pro Vertiefung einer 96-Loch Platte (Opaque Plate, Costar, Bodenheim) vorgelegt. Anschließend wurden je 10µl Proteinextrakt in 2 Vertiefungen pipettiert, für 20min bei RT inkubiert und die umgesetzte Menge an Galakton durch Zugabe von 100µl Reaktionspuffer B im MikroLumat LB96P (Berthold, Wildbad) mit dem Programm WinGlow unter Verwendung des Parameters b_Gal.ipt gemessen (Gal). Zur Ermittlung des Leerwerts wurden je 10µl des Extraktionspuffers in 6 Vertiefungen pipettiert und anschließend der Mittelwert gebildet (GalLeer). Innerhalb eines Experiments kam es zu keinen großen Schwankungen der β-Galaktosidase Werte.

Reaktionspuffer A: 100mM Na_2HPO_4 (pH 8,0); 0,1mM MgCl_2 ; 1% Galakton-Plus (Applied Biosystems)

Reaktionspuffer B: 0,2M NaOH; 10% Emerald-Enhancer (Applied Biosystems)

6.9.5 Standardisierung und Berechnung der x-fachen Transaktivierung

Die Standardisierung der Reaktionen erfolgte mit nachfolgender Rechnung:

Mittelwert (Luc-LucLeer)

Mittelwert (Gal-GalLeer)

Alle Transfektionen wurden in Doppel- oder Dreifach- (Triplett-) Ansätzen durchgeführt. Von diesen wurde nach Standardisierung der Mittelwert berechnet. Die Fold Induction oder x-fache Transaktivierung berechnet sich aus dem Quotienten von mit Expressionsplasmid-transfizierten Zellen und Kontrollplasmid-transfizierten Zellen. Aus den x-fachen Transaktivierungswerten von 3-6 Experimenten wurden pro Abbildung ein Gesamt-Mittelwert ermittelt und die Standardabweichung berechnet.

6.10 Tetramer-Produktion

6.10.1 Transfektion

293-T Zellen wurden wie oben beschrieben (6.2.1) mit der Ca^{2+} Phosphat-Transfektionsmethode mit den Expressionsplasmiden 101, 102 oder 103 transfiziert (s. Anhang 9.3) und für 10 Tage in je 20ml Serum-freien Medium (SFMII293) kultiviert. Der Überstand wurde abgenommen, in 250ml Falkons (Costar, Bodenheim) für 20min bei 2000Upm und 4°C von restlichen Zellen und Schwebpartikeln befreit und in eine sterile Zellkulturflasche überführt. Dem Überstand wurden 0,02% Natriumazid und ein Proteaseinhibitorcocktail (Sigma, Taufkirchen) beigegeben und durch einen 0,2µm Sterilfilter (Stericup, Millipore) sterilfiltriert. Die Proteinüberstände wurden bei 4°C bis zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt. Insgesamt wurden pro Tetramer ca. 1,5-2,5l CD83-Monomer-Überstand aus je 150-200 transfizierten 13cm Zellkulturschalen produziert.

6.10.2 Anreicherung (Tangentialflow, NiNTA)

Zur Verringerung des Volumens wurde eine Tangentialflow-Pumpe (Merco, USA) verwendet. Dadurch wurde der Überstand von ca. 2l auf ca. 250ml reduziert. 5ml NiNTA-Agarose wurde dreimal in 50ml kaltem PBS gewaschen (1800Upm, 15min, 4°C) und auf Eis bis zur weiteren Verwendung gelagert. In die mit ca. 220-240ml gefüllte Zellkulturflaschen wurden je 5ml NiNTA-Agarose (Qiagen, Hilden) dazugegeben und mit PBS bis auf eine 1cm³ große Luftblase mit PBS auf 250ml aufgefüllt. Die Zellkulturflaschen wurden mit Parafilm abgedichtet, mit TESA-Klebeband an einem Mixing Rotor (Renner GmbH, Darmstadt) befestigt und über Nacht bei 4°C im Kühlraum langsam rotiert.

6.10.3 Imidazol-Aufreinigung

Am nächsten Tag wurden die Überstände filtriert (0,45µm Filter Millipore, Irland; Glasvakuumfiltrationsgerät, Sartorius, Göttingen) und die NiNTA-Agarose-Beads auf eine vorbereitete Säule (Ø ca. 1cm, Länge 15-20cm, Amersham/Pharmacia, Freiburg) gegeben und mit einem Stempel komprimiert. Anschließend wurden die Proteine im 4°C Kühlraum über eine FPLC-Anlage mit 200mM Imidazol (pH 7,5; in H₂O) von den NiNTA-Agarose-Beads eluiert. Die Proteine wurden in 1,5ml Fraktionen aufgefangen. Über einen UV-Detektor (OD₂₈₀) wurde die Elution der Proteine verfolgt und auf einem Schreiber festgehalten. Anschließend wurden die proteinhaltigen Fraktionen vereinigt und über Mikro-Spin Tubes (Ultrafree 15, Amicon, Zefa-Laborservice, Augsburg) auf ein Volumen von ca. 500µl reduziert und gewaschen. Anschließend wurde zweimal mit 15ml sterilem FPLC-Puffer aufgefüllt und auf ein Volumen von 700µl zentrifugiert.

FPLC-Puffer: 20mM Tris/HCl (in Pulverform, Roth); 50mM NaCl, auf pH 8,0 mit NaOH einstellen

6.10.4 Biotinylierung

Die 700µl Proteinlösung wurden in 1,5ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt, mit je 0,5µl Protease-Inhibitoren Pepstatin und Leupeptin, je 100µl Lösung A und B, 100µl extra d-Biotin und zuletzt mit 10µl BirA Enzym über Nacht bei RT inkubiert.

Pepstatin: 2mg/ml Stammlösung in DMSO

Leupeptin: 2mg/ml Stammlösung in H₂O

Alle nachfolgenden Reagenzien stammen von der Firma Avidity (Denver, USA):

Biotin-Protein Ligase BirA: Stammlösung 3mg/ml (10µl Aliquots auf -80°C)

Lösung A: 0,5M Bicin (pH 8,3)

Lösung B: 100mM ATP; 100mM MgOAc, 200µM Biotin

Extra d-Biotin: 500µM Biotin

6.10.5 Aufreinigung der biotinylierten CD83-Monomere

Die Aufreinigung und Gelfiltration der CD83-Monomere erfolgte über eine FPLC-Anlage bei 4°C im Kühlraum. Zunächst wurde die Pumpe gewaschen und die Säule mit FPLC-Puffer

equilibriert (mit einer Durchflußrate von 0,2ml/min). Bevor die Proteine auf die Superdex 200HR Gelfiltrationssäule (Amersham/Pharmacia, Freiburg) aufgeladen werden konnten, wurden die biotinylierten Proteine über einen 0,22µm Sterilfilter sterilfiltriert. Bei einer Durchflußrate von 0,2ml FPLC-Puffer/min erfolgte die Trennung von biotinyliertem Protein, BirA Enzym, kleinen Peptiden, ATP und d-Biotin. Die Proteine wurden in 500µl Fraktionen gesammelt. Über einen UV-Detektor wurde die Elution der Proteine verfolgt und auf einem Schreiber festgehalten. Die Fraktionen der biotinylierten Proteine wurden vereinigt, über Mikro-Spin Tubes (Ultrafree 4, MW 10.000, Zefa-Laborservice, Augsburg) aufkonzentriert und anschließend einmal in mit 2µl Leupeptin, 2µl Pepstatin und 8µl EDTA (pH 8,0) versetztem PBS (4ml) bei 3000Upm und 4°C auf ein Volumen von 850µl (Monomer 101), bzw. 550µl (Monomer 102 und 103) zentrifugiert. Jeweils 20µl Proteinlösung wurden mit BCA-Lösung versetzt und die Proteinkonzentration nach Angaben des Herstellers ermittelt. Zuletzt wurden die Proteine in 200µl Aliquots (200µl = 200µg) bis zur weiteren Verwendung in flüssigem Stickstoff weggefroren.

6.10.6 Streptavidin-Shift-Assay

Zum Test, ob funktionell biotinyliertes Protein, das tetramerisiert werden kann, produziert wurde, wurde ein sogenannter Shift-Assay durchgeführt. Dazu wurden pro CD83-Monomer 3 Proben mit in Tab. 2 aufgeführter Zusammensetzung vorbereitet.

Die Proben wurden über Nacht bei 4°C inkubiert, am nächsten Tag 4:1 mit Ladepuffer gemischt, nicht aufgeköcht und auf ein 10%iges SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen, eine Coomassie-Färbung und ein Western-Blot (6.8.4) durchgeführt und das Protein anschließend sowohl mit einem anti-CD83- als auch mit einem anti-His-Antikörper nachgewiesen. Bei einer Bindung von Streptavidin an Biotin erfolgt eine Tetramerisierung, da Streptavidin vier Bindestellen zur Verfügung hat. Im Gel läuft ein tetramerisiertes Protein demzufolge mit einer höheren Proteingröße.

Tabelle 2: Überblick über Zusammensetzung der Proben für den Shift-Assay

	Cap 1	Cap 2	Cap 3
1. biotinyliertes Protein (µl)	-	15	15
2. PBS (µl)	15	5	-
3. Streptavidin (µl)	5	-	5

Streptavidin: 1mg/ml in PBS (MoBiTec, Göttingen)

6.10.7 Multimerisierung der biotinylierten CD83-Monomere

Nachdem gezeigt wurde, daß die biotinylierten Proteine tetramerisiert werden konnten und die Biotinylierungssequenz funktionell aktiv war, wurden nun Tetramere mit PE-markiertem Streptavidin (SAPE) hergestellt, unter der Annahme, daß mind. 50% des Proteins biotinyliert wurden, was pro aliquotiertem Protein (200µg in 200µl) 100µg entspricht. Zusammen mit der Biotinylierungssequenz und dem His-Tag besitzen die Tetramere eine Größe von ca. 40kDa. Streptavidin-PE hat eine Größe von 300kDa (Streptavidin: 60kDa; PE=R-Phycoerythrin: 240kDa). Mit folgender Rechnung wurde ermittelt, wieviel Streptavidin zu 100µg Protein zugegeben werden mußte:

1. 100 (µg Protein): 40 (MW von biot. Protein in kDa) = 2,5nmol
2. 2,5nmol : 4 (4 Bindestellen von Streptavidin) = 0,625nmol Streptavidin-PE
3. 0,625nmol x 300 (MW von SAPE in kDa) =
4. 185-187µl Streptavidin-PE einer 1µg/µl Stammlösung zu je 100µg Tetramer.

Die Zugabe von 185µl Streptavidin-PE erfolgte sehr langsam und in kleinen Schritten (je 5-30µl alle 20-30min). Nach Inkubation bei 4°C über Nacht (dunkel) wurden die tetramerisierten Proteine ein letztes Mal über ein Mikro-Spin Tube (Ultrafree-4 Filter, Biomax-100, Amicon) mit einer 100kDa Membran in PBS, versetzt mit Protease-Inhibitoren, gewaschen (6.13.7), auf ein Volumen von 250µl eingengt und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C im Dunkeln aufbewahrt.

Streptavidin-PE: 1mg/ml in 0,1M NaPi; 0,1M NaCl; pH7,5; versetzt mit 2mM Natriumazid (Molecular Probes, Leiden, Niederlande)

6.10.8 FACS mit CD83-Tetramer

Ca. $1-2 \times 10^7$ frisch aufgereinigte PBMC, CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen, bzw. ca. 2×10^6 CD4⁺ Klone oder Linien (zur Verfügung gestellt von J. Mautner und S. Milosevic) wurden in FACS-Röhrchen (Becton-Dickinson/Pharmingen, Erembodegem, Belgien) überführt, einmal mit gekühltem FACS-Puffer gewaschen (1500Upm, 5min, 4°C), mit konzentrierter Streptavidin-Lösung (1mg/ml in PBS) für 30min auf Eis präinkubiert, mit 1ml FACS-Puffer aufgefüllt, abzentrifugiert, der Überstand verworfen und anschließend mit Tetramer (1:10), bzw. PE-markiertem Streptavidin (1:50, =SAPE) als Kontrolle für 30-60min auf Eis (dunkel)

gefärbt. Der Verdünnungsunterschied von Tetramer und SAPE-Kontrolle ergibt sich aus den vier Bindestellen von Streptavidin. Die Zellen wurden anschließend dreimal in FACS-Puffer gewaschen und in Propidiumjodid-haltigem FACS-Puffer aufgenommen. Zur FACS™-Analyse wurden 1×10^6 - 1×10^7 als lebend definierte Zellen analysiert (6.8).

FACS-Puffer: 0,5% BSA in PBS

6.11 Produktion des CD83-Ig Fusionsproteins

6.11.1 Transfektion

Die 293-T Zellen wurden pro Platte (13cm/10cm) mit je 60µg (bzw. 20µg) CDM7/CD83-Ig (S/L) mit der Ca^{2+} -Phosphat-Transfektionsmethode transient transfiziert (6.2.1), das Medium nach 9 Stunden abgezogen und die Zellen in 20ml Serum-freien Medium (SFMII293) für 10 Tage kultiviert. Der Überstand wurde bei 2000Upm und 4°C für 20min von groben Bestandteilen befreit, mit 0,02% Natriumazid und einem Protease-Inhibitor-Cocktail (Sigma, Taufkirchen) versetzt, sterilfiltriert (0,22µm, Stericup, Millipore) und bis zur weiteren Verarbeitung bei 4°C im Kühlraum aufbewahrt.

6.11.2 Aufreinigung der Überstände über Protein A

Die Aufreinigung der Überstände erfolgte über eine mit ca. 2ml Protein A gefüllte Säule (BioRAD, München). Nach Beladen der Säule mit proteinhaltigem Überstand wurde das Protein durch Spülen mit Citratpuffer bei pH 4 und pH 2,7 von Protein A getrennt. Das freiwerdende Ig-Fusionsprotein wurde mit Hilfe eines UV-Detektors (OD_{280}) detektiert. Die proteinhaltige Flüssigkeit wurde über eine Dialyseröhre im Gegenstromprinzip mit PBS dialysiert. Das aufgereinigte Protein wurde anschließend FITC-markiert (von E. Kremmer zur Verfügung gestellt).

Citratpuffer: Lösung 1: 0,1M Citric Acid (MW=210,1g/mol)
Lösung 2: 0,1M Natriumcitrat (MW=294,1g/mol)

Zu Lösung 1 wird soviel Lösung 2 zugegeben bis auf der pH-Wert bei 2,7 oder pH 4 liegt und mit Wasser auf 1l aufgefüllt.

6.12 Bakterien

6.12.1 Kultivierung und Aufbewahrung von Bakterien

Die Bakterien der *Escherichia coli* (*E. coli*) Stämme XL-1 blue und MC1061-P3 wurden in einem Bakterieninkubator oder als Suspensionskultur in LB Medium in einem Bakterien-schüttler (New Brunswick Scientific Co., Edison, USA) bei 37°C kultiviert. Mit Plasmiden transformierte XL-1 Bakterien wurden in Gegenwart von Ampicillin (100µg/ml) im Fest- und Flüssigmedium gehalten. Mit dem Vektor CDM7/8 transformierte MC1061-P3 Bakterien wurden in Gegenwart von Ampicillin (200µg/ml) und Tetrazyklin (300µg/ml) im Fest- und Flüssigmedium kultiviert. Zur langfristigen Aufbewahrung wurde ein Aliquot einer dicht gewachsenen Bakterienkultur von ca. 1ml in ein steriles Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, bei 6000Upm und 4°C für 10min sedimentiert, in 1ml Einfrierlösung resuspendiert und in einer Einfrierampulle (Nunc, Wiesbaden) bei -80°C weggefroren.

LB-Medium: 20mM MgSO₄; 10mM KCl; 10g Trypton; 5g Yeast-Extract; 5g NaCl; ad 1l H₂O

LB-Platten: 1% Trypton, 0,5% Hefe Extrakt, 0,5% NaCl, 1,2% Bacto-Agar

Einfriermedium: 10% (w/v) Glycerin in LB-Medium

6.12.2 Kompetente Bakterien

XL-1 blue oder MC1061-P3 Bakterien wurden von einer Einzelkolonie in 3ml LB-Medium (ohne Antibiotika) angeimpft und über Nacht bei 37°C in einem Bakterien-schüttler (New Brunswick Scientific Co., Edison, USA) geschüttelt. Am nächsten Tag wurden 100ml LB-Medium mit je 2ml einer 1M KCl und einer 1M MgSO₄ Lösung versetzt, die Bakterien dazugegeben und bis zu einem OD₆₀₀ von 0,4-0,55 geschüttelt. Anschließend wurden die Bakterien für mind. 10min auf Eis stehen gelassen, bei 4000Upm und 4°C für 10min sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in je 15ml kaltem TFB1-Puffer vorsichtig resuspendiert. Nach 5-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Bakterien ein zweites Mal bei 4000U/min, 4°C für 10min sedimentiert, der Überstand verworfen und in je 2ml TFB2-Puffer vorsichtig resuspendiert. Die Bakterien wurden in Aliquots á 100µl bei -80°C weggefroren.

TFB1-Puffer: 30mM KAc; 50mM MnCl₂; 100mM RbCl; 10mM CaCl₂; 15% (w/v) Glycerin mit 0,02N Essigsäure auf pH 5,8 einstellen, sterilfiltrieren, bei 4°C lagern

TFB2-Puffer: 10mM MOPS/NaOH (pH 7,0); 75mM CaCl₂; 10mM RbCl; 15% (w/v) Glycerin
sterilfiltrieren, bei 4°C lagern

6.13 Präparative Aufarbeitung von Plasmid-DNA

Die Vermehrung zur präparativen Aufarbeitung großer Mengen reiner Plasmid-DNA (Maxi-Präp) erfolgte immer von einer Einzelkolonie oder einer ausgestrichenen Einzelkolonie aus. Eine 400ml mit Antibiotika versetzte ü/N Kultur wurde bei 5000Upm bei 4°C für 10min sedimentiert und anschließend nach Angaben des Herstellers aufgearbeitet (JetStar, Genomed, Bad Oeyenhausen).

6.14 Klonierte Plasmide

Klonierungen wurden nach Standardmethoden (*Ausubel et al., 1993 oder Sambrook et al., 1989*), bzw. nach Angaben des Herstellers (Restriktionsanalyse, TAE-Agarose-Gelelektrophorese, Gel-Extraktion (Qiagen (Hilden)), Ligation (T4-DNA-Ligase), Transformation, Mini und Maxi-Präparation (Qiagen (Hilden), bzw. JetStar (Genomed, Bad Oeyenhausen) durchgeführt.

PCR-Reaktionen wurden wie unter 6.7.4 in einer Perkin Elmer (GenAmp 9600) PCR-Maschine durchgeführt, wobei für Klonierungen ausschließlich mit der Pfu-Polymerase benutzt wurde. Positive Klone wurden durch Restriktionsanalyse und Sequenzierung (Sequiserie, Vaterstedten) überprüft.

6.14.1 CD83-Spleißprodukte

Jeweils 1µl cDNA von unstimulierten PBMCs oder von für 4 Tagen ausgewaschenen, für 6 Stunden re-induzierten oder proliferierenden ER/EB2-5 Zellen wurde eine RT-PCR (s. 6.10.4) mit der Pfu-DNA-Polymerase (Promega, Mannheim) und mit CD83 spezifischen Primern, die den gesamten ORF von CD83 umspannten, durchgeführt. An den Primerenden von CD83 5.9 und CD83 3.17 befanden sich eine *EcoRI*, bzw. eine *NotI* Restriktionsschnittstelle, mit deren Hilfe ein Klonieren in den Vektor pcDNA3.1 über *EcoRI* und *NotI* ermöglicht wurde. Die PCR-Bedingungen waren wie folgt: 2min 94°C, 35x (1min 94°C, 1min 57°C, 3min 72°C), 10min 72°C, 4°C. Nach der PCR wurde die DNA über ein 2%-iges TAE-Agarose-Gel getrennt, CD83-Spleißprodukte ausgeschnitten, mit einem Gelextraktionskit in 30µl eluiert

und mit *EcoRI* und *NotI* verdaut und in den Vektor pcDNA3.1 kloniert. Aus den Sequenzvergleichen konnten drei verschiedene CD83-Spleißvarianten identifiziert werden, die mit CD83-a, CD83-b und CD83-c bezeichnet wurden (Sequenzen s. Anhang).

6.14.2 CD83-Ig Fusionsprotein

Aus jeweils 20ng Plasmid-DNA von pcDNA3.1/CD83 (29) wurden mit der Primerkombination CD83 5.1 und CD83 3.1 (CD83-S), bzw. mit der Primerkombination CD83 5.1 und CD83 3.2 (CD83-L) in einer PCR die extrazelluläre Domäne von CD83 unter folgenden Bedingungen mit einer Pfu-Polymerase amplifiziert: 2min 94°C, 35x (1min 94°C, 1min 57°C, 1,5min 72°C), 10min 72°C, 4°C. Die aufgereinigten PCR-Fragmente wurden über die an den Primerenden enthaltenen Restriktionsschnittstellen mit *XhoI* und *BglII* gespalten und in den Vektor CDM7 der mit *XhoI* und *BamHI* gespalten worden war, kloniert. Die daraus resultierenden Klone wurden als CDM7/CD83-S-Ig und CDM7/CD83-L-Ig bezeichnet.

6.14.3 CD83-Tetramere

Der Vektor pcDNA3.1 (10µg) wurde mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *NotI* gespalten, aufgereinigt und ein E/X/N-Linker (mit einer *EcoRI*, *XhoI*, *AgeI*, His-Tag, Stop-Codon, *Sall* und *NotI* Sequenz, Oligohybridisierung) eingebracht. Der erhaltene Vektor wurde pcDNA3.1/EXN bezeichnet. Anschließend wurde der Vektor mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *AgeI* geschnitten und ein EXEBN-Linker (mit einer *EcoRI*, *XhoI*, *Eco72I*, Biotinylierungssequenz, *AgeI* Sequenz) inkloniert. Der Vektor pcDNA3.1/EXEBN wurde mit *XhoI* und *Eco72I* gespalten und zwei verschieden lange Abschnitte der extrazellulären Domäne von CD83 (CD83-S, CD83-L, s. CD83-Ig) in den Vektor kloniert. Die CD83-S, bzw. CD83-L Varianten wurde über PCR mit den Primern CD83 5.9 und CD83 3.15, bzw. mit den Primern CD83 5.9 und CD83 3.16 erhalten (PCR-Bedingungen: 2min 94°C, 35x (1min 94°C, 1min 57°C, 3min 72°C), 10min 72°C, 4°C). Die klonierten Plasmide wurden pcDNA3.1/CD83-S-Tetramer und pcDNA3.1/CD83-L-Tetramer genannt. Weiterhin wurde auch eine CD83-S-Tetramer-Variante kloniert, die anstelle der *Eco72I* Restriktionsschnittstelle eine *ClaI* Schnittstelle aufweist (PCR mit den Primern CD83 5.9 und CD83 3.13). Der erhaltene Vektor wurde pcDNA3.1/CD83-S-*ClaI*-Tetramer genannt. Anschließend wurden alle drei Fusionsgene in den Vektor CDM7 über *XhoI/NotI* umkloniert und als CDM7/CD83-S *Eco72I* (102)

und CDM7/CD83-L Eco72I (103) und CDM7 CD83-S ClaI (101) Tetramer bezeichnet (Sequenzen s. Anhang 9.3).

6.14.4 pINCO/CD80 und pINCO/CD83

Zur Klonierung von CD80, bzw. CD83 wurde eine RT-PCR durchgeführt. Dazu wurde im Falle von CD80 1µl cDNA der Zelllinie RCC p77 (stabil mit CD80 transfiziert RCC Nierenkarzinomzelllinie, von J. Mautner zur Verfügung gestellt) mit den Primern CD80 5.1 und CD80 3.1 mit Pfu-Polymerase (Promega, Mannheim) amplifiziert: 2min 94°C, 35x (1min 94°C, 1min 57°C, 3min 72°C), 10min 72°C, 4°C, aufgereinigt und mit *EcoRI* und *NotI* nachgeschnitten und in den Vektor pcDNA3.1 über *EcoRI* und *NotI* kloniert. Anschließend wurde CD80 pcDNA3.1/CD80 Restriktionsenzymen *HindIII* und *NotI* geschnitten, bzw. CD83 aus dem Vektor pcDNA3.1/CD83 mit Hilfe der Restriktionsenzyme *HindIII* und *EcoRI* (Enden von *EcoRI* mit T4 DNA-Polymerase geglättet) ausgeschnitten. Anschließend wurde das CD80-Fragment in den Vektor pINCO über *HindIII* und *NotI* und das CD83-Fragment über *HindIII* und *NotI* (Enden von *NotI* mit T4 DNA-Polymerase geglättet) kloniert. Die erhaltenen Plasmide wurden als pINCO/CD80 und pINCO/CD83 bezeichnet.

7 Literatur

A

Allday, M. J., D. H. Crawford and B. E. Griffin (1989). Epstein-Barr virus latent gene expression during the initiation of B cell immortalization. *J Gen Virol* 70(Pt 7): 1755-64.

Altman, J.D., P.A.H. Moss, P.J.R. Goulder, D.H. Barouch, M.G. McHeyzer-Williams, J.I. Bell, A.J. McMichael and M.M. Davis (1996). Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. *Science* 274, 94.

Ardehshna, K. M., A. R. Pizzey, S. Devereux and A. Khwaja (2000). The PI3 kinase, p38 SAP kinase, and NF-kappaB signal transduction pathways are involved in the survival and maturation of lipopolysaccharide-stimulated human monocyte-derived dendritic cells. *Blood* 96(3): 1039-46.

Armitage, R.J., D.T. Ulrich, B.M. Macduff, J. Zappone, M.Z. Kubin and W.C. Fanslow (1996). Induction of membrane-associated and soluble CD83 from B, T, and dendritic cells. In Kishimoto, T., H.Kikutani, A.E.G.K. von dem Borne, S.M. Goyert, D.Y. Mason, M. Miyasaka, L. Moretta, K. Okumura, S. Shaw, T.A. Springer, K. Sugamura and H. Zola, eds, *Leukocyte Typing VI*, p. 593. Garland, New York.

Arrighi, J. F., M. Rebsamen, F. Rousset, V. Kindler and C. Hauser (2001). A critical role for p38 mitogen-activated protein kinase in the maturation of human blood-derived dendritic cells induced by lipopolysaccharide, TNF-alpha, and contact sensitizers. *J Immunol* 166(6): 3837-45.

Aruffo, A. and B. Seed (1987). Molecular cloning of a CD28 cDNA by a high-efficiency COS cell expression system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84(23): 8573-7.

Asso-Bonnet, M., J. Feuillard, V. Ferreira, P. Bissieres, N. Tarantino, M. Korner and M. Raphael (1998). Relationship between IkappaBalph constitutive expression, TNFalpha synthesis, and apoptosis in EBV-infected lymphoblastoid cells. *Oncogene* 17(12): 1607-15.

Ausubel, U.K., R. Brent, R.E. Kingston, D.D Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith and K. Struhl (1993). *Current Protocols in molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc., New York.

Azuma, M., D. Ito, H. Yagita, K. Okumura, J. H. Phillips, L. L. Lanier and C. Somoza (1993). B70 antigen is a second ligand for CTLA-4 and CD28. *Nature* 366(6450): 76-9.

B

Babcock, G. J., D. Hochberg and A. D. Thorley-Lawson (2000). The expression pattern of Epstein-Barr virus latent genes in vivo is dependent upon the differentiation stage of the infected B cell. *Immunity* 13(4): 497-506.

Babcock, G. J. and D. A. Thorley-Lawson (2000). Tonsillar memory B cells, latently infected with Epstein-Barr virus, express the restricted pattern of latent genes previously found only in Epstein-Barr virus-associated tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(22): 12250-5.

Baichwal, V. R. and B. Sugden (1988). Transformation of Balb 3T3 cells by the BNLF-1 gene of Epstein-Barr virus. *Oncogene* 2(5): 461-7.

Bajorath, J., R. J. Peach and P. S. Linsley (1994). Immunoglobulin fold characteristics of B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86). *Protein Sci* 3(11): 2148-50.

Baud, V., Z. G. Liu, B. Bennett, N. Suzuki, Y. Xia and M. Karin (1999). Signaling by proinflammatory cytokines: oligomerization of TRAF2 and TRAF6 is sufficient for JNK and IKK activation and target gene induction via an amino-terminal effector domain. *Genes Dev* 13(10): 1297-308.

- Ben-Bassat, H., A. Polliack, S. Mitrani-Rosenbaum, F. Reichert, M. Froimovici and N. Goldblum** (1977). A comparative study of human cell lines derived from patients with lymphoma, leukemia and infectious mononucleosis: membrane properties, ultrastructure, and surface morphology. *Cancer* 40(4): 1481-91.
- Berchtold, S., P. Muhl-Zurbes, E. Maczek, A. Golka, G. Schuler and A. Steinkasserer** (2002). Cloning and characterization of the promoter region of the human CD83 gene. *Immunobiol* 205, 231-246
- Berchtold, S., P. Muhl-Zurbes, C. Heufler, P. Winklehner, G. Schuler and A. Steinkasserer** (1999b). Cloning, recombinant expression and biochemical characterization of the murine CD83 molecule which is specifically upregulated during dendritic cell maturation. *FEBS Lett* 461(3): 211-6.
- Berchtold, S., T. Jones, P. Muhl-Zurbes, D. Sheer, G. Schuler and A. Steinkasserer** (1999a). The human dendritic cell marker CD83 maps to chromosome 6p23. *Ann Hum Genet* 63(Pt 2): 181-3.
- Bertin, J., S.M. Mendrysa, D.J. LaCount, J.F. Krebs, R.C. Armstrong, K.J. Tomaselli and P.D. Friesen** (1996). *J. Virol.* 70, 6251-6259.
- Bornkamm, G. W. and W. Hammerschmidt** (2001). Molecular virology of Epstein-Barr virus. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 356(1408): 437-59.
- Bornkamm, G. W., J. Hudewentz, U. K. Freese and U. Zimmer** (1982). Deletion of the nontransforming Epstein-Barr virus strain P3HR-1 causes fusion of the large internal repeat to the DSL region. *J Virol* 43(3): 952-68.
- Brielmeier, M., J. Mautner, G. Laux and W. Hammerschmidt** (1996). The latent membrane protein 2 gene of Epstein-Barr virus is important for efficient B cell immortalization. *J Gen Virol* 77(Pt 11): 2807-18.
- Brodeur, S. R., G. Cheng, D. Baltimore and D. A. Thorley-Lawson** (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(32): 19777-84.
- Brooks, L., Q. Y. Yao, A. B. Rickinson and L. S. Young** (1992). Epstein-Barr virus latent gene transcription in nasopharyngeal carcinoma cells: coexpression of EBNA1, LMP1, and LMP2 transcripts. *J Virol* 66(5): 2689-97.
- Brunet, J. F., F. Denizot, M. F. Luciani, M. Roux-Dosseto, M. Suzan, M. G. Mattei and P. Golstein** (1987). A new member of the immunoglobulin superfamily-CTLA-4. *Nature* 328(6127): 267-70.
- Bump, N.J., M.Hackett, M. Hugunin, S. Seshagiri, K. Brady, P. Chen, C. Ferez, S. Franklin, T. Ghayur, P. Li, J. Mancovich, L. Shi, A.H. Greenberg, L.K. Miller and W.W. Wong** (1995). *Science* 269, 1885-1888.

C

- Cahir-McFarland, E. D., D. M. Davidson, S. L. Schauer, J. Duong and E. Kieff** (2000). NF-kappa B inhibition causes spontaneous apoptosis in Epstein-Barr virus-transformed lymphoblastoid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(11): 6055-60.
- Callan, M. F., N. Steven, P. Krausa, J. D. Wilson, P. A. Moss, G. M. Gillespie, J. I. Bell, A. B. Rickinson and A. J. McMichael** (1996). Large clonal expansions of CD8+ T cells in acute infectious mononucleosis. *Nat Med* 2(8): 906-11.
- Callan, M. F., L. Tan, N. Annels, G. S. Ogg, J. D. Wilson, C. A. O'Callaghan, N. Steven, A. J. McMichael and A. B. Rickinson** (1998). Direct visualization of antigen-specific CD8+ T cells during the primary immune response to Epstein-Barr virus In vivo. *J Exp Med* 187(9): 1395-402.
- Calender, A., M. Billaud, J. P. Aubry, J. Banchereau, M. Vuillaume and G. M. Lenoir** (1987). Epstein-Barr virus (EBV) induces expression of B-cell activation markers on in vitro infection of EBV-negative B-lymphoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84(22): 8060-4.
- Carbone, A., G. Gaidano, A. Gloghini, L. M. Larocca, D. Capello, V. Canzonieri, A. Antinori, U. Tirelli, B. Falini and R. Dalla-Favera** (1998). Differential expression of BCL-6, CD138/syndecan-1, and Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein-1 identifies distinct histogenetic subsets of acquired immunodeficiency syndrome-related non-Hodgkin's lymphomas. *Blood* 91(3): 747-55.

Carel, J. C., B. L. Myones, B. Frazier and V. M. Holers (1990). Structural requirements for C3d,g/Epstein-Barr virus receptor (CR2/CD21) ligand binding, internalization, and viral infection. *J Biol Chem* 265(21): 12293-9.

Caux, C., C. Massacrier, B. Vanbervliet, B. Dubois, C. Van Kooten, I. Durand and J. Banchereau (1994). Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking. *J Exp Med* 180(4): 1263-72.

Chambers, C. A. and J. P. Allison (1999). Costimulatory regulation of T cell function. *Curr Opin Cell Biol* 11(2): 203-10.

Clausse, B., K. Fizazi, V. Walczak, C. Tetaud, J. Wiels, T. Tursz and P. Busson (1997). High concentration of the EBV latent membrane protein 1 in glycosphingolipid-rich complexes from both epithelial and lymphoid cells. *Virology* 228(2): 285-93.

Clem, R.J., M. Fechheimer and L.K. Miller (1991). *Science* 254, 1388-1390.

Cohen, J. I., F. Wang, J. Mannick and E. Kieff (1989). Epstein-Barr virus nuclear protein 2 is a key determinant of lymphocyte transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(23): 9558-62.

Cramer, S. O., C. Trumpheller, U. Mehlhoop, S. More, B. Fleischer and A. von Bonin (2000). Activation-induced expression of murine CD83 on T cells and identification of a specific CD83 ligand on murine B cells. *Int Immunol* 12(9): 1347-51.

Cuomo, L., P. Trivedi, F. Wang, G. Winberg, G. Klein and M. G. Masucci (1990). Expression of the Epstein-Barr virus (EBV)-encoded membrane antigen (LMP) increases the stimulatory capacity of EBV-negative B lymphoma lines in allogeneic mixed lymphocyte cultures. *Eur J Immunol* 20(10): 2293-9.

D

de Campos-Lima, P. O., S. Torsteinsdottir, L. Cuomo, G. Klein, D. Sulitzeanu and M. G. Masucci (1993). Antigen processing and presentation by EBV-carrying cell lines: cell-phenotype dependence and influence of the EBV-encoded LMP1. *Int J Cancer* 53(5): 856-62.

Delecluse, H. J., S. Bartnizke, W. Hammerschmidt, J. Bullerdiek and G. W. Bornkamm (1993). Episomal and integrated copies of Epstein-Barr virus coexist in Burkitt lymphoma cell lines. *J Virol* 67(3): 1292-9.

Devergne, O., E. D. Cahir McFarland, G. Mosialos, K. M. Izumi, C. F. Ware and E. Kieff (1998). Role of the TRAF binding site and NF-kappaB activation in Epstein-Barr virus latent membrane protein 1-induced cell gene expression. *J Virol* 72(10): 7900-8.

Devergne, O., E. Hatzivassiliou, K. M. Izumi, K. M. Kaye, M. F. Kleijnen, E. Kieff and G. Mosialos (1996). Association of TRAF1, TRAF2, and TRAF3 with an Epstein-Barr virus LMP1 domain important for B-lymphocyte transformation: role in NF-kappaB activation. *Mol Cell Biol* 16(12): 7098-108.

D'Souza, B., M. Rowe and D. Walls (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(14): 6652-8.

Dunbar, P.R., G.S. Ogg, J. Chen, N. Rust, P. van der Bruggen, V. Cerundolo (1998). Direct isolation, phenotyping and cloning of low-frequency antigen-specific cytotoxic T lymphocytes from peripheral blood. *Curr. Biol.* 8, 413

E

Eliopoulos, A. G., N. J. Gallagher, S. M. Blake, C. W. Dawson and L. S. Young (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(23): 16085-96.

Eliopoulos, A. G. and L. S. Young (1998). Activation of the cJun N-terminal kinase (JNK) pathway by the Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1 (LMP1). *Oncogene* 16(13): 1731-42.

Epstein, M. A., Y. M. Barr and B. G. Achong (1965). Studies with Burkitt's lymphoma. Wistar Inst Symp Monogr 4: 69-82.

Ernberg, I., K. Falk and M. Hansson (1987). Progenitor and pre-B lymphocytes transformed by Epstein-Barr virus. Int J Cancer 39(2): 190-7.

F

Farrell, P. J. (2001). Epstein-Barr virus. The B95-8 strain map. Methods Mol Biol 174: 3-12.

Fennewald, S., V. van Santen and E. Kieff (1984). Nucleotide sequence of an mRNA transcribed in latent growth-transforming virus infection indicates that it may encode a membrane protein. J Virol 51(2): 411-9.

Feuillard, J., M. Schuhmacher, S. Kohanna, M. Asso-Bonnet, F. Ledeur, R. Joubert-Caron, P. Bissieres, A. Polack, G. W. Bornkamm and M. Raphael (2000). Inducible loss of NF-kappaB activity is associated with apoptosis and Bcl-2 down-regulation in Epstein-Barr virus-transformed B lymphocytes. Blood 95(6): 2068-75.

Floettmann, J. E. and M. Rowe (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(15): 1851-8.

Floettmann, J. E., K. Ward, A. B. Rickinson and M. Rowe (1996). Cytostatic effect of Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 analyzed using tetracycline-regulated expression in B cell lines. Virology 223(1): 29-40.

Freeman, G. J., J. G. Gribben, V. A. Boussiotis, J. W. Ng, V. A. Restivo, Jr., L. A. Lombard, G. S. Gray and L. M. Nadler (1993). Cloning of B7-2: a CTLA-4 counter-receptor that costimulates human T cell proliferation. Science 262(5135): 909-11.

Freeman, G. J., A. S. Freedman, J. M. Segil, G. Lee, J. F. Whitman and L. M. Nadler (1989). B7, a new member of the Ig superfamily with unique expression on activated and neoplastic B cells. J Immunol 143(8): 2714-22.

Fuentes-Panana, E. M., R. Peng, G. Brewer, J. Tan and P. D. Ling (2000). Regulation of the Epstein-Barr virus C promoter by AUF1 and the cyclic AMP/protein kinase A signaling pathway. J Virol 74(17): 8166-75.

G

Gahn, T. A. and B. Sugden (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(11): 6379-86.

Gallimore, A., A. Glithero, A. Godkin, A.C. Tissot, A. Plückthun, T. Elliott, H. Hengartner, R. Zinkernagel (1998). Induction and exhaustion of lymphocytic choriomeningitis virus-specific cytotoxic T lymphocytes visualized using soluble tetrameric major histocompatibility complex class I-peptide complexes. J. Exp. Med. 187, 1383.

Gires, O., F. Kohlhuber, E. Kilger, M. Baumann, A. Kieser, C. Kaiser, R. Zeidler, B. Scheffer, M. Ueffing and W. Hammerschmidt (1999). Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus interacts with JAK3 and activates STAT proteins. Embo J 18(11): 3064-73.

Gires, O., U. Zimmer-Strobl, R. Gonnella, M. Ueffing, G. Marschall, R. Zeidler, D. Pich and W. Hammerschmidt (1997). Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus mimics a constitutively active receptor molecule. Embo J 16(20): 6131-40.

Glaser, S. L., R. J. Lin, S. L. Stewart, R. F. Ambinder, R. F. Jarrett, P. Brousset, G. Pallesen, M. L. Gulley, G. Khan, J. O'Grady, M. Hummel, M. V. Preciado, H. Knecht, J. K. Chan and A. Claviez (1997). Epstein-Barr virus-associated Hodgkin's disease: epidemiologic characteristics in international data. Int J Cancer 70(4): 375-82.

Gluzman, Y. (1981). SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. Cell 23(1): 175-82.

Gossen, M. and H. Bujard (1992). Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. Proc Natl Acad Sci U S A 89(12): 5547-51.

Graham, F. L., J. Smiley, W. C. Russell and R. Nairn (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. J Gen Virol 36(1): 59-74.

Grasser, F. A., P. Haiss, S. Gottel and N. Mueller-Lantzsch (1991). Biochemical characterization of Epstein-Barr virus nuclear antigen 2A. J Virol 65(7): 3779-88.

Grossman, S. R., E. Johannsen, X. Tong, R. Yalamanchili and E. Kieff (1994). The Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 transactivator is directed to response elements by the J kappa recombination signal binding protein. Proc Natl Acad Sci U S A 91(16): 7568-72.

Gulley, M. L. (2001). Molecular diagnosis of Epstein-Barr virus-related diseases. J Mol Diagn 3(1): 1-10.

Guo, Y., Y. Wu, M. Zhao, X. P. Kong and Y. Liu (1995). Mutational analysis and an alternatively spliced product of B7 defines its CD28/CTLA4-binding site on immunoglobulin C-like domain. J Exp Med 181(4): 1345-55.

H

Halaby, D. M. and J. P. Mornon (1998). The immunoglobulin superfamily: an insight on its tissular, species, and functional diversity. J Mol Evol 46(4): 389-400.

Hammarskjold, M. L. and M. C. Simurda (1992). Epstein-Barr virus latent membrane protein transactivates the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat through induction of NF-kappa B activity. J Virol 66(11): 6496-501.

Hammerschmidt, W. and B. Sugden (1989). Genetic analysis of immortalizing functions of Epstein-Barr virus in human B lymphocytes. Nature 340(6232): 393-7.

Hammerschmidt, W., B. Sugden and V. R. Baichwal (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(6): 2469-75.

Haskill, S., A. A. Beg, S. M. Tompkins, J. S. Morris, A. D. Yurochko, A. Sampson-Johannes, K. Mondal, P. Ralph and A. S. Baldwin, Jr. (1991). Characterization of an immediate-early gene induced in adherent monocytes that encodes I kappa B-like activity. Cell 65(7): 1281-9.

Hatzivassiliou, E., W. E. Miller, N. Raab-Traub, E. Kieff and G. Mosialos (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(3): 1116-21.

Henderson, S., M. Rowe, C. Gregory, D. Croom-Carter, F. Wang, R. Longnecker, E. Kieff and A. Rickinson (1991). Induction of bcl-2 expression by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 protects infected B cells from programmed cell death. Cell 65(7): 1107-15.

Henderson, A., S. Ripley, M. Heller and E. Kieff (1983). Chromosome site for Epstein-Barr virus DNA in a Burkitt tumor cell line and in lymphocytes growth-transformed in vitro. Proc Natl Acad Sci U S A 80(7): 1987-91.

Henkel, T., P. D. Ling, S. D. Hayward and M. G. Peterson (1994). Mediation of Epstein-Barr virus EBNA2 transactivation by recombination signal-binding protein J kappa. Science 265(5168): 92-5.

Henkel, T., U. Zabel, K. van Zee, J. M. Muller, E. Fanning and P. A. Baeuerle (1992). Intramolecular masking of the nuclear location signal and dimerization domain in the precursor for the p50 NF-kappa B subunit. Cell 68(6): 1121-33.

Henle, G., W. Henle and V. Diehl (1968). Relation of Burkitt's tumor-associated herpes-type virus to infectious mononucleosis. Proc Natl Acad Sci U S A 59:94-101

- Henle, W., V. Diehl, G. Kohn, H. Zur Hausen and G. Henle** (1967). Herpes-type virus and chromosome marker in normal leukocytes after growth with irradiated Burkitt cells. Science 157(792): 1064-5.
- Hennessy, K., S. Fennewald, M. Hummel, T. Cole and E. Kieff** (1984). A membrane protein encoded by Epstein-Barr virus in latent growth-transforming infection. Proc Natl Acad Sci U S A 81(22): 7207-11.
- Hennessy, K. and E. Kieff** (1983). One of two Epstein-Barr virus nuclear antigens contains a glycine-alanine copolymer domain. Proc Natl Acad Sci U S A 80(18): 5665-9.
- Hennet, T., D. Chui, J.C. Paulson and J.D. Marth** (1998). Immune regulation by the ST6Gal sialyltransferase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 95:4504-4509.
- Henriksson, M., and B. Lüscher** (1996). Proteins of the Myc network: essential regulators of cell growth and differentiation. Adv. Canc. Res., 68, 109-182.
- Hinuma, Y., M. Konn, J. Yamaguchi, D.J. Wudarski, J.R. Blakeslee, Jr and J.T. Grace** (1967). Immunofluorescence and herpes-type virus particles in the P3HR-1 Burkitt lymphoma cell line. J. Virol. 1: 1045-1051
- Hock, B. D., M. Kato, J. L. McKenzie and D. N. Hart** (2001). A soluble form of CD83 is released from activated dendritic cells and B lymphocytes, and is detectable in normal human sera. Int Immunol 13(7): 959-67.
- Hofelmayr, H., L. J. Strobl, G. Marschall, G. W. Bornkamm and U. Zimmer-Strobl** (2001). Activated Notch1 can transiently substitute for EBNA2 in the maintenance of proliferation of LMP1-expressing immortalized B cells. J Virol 75(5): 2033-40.
- Hsieh, J. J., T. Henkel, P. Salmon, E. Robey, M. G. Peterson and S. D. Hayward** (1996). Truncated mammalian Notch1 activates CBF1/RBPJk-repressed genes by a mechanism resembling that of Epstein-Barr virus EBNA2. Mol Cell Biol 16(3): 952-9.
- Hsu, H., H. B. Shu, M. G. Pan and D. V. Goeddel** (1996). TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways. Cell 84(2): 299-308.
- Huen, D. S., S. A. Henderson, D. Croom-Carter and M. Rowe** (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(3): 549-60.
- Hurley, E. A. and D. A. Thorley-Lawson** (1988). B cell activation and the establishment of Epstein-Barr virus latency. J Exp Med 168(6): 2059-75.
- I**
- Iking-Konert, C., C. Cseko, C. Wagner, S. Stegmaier, K. Andrassy and G. M. Hansch** (2001). Transdifferentiation of polymorphonuclear neutrophils: acquisition of CD83 and other functional characteristics of dendritic cells. J Mol Med 79(8): 464-74.
- Imai, S., S. Koizumi, M. Sugiura, M. Tokunaga, Y. Uemura, N. Yamamoto, S. Tanaka, E. Sato and T. Osato** (1994). Gastric carcinoma: monoclonal epithelial malignant cells expressing Epstein-Barr virus latent infection protein. Proc Natl Acad Sci U S A 91(19): 9131-5.
- Inobe, M., N. Aoki, P. S. Linsley, J. A. Ledbetter, R. Abe, M. Murakami and T. Uede** (1996). The role of the B7-1a molecule, an alternatively spliced form of murine B7-1 (CD80), on T cell activation. J Immunol 157(2): 582-8.
- Inobe, M., P. S. Linsley, J. A. Ledbetter, Y. Nagai, M. Tamakoshi and T. Uede** (1994). Identification of an alternatively spliced form of the murine homologue of B7. Biochem Biophys Res Commun 200(1): 443-9.
- Izumi, K. M., E. D. Cahir McFarland, E. A. Riley, D. Rizzo, Y. Chen and E. Kieff** (1999). The residues between the two transformation effector sites of Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 are not critical for B-lymphocyte growth transformation. J Virol 73(12): 9908-16.

Izumi, K. M. and E. D. Kieff (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(23): 12592-7.

J

Janz, A., M. Oezel, C. Kurzeder, J. Mautner, D. Pich, M. Kost, W. Hammerschmidt and H. J. Delecluse (2000). Infectious Epstein-Barr virus lacking major glycoprotein BLLF1 (gp350/220) demonstrates the existence of additional viral ligands. J Virol 74(21): 10142-52.

Jassal, R., N. Jenkins, J. Charlwood, P. Camilleri, R. Jefferis and J. Lund (2001). Sialylation of human IgG-Fc carbohydrate by transfected rat alpha2,6-sialyltransferase. Biochem Biophys Res Commun 286(2): 243-9.

Jeannin, P., G. Magistrelli, J. P. Aubry, G. Caron, J. F. Gauchat, T. Renno, N. Herbault, L. Goetsch, A. Blaecke, P. Y. Dietrich, J. Y. Bonnefoy and Y. Delneste (2000). Soluble CD86 is a costimulatory molecule for human T lymphocytes. Immunity 13(3): 303-12.

K

Kaiser, C., O. von Stein, G. Laux and M. Hoffmann (1999b). Functional genomics in cancer research: identification of target genes of the Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 by subtractive cDNA cloning and high-throughput differential screening using high-density agarose gels. Electrophoresis 20(2): 261-8.

Kaiser, C., G. Laux, D. Eick, N. Jochner, G. W. Bornkamm and B. Kempkes (1999a). The proto-oncogene c-myc is a direct target gene of Epstein-Barr virus nuclear antigen 2. J Virol 73(5): 4481-4.

Karin, M. (1999). How NF-kappaB is activated: the role of the IkappaB kinase (IKK) complex. Oncogene 18(49): 6867-74.

Kaye, K. M., O. Devergne, J. N. Harada, K. M. Izumi, R. Yalamanchili, E. Kieff and G. Mosialos (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(20): 11085-90.

Kaye, K. M., K. M. Izumi and E. Kieff (1993). Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 is essential for B-lymphocyte growth transformation. Proc Natl Acad Sci U S A 90(19): 9150-4.

Kempkes, B., U. Zimmer-Strobl, G. Eissner, M. Pawlita, M. Falk, W. Hammerschmidt and G.W. Bornkamm (1996). Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 (EBNA2)-estrogen receptor fusion proteins complement the EBNA2-deficient Epstein-Barr virus strain P3HR1 in transformation of primary B cells but suppress growth of human B cell lymphoma lines. J. Gen. Virol. 77 :227-237

Kempkes, B., D. Spitkovsky, P. Jansen-Durr, J. W. Ellwart, E. Kremmer, H. J. Delecluse, C. Rottenberger, G. W. Bornkamm and W. Hammerschmidt (1995b). B-cell proliferation and induction of early G1-regulating proteins by Epstein-Barr virus mutants conditional for EBNA2. Embo J 14(1): 88-96.

Kempkes, B., M. Pawlita, U. Zimmer-Strobl, G. Eissner, G. Laux and G. W. Bornkamm (1995a). Epstein-Barr virus nuclear antigen 2-estrogen receptor fusion proteins transactivate viral and cellular genes and interact with RBP-J kappa in a conditional fashion. Virology 214(2): 675-9.

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

Kieser, A., C. Kaiser and W. Hammerschmidt (1999). LMP1 signal transduction differs substantially from TNF receptor 1 signaling in the molecular functions of TRADD and TRAF2. Embo J 18(9): 2511-21.

Kieser, A., E. Kilger, O. Gires, M. Ueffing, W. Kolch and W. Hammerschmidt (1997). Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 triggers AP-1 activity via the c-Jun N-terminal kinase cascade. Embo J 16(21): 6478-85.

- Kilger, E., A. Kieser, M. Baumann and W. Hammerschmidt** (1998). Epstein-Barr virus-mediated B-cell proliferation is dependent upon latent membrane protein 1, which simulates an activated CD40 receptor. Embo J 17(6): 1700-9.
- Kim, O. J. and J. L. Yates** (1993). Mutants of Epstein-Barr virus with a selective marker disrupting the TP gene transform B cells and replicate normally in culture. J Virol 67(12): 7634-40.
- Klein, G.** (1989). Viral latency and transformation: the strategy of Epstein-Barr virus. Cell 58(1): 5-8.
- Koulova, L., E. A. Clark, G. Shu and B. Dupont** (1991). The CD28 ligand B7/BB1 provides costimulatory signal for alloactivation of CD4+ T cells. J Exp Med 173(3): 759-62.
- Kozlow, E. J., G. L. Wilson, C. H. Fox and J. H. Kehrl** (1993). Subtractive cDNA cloning of a novel member of the Ig gene superfamily expressed at high levels in activated B lymphocytes. Blood 81(2): 454-61.
- Kruse, M., O. Rosorius, F. Kratzer, D. Bevec, C. Kuhnt, A. Steinkasserer, G. Schuler and J. Hauber** (2000). Inhibition of CD83 cell surface expression during dendritic cell maturation by interference with nuclear export of CD83 mRNA. J Exp Med 191(9): 1581-90.
- Kruse, M., O. Rosorius, F. Kratzer, G. Stelz, C. Kuhnt, G. Schuler, J. Hauber and A. Steinkasserer** (2000). Mature dendritic cells infected with herpes simplex virus type 1 exhibit inhibited T-cell stimulatory capacity. J Virol 74(15): 7127-36.
- Kulwichit, W., R. H. Edwards, E. M. Davenport, J. F. Baskar, V. Godfrey and N. Raab-Traub** (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(20): 11963-8.
- Kurth, J., T. Spieker, J. Wustrow, G. J. Strickler, L. M. Hansmann, K. Rajewsky and R. Kuppers** (2000). EBV-infected B cells in infectious mononucleosis: viral strategies for spreading in the B cell compartment and establishing latency. Immunity 13(4): 485-95.
- L**
- Laherty, C. D., H. M. Hu, A. W. Opipari, F. Wang and V. M. Dixit** (1992). The Epstein-Barr virus LMP1 gene product induces A20 zinc finger protein expression by activating nuclear factor kappa B. J Biol Chem 267(34): 24157-60.
- Laux, G., B. Adam, L. J. Strobl and F. Moreau-Gachelin** (1994). The Spi-1/PU.1 and Spi-B ets family transcription factors and the recombination signal binding protein RBP-J kappa interact with an Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 responsive cis-element. Embo J 13(23): 5624-32.
- Laux, G., A. Economou and P. J. Farrell** (1989). The terminal protein gene 2 of Epstein-Barr virus is transcribed from a bidirectional latent promoter region. J Gen Virol 70(Pt 11): 3079-84.
- Laux, G., M. Perricaudet and P. J. Farrell** (1988). A spliced Epstein-Barr virus gene expressed in immortalized lymphocytes is created by circularization of the linear viral genome. Embo J 7(3): 769-74.
- Lawrence, J. B., C. A. Villave and R. H. Singer** (1988). Sensitive, high-resolution chromatin and chromosome mapping in situ: presence and orientation of two closely integrated copies of EBV in a lymphoma line. Cell 52(1): 51-61.
- Lechmann, M., D. J. Krooshoop, D. Dudziak, E. Kremmer, C. Kuhnt, C. G. Figdor, G. Schuler and A. Steinkasserer** (2001). The extracellular domain of CD83 inhibits dendritic cell-mediated T cell stimulation and binds to a ligand on dendritic cells. J Exp Med 194(12): 1813-21.
- Lee, K. P., C. Taylor, B. Petryniak, L. A. Turka, C. H. June and C. B. Thompson** (1990). The genomic organization of the CD28 gene. Implications for the regulation of CD28 mRNA expression and heterogeneity. J Immunol 145(1): 344-52.
- Lenoir, G. M., M. Vuillaume and C. Bonnardel** (1985). The use of lymphomatous and lymphoblastoid cell lines in the study of Burkitt's lymphoma. IARC Sci Publ(60): 309-18.

Leukocyte Typing VI, (1996). Kishimoto, T., H.Kikutani, A.E.G.K. von dem Borne, S.M. Goyert, D.Y. Mason, M. Miyasaka, L. Moretta, K. Okumura, S. Shaw, T.A. Springer, K. Sugamura and H. Zola, eds, p. 593. Garland, New York.

Levitskaya, J., M. Coram, V. Levitsky, S. Imreh, P. M. Steigerwald-Mullen, G. Klein, M. G. Kurilla and M. G. Masucci (1995). Inhibition of antigen processing by the internal repeat region of the Epstein-Barr virus nuclear antigen-1. *Nature* 375(6533): 685-8.

Liebowitz, D., R. Kopan, E. Fuchs, J. Sample and E. Kieff (1987). An Epstein-Barr virus transforming protein associates with vimentin in lymphocytes. *Mol Cell Biol* 7(7): 2299-308.

Liebowitz, D., D. Wang and E. Kieff (1986). Orientation and patching of the latent infection membrane protein encoded by Epstein-Barr virus. *J Virol* 58(1): 233-7.

Linsley, P. S., J. Ledbetter, R. Peach and J. Bajorath (1995). CD28/CTLA-4 receptor structure, binding stoichiometry and aggregation during T-cell activation. *Res Immunol* 14

Linsley, P. S., J. L. Greene, W. Brady, J. Bajorath, J. A. Ledbetter and R. Peach (1994). Human B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) bind with similar avidities but distinct kinetics to CD28 and CTLA-4 receptors. *Immunity* 1(9): 793-801.

Linsley, P. S., R. Peach, P. Gladstone and J. Bajorath (1994). Extending the B7 (CD80) gene family. *Protein Sci* 3(8): 1341-3.
6(3): 130-40.

Linsley, P. S., P. M. Wallace, J. Johnson, M. G. Gibson, J. L. Greene, J. A. Ledbetter, C. Singh and M. A. Tepper (1992). Immunosuppression in vivo by a soluble form of the CTLA-4 T cell activation molecule. *Science* 257(5071): 792-5.

Littman, D. R. and S. N. Gettner (1987). Unusual intron in the immunoglobulin domain of the newly isolated murine CD4 (L3T4) gene. *Nature* 325(6103): 453-5.

Longnecker, R., C. L. Miller, X. Q. Miao, B. Tomkinson and E. Kieff (1993b). The last seven transmembrane and carboxy-terminal cytoplasmic domains of Epstein-Barr virus latent membrane protein 2 (LMP2) are dispensable for lymphocyte infection and growth transformation in vitro. *J Virol* 67(4): 2006-13.

Longnecker, R., C. L. Miller, B. Tomkinson, X. Q. Miao and E. Kieff (1993a). Deletion of DNA encoding the first five transmembrane domains of Epstein-Barr virus latent membrane proteins 2A and 2B. *J Virol* 67(8): 5068-74.

Lyakh, L. A., G. K. Koski, W. Telford, R. E. Gress, P. A. Cohen and N. R. Rice (2000). Bacterial lipopolysaccharide, TNF-alpha, and calcium ionophore under serum-free conditions promote rapid dendritic cell-like differentiation in CD14+ monocytes through distinct pathways that activate NK-kappa B. *J Immunol* 165(7): 3647-55.

M

Magistrelli, G., G. Caron, J. F. Gauchat, P. Jeannin, J. Y. Bonnefoy and Y. Delneste (2001). Identification of an alternatively spliced variant of human CD86 mRNA. *Biochem Biophys Res Commun* 280(5): 1211-5.

Magistrelli, G., P. Jeannin, G. Elson, J. F. Gauchat, T. N. Nguyen, J. Y. Bonnefoy and Y. Delneste (1999). Identification of three alternatively spliced variants of human CD28 mRNA. *Biochem Biophys Res Commun* 259(1): 34-7.

Magistrelli, G., P. Jeannin, N. Herbault, A. Benoit De Coignac, J. F. Gauchat, J. Y. Bonnefoy and Y. Delneste (1999). A soluble form of CTLA-4 generated by alternative splicing is expressed by nonstimulated human T cells. *Eur J Immunol* 29(11): 3596-602.

Maniatis, T., E.F. Fritsch and J. Sambrook (1989). Molecular cloning. A laboratory manual (New York: Cold Spring Harbour Press).

- Mann, K. P. and D. Thorley-Lawson** (1987). Posttranslational processing of the Epstein-Barr virus-encoded p63/LMP protein. *J Virol* 61(7): 2100-8.
- Mannick, J. B., J. I. Cohen, M. Birkenbach, A. Marchini and E. Kieff** (1991). The Epstein-Barr virus nuclear protein encoded by the leader of the EBNA RNAs is important in B-lymphocyte transformation. *J Virol* 65(12): 6826-37.
- Martin, J. and B. Sugden** (1991). Transformation by the oncogenic latent membrane protein correlates with its rapid turnover, membrane localization, and cytoskeletal association. *J Virol* 65(6): 3246-58.
- Marschalek, R., J. Greil, K. Lochner, I. Nilson, G. Siegler, I. Zweckbronner, J. D. Beck and G. H. Fey** (1995). Molecular analysis of the chromosomal breakpoint and fusion transcripts in the acute lymphoblastic SEM cell line with chromosomal translocation t(4;11). *Br J Haematol* 90(2): 308-20.
- Matsuo, T., M. Heller, L. Petti, E. O'Shiro and E. Kieff** (1984). Persistence of the entire Epstein-Barr virus genome integrated into human lymphocyte DNA. *Science* 226(4680): 1322-5.
- McKinsey, T. A., Z. Chu, T. F. Tedder and D. W. Ballard** (2000). Transcription factor NF-kappaB regulates inducible CD83 gene expression in activated T lymphocytes. *Mol Immunol* 37(12-13): 783-8.
- Miller, W. E., G. Mosialos, E. Kieff and N. Raab-Traub** (1997). Epstein-Barr virus LMP1 induction of the epidermal growth factor receptor is mediated through a TRAF signaling pathway distinct from NF-kappaB activation. *J Virol* 71(1): 586-94.
- Miller, W. E., H. S. Earp and N. Raab-Traub** (1995). The Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 induces expression of the epidermal growth factor receptor. *J Virol* 69(7): 4390-8.
- Miller, N. and L. M. Hutt-Fletcher** (1988). A monoclonal antibody to glycoprotein gp85 inhibits fusion but not attachment of Epstein-Barr virus. *J Virol* 62(7): 2366-72.
- Miller, G., J. Robinson, L. Heston and M. Lipman** (1974). Differences between laboratory strains of Epstein-Barr virus based on immortalization, abortive infection, and interference. *Proc Natl Acad Sci U S A* 71(10): 4006-10.
- Miller, G. and M. Lipman** (1973). Release of infectious Epstein-Barr virus by transformed marmoset leukocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 70(1): 190-4.
- Minarovits, J., L. F. Hu, S. Imai, Y. Harabuchi, A. Kataura, S. Minarovits-Kormuta, T. Osato and G. Klein** (1994). Clonality, expression and methylation patterns of the Epstein-Barr virus genomes in lethal midline granulomas classified as peripheral angiocentric T cell lymphomas. *J Gen Virol* 75(Pt 1): 77-84.
- Mitchell, T. and B. Sugden** (1995). Stimulation of NF-kappa B-mediated transcription by mutant derivatives of the latent membrane protein of Epstein-Barr virus. *J Virol* 69(5): 2968-76.
- Miyashita, E. M., B. Yang, G. J. Babcock and D. A. Thorley-Lawson** (1997). Identification of the site of Epstein-Barr virus persistence in vivo as a resting B cell. *J Virol* 71(7): 4882-91.
- Miyashita, E. M., B. Yang, K. M. Lam, D. H. Crawford and D. A. Thorley-Lawson** (1995). A novel form of Epstein-Barr virus latency in normal B cells in vivo. *Cell* 80(4): 593-601.
- Moorthy, R. K. and D. A. Thorley-Lawson** (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(3): 1638-46.
- Mosialos, G.** (2001). Cytokine signaling and Epstein-Barr virus-mediated cell transformation. *Cytokine Growth Factor Rev* 12(2-3): 259-70.
- Mosialos, G., M. Birkenbach, R. Yalamanchili, T. VanArsdale, C. Ware and E. Kieff** (1995). The Epstein-Barr virus transforming protein LMP1 engages signaling proteins for the tumor necrosis factor receptor family. *Cell* 80(3): 389-99.
- Mosmann, T.** (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immun. Methods* 65, 55-63.

N

Nemerow, G. R., C. Mold, V. K. Schwend, V. Tollefson and N. R. Cooper (1987). Identification of gp350 as the viral glycoprotein mediating attachment of Epstein-Barr virus (EBV) to the EBV/C3d receptor of B cells: sequence homology of gp350 and C3 complement fragment C3d. *J Virol* 61(5): 1416-20.

Nemerow, G. R. and N. R. Cooper (1984). Early events in the infection of human B lymphocytes by Epstein-Barr virus: the internalization process. *Virology* 132(1): 186-98.

O

Oaks, M. K., K. M. Hallett, R. T. Penwell, E. C. Stauber, S. J. Warren and A. J. Tector (2000). A native soluble form of CTLA-4. *Cell Immunol* 201(2): 144-53.

Oosterwegel, M. A., R. J. Greenwald, D. A. Mandelbrot, R. B. Lorschach and A. H. Sharpe (1999). CTLA-4 and T cell activation. *Curr Opin Immunol* 11(3): 294-300.

Oehler, L., O. Majdic, W. F. Pickl, J. Stockl, E. Riedl, J. Drach, K. Rappersberger, K. Geissler and W. Knapp (1998). Neutrophil granulocyte-committed cells can be driven to acquire dendritic cell characteristics. *J Exp Med* 187(7): 1019-28.

Owens, G. C., G. M. Edelman and B. A. Cunningham (1987). Organization of the neural cell adhesion molecule (N-CAM) gene: alternative exon usage as the basis for different membrane-associated domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84(1): 294-8.

P

Pajic, A., D. Spitkovsky, B. Christoph, B. Kempkes, M. Schuhmacher, M. S. Staeger, M. Brielmeier, J. Ellwart, F. Kohlhuber, G. W. Bornkamm, A. Polack and D. Eick (2000). Cell cycle activation by c-myc in a burkitt lymphoma model cell line. *Int J Cancer* 87(6): 787-93.

Pajic, A., M. S. Staeger, D. Dudziak, M. Schuhmacher, D. Spitkovsky, G. Eissner, M. Brielmeier, A. Polack and G. W. Bornkamm (2001). Antagonistic effects of c-myc and Epstein-Barr virus latent genes on the phenotype of human B cells. *Int J Cancer* 93(6): 810-6.

Palucka, K. A., N. Taquet, F. Sanchez-Chapuis and J. C. Gluckman (1998). Dendritic cells as the terminal stage of monocyte differentiation. *J Immunol* 160(9): 4587-95.

Peng, M. and E. Lundgren (1992). Transient expression of the Epstein-Barr virus LMP1 gene in human primary B cells induces cellular activation and DNA synthesis. *Oncogene* 7(9): 1775-82.

Petti, L. and E. Kieff (1988). A sixth Epstein-Barr virus nuclear protein (EBNA3B) is expressed in latently infected growth-transformed lymphocytes. *J Virol* 62(6): 2173-8.

Polack, A., K. Hortnagel, A. Pajic, B. Christoph, B. Baier, M. Falk, J. Mautner, C. Geltinger, G. W. Bornkamm and B. Kempkes (1996). c-myc activation renders proliferation of Epstein-Barr virus (EBV)-transformed cells independent of EBV nuclear antigen 2 and latent membrane protein 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(19): 10411-6.

Puglielli, M. T., N. Desai and S. H. Speck (1997). Regulation of EBNA gene transcription in lymphoblastoid cell lines: characterization of sequences downstream of BCR2 (Cp). *J Virol* 71(1): 120-8.

Puglielli, M. T., M. Woisetschlaeger and S. H. Speck (1996). oriP is essential for EBNA gene promoter activity in Epstein-Barr virus-immortalized lymphoblastoid cell lines. *J Virol* 70(9): 5758-68.

R

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

- Rickinson, A. B., S. P. Lee and N. M. Steven** (1996). Cytotoxic T lymphocyte responses to Epstein-Barr virus. Curr Opin Immunol 8(4): 492-7.
- Rickinson, A. B. and D. J. Moss** (1997). Human cytotoxic T lymphocyte responses to Epstein-Barr virus infection. Annu Rev Immunol 15: 405-31.
- Robertson, E. S., B. Tomkinson and E. Kieff** (1994). An Epstein-Barr virus with a 58-kilobase-pair deletion that includes BARF0 transforms B lymphocytes in vitro. J Virol 68(3): 1449-58.
- Rocchi, G., A. Felici, G. Ragona and A. Heinz** (1977). Quantitative evaluation of Epstein-Barr-virus-infected mononuclear peripheral blood leukocytes in infectious mononucleosis. N Engl J Med 296(3): 132-4.
- Romani, N., D. Reider, M. Heuer, S. Ebner, E. Kampgen, B. Eibl, D. Niederwieser and G. Schuler** (1996). Generation of mature dendritic cells from human blood. An improved method with special regard to clinical applicability. J Immunol Methods 196(2): 137-51.
- Rooney, C., J. G. Howe, S. H. Speck and G. Miller** (1989). Influence of Burkitt's lymphoma and primary B cells on latent gene expression by the nonimmortalizing P3J-HR-1 strain of Epstein-Barr virus. J Virol 63(4): 1531-9.
- Rowe, D. T., M. Rowe, G. I. Evan, L. E. Wallace, P. J. Farrell and A. B. Rickinson** (1986). Restricted expression of EBV latent genes and T-lymphocyte-detected membrane antigen in Burkitt's lymphoma cells. Embo J 5(10): 2599-607.
- Rowe, M., R. Khanna, C. A. Jacob, V. Argat, A. Kelly, S. Powis, M. Belich, D. Croom-Carter, S. Lee, S. R. Burrows and et al.** (1995). Restoration of endogenous antigen processing in Burkitt's lymphoma cells by Epstein-Barr virus latent membrane protein-1: coordinate up-regulation of peptide transporters and HLA-class I antigen expression. Eur J Immunol 25(5): 1374-84.
- Rowe, M., A. L. Lear, D. Croom-Carter, A. H. Davies and A. B. Rickinson** (1992). Three pathways of Epstein-Barr virus gene activation from EBNA1-positive latency in B lymphocytes. J Virol 66(1): 122-31.
- Rowe, M., D. T. Rowe, C. D. Gregory, L. S. Young, P. J. Farrell, H. Rupani and A. B. Rickinson** (1987). Differences in B cell growth phenotype reflect novel patterns of Epstein-Barr virus latent gene expression in Burkitt's lymphoma cells. Embo J 6(9): 2743-51.
- Rowe, M., C. M. Rooney, C. F. Edwards, G. M. Lenoir and A. B. Rickinson** (1986). Epstein-Barr virus status and tumour cell phenotype in sporadic Burkitt's lymphoma. Int J Cancer 37(3): 367-73.
- S**
- Sakai, T., K. Tamura, S. Minoguchi, L.J.Strobl, U.Zimber-Strobl, G.W. Bornkamm und T. Honjo** (1998). Functional replacement of the intracellular region of the Notch-1 receptor by Epstein-Barr virus nuclear antigen 2. J Virol. 72:6034-6039
- Sallusto, F. and A. Lanzavecchia** (1994). Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. J Exp Med 179(4): 1109-18.
- Sandberg, M., W. Hammerschmidt and B. Sugden** (1997). Characterization of LMP-1's association with TRAF1, TRAF2, and TRAF3. J Virol 71(6): 4649-56.
- Schall, T. J., M. Lewis, K. J. Koller, A. Lee, G. C. Rice, G. H. Wong, T. Gatanaga, G. A. Granger, R. Lentz, H. Raab and et al.** (1990). Molecular cloning and expression of a receptor for human tumor necrosis factor. Cell 61(2): 361-70.
- Schlager, S., S. H. Speck and M. Woisetschlager** (1996). Transcription of the Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 (EBNA1) gene occurs before induction of the BCR2 (Cp) EBNA gene promoter during the initial stages of infection in B cells. J Virol 70(6): 3561-70.
- Schmitz, M. L., S. Bacher and M. Kracht** (2001). I kappa B-independent control of NF-kappa B activity by modulatory phosphorylations. Trends Biochem Sci 26(3): 186-90.

Scholler, N., M. Hayden-Ledbetter, A. Dahlin, I. Hellstrom, K. E. Hellstrom and J. A. Ledbetter (2002). Cutting Edge: CD83 Regulates the Development of Cellular Immunity. J Immunol 168(6): 2599-602.

Scholler, N., M. Hayden-Ledbetter, K. E. Hellstrom, I. Hellstrom and J. A. Ledbetter (2001). CD83 is a sialic acid-binding Ig-like lectin (Siglec) adhesion receptor that binds monocytes and a subset of activated CD8+ T cells. J Immunol 166(6): 3865-72.

Schneider, U. and H. U. Schwenk (1977). Characterization of "T" and "non-T" cell lines established from children with acute lymphoblastic leukemia and non-Hodgkin lymphoma after leukemic transformation. Hamatol Bluttransfus 20: 265-9.

Schuhmacher, M., M. S. Staeger, A. Pajic, A. Polack, U. H. Weidle, G. W. Bornkamm, D. Eick and F. Kohlhuber (1999). Control of cell growth by c-Myc in the absence of cell division. Curr Biol 9(21): 1255-8.

Schultheiss, U., S. Puschner, E. Kremmer, T. W. Mak, H. Engelmann, W. Hammerschmidt and A. Kieser (2001). TRAF6 is a critical mediator of signal transduction by the viral oncogene latent membrane protein 1. Embo J 20(20): 5678-91.

Seshagiri, S. and L. K. Miller (1997). Baculovirus inhibitors of apoptosis (IAPs) block activation of Sf-caspase-1. Proc Natl Acad Sci U S A 94(25): 13606-11.

Sjoblom, A., A. Jansson, W. Yang, S. Lain, T. Nilsson and L. Rymo (1995). PU box-binding transcription factors and a POU domain protein cooperate in the Epstein-Barr virus (EBV) nuclear antigen 2-induced transactivation of the EBV latent membrane protein 1 promoter. J Gen Virol 76(Pt 11): 2679-92.

Sjoblom, A., W. Yang, L. Palmqvist, A. Jansson and L. Rymo (1998). An ATF/CRE element mediates both EBNA2-dependent and EBNA2-independent activation of the Epstein-Barr virus LMP1 gene promoter. J Virol 72(2): 1365-76.

Sorg, U. R., T. M. Morse, W. N. Patton, B. D. Hock, H. B. Angus, B. A. Robinson, B. M. Colls and D. N. Hart (1997). Hodgkin's cells express CD83, a dendritic cell lineage associated antigen. Pathology 29(3): 294-9.

Staeger, M. S., S. P. Lee, T. Frisan, J. Mautner, S. Scholz, A. Pajic, A. B. Rickinson, M. G. Masucci, A. Polack and G. W. Bornkamm (2002). MYC overexpression imposes a nonimmunogenic phenotype on Epstein-Barr virus-infected B cells. Proc Natl Acad Sci U S A 99(7): 4550-5.

Strobl, L. J., H. Hofelmayr, G. Marschall, M. Brielmeier, G. W. Bornkamm and U. Zimmer-Strobl (2000). Activated Notch1 modulates gene expression in B cells similarly to Epstein-Barr viral nuclear antigen 2. J Virol 74(4): 1727-35.

Sugden, B., K. Marsh and J. Yates (1985). A vector that replicates as a plasmid can be efficiently selected in B-lymphoblasts transformed by Epstein-Barr virus. Mol. Cell Biol. 5:410-413

Swaminathan, S., B. Tomkinson and E. Kieff (1991). Recombinant Epstein-Barr virus with small RNA (EBER) genes deleted transforms lymphocytes and replicates in vitro. Proc Natl Acad Sci U S A 88(4): 1546-50.

T

Takada, K., K. Horinouchi, Y. Ono, T. Aya, T. Osato, M. Takahashi and S. Hayasaka (1991). An Epstein-Barr virus-producer line Akata: establishment of the cell line and analysis of viral DNA. Virus Genes 5(2): 147-56.

Takeshita, H., T. Yoshizaki, W. E. Miller, H. Sato, M. Furukawa, J. S. Pagano and N. Raab-Traub (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(7): 5548-55.

Tamura, K., Y. Taniguchi, S. Minoguchi, T. Sakai, T. Tun, T. Furukawa and T. Honjo (1995). Physical interaction between a novel domain of the receptor Notch and the transcription factor RBP-J kappa/Su(H). Curr Biol 5(12): 1416-23.

Tanner, J., J. Weis, D. Fearon, Y. Whang and E. Kieff (1987). Epstein-Barr virus gp350/220 binding to the B lymphocyte C3d receptor mediates adsorption, capping, and endocytosis. *Cell* 50(2): 203-13.

Thompson, C. B. and J. P. Allison (1997). The emerging role of CTLA-4 as an immune attenuator. *Immunity* 7(4): 445-50.

Thorley-Lawson, D. A. and K. P. Mann (1985). Early events in Epstein-Barr virus infection provide a model for B cell activation. *J Exp Med* 162(1): 45-59.

Tissot, A.C., Pecorari F., A. Plückthun (1999). Characterizing the functionality of recombinant T-cell receptors in vitro: a pMHC tetramer based approach. *J. Immunol. Methods* 236: 147-165.

Tomkinson, B., E. Robertson and E. Kieff (1993). Epstein-Barr virus nuclear proteins EBNA-3A and EBNA-3C are essential for B-lymphocyte growth transformation. *J Virol* 67(4): 2014-25.

Tosato, G., A. D. Steinberg, R. Yarchoan, C. A. Heilman, S. E. Pike, V. De Seau and R. M. Blaese (1984). Abnormally elevated frequency of Epstein-Barr virus-infected B cells in the blood of patients with rheumatoid arthritis. *J Clin Invest* 73(6): 1789-95.

Twist, C. J., D. R. Beier, C. M. Disteche, S. Edelhoff and T. F. Tedder (1998). The mouse Cd83 gene: structure, domain organization, and chromosome localization. *Immunogenetics* 48(6): 383-93.

U

Uchida, J., T. Yasui, Y. Takaoka-Shichijo, M. Muraoka, W. Kulwichit, N. Raab-Traub and H. Kikutani (1999). Mimicry of CD40 signals by Epstein-Barr virus LMP1 in B lymphocyte responses. *Science* 286(5438): 300-3.

V

van der Merwe, P. A., D. L. Bodian, S. Daenke, P. Linsley and S. J. Davis (1997). CD80 (B7-1) binds both CD28 and CTLA-4 with a low affinity and very fast kinetics. *J Exp Med* 185(3): 393-403.

Vockerodt, M., B. Haier, P. Buttgerit, H. Tesch and D. Kube (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(2): 183-98.

W

Wagner, H. J., G. Bein, A. Bitsch and H. Kirchner (1992). Detection and quantification of latently infected B lymphocytes in Epstein-Barr virus-seropositive, healthy individuals by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 30(11): 2826-9.

Wang, S., M. Rowe and E. Lundgren (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(20): 4610-3.

Wang, F., C. Gregory, C. Sample, M. Rowe, D. Liebowitz, R. Murray, A. Rickinson and E. Kieff (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(5): 2309-18.

Wang, D., D. Liebowitz and E. Kieff (1988). The truncated form of the Epstein-Barr virus latent-infection membrane protein expressed in virus replication does not transform rodent fibroblasts. *J Virol* 62(7): 2337-46.

Wang, D., D. Liebowitz and E. Kieff (1985). An EBV membrane protein expressed in immortalized lymphocytes transforms established rodent cells. *Cell* 43(3 Pt 2): 831-40.

Watts, T. H., N. Alaverdi, W. F. Wade and P. S. Linsley (1993). Induction of costimulatory molecule B7 in M12 B lymphomas by cAMP or MHC-restricted T cell interaction. *J Immunol* 150(6): 2192-202.

Woisetschlaeger, M., X. W. Jin, C. N. Yandava, L. A. Furmanski, J. L. Strominger and S. H. Speck (1991). Role for the Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 in viral promoter switching during initial stages of infection. Proc Natl Acad Sci U S A 88(9): 3942-6.

Woisetschlaeger, M., J. L. Strominger and S. H. Speck (1989). Mutually exclusive use of viral promoters in Epstein-Barr virus latently infected lymphocytes. Proc Natl Acad Sci U S A 86(17): 6498-502.

Wu, D. Y., G. V. Kalpana, S. P. Goff and W. H. Schubach (1996). Epstein-Barr virus nuclear protein 2 (EBNA2) binds to a component of the human SNF-SWI complex, hSNF5/Ini1. J Virol 70(9): 6020-8.

X

Xue, D. and H.R. Horvitz (1995). Nature (London) 377, 248-251.

Y

Yamashiro, S., J. M. Wang, D. Yang, W. H. Gong, H. Kamohara and T. Yoshimura (2000). Expression of CCR6 and CD83 by cytokine-activated human neutrophils. Blood 96(12): 3958-63.

Yang, X., Z. He, B. Xin and L. Cao (2000). LMP1 of Epstein-Barr virus suppresses cellular senescence associated with the inhibition of p16INK4a expression. Oncogene 19(16): 2002-13.

Yoshiyama, H., N. Shimizu and K. Takada (1995). Persistent Epstein-Barr virus infection in a human T-cell line: unique program of latent virus expression. Embo J 14(15): 3706-11.

Yoshizaki, T., H. Sato, S. Muro, J. S. Pagano and M. Furukawa (1999). Matrix metalloproteinase 9 is induced by the Epstein-Barr virus BZLF1 transactivator. Clin Exp Metastasis 17(5): 431-6.

Z

Zabel, U., T. Henkel, M. S. Silva and P. A. Baeuerle (1993). Nuclear uptake control of NF-kappa B by MAD-3, an I kappa B protein present in the nucleus. Embo J 12(1): 201-11.

Zhou, L. J. and T. F. Tedder (1996). CD14+ blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83+ dendritic cells. Proc Natl Acad Sci U S A 93(6): 2588-92.

Zhou, L. J. and T. F. Tedder (1995). Human blood dendritic cells selectively express CD83, a member of the immunoglobulin superfamily. J Immunol 154(8): 3821-35.

Zhou, L. J., R. Schwarting, H. M. Smith and T. F. Tedder (1992). A novel cell-surface molecule expressed by human interdigitating reticulum cells, Langerhans cells, and activated lymphocytes is a new member of the Ig superfamily. J Immunol 149(2): 735-42.

Zimber-Strobl, U., B. Kempkes, G. Marschall, R. Zeidler, C. Van Kooten, J. Banchereau, G. W. Bornkamm and W. Hammerschmidt (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(24): 7070-8.

Zimber-Strobl, U., L. J. Strobl, C. Meitinger, R. Hinrichs, T. Sakai, T. Furukawa, T. Honjo and G. W. Bornkamm (1994). Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 exerts its transactivating function through interaction with recombination signal binding protein RBP-J kappa, the homologue of Drosophila Suppressor of Hairless. Embo J 13(20): 4973-82.

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

8 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenosin
Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
APC	Antigen Presenting Cell (Antigen präsentierende Zelle)
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
Bp	Basenpaar
β -Gal	Beta-Galaktosidase
BL	Burkitt Lymphom
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytosin
$^{\circ}$ C	Grad Celcius
ca.	circa
cDNA	komplementäre DNA
Ci	Curie
CHX	Cycloheximid
(H)CMV	(Humanes) Cytomegalovirus
CTP	Cytosintriphosphat
d	Tag
DC	Dendritische Zelle(n)
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
d/n	dominant/negativ
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
dpm	Radioaktive Zerfälle (Desintegration) pro Minute
DTAF	Dichlorotriazinyl-Amino-Fluorescein
DTT	Dithiothreitol
EBER	EBV-nicht polyadenylierte RNA
EBNA	EBV-nukleäres Antigen
EBNA2RE	EBNA-2 responsives Element
EBNA-LP	EBNA Leader Protein
EBV	Epstein-Barr Virus
ECL	Enhanced chemiluminescence
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>

EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (Titriplex)
ER	Östrogen-Rezeptor
EtBr	Ethidiumbromid
F	Farad
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FDCP-Mix	Faktorabhängige murine Zellen aus dem Paterson Institut mit gemischtem Differenzierungspotential
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FKS	Fötales Kälberserum
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
G	Guanin
g	Gramm Erdbeschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase
GFP	Green Fluorescent Protein
GM-CSF	Granulocyte/Makrophage-colony stimulating factor
gp	Glykoprotein
h	Stunde
HA	Hämagglutinin
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethan-sulfonsäure
His	6xHis, Histidin-Epitop
Hyg	Hygromycin
HSV	Herpes Simplex Virus
ICAM-1	Intrazelluläres Adhäsions-Molekül 1
IFN γ	Interferon gamma
Ig	Immunglobulin
Ig-SF	Immunglobulin-Supergen-Familie
IL	Interleukin
IR	Interne Repetitionen
Jak	Janus-Kinase
k	Kilo (10^3)
kBp	Kilobasenpaare
kDa	Kilo-Dalton
L	Ligand
l	Liter
LB	Luria-Broth
LCL	Lymphoblastoide Cell Line, Lymphoblastoide Zelllinie
LMP	Latentes Membranprotein
LPS	Lipopolysaccharid
LTR	Long Terminal Repeat (lange terminale Wiederholung)
Luc	Luziferase

μ	Mikro (10^{-6})
m	Milli (10^{-3})
M	mol/l, Molar
mA	Milliampere
MACS	Magnetic Activated Cell Sorting
min	Minute
MLR	Mixed Lymphocyte Reaction
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
mRNA	Messenger RNA
MTT	MTT-Reagenz = Thiazolylblau
MW	Molekulargewicht
n	Nano (10^{-9})
NaPi	Natriumphosphatpuffer
neo	Neomycin
neoR	Neomycin-Resistenz (Neomycin Phosphotransferase)
NGF, NGF-R	Nerve Growth Factor, Nerve Growth Factor Receptor
NK	Natural Killer Cells
NLS	Kernlokalisationssequenz, nuclear localisation sequence
nm	Nanometer
Notch-IC	Intrazelluläre Region von Notch-1
np	non-professionell
nt	Nukleotid
OD	Optische Dichte
ORF	Open Reading Frame, offener Leserahmen
ori ^{Lyt}	Replikationsursprung für die lytische Replikation
ori ^P	Replikationsursprung für die latente Replikation
p	professionell
p.	proliferierend
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PHA	Phytohämagglutinin
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	polyvinylidene fluoride
R	Rezeptor
RBP- κ	recombination signal sequence binding protein for κ -genes
RLU	Relative Light Units (relative Lichteinheiten)
RNA	Ribonukleinsäure

RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkription mit Polymerase-Kettenreaktion
s.	siehe
SA	Streptavidin
SAPE	Streptavidin-PE
SDS	Natriumdodecylsulfat
sek.	Sekunde
SSC	NaCl-Natriumcitrat-Salzlösung
STAT	Signal transducer and activator of transcription
SV40	Simian Virus 40
T	Tyrosin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Natriumazetat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N,N-Tetramethylethyldiamin
T _H	T-Helferzellen
TM	Transmembrandomäne
TNF- α	Tumor-Necrosis-Factor- α
TPB	Tyrosine Phosphate Broth
TP tet O7	Tetrazyklin-regulierbarer Promotor mit 7 Operatorbindestellen
TR	Terminale Repetitionen (terminal repeats)
TRAF	TNF-Receptor activated protein
Tris	Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan
tTA	Tet spezifischer Transaktivator
U	Unit
u.a.	unter anderem
Upm	Umdrehungen pro Minute
U _S , U _L	Kurze, bzw. lange „unique“ Region
ü.N.	über Nacht
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
W	Watt
WT	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen
Ω	Ohm, Widerstand
%	Prozent
∞	unendlich

9 Anhang

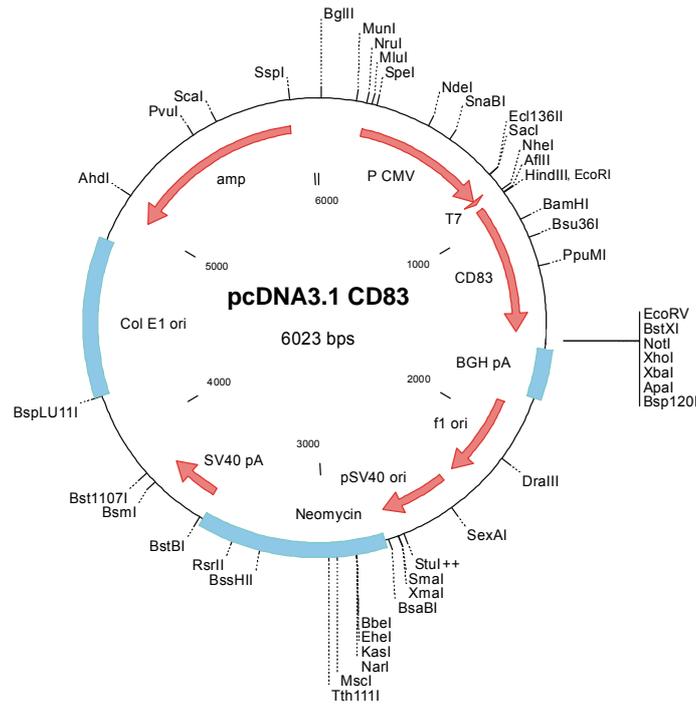
9.1 CD83 und CD83-Spleißprodukte

9.1.1 Darstellung der verschiedenen Exons von CD83

1 CACAGCTCTG CAGCTCGTGG CAGCGGCGCA GCGCTCCAGC CATGTCGCGC GGCCTCCAGC
 61 TTCTGCTCCT GAGCTGCGCC TACAGCCTGG CTCCC GCGAC GCCGGAGGTG AAGGTGGCTT
 121 GCTCCGAAGA TGTGGACTTG CCCTGCACCG CCCCTGGGA TCCGCAGGTT CCCTACACGG
 181 TCTCCTGGGT CAAGTTATTG GAGGGTGGTG AAGAGAGGAT GGAGACACCC CAGGAAGACC
 241 ACCTCAGGGG ACAGCACTAT CATCAGAAGG GGCAAAATGG TTCTTTTCGAC GCCCCCAATG
 301 AAAGGCCCTA TTCCCTGAAG ATCCGAAACA CTACCAGCTG CAACTCGGGG ACATACAGGT
 361 GCACTCTGCA GGACCCGGAT GGGCAGAGAA ACCTAAGTGG CAAGGTGATC TTGAGAGTGA
 421 CAGGATGCCC TGCACAGCGT AAAGAAGAGA CTTTTAAGAA ATACAGAGCG GAGATTGTCC
 481 TGCTGCTGGC TCTGGTTATT TTCTACTTAA CACTCATCAT TTCACTTGT AAGTTTGCAC
 541 GGCTACAGAG TATCTTCCCA GATTTTTCTA AAGCTGGCAT GGAACGAGCT TTTCTCCAG
 601 TTACCTCCCC AAATAAGCAT TTAGGGCTAG TGA CTCTCA CAAGACAGAA CTGGTATGAG
 661 CAGGATTTCT GCAGGTTCTT CTTCTGAAG CTGAGGCTCA GGGGTGTGCC TGTCTGTTAC
 721 ACTGGAGGAG AGAAGAATGA GCCTACGCTG AAGATGGCAT CCTGTGAAGT CCTTCACCTC

9.1.2 CD83-TM

901 GTTTAAACTT AAGCTTGCGC TCCAGCCATG TCGCGCGGCC TCCAGCTTCT GCTCCTGAGC
 961 TGCGCCTACA GCCTGGCTCC CGCGACGCCG GAGGTGAAGG TGGCTTGCTC CGAAGATGTG
 1021 GACTTGCCCT GCACCGCCCC CTGGGATCCG CAGGTTCCTT ACACGGTCTC CTGGGTCAAG
 1081 TTATTGGAGG GTGGTGAAGA GAGGATGGAG ACACCCAGG AAGACCACCT CAGGGGACAG
 1141 CACTATCATC AGAAGGGGCA AAATGGTTCT TTTCGACGCC CCAATGAAAG GCCCTATTCC
 1201 CTGAAGATCC GAAACACTAC CAGCTGCAAC TCGGGGACAT ACAGGTGCAC TCTGCAGGAC
 1261 CCGGATGGGC AGAGAAACCT AAGTGGCAAG GTGATCTTGA GAGTGACAGG ATGCCCTGCA
 1321 CAGCGTAAAG AAGAGACTTT TAAGAAATAC AGAGCGGAGA TTGTCTTGCT GCTGGCTCTG
 1381 GTTATTTTCT ACTTAACACT CATCATTTTC ACTTGTAAGT TTGCACGGCT ACAGAGTATC
 1441 TTCCAGATT TTTCTAAAGC TGGCATGGAA CGAGCTTTTC TCCAGTTAC CTCCCAAAT
 1501 AAGCATTTAG GGCTAGTGAC TCCTACAAG ACAGA ACTGG TAGTGAGAAT TCTGCAGATA



9.1.3 CD83-a

```

901 GTTTAAACTT AAGCTTGGTA CCGAGCTCGG ATCCACTAGT CCAGTGTTGGT GGAATTCCTC
961 GAGGCCACCA TGTCGCGCGG CCTCCAGCTT CTGCTCCTGA GCTGCGCCTA CAGCCTGGCT
1021 CCCGCGACGC CGGAGGTGAA GGTGGCTTGC TCCGAAGATG TGGACTTGCC CTGCACCGCC
1081 CCCTGGGATC CGCAGGTTCC CTACACGGTC TCCTGGGTCA AGTTATTGGA GGGTGGTGAA
1141 GAGAGGATGG AGACACCCCA GGAAGACCAC CTCAGGGGAC AGCACTATCA TCAGAAGGGG
1201 CAAAATGGTT CTTTCGACGC CCCCAATGAA AGGCCCTATT CCCTGAAGAT CCGAAACACT
1261 ACCAGCTGCA ACTCGGGGAC ATACAGGTGC ACTCTGCAGG ACCCGGATGG GCAGAGAAAC
1321 CTAAGTGGCA AGGATGCCCT GCACAGCGTA AAGAAGAGAC TTTTAAGAAA TACAGAGCGG
1381 AGATTGTCCT GCTGCTGGCT CTGGTTATTT TCTACTTAAC ACTCATCATT TTCACTTGTA
1441 AGTTTGCACG GCTACAGAGT ATCTTCCCAG ATTTTTCTAA AGCTGGCATG GAACGAGCTT
1501 TTCTCCCAGT TACCTCCCCA AATAAGCATT TAGGGCTAGT GACTCCTCAC AAGACAGAAC
1561 TGGTATTGAGC AGGATTTCTG CAGGTTCTTC TTCCTGAAGC TGAGGCTCAG GGGTGTGCCT

```

9.1.4 CD83-b

```

1 AGACCCAAGC TGGCTAGCGT TTAAACTTAA GCTTGGTACC GAGCTCGGAT CCACTAGTCC
61 AGTGTGGTGG AATTCCTCGA GGCCACCATG TCGCGCGGCC TCCAGCTTCT GCTCCTGAGC
121 TGCGCCTACA GCCTGGCTCC CGCGACGCCG GAGGTGAAGG TGGCTTGCTC CGAAGATGTG
181 GACTTGCCCT GCACCGCCCC CTGGGATCCG CAGGTTCCCT ACACGGTCTC CTGGGTCAAG
241 GATGCCCTGC ACAGCGTAAA GAAGAGACTT TTAAGAAATA CAGAGCGGAG ATTGTCCTGC
301 TGCTGGCTCT GGTATTTTTC TACTTAACAC TCATCATTTT CACTTGTAAG TTTGCACGGC
361 TACAGAGTAT CTTCCAGAT TTTTCTAAAG CTGGCATGGA ACGAGCTTTT CTCCAGTTA
421 CCTCCCCAAA TAAGCATTTA GGGCTAGTGA CTCCTCACAA GACAGAACTG GTATTGACGCG
481 CCGCTCGAGT CTAGAGGGCC CGTTTAAACC CGCTGATCAG CCTCGACTGT GCCTTCTAGT

```

9.1.5 CD83-c

```

1 AGACCCAAGC TGGCTAGCGT TTAAACTTAA GCTTGGTACC GAGCTCGGAT CCACTAGTCC
61 AGTGTGGTGG AATTCCTCGA GGCCACCATG TCGCGCGGCC TCCAGCTTCT GCTCCTGAGC

```

```

121 TGC GCCTTACA GCCTGGCTCC CGCGACGCCG GAGGTGAAGG TGGCTTGCTC CGAAGATGTG
181 GACTTGCCCT GCACCGCCCC CTGGGATCCG CAGGTTCCCT ACACGGTCTC CTGGGTCAAG
241 AAGTTTGCAC GGCTACAGAG TATCTTCCCA GATTTTCTA AAGCTGGCAT GGAACGAGCT
301 TTTCTCCCAG TTACCTCCCC AAATAAGCAT TTAGGGCTAG TGA CTCTCA CAAGACAGAA
361 CTGGTATGAG CGGCCGCTCG AGTCTAGAGG GCCCGTTTAA ACCCGCTGAT CAGCCTCGAC

```

9.1.6 CD83-c-His

```

1 AGACCCAAGC TGGCTAGCGT TTAAACTTAA GCTTGGTACC GAGCTCGGAT CCACTAGTCC
61 AGTGTGGTGG AATTCCTCGA GGCCACCATG TCGCGCGGCC TCCAGCTTCT GCTCCTGAGC
121 TGC GCCTTACA GCCTGGCTCC CGCGACGCCG GAGGTGAAGG TGGCTTGCTC CGAAGATGTG
181 GACTTGCCCT GCACCGCCCC CTGGGATCCG CAGGTTCCCT ACACGGTCTC CTGGGTCAAG
241 AAGTTTGCAC GGCTACAGAG TATCTTCCCA GATTTTCTA AAGCTGGCAT GGAACGAGCT
301 TTTCTCCCAG TTACCTCCCC AAATAAGCAT TTAGGGCTAG TGA CTCTCA CAAGACAGAA
361 CTGGTACATC ACCATCACCA TCACAGAGCG GCCGCTCGAG TCTAGAGGGC CCGTTTAAAC

```

9.2 CD83-Ig Fusionsproteine

9.2.1 CD83-S-Ig

Übergang der extrazellulären Domäne von CD83 (kürzerer Teil) zu hIgG1

```

301 ATGGGCGGTA GCGGTGTACG GTGGGAGGTC TATATAAGCA GAGCTCTCTG GCTAACTAGA
361 GAACCCACTG CTTAAGCCTC AATAAAGCTT CTAGAGATCC CTCGACCTCG AGGCCACCAT
421 GTCGCGCGGC CTCCAGCTTC TGCTCCTGAG CTGCGCCTAC AGCCTGGCTC CCGCGACGCC
481 GGAGGTGAAG GTGGCTTGCT CCGAAGATGT GGACTTGCCC TGCACCGCCC CCTGGGATCC
541 GCAGGTTCCC TACACGGTCT CCTGGGTCAA GTTATTGGAG GGTGGTGAAG AGAGGATGGA
601 GACACCCAG GAAGACCACC TCAGGGGACA GCACTATCAT CAGAAGGGGC AAAATGGTTC
661 TTTTCGACGCC CCCAATGAAA GGCCCTATTC CCTGAAGATC CGAAACACTA CCAGCTGCAA
721 CTCGGGGACA TACAGGTGCA CTCTGCAGGA CCCGGATGGG CAGAGAAAACC TAAGTGGCAA
781 GGTGATCTTG AGAGTGACAG GATGCCCTGC AGATCCCGAG GGTGAGTACT AAGCTTCAGC
841 GCTCCTGCCT GGACGCATCC CGGCTATGCA GCCCCAGTCC AGGGCAGCAA GGCAGGCCCC
901 GTCTGCCTCT TCACCCGGAG GCCTCTGCCC GCCCCACTCA TGCTCAGGGA GAGGGTCTTC

```

9.2.2 CD83-L-Ig

Übergang der extrazellulären Domäne von CD83 (längerer Teil) zu hIgG1

```

301 ATGGGCGGTA GCGGTGTACG GTGGGAGGTC TATATAAGCA GAGCTCTCTG GCTAACTAGA
361 GAACCCACTG CTTAAGCCTC AATAAAGCTT CTAGAGATCC CTCGACCTCG AGGCCACCAT
421 GTCGCGCGGC CTCCAGCTTC TGCTCCTGAG CTGCGCCTAC AGCCTGGCTC CCGCGACGCC
481 GGAGGTGAAG GTGGCTTGCT CCGAAGATGT GGACTTGCCC TGCACCGCCC CCTGGGATCC
541 GCAGGTTCCC TACACGGTCT CCTGGGTCAA GTTATTGGAG GGTGGTGAAG AGAGGATGGA
601 GACACCCAG GAAGACCACC TCAGGGGACA GCACTATCAT CAGAAGGGGC AAAATGGTTC
661 TTTTCGACGCC CCCAATGAAA GGCCCTATTC CCTGAAGATC CGAAACACTA CCAGCTGCAA
721 CTCGGGGACA TACAGGTGCA CTCTGCAGGA CCCGGATGGG CAGAGAAAACC TAAGTGGCAA
781 GGTGATCTTG AGAGTGACAG GATGCCCTGC ACAGCGTAAA GAAGAGACTT TTAAGAAATA
841 CAGAGCAGAT CCCGAGGGTG AGTACTAAGC TTCAGCGCTC CTGCCTGGAC GCATCCCGGC
901 TATGCAGCCC CAGTCCAGGG CAGCAAGGCA GGCCCCGTCT GCCTCTTCAC CCGGAGGCCCT
961 CTGCCCCGCC CACTCATGCT CAGGGAGAGG GTCTTCTGGC TTTTCCCA GGCTCTGGGC

```

9.3 CD83-Tetramere

9.3.1 CD83-Tetramer 101

961 GAGGCCACCA TGTCGCGCGG CCTCCAGCTT CTGCTCCTGA GCTGCGCCTA CAGCCTGGCT
 1021 CCCGCGACGC CGGAGGTGAA GGTGGCTTGC TCCGAAGATG TGGACTTGCC CTGCACCGCC
 1081 CCCTGGGATC CGCAGGTTCC CTACACGGTC TCCTGGGTCA AGTTATTGGA GGGTGGTGAA
 1141 GAGAGGATGG AGACACCCCA GGAAGACCAC CTCAGGGGAC AGCACTATCA TCAGAAGGGG
 1201 CAAAATGGTT CTTTCGACGC CCCCAATGAA AGGCCCTATT CCCTGAAGAT CCGAAACACT
 1261 ACCAGCTGCA ACTCGGGGAC ATACAGGTGC ACTCTGCAGG ACCCGGATGG GCAGAGAAAC
 1321 CTAAGTGGCA AGGTGATCTT GAGAGTGACA GGATGCCCTG CAATCGATCT TAATGACATT
 1381 TTCGAGGCC AAAAATAGA GTGGCATGAA ACCGGTCATC ACCATCACCA TCACTGAGTT
 1441 GACGCGGCCG C

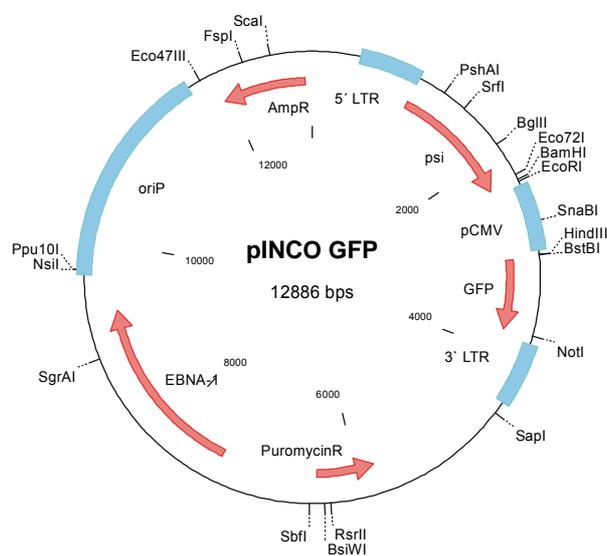
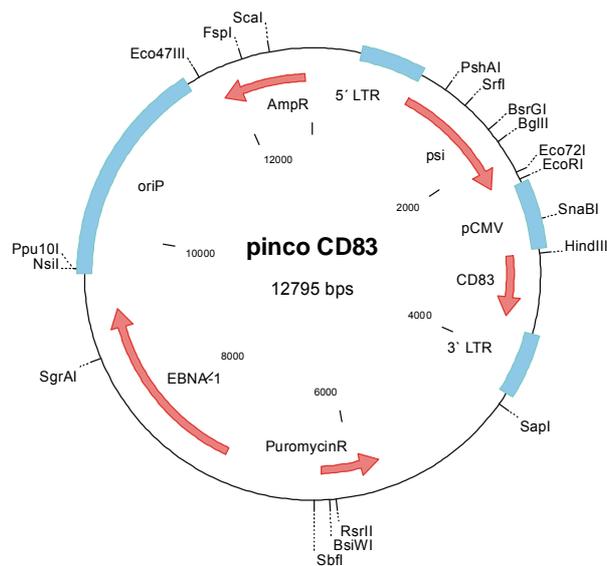
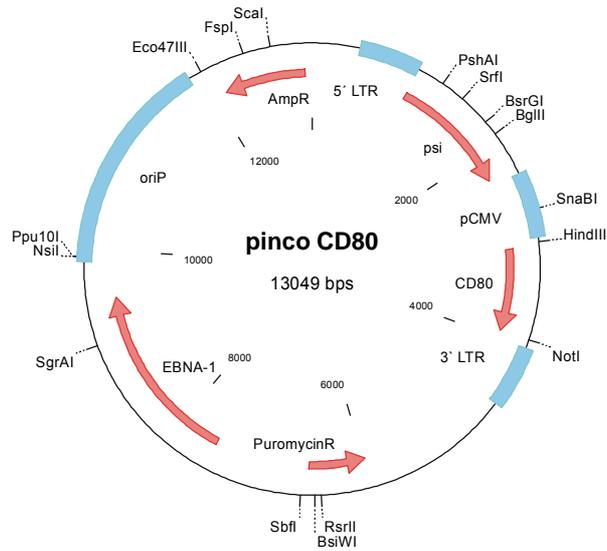
9.3.2 CD83-Tetramer 102

961 GAGGCCACCA TGTCGCGCGG CCTCCAGCTT CTGCTCCTGA GCTGCGCCTA CAGCCTGGCT
 1021 CCCGCGACGC CGGAGGTGAA GGTGGCTTGC TCCGAAGATG TGGACTTGCC CTGCACCGCC
 1081 CCCTGGGATC CGCAGGTTCC CTACACGGTC TCCTGGGTCA AGTTATTGGA GGGTGGTGAA
 1141 GAGAGGATGG AGACACCCCA GGAAGACCAC CTCAGGGGAC AGCACTATCA TCAGAAGGGG
 1201 CAAAATGGTT CTTTCGACGC CCCCAATGAA AGGCCCTATT CCCTGAAGAT CCGAAACACT
 1261 ACCAGCTGCA ACTCGGGGAC ATACAGGTGC ACTCTGCAGG ACCCGGATGG GCAGAGAAAC
 1321 CTAAGTGGCA AGGTGATCTT GAGAGTGACA GGATGCCCTG CACACGTGCT TAATGACATT
 1381 TTCGAGGCC AAAAATAGA GTGGCATGAA ACCGGTCATC ACCATCACCA TCACTGAGTT
 1441 GACGCGGCCG C

9.3.3 CD83-Tetramer 103

961 GAGGCCACCA TGTCGCGCGG CCTCCAGCTT CTGCTCCTGA GCTGCGCCTA CAGCCTGGCT
 1021 CCCGCGACGC CGGAGGTGAA GGTGGCTTGC TCCGAAGATG TGGACTTGCC CTGCACCGCC
 1081 CCCTGGGATC CGCAGGTTCC CTACACGGTC TCCTGGGTCA AGTTATTGGA GGGTGGTGAA
 1141 GAGAGGATGG AGACACCCCA GGAAGACCAC CTCAGGGGAC AGCACTATCA TCAGAAGGGG
 1201 CAAAATGGTT CTTTCGACGC CCCCAATGAA AGGCCCTATT CCCTGAAGAT CCGAAACACT
 1261 ACCAGCTGCA ACTCGGGGAC ATACAGGTGC ACTCTGCAGG ACCCGGATGG GCAGAGAAAC
 1321 CTAAGTGGCA AGGTGATCTT GAGAGTGACA GGATGCCCTG CACAGCGTAA AGAAGAGACT
 1381 TTTAAGAAAT ACAGAGCGCA CGTGCTTAAT GACATTTTCG AGGCCCAAAA AATAGAGTGG
 1441 CATGAAACCG GTCATCACCA TCACCATCAC TGAGTTGACG CGGCCG

9.4 Retrovirale Vektoren



Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Georg W. Bornkamm für die Überlassung des Themas, für seinen stets sehr hilfreichen Rat, für die Durchsicht dieser Arbeit, vor allem jedoch dafür, die Weichen für das richtige Thema zur richtigen Zeit gestellt zu haben.

Herrn Prof. Dirk Eick danke ich für das konstante Interesse am Fortgang meiner Arbeit und die Übernahme der offiziellen Betreuung mit allen damit verbundenen Aufgaben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Gerhard Laux. Ich danke Dir für Deine Hilfe im Labor, die geduldige Unterstützung bei allen Fragen rund um den Computer sowie dem Korrigieren dieser Arbeit. Besonders viel habe ich jedoch von Dir über das Wesen Mensch, dessen Kommunikation und dem Umgang mit beidem gelernt.

Danken möchte ich Herrn Prof. Joachim Hauber. Lieber Yogi, wärst Du nicht gewesen, wäre diese Doktorarbeit nicht entstanden.

Mein großer Dank gilt allen Wissenschaftlern, die diese Arbeit durch die Bereitstellung von Antikörpern, Reporterkonstrukten, Expressionsplasmiden sowie Zellen und die Einführung in neue Techniken unterstützten: Prof. Alexander Steinkasserer, Dr. Arnd Kieser, Dr. Elisabeth Kremmer, PD Dr. Waldemar Kolanus, Dr. Susanne Berchtold, Dr. Greil, Dipl. Biol. Ulrike Dirmeier, Nathalie Scholler, Dr. Timm Schröder und Christian v. Hessler.

Ich möchte mich bei Herrn Dr. Dirk Busch bedanken. Danke für Deine tatkräftige Unterstützung bei der Umsetzung der großen Idee vom CD83-Tetramer in ein tatsächliches Endprodukt, Deine ständige Diskussionsbereitschaft und die Eingabe neuer Ideen. Auch möchte ich mich bei Deiner ganzen Crew für die nette Aufnahme eines plötzlichen Gastes bedanken, insbesondere bei Matthias und Anna für die praktische Unterstützung.

Ich danke besonders Dr. Uta Behrens und Dr. Josef Mautner für die Bereitstellung von cDNAs, T-Zellen und ab und an ein Stück Schokolade. Lieber Josef, Dir möchte ich für die Betreuung in Sachen Co-Stimulation und die Durchsicht dieser Arbeit danken. Ohne Dich hätte ich bestimmt nicht soviel über die Immunologie und das Verstehen dieser gelernt. Außerdem danke ich Dir dafür, daß Du immer ein offenes Ohr hast, sei es über das Labor oder das Leben nach dem Labor.

Liebe Gabi! Ohne Dich wäre das Laborleben nur halb so schön gewesen. Ich danke Dir für Deine tatkräftige Hilfe, für Deine ermunternden Worte bei positiven und negativen Laborerlebnissen und den Gesprächen über die Laboraußenwelt, ohne die ich bestimmt nicht wüßte, daß neben dem Labor noch eine andere Welt existiert. Froh bin ich, in Dir einen neuen Freund gefunden zu haben.

Weiterhin möchte ich mich bei allen bedanken, die sich meiner Probleme und Ideen annahmen als auch für die alltägliche Unterstützung im Labor: Falk Nimmerjahn, Slavoljub Milosevic (für einige T-Zellen und PBMCs), Martin Schlee (Danke für viele Stunden des Zuhörens und dem Austausch von auch philosophischen Gedanken), Gilbert Reisbach (für so viele Liter Blut), Elisabeth Dumont (über ein halbes Jahr im Hot-Lab ohne Dich, wäre recht langweilig gewesen), Kristina Grabucic (Deine aufmunternden Worte gaben mir immer wieder Mut), Klaus Fuchs, Franz Kohlhuber (für die ersten Schritte in Richtung CD83 und Deinem Interesse an den Fortschritten meiner Doktorarbeit), Jean-Marie Bechet (für so manche gemeinsame Heimfahrt in der Nacht, das Zuhören und den Rat eines erfahrenen Menschen) sowie Frau Birgit Schrezenmeier und Frau Mangelkammer (für das geduldige Zuhören, dem Herumtelefonieren und dem Stellen von Beschaffungsaufträgen).

Ich danke allen Mitgliedern des Instituts, die hier nicht erwähnt wurden, für die humorvolle Arbeitsatmosphäre, das gemeinschaftliche Miteinander und ihre aufbauenden Worte.

Liebe Mutti! Lieber Vati! Lieber Christian! Ich möchte mich bei Euch für alles, was ihr mir in meinem Leben so selbstverständlich ermöglicht habt, bedanken.

Ich danke Dir mein lieber Falk, für Deine wissenschaftlichen Diskussionen sowie dem Planen und Durchführen so mancher Experimente. Aber eigentlich möchte ich mich bei Dir für Deine aufmunternden Worte, dem Trocknen einiger Tränen, dem gemeinsamen Freuen auch über die kleinen Dinge im Leben und die wunderschönen Jahre, die wir durch Dick und Dünn gegangen sind, bedanken. Ich bin froh, Dich gefunden zu haben. In Liebe Diana.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, Diana Dudziak, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur mit den angegebenen Quellen und Hilfsmitteln angefertigt habe. Alle Ausführungen, die wörtlich oder sinngemäß übernommen wurden, sind als solche gekennzeichnet.

München, April 2002

Diana Dudziak

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Diana Dudziak
Geburtsdatum 07.02.1975
Geburtsort Gera
Nationalität Deutsch
Familienstand ledig

Schulbildung

1981-1990 7. Polytechnische Oberschule „Johann Gutenberg“ Erfurt
1990-1991 Erweiterte Oberschule „Alexander von und Wilhelm von Humboldt“
Erfurt
1991-1993 3. Staatliches Gymnasium „Johann Gutenberg“ Erfurt
Abschluß: Abitur 1,6

Wissenschaftliche Ausbildung

1993-1995 Grundstudium der Biologie an der Universität Bayreuth
Abschluß: Vordiplom 2,3
Hauptstudium der Biologie an der Friedrich-Alexander Universität
Erlangen-Nürnberg
Abschluß: Diplom der Biologie (Dipl. Biol. Univ.) 1,2
Titel der Diplomarbeit:
*Einsatz der REH-Zelllinie zum Aufbau eines episomalen Tetrazyklin-
induzierbaren eukaryontischen Expressionssystems*

1999-2002 Promotion am GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit
GmbH, am Institut für Klinische Molekularbiologie und Tumorgenetik,
Prof. G.W. Bornkamm, Abschluß: Dr. rer. Nat. 1,0
Titel der Arbeit:
*Regulation des Zelloberflächenmoleküls CD83 durch das Epstein-Barr
Virus und Analyse seiner Funktion*