

**REGULATION DER LATENZ
DES EPSTEIN-BARR-VIRUS
IN HUMANEN B-LYMPHOZYTEN DURCH DIE
VIRALEN LATENTEN MEMBRANPROTEINE 1 UND 2A**

Dissertation

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

vorgelegt von

Eveline Schaadt

München, Juni 2002

Die Arbeit wurde am Institut für Klinische Molekularbiologie und Tumorgenetik
des GSF-Forschungszentrums für Umwelt und Gesundheit, München, durchgeführt.

Erstgutachter: Prof. Dr. Dirk Eick

Zweitgutachterin: Prof. Dr. Elisabeth Weiß

Tag der mündlichen Prüfung: 17. Oktober 2002

meinen Eltern gewidmet

Teile dieser Arbeit sind oder werden wie folgt veröffentlicht:

Adler B., Schaadt E., Kempkes B., Zimmer-Strobl U., Baier B. und Bornkamm G. W. (2002): *Control of Epstein-Barr virus reactivation by activated CD40 and viral latent membrane protein 1*. PNAS 99, 437-442.

Schaadt E., Kieser A., Hammerschmidt W., Baier B., Bornkamm G. W. und Adler B.: *Control of Epstein-Barr virus reactivation by LMP1 is mediated by NF- κ B*. Manuskript in Vorbereitung.

Schaadt E., Brielmeier M., Kremmer E., Baier B., Bornkamm G. W. und Adler B.: *LMP2A can simulate the activated B-cell-receptor in stimulating EBV's lytic cycle*. Manuskript in Vorbereitung.

Inhaltsverzeichnis

1	<i>Einleitung</i>	1
1.1	Das Epstein-Barr-Virus, ein humanes Herpesvirus	1
1.2	Das EBV-Genom	2
1.3	Die EBV-Infektion	3
1.3.1	Die <i>in vitro</i> Infektion von B-Zellen.....	3
1.3.2	Die <i>in vivo</i> Infektion.....	5
1.3.3	EBV-assoziierte Tumorerkrankungen.....	7
1.4	Die Reaktivierung von EBV	8
1.4.1	Die <i>in vitro</i> Reaktivierung.....	8
1.4.2	Die <i>in vivo</i> Reaktivierung.....	9
1.5	Das „unmittelbar frühe“ Genprodukt BZLF1	10
1.5.1	Das BZLF1-Protein.....	10
1.5.2	Der BZLF1-Promotor.....	11
1.6	Das Latente Membranprotein 1 (LMP1)	13
1.6.1	LMP1, ein Onkogen.....	13
1.6.2	Struktureller Aufbau von LMP1.....	14
1.6.3	Vergleich von LMP1 mit CD40.....	17
1.7	Das Latente Membranprotein 2A (LMP2A)	18
1.7.1	Struktureller Aufbau von LMP2A.....	18
1.7.2	LMP2A und der B-Zell-Rezeptor.....	19
1.8	Fragestellung der Arbeit	20
2	<i>Material</i>	22
2.1	Zelllinien	22
2.2	Bakterienstämme	23
2.3	Plasmide	23
2.4	Antikörper	24
2.5	Enzyme	25
2.6	Radioaktive Isotope	25
2.7	Chemikalien und andere Materialien	25
2.8	Geräte	27

3 Methoden.....	29
3.1 Zellkultur.....	29
3.1.1 Kultivierung von Zelllinien	29
3.1.1.1 Kultivierung von in Suspension wachsenden Zellen.....	29
3.1.1.2 Kultivierung adhärent wachsender Zellen.....	29
3.1.2 Aufbewahren von Zellen	30
3.1.3 Auswaschen von Zellen	30
3.1.4 Bestimmung der Lebendzellzahl	31
3.1.5 Transfektion von Zellen	31
3.1.5.1 Transfektion mittels Elektroporation (nach Cann <i>et al.</i> , 1988)	31
3.1.5.2 Transfektion mittels Lipofektamin	31
3.1.6 Aufreinigung transfizierter Zellen.....	32
3.1.6.1 „MicroBeads assisted cell sorting“ (MACS).....	32
3.1.6.2 „Fluorescence assisted cell sorting“ (FACS)	33
3.1.7 Einzelzellklonierung zur Gewinnung stabil transfizierter Zellklone	33
3.1.8 Stimulation von B-Zellen mit TPA und anti-Immunglobulin-Antikörpern	33
3.1.9 Bestimmung der Luziferase-Aktivität nach Transfektion von Promotor/ Luziferase-Konstrukten	34
3.2 Bakterienkultur	34
3.2.1 Vermehrung und Aufbewahrung von Bakterien	34
3.2.2 Herstellung transformationskompetenter Bakterien (nach Hanahan, 1983)	35
3.2.3 Transformation von Bakterien	35
3.3 Charakterisierung von DNA	35
3.3.1 Plasmidschnellaufarbeitung	35
3.3.2 Präparative Plasmidaufarbeitung.....	36
3.3.3 Spaltung mit Restriktionsenzymen.....	36
3.3.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)	36
3.3.5 Agarose-Gelelektrophorese	37
3.3.6 Isolierung und Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	37
3.3.7 Herstellung stumpfer Enden.....	37
3.3.8 Ligierung von DNA-Fragmenten	38
3.3.9 Radioaktive Markierung.....	38
3.4 Charakterisierung von RNA	38
3.4.1 Präparation von Gesamt-RNA aus Zellen	38
3.4.2 Auftrennung von RNA in Formaldehydgelen (nach Seed, 1982).....	39

3.4.3	Northern Blot.....	39
3.4.4	Hybridisierung der RNA-Filter	39
3.5	Charakterisierung von Proteinen	40
3.5.1	Präparation von Proteinextrakten für Protein-Immunoblots	40
3.5.2	Proteinbestimmung.....	41
3.5.3	Auftrennung von Proteinen durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	41
3.5.4	Western Blot und Chemolumineszenz-Detektion	42
3.5.5	FACS-Analyse	42
3.5.5.1	Untersuchung von Oberflächenproteinen.....	42
3.5.5.2	Untersuchung intrazellulärer Proteine.....	43
3.5.6	Indirekte Immunfluoreszenz	43
3.6	Plasmidkonstruktionen	44
3.6.1	Klonierung der pSG5LMP1-Expressionsplasmide	44
3.6.2	Klonierung des SVBZLF1-Expressionsplasmids.....	45
3.6.3	Klonierung des BZLF1-Promotor/Luziferase-Konstrukts Zp/luc.....	45
4	Ergebnisse.....	46
4.1	LMP1 und aktiviertes CD40 hemmen die Reaktivierung von EBV über die Regulation des unmittelbar frühen Proteins BZLF1	46
4.1.1	LMP1 und aktiviertes CD40 hemmen die Expression des BZLF1-Proteins	46
4.1.2	LMP1 und aktiviertes CD40 erniedrigen die Menge der BZLF1-mRNA	50
4.1.3	LMP1 und konstitutiv aktives CD40 hemmen den BZLF1-Promotor.....	50
4.2	Charakterisierung der Signaltransduktionswege des lytischen Zyklus, die von LMP1 beeinflusst werden	53
4.2.1	LMP1 hemmt die autoregulatorische Aktivierung des BZLF1-Promotors durch das BZLF1-Protein in der Zelllinie Ramos	53
4.2.2	LMP1 hemmt die Aktivierung des BZLF1-Promotors durch TPA und durch das BZLF1-Protein in der Zelllinie 293	56
4.3	Charakterisierung der Signaltransduktionswege von LMP1, die für die Hemmung des lytischen Zyklus verantwortlich sind	57
4.3.1	LMP1 hemmt die Aktivierung des BZLF1-Promotors durch das BZLF1-Protein in der Zelllinie Ramos unabhängig von CTAR1 und CTAR2	57
4.3.2	LMP1 hemmt die Aktivierung der BZLF1-Expression durch anti-IgM in transient transfizierten EREB-Zellen abhängig von CTAR1 und CTAR2	61

4.3.3	LMP1 hemmt die Aktivierung der VCA-Expression durch anti-IgM in stabil transfizierten EREB-Zellen abhängig von CTAR1 und CTAR2	72
4.3.4	Die Hemmung der durch anti-IgM aktivierten BZLF1-Expression in EREB-Zellen ist unabhängig von p38 MAPK und JNK1	77
4.3.5	Die Hemmung der durch anti-IgM aktivierten BZLF1-Expression in EREB-Zellen ist abhängig von NF- κ B	80
4.4	Regulation von latenter und lytischer Phase durch LMP2A.....	82
4.4.1	LMP2A hemmt die Aktivierung der BZLF1-Expression durch anti-IgM in der Zelllinie EREB	82
4.4.2	LMP2A aktiviert die BZLF1-Expression in unstimulierten EREB-Zellen.....	84
4.4.3	LMP2A aktiviert die BZLF1-Expression in unstimulierten Akata- und P3HR1-Zellen.....	87
4.4.4	Die Induktion der BZLF1-Expression durch LMP2A und den aktivierten B-Zell-Rezeptor ist abhängig von ERK1/2	88
4.4.5	Die Induktion der BZLF1-Expression durch LMP2A und den aktivierten B-Zell-Rezeptor wird von LMP1 gehemmt	90
5	Diskussion	92
5.1	Hemmung der Reaktivierung von EBV durch LMP1 und aktiviertes CD40.....	92
5.2	Hemmung der BZLF1-Expression durch LMP1.....	95
5.3	Signaltransduktionswege von LMP1, die für die Hemmung der BZLF1-Expression verantwortlich sind	97
5.4	Bedeutung von LMP2A für die Regulation der Latenz von EBV.....	102
6	Zusammenfassung.....	105
7	Literaturverzeichnis.....	107
Anhang.....		128
Abkürzungsverzeichnis		128
Danksagung		131
Lebenslauf.....		132

1 *Einleitung*

1.1 **Das Epstein-Barr-Virus, ein humanes Herpesvirus**

Das Epstein-Barr-Virus (EBV) ist ein Vertreter der Familie der Herpesviridae. Eine Einteilung in diese Virusfamilie erfolgt aufgrund der Morphologie des Virions. Die Virionen der Herpesviren haben einen Durchmesser von 120 bis 300 nm. Das Virus-Core im Innern der Viruspartikel, das das lineare, doppelsträngige DNA-Genom des Virus enthält, ist von einem ikosaedrischen Kapsid aus 162 Kapsomeren umgeben. Auf das Kapsid folgen nach außen das Tegument aus einer teilweise strukturierten Proteinmatrix und die Hüllmembran mit viralen Glykoproteinen. Eine weitere Gemeinsamkeit der Herpesviren besteht in ihrer lebenslangen, latenten Persistenz im Wirt. Bisher sind neun humanpathogene Herpesviren beschrieben: Herpes-simplex-Virus 1 und -2 (HHV1, -2), Varicella-Zoster-Virus (HHV3), Epstein-Barr-Virus (HHV4), Zytomegalievirus (HHV5), humane Herpesviren 6A, -6B und -7 sowie das Kaposi-Sarkom-assoziierte Herpesvirus (HHV8) (Modrow und Falke, 1998; Roizman und Pellett, 2001).

EBV gehört zur Unterfamilie der γ -Herpesviren und zum Genus der Lymphokryptoviren. Seine Entdeckung ist eng mit der Erforschung des EBV-assoziierten Burkitt-Lymphoms verbunden. Denis Burkitt beschrieb in den 1950er Jahren ein in Äquatorialafrika bei Kindern weit verbreitetes Lymphom, das mit dem Auftreten von Malaria korrelierte, und postulierte eine Infektionskrankheit als Ursache. 1964 gelang es sowohl A. Epstein und Y. Barr als auch R. Pulvertaft, Burkitt-Lymphom-Zellen aus den von Denis Burkitt erhaltenen Tumorbiopsien zu kultivieren (Epstein und Barr, 1964; Pulvertaft, 1964). Noch im selben Jahr konnten A. Epstein, Y. Barr und B. Achong elektronenmikroskopisch Viruspartikel in den kultivierten Burkitt-Lymphom-Zellen nachweisen, die morphologisch zu den Herpesviren gehörten (Epstein *et al.*, 1964). Gertrude und Walter Henle zeigten durch serologische Tests, dass es sich bei dem entdeckten Virus um ein neues humanes Herpesvirus handelte (Henle und Henle, 1966), das nach seinen Entdeckern Epstein-Barr-Virus genannt wurde. 1967/68 wurde erstmals gezeigt, dass humane B-Lymphozyten durch Infektion mit EBV zu unbegrenztem Wachstum angeregt werden können (Henle *et al.*, 1967; Pope *et al.*, 1968). Damit war das erste humane Tumorstoff entdeckt.

1.2 Das EBV-Genom

Das Genom des EBV-Stammes B95-8 war das erste Herpesvirusgenom, das vollständig kloniert (Arrand *et al.*, 1981; Polack *et al.*, 1984; Skare und Strominger, 1980) und sequenziert wurde (Baer *et al.*, 1984). Es besteht aus etwa 172000 Basenpaaren und kodiert für ungefähr 100 Gene. Da die Sequenzierung des EBV-Genoms auf einer Bibliothek aus *Bam*HI-Fragmenten basierte, sind EBV-Gene oft nach dem korrespondierenden *Bam*HI-Fragment benannt, beispielsweise steht BZLF1 für den ersten offenen Leserahmen in linker Orientierung des *Bam*HI-Z-Fragments.

Das Genom besitzt folgende charakteristische Strukturen: An den beiden Genomenden befinden sich 0,5 kb große terminale Repetitionen (TR). Interne Repetitionen aus 6 bis 12 3,1 kb-Einheiten (IR) teilen das Genom in einen kurzen und einen langen „unique“ Abschnitt (U_S und U_L) (Abb. 1). Im Viruspartikel liegt das Genom als lineare doppelsträngige DNA vor. Nach der Infektion zirkularisiert die lineare DNA über die TR-Bereiche und gelangt als episomale DNA in den Zellkern (Kieff und Rickinson, 2001).

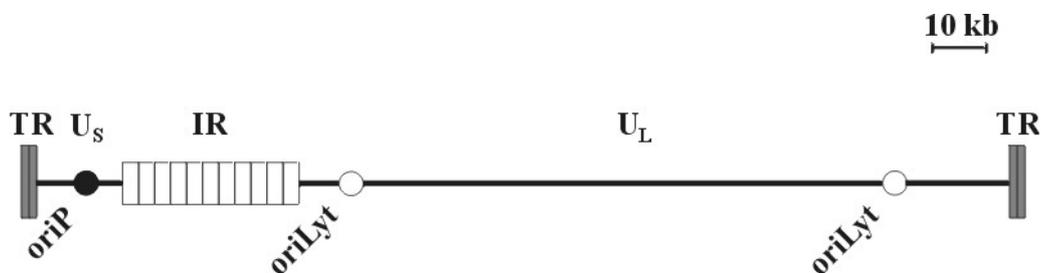


Abbildung 1: Schematische Darstellung der charakteristischen Strukturen des EBV-Genoms.

EBV besitzt zwei funktionell verschiedene Replikationsursprünge, oriP und oriLyt. oriP stellt den Replikationsursprung für die Replikation der viralen DNA in der latenten Phase des Virus dar, die parallel mit der Replikation der DNA der Wirtszelle durch die zelluläre DNA-Polymerase erfolgt (Rawlins *et al.*, 1985; Yates *et al.*, 1984). In der lytischen Phase wird die DNA ausgehend von zwei oriLyt-Replikationsursprüngen repliziert. Diese Replikation verläuft nach dem Mechanismus der σ -Replikation bzw. des „rolling circle“ und benötigt die virale DNA-Polymerase (Hammerschmidt und Sugden, 1988).

Einige Virusstämme tragen *in vitro* erworbene Deletionen. Das P3HR1-Virus weist zum Beispiel eine 6,6 kb große Deletion auf, die Sequenzen betrifft, die für die nukleären Antigene von EBV EBNA2 und zum Teil EBNA-LP („leader protein“) kodieren (Bornkamm *et al.*, 1982). P3HR1 ist nicht mehr in der Lage, B-Zellen zu transformieren.

1.3 Die EBV-Infektion

1.3.1 Die *in vitro* Infektion von B-Zellen

EBV kann *in vitro* primäre humane B-Lymphozyten infizieren. Das Wirtsspektrum für die *in vitro*-Infektion umfasst B-Zellen in allen Entwicklungsstadien von pro-B-Zellen zu Memory-B-Zellen mit Ausnahme der ausdifferenzierten Plasmazellen. Die infizierten B-Zellen werden zu kontinuierlichem Wachstum angeregt. Es entstehen sogenannte lymphoblastoide Zelllinien (LCLs), die unbegrenzt proliferieren (Henle *et al.*, 1967; Pope *et al.*, 1968). LCLs können auch aus B-Lymphozyten des peripheren Bluts eines EBV-seropositiven Donors ohne Zugabe von exogenem Virus auswachsen (Nilsson *et al.*, 1971).

LCLs zeigen einen lymphoblastoiden Phänotyp und ein typisches virales Genexpressionsmuster, das auch Wachstumsprogramm oder Latenz III genannt wird. Die in LCLs exprimierten viralen Gene kodieren für sechs nukleäre Antigene (EBNA1, -2, -3A, -3B, -3C und -LP), drei latente Membranproteine (LMP1, -2A und -2B), zwei kleine, nicht polyadenylierte RNA-Moleküle (EBER1 und -2) und *Bam*HI-Transkripte (BARTs) (Abb. 2). Fünf dieser Gene sind für die Immortalisierung essentiell, EBNA1, -2, -3A, -3C und LMP1 (Cohen *et al.*, 1989; Hammerschmidt und Sugden, 1989; Kaye *et al.*, 1993; Lee *et al.*, 1999; Tomkinson *et al.*, 1993). EBNA-LP und LMP2A/B verbessern lediglich die Immortalisierungseffizienz (Briemeier *et al.*, 1996; Hammerschmidt und Sugden, 1989; Longnecker *et al.*, 1992 und 1993; Mannick *et al.*, 1991), EBNA3B, EBERs und BARTs besitzen keinen Einfluss auf den Immortalisierungsprozess (Robertson *et al.*, 1994; Swaminathan *et al.*, 1991; Tomkinson und Kieff, 1992).

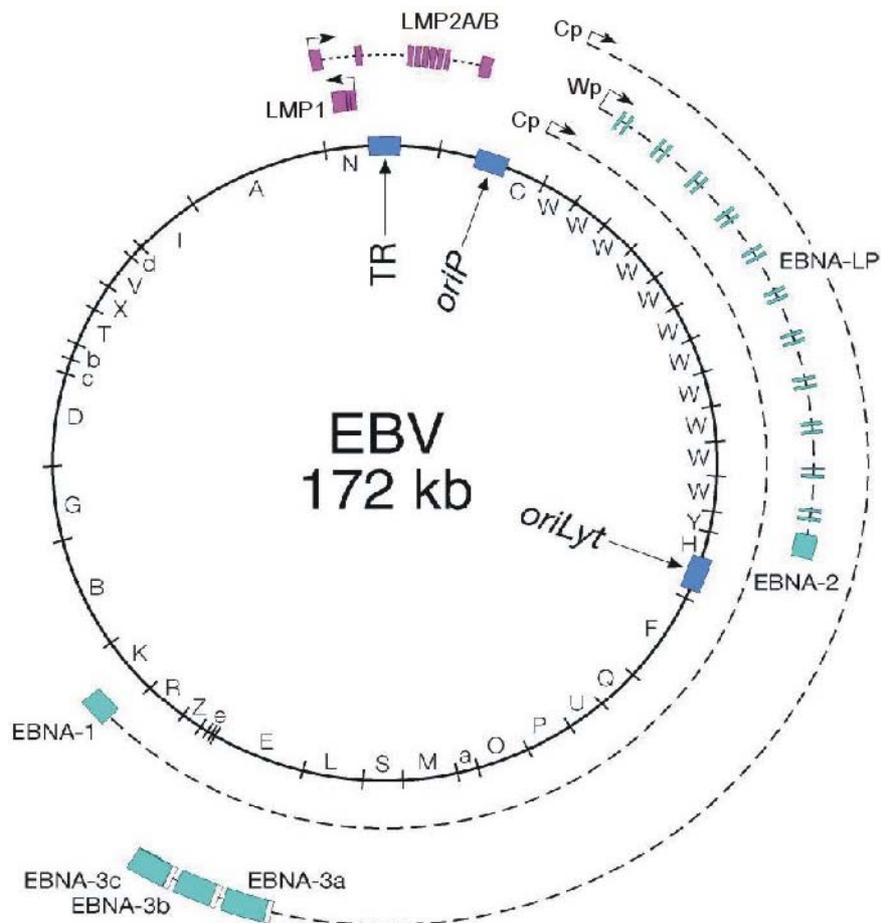


Abbildung 2: Schematische Darstellung des episomalen EBV-Genoms und der viralen Proteine, die in lymphoblastoiden Zelllinien exprimiert werden.

(Zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Wolfgang Hammerschmidt.)

Die Transkription aller EBNA-Gene startet von den Promotoren Wp (Promotor im *Bam*HI-W-Fragment) oder Cp (Promotor im *Bam*HI-C-Fragment). Aus dem bis zu 100 kb langen Primärtranskript entstehen anschließend durch komplexe differentielle Spleißvorgänge die verschiedenen EBNA-Moleküle (Woisetschlaeger *et al.*, 1989 und 1990). EBNA1 ist ein DNA-bindendes Kernprotein, das durch die Bindung an oriP und die Rekrutierung des zellulären „origin recognition complex“ (ORC) die Replikation der viralen DNA vermittelt (Chaudhuri *et al.*, 2001; Dhar *et al.*, 2001; Schepers *et al.*, 2001). Zudem ist es für die korrekte Segregation des episomalen Virusgenoms während der Zellteilung verantwortlich (Aiyar *et al.*, 1998; Rawlins *et al.*, 1985; Yates *et al.*, 1985). EBNA1 zeichnet sich außerdem dadurch aus, dass es durch eine Glycin-Alanin-Wiederholungsdomäne seinen proteasomalen Abbau und damit seine MHC-Klasse I-abhängige Präsentation blockiert, wodurch eine immunogene Wirkung verhindert wird (Levitskaya *et al.*, 1995). EBNA2 ist das erste virale

Protein, das nach der Infektion primärer Zellen exprimiert wird (Allday *et al.*, 1989). Es wirkt als Transaktivator zellulärer und viraler Gene, beispielsweise induziert es die Transkription der B-Zell-Aktivierungsmarker CD21 und CD23 (Calender *et al.*, 1987; Cordier *et al.*, 1990; Wang *et al.*, 1987), der Proto-Onkogene *c-fgr* (Knutson, 1990) und *c-myc* (Kaiser *et al.*, 1999; Kempkes *et al.*, 1995) und der viralen Gene LMP1, LMP2A und -2B (Abbot *et al.*, 1990; Fahraeus *et al.*, 1990a; Wang *et al.*, 1990b; Zimmer-Strobl *et al.*, 1991) sowie den viralen Cp-Promotor (Sung *et al.*, 1991). EBNA2 bindet jedoch nicht direkt an die DNA, sondern wird durch Interaktion mit dem zellulären Transkriptionsfaktor RBP-Jκ (Rekombinationssignal-Bindeprotein-Jκ) an Promotorsequenzen rekrutiert (Grossman *et al.*, 1994; Henkel *et al.*, 1994; Waltzer *et al.*, 1994; Zimmer-Strobl *et al.*, 1994). Alle drei Mitglieder der EBNA3-Familie sind ebenfalls in der Lage, RBP-Jκ zu binden. Damit interferieren die EBNA3-Proteine mit der Komplexbildung von EBNA2 mit RBP-Jκ und können so die Transaktivierung RBP-Jκ-abhängiger Promotoren durch EBNA2 negativ modulieren (Robertson *et al.*, 1995 und 1996).

1.3.2 Die *in vivo* Infektion

Weltweit sind über 90% der Erwachsenen mit EBV infiziert. Das Alter der Primärinfektion liegt in Abhängigkeit von den Lebensbedingungen in Entwicklungsländern deutlich niedriger als in Ländern mit höheren Lebens- und Hygienestandards. Bei Kindern verläuft die Primärinfektion in der Regel asymptomatisch, während Jugendliche und Erwachsene häufig nach einer Inkubationszeit von vier bis sechs Wochen eine Infektiöse Mononukleose (Pfeiffer'sches Drüsenfieber, „kissing disease“) entwickeln. Diese äußert sich in grippeähnlichen Symptomen wie Halsschmerzen, Fieber, Lymphknotenschwellungen und in einem veränderten Blutbild mit ausgeprägter Mononukleose (Henle *et al.*, 1968; Niedermann *et al.*, 1968).

Das Virus wird über den Speichel übertragen (Gerber *et al.*, 1972). Nach der Aufnahme über den Speichel gelangt das Virus zu seinen Zielzellen, den B-Zellen in der Oropharynx-Mucosa (Karajannis *et al.*, 1997). Die Adsorption des Virus an die Wirtszelle erfolgt entweder durch Bindung des viralen Glykoproteins gp350/220 an den zellulären Komplementrezeptor 2 (CR2, CD21), der auf allen unreifen B-Zellen exprimiert ist, oder durch weitere, bisher nicht auf molekularer Ebene identifizierte Ligand-Rezeptor-Paarungen (Fingerroth *et al.*, 1984; Janz

et al., 2000; Nemerow *et al.*, 1987). Nach der Penetration des Virus in die Zelle durch eine rezeptorvermittelte Endozytose löst sich die Kapsidhülle des Virus auf, die freigesetzte lineare DNA zirkularisiert im Zellkern und wird in Chromatin verpackt (Lindahl *et al.*, 1976). Man nimmt an, dass das Virus durch die Einleitung der lytischen Phase in der primär infizierten Zelle und durch die folgende Freisetzung von Viruspartikeln die Infektion einer Vielzahl von zirkulierenden B-Zellen in den Tonsillen erreicht und in diesen Zellen versucht, mit dem Wachstumsprogramm die latente Phase zu etablieren. Die Expression der Latenz III-Gene führt wie in den LCLs zu einer Aktivierung und zur Proliferation der infizierten Zellen (Falk *et al.*, 1990; Robinson *et al.*, 1980; Tierney *et al.*, 1994). Gegen latente Antigene und gegen Antigene des lytischen Zyklus entwickelt das Immunsystem eine zytotoxische T-Zell-Antwort. Die massive Expansion EBV-spezifischer CD8⁺ T-Zellen und die damit verbundene Zytokin-Freisetzung verursachen sowohl das veränderte Blutbild als auch die grippeähnlichen Symptome der Infektiösen Mononukleose. Die zytotoxische T-Zell-Antwort führt aber auch zur Eliminierung der EBV-infizierten, Antigen-präsentierenden Zellen (Rickinson und Moss, 1997). Es wird diskutiert, dass ein Teil der Zellen durch eine stark eingeschränkte Genexpression, der sogenannten Latenz 0, und durch eine damit verbundene Differenzierung zu Memory-B-Zellen der Immunkontrolle entgehen kann (Miyashita *et al.*, 1995 und 1997; Babcock *et al.*, 1998 und 2000). Auf diese Weise erreicht das Virus eine lebenslange Persistenz im Wirt. In diesem Zustand des Gleichgewichts zwischen Virus und Wirt finden sich 1 bis 50 EBV-positive Zellen pro 10⁶ Zellen im peripheren Blut, in denen zwar zum Teil mRNA-Transkripte von LMP2A, aber keine viralen Proteine nachgewiesen werden konnten (Babcock *et al.*, 1998 und 1999; Decker *et al.*, 1996; Miyashita *et al.*, 1997; Qu und Rowe, 1992; Tierney *et al.*, 1994). Durch bisher unbekannte physiologische Stimuli erfolgt von Zeit zu Zeit eine Virusreaktivierung, die zur Freisetzung von Viruspartikeln im Oropharynx-Epithel, zur Ausscheidung über den Speichel und zur weiteren Verbreitung des Virus führt (Yao *et al.*, 1985). Ausnahmefälle, in denen sich kein Gleichgewicht zwischen der Immunabwehr des Wirts und dem Virus einstellen kann, führen zu ernsten Erkrankungen wie chronisch aktiven EBV-Infektionen oder EBV-assoziierten Tumoren.

Neben B-Zellen können auch Epithelzellen mit EBV infiziert werden (Sixbey *et al.*, 1983). Die Infektion von Epithelzellen ist aber für die normale EBV-Infektion *in vivo* wahrscheinlich nicht von Bedeutung (Karajannis *et al.*, 1997; Tao *et al.*, 1995a; Thorley-Lawson *et al.*, 1996). Allerdings stehen einige EBV-assoziierte Tumoren wie das Nasopharynx-Karzinom mit der Infektion von Epithelzellen in Verbindung.

1.3.3 EBV-assoziierte Tumorerkrankungen

Zu den EBV-assoziierten Tumorerkrankungen gehören Tumoren, die sich unter Bedingungen der Immunsuppression entwickeln, sowie das Burkitt-Lymphom, das Hodgkin-Lymphom und das Nasopharynx-Karzinom. Daneben werden zum Teil auch T-Zell-Lymphome und gastrische Tumoren mit EBV in Verbindung gebracht. Die einzelnen Erkrankungen unterscheiden sich untereinander unter anderem in ihrer Korrelation mit EBV und in ihrem viralen Genexpressionsmuster.

Bei immunsupprimierten Personen kann es durch die geschwächte Immunabwehr zu einem Verlust der Wachstumskontrolle EBV-infizierter B-Zellen kommen. So entwickelt sich bei manchen Transplantationspatienten eine lymphoproliferative Erkrankung („post-transplantant lymphoproliferative disease“, PTLD), deren Risiko mit der Stärke der Immunsuppression korreliert (Craig *et al.*, 1993; Nalesnik, 1998). Die unter diesen Bedingungen der Immundefizienz proliferierenden EBV-infizierten B-Zellen zeigen einen lymphoblastoiden Phänotyp, das heißt das virale Genexpressionsmuster Latenz III (Falk *et al.*, 1990; Gratama *et al.*, 1991; Thomas *et al.*, 1990). AIDS-Patienten leiden häufig ebenfalls an einer PTLD-artigen Erkrankung (Freter, 1990; Hamilton-Dutoit *et al.*, 1991) und an einer massiven Virusproduktion in Epithelzellen, die sich in Läsionen des Zungenrandes äußert (Haarleukoplakie, „hairy oral leukoplakia“) (Greenspan *et al.*, 1985). Jungen mit dem genetisch bedingten Purtilo-Syndrom („x-linked lymphoproliferative syndrome“) sterben häufig früh an einer tödlich verlaufenden Infektiösen Mononukleose, da sie nicht in der Lage sind, mit einer funktionalen Immunantwort auf eine EBV-Infektion zu reagieren (Purtilo *et al.*, 1975; Schuster und Kreth, 2000).

Burkitt-Lymphome (BL) treten als endemische, sporadische und AIDS-assoziierte Formen auf. Allen Formen gemeinsam ist eine typische Chromosomentranslokation, die das Proto-Onkogen *c-myc* von Chromosom 8 in einen Immunglobulin-Lokus auf Chromosom 2, 14 oder 22 versetzt und dereguliert (Magrath, 1990). Die endemische Form des BLs tritt vor allem in Äquatorialafrika und in Neuguinea auf und ist dort die häufigste Krebserkrankung bei Kindern. Sie ist zu fast 100% mit EBV assoziiert. Die sporadische und die AIDS-assoziierte Form sind weltweit zu finden und haben eine EBV-Assoziation von 15% bis 20% bzw. 30% bis 40%. In EBV-positiven BL-Zellen werden EBNA1, die EBER- und die BART-Transkripte exprimiert (Latenz I). Allerdings zeigen die meisten aus Tumorbiopsien etablierten BL-Zelllinien nach mehrmaliger Passage *in vitro* einen Übergang von dem in

Einzelzellsuspension wachsenden Latenz I-Typ zu dem in Zellklumpen wachsenden Latenz III-Typ (Rowe *et al.*, 1987). Das Zusammenspiel der *c-myc*-Translokation und der EBV-Infektion in der Entstehung des BLs ist bislang noch nicht aufgeklärt.

Etwa die Hälfte der weltweit auftretenden Hodgkin-Lymphome („Hodgkin’s disease“, HD) sind mit EBV assoziiert. In den malignen Zellen EBV-positiver Tumoren, Hodgkin-Zellen und Reed-Sternberg-Zellen, konnte die Expression von EBNA1, den EBERs und BARTs und von LMP1 und LMP2A/B nachgewiesen werden (Latenz II) (Deacon *et al.*, 1993). Die genaue Rolle von EBV bei der Onkogenese ist jedoch unbekannt.

Das Nasopharynx-Karzinom („nasopharyngeal carcinoma“, NPC), ein epithelialer Tumor des Nasen-Rachen-Raumes, ist die häufigste Krebserkrankung bei Männern in Südostasien. Es ist zu 100% mit EBV assoziiert. Die virale Genexpression gleicht der in Hodgkin-Lymphom-Zellen (Latenz II) (Brooks *et al.*, 1992). Neben der EBV-Infektion spielen wahrscheinlich auch die genetische Prädisposition und Umweltfaktoren bei der Tumorentstehung eine Rolle (Lu *et al.*, 1990; Yu *et al.*, 1986).

1.4 Die Reaktivierung von EBV

1.4.1 Die *in vitro* Reaktivierung

Im Gegensatz zu den übrigen Herpesviren, die *in vitro* lytische Systeme bilden und deren Zellen *in vitro* schwer latent zu infizieren sind, zeigt EBV in Kultur eine sehr stabile latente Infektion (Modrow und Falke, 1998). Es stellt sich hier vielmehr das umgekehrte Problem, nämlich in latent EBV-infizierten Zellen den lytischen Zyklus zu induzieren. LCLs stellen das für die *in vitro*-Untersuchung von EBV am meisten genutzte System dar. Diese Zellen, die das komplette Programm der latenten Gene exprimieren (Latenz III), sind allerdings nicht permissiv für den lytischen Zyklus. Eine spontane Induktion des lytischen Zyklus läuft nur in einem kleinen Teil der Zellen (zwischen null und wenigen Prozent) ab. Auch mithilfe spezieller Kulturbedingungen lässt sich der Anteil permissiver Zellen nur gering erhöhen. In einigen BL-Zelllinien hingegen ist unter diesen Kulturbedingungen eine relativ gute Stimulation des lytischen Zyklus möglich, in Akata-Zellen beispielsweise in immerhin 20% bis zu 50% der Zellen (Takada und Ono, 1989). Dies hängt damit zusammen, dass Akata-

Zellen eine der wenigen Typ I-BL-Zelllinien sind, die auch in Kultur eine stabile Latenz I-Expression zeigen. Typ I-BL-Zelllinien sind das derzeit beste *in vitro*-Modell für die Untersuchung des Wechsels von der latenten zur lytischen Phase.

Häufig *in vitro* verwendete Induktoren des lytischen Zyklus sind Phorbol ester (Hudewentz *et al.*, 1980; Laux *et al.*, 1988; zur Hausen *et al.*, 1978), Butyrat (Luka *et al.*, 1979), Calcium-Ionophore (Faggioni *et al.*, 1986), Immunglobulin-Antikörper (Takada, 1984; Tovey *et al.*, 1978) oder eine Superinfektion mit dem P3HR1-Virus (Henle *et al.*, 1970). Alle diese Induktoren führen zu einer Aktivierung der für die Einleitung der lytischen Phase essentiellen Expression des BZLF1-Proteins und nach einer bestimmten Reihenfolge zur Expression fast aller viraler Gene.

1.4.2 Die *in vivo* Reaktivierung

In vivo persistiert EBV latent in ruhenden Memory-B-Zellen. Da der Eintritt in die lytische Replikation immer mit dem Tod der Zelle einhergeht, ist für die Etablierung der Latenz eine strikte Kontrolle der Virusreaktivierung nötig. Für die Unterdrückung der Reaktivierung während der primären Infektion und in der etablierten latenten Phase kommen sowohl virale Faktoren als auch Wirtsfaktoren infrage. Es konnte gezeigt werden, dass das virale Protein LMP2A den durch anti-Immunglobulin-Antikörper induzierten lytischen Zyklus blockieren kann (Miller *et al.*, 1994). Auch das virale LMP1 und die Aktivierung des CD40-Rezeptors auf B-Zellen durch den CD40-Liganden sind in der Lage, die Induktion des lytischen Zyklus zu hemmen (Adler *et al.*, 2002; Sarawar *et al.*, 2001).

Die physiologischen Stimuli, die *in vivo* zu einer Reaktivierung des Virus führen, kennt man bisher nicht. In gesunden Personen lässt sich in Zellen des peripheren Bluts keine lytische Replikation des Virus detektieren (Decker *et al.*, 1996). Die zur Sicherung der lebenslangen Virusinfektion notwendige Reaktivierung und Neuinfektion von B-Zellen findet wahrscheinlich in den Tonsillen statt (Babcock *et al.*, 1998; Joseph *et al.*, 2000).

1.5 Das „unmittelbar frühe“ Genprodukt BZLF1

1.5.1 Das BZLF1-Protein

Das Genprodukt des BZLF1-Gens (*Bam*HI *Z* fragment leftward open reading frame number 1) ist in der Literatur unter den Namen BZLF1, ZEBRA (*Bam*HI *Z* Epstein-Barr virus replication activator), EB1, Z und Zta beschrieben. Im folgenden wird es BZLF1 genannt.

Die Einleitung der Virusvermehrung geht mit einer Aktivierung der viralen Genexpression einher. Es konnte gezeigt werden, dass die Transkription der viralen BRLF1- (*Bam*HI *R* fragment leftward open reading frame number 1) und BZLF1-Gene nach der Induktion des lytischen Zyklus unabhängig von der Gegenwart von Inhibitoren der Proteinsynthese wie Anisomycin und Cycloheximid stattfindet (Biggin *et al.*, 1987; Takada und Ono, 1989). Bei BRLF1 und BZLF1 handelt es sich somit um unmittelbar frühe Gene („immediate-early genes“) von EBV, deren Expression ohne zwischengeschaltete Faktoren direkt induziert werden kann. Es stellte sich außerdem heraus, dass alleine die Expression von BZLF1 notwendig und ausreichend für die Induktion des lytischen Zyklus ist (Chevallier-Greco *et al.*, 1986; Countryman und Miller, 1985; Takada *et al.*, 1986).

Das BZLF1-Protein besteht aus einer aminoterminalen Transaktivierungsdomäne (AS 1-167), einer DNA-Bindedomäne (AS 168-203) und einer carboxyterminalen Dimerisierungsdomäne (AS 204-245) (Flemington *et al.*, 1992; Kouzarides *et al.*, 1991; Packham *et al.*, 1990). Es gehört wie c-Jun und c-Fos zur bZip-Familie („basic leucine zipper“) von Transkriptionsfaktoren und bindet als Homodimer an sogenannte ZEBRA-responsive Elemente (ZREs) in den Promotoren von Zielgenen und in der oriLyt-Region des EBV-Genoms (Farrell *et al.*, 1989; Flemington und Speck, 1990a; Kouzarides *et al.*, 1991; Lieberman *et al.*, 1990; Urier *et al.*, 1989). Durch seine Assoziation mit dem generellen Transkriptionsfaktor TFIID und mit dem Transkriptionsregulator CREB-Bindeprotein (CBP) kann das BZLF1-Protein die Transkription zellulärer und viraler Gene anschalten und so das sequentielle lytische Expressionsprogramm des Virus einleiten (Adamson und Kenney, 1999; Lieberman und Berk, 1991). Zum andern kann das BZLF1-Protein die lytische Replikation des Virus starten, indem es die virale Primase und andere Faktoren der viralen DNA-Polymerase bindet und zu oriLyt rekrutiert (Schepers *et al.*, 1993; Zeng *et al.*, 1997).

Im latenten Zustand unterliegt die BZLF1-Aktivität einer strengen Kontrolle durch zelluläre Faktoren. Die konstitutive, niedrige Expression einer NO-Synthase (iNOS) blockiert die BZLF1-Expression und fördert die Aufrechterhaltung der Latenz (Mannick *et al.*, 1994). Desgleichen halten Histon-Deacetylasen (Gruffat *et al.*, 2002; Jenkins *et al.*, 2000) und negative Elemente („silencing“-Elemente) des BZLF1-Promotors (Kraus *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 1998; Montalvo *et al.*, 1991; Schwarzmann *et al.*, 1994; Zhang *et al.*, 1999) das Gen im ruhenden Status. In Kotransfektionsexperimenten konnte außerdem mittels Immunpräzipitation eine direkte Interaktion von BZLF1 mit p53 und der p65-Untereinheit von NF- κ B (nukleärer Faktor- κ B) und mittels Promotorstudien eine Inaktivierung des BZLF1-Proteins durch diese beiden Proteine nachgewiesen werden (Gutsch *et al.*, 1994; Zhang *et al.*, 1994).

1.5.2 Der BZLF1-Promotor

Die Transkription des BZLF1-Proteins kann an zwei benachbarten Promotoren gestartet werden. Der proximale BZLF1-Promotor (Zp) liefert ein 1,0 kb langes, monozistronisches BZLF1-Transkript, der distale BRLF1/BZLF1-Promotor (Rp) liefert ein 2,8 kb langes, bizistronisches BRLF1/BZLF1-Transkript (Biggin *et al.*, 1987) (Abb. 3).

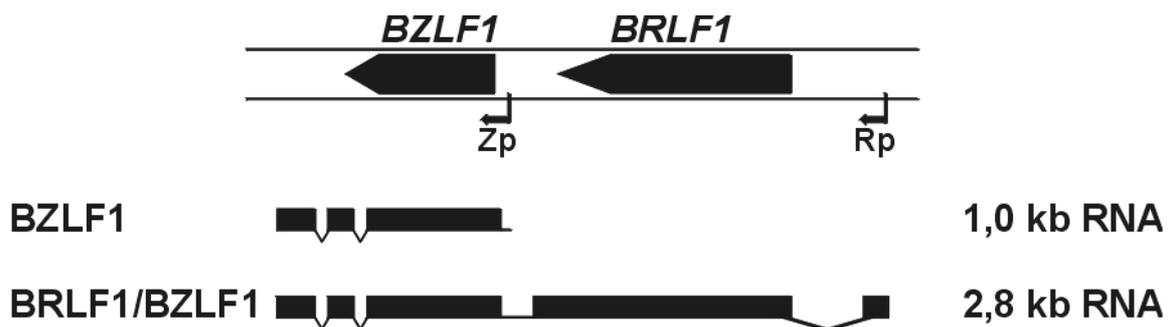


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Transkription des BZLF1-Gens.

Die Aktivierung eines der beiden Promotoren führt unmittelbar zur Aktivierung des anderen Promotors. Das BZLF1-Protein kann den Rp-Promotor über darin enthaltene ZREs direkt anschalten (Sinclair *et al.*, 1991), das BRLF1-Protein kann den Zp-Promotor über zwischen-

geschaltete Signaltransduktionswege indirekt aktivieren (Adamson *et al.*, 2000). Bei der Induktion des lytischen Zyklus geht wahrscheinlich eine Aktivierung von Zp der Aktivierung von Rp voraus.

Der Zp-Promotor besitzt eine sehr niedrige basale Aktivität, die durch Induktoren des lytischen Zyklus stark erhöht werden kann. Die Region von -221 bis +12 von Zp enthält die für die niedrige Basalaktivität und für die hohe Induzierbarkeit nötigen cis-Elemente (Abb. 4). In dieser Region wurden drei verschiedene positive Elemente identifiziert: Vier ZI-Elemente (ZIA-D), die mit unterschiedlicher Affinität die zellulären Transkriptionsfaktoren Sp1/3 und MEF2D binden; ein ZII-Element, das Homologie zur CRE/AP-1-Bindestelle besitzt und ATF1/2, CREB und c-Jun bindet; und zwei ZIII-Elemente (ZIIIA,B), die als ZREs das BZLF1-Protein binden (Liu *et al.*, 1997a, b und 1998; Flemington und Speck, 1990a und b; Urien *et al.*, 1989; Wang *et al.*, 1997).

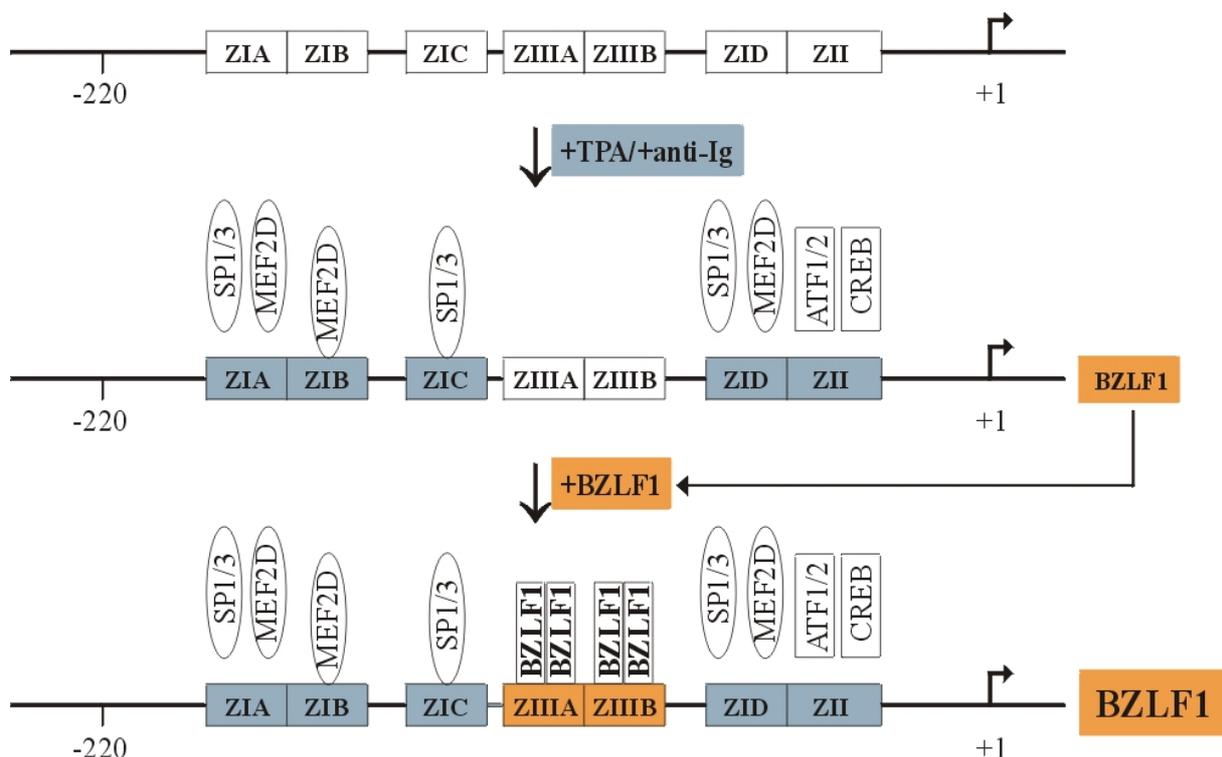


Abbildung 4: Schematische Darstellung des BZLF1-Promotors im Bereich von -221 bis +12 und des zwei-Schritt-Modells der Promotoraktivierung.

Daneben sind auch negative Elemente in Zp charakterisiert: ZIIR (-77 bis -70); ZIV (-551 bis -386); ZV (-17 bis -12); eine Spbp-2-Bindestelle (-93 bis -79); und fünf HI-Elemente (viermal zwischen -551 und -227, einmal von -60 bis -53) (Kraus *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 1998; Montalvo *et al.*, 1991; Schwarzmann *et al.*, 1994; Zhang *et al.*, 1999).

Für die Aktivierung des BZLF1-Promotors ist ein zwei-Schritt-Modell postuliert worden (Flemington und Speck, 1990a; Flemington *et al.*, 1991) (Abb. 4): Zunächst induzieren exogene Faktoren wie TPA und anti-Immunglobulin-Antikörper über responsive Elemente des Promotors (ZI, ZII) eine schwache BZLF1-Expression. Übersteigt die produzierte Menge an BZLF1-Protein eine kritische Konzentration, führt die Autoaktivierung des Promotors über ZREs (ZIII) zu einer starken Expression des BZLF1-Proteins. Durch die Einführung eines bestimmten Schwellenwertes der BZLF1-Konzentration und durch den positiven Rückkopplungsmechanismus sichert das Virus unter nicht stimulatorischen Bedingungen die Latenz und unter stimulatorischen Bedingungen einen effizienten lytischen Replikationszyklus.

1.6 Das Latente Membranprotein 1 (LMP1)

1.6.1 LMP1, ein Onkogen

Das immortalisierende Potential von EBV wird zu einem wesentlichen Anteil LMP1 zugeschrieben. *In vitro* ist die konstitutive Expression von LMP1 für die Transformation von B-Zellen und für die Proliferation EBV-immortalisierter B-Zellen essentiell (Kaye *et al.*, 1993; Kilger *et al.*, 1998); *in vivo* kann in vielen EBV-assoziierten Tumoren die Expression von LMP1 nachgewiesen werden (Rickinson und Kieff, 2001). Für die onkogene Wirkung von LMP1 spricht auch, dass die exogene LMP1-Expression in Nagerfibroblasten zur Transformation der Zellen, in transgenen Mäusen zur Entwicklung von B-Zell-Lymphomen und in Epithelzellen zur Inhibition der normalen Zelldifferenzierung führt (Dawson *et al.*, 1990; Fahraeus *et al.*, 1990b; Kulwichit *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1985 und 1988a). Der onkogene Effekt von LMP1 kann auf wachstumsfaktorähnliche, mitogene Effekte sowie auf die Aktivierung antiapoptotischer Gene wie *bcl-2* und *A20* zurückgeführt werden (Kaye *et al.*, 1995; Laherty *et al.*, 1992; Rowe *et al.*, 1994). Daneben induziert LMP1 die Expression von B-Zell-Aktivierungsmarkern wie CD21, CD23, CD39, CD40, CD44 und MHC-Klasse II-

Molekülen, der Zelladhäsionsmoleküle LFA-1, LFA-3 und ICAM-1 und der Zytokine IL-6, IL-8 und IL-10 (Eliopoulos *et al.*, 1997 und 1999; Nakagomi *et al.*, 1994; Peng und Lundgren, 1992; Vockerodt *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 1988b und 1990a).

Die Expressionsstärke von LMP1 unterliegt einer genauen Regulation, indem LMP1 in hohen Konzentrationen seine proliferationsfördernde Eigenschaft verliert, die allgemeine Proteinsynthese inhibiert und zytostatisch wirkt (Hammerschmidt *et al.*, 1989; Kaykas und Sugden, 2000; Sandberg *et al.*, 2000). Der Ubiquitin-abhängige Abbau von LMP1 erfolgt nach einer relativ kurzen Halbwertszeit von 1,5 bis 7,0 Stunden im Proteasom (Aviel *et al.*, 2000; Baichwal und Sugden, 1987; Mann und Thorley-Lawson, 1987; Martin und Sugden, 1991).

1.6.2 Struktureller Aufbau von LMP1

LMP1 mit einem scheinbaren Molekulargewicht von 63 kD besteht aus einem zyttoplasmatischen Aminoterminus (AS 1-24), sechs hydrophoben Transmembrandomänen (AS 25-186) und einem zyttoplasmatischen Carboxyterminus (AS 187-386) (Fennewald *et al.*, 1984; Hennessy *et al.*, 1984; Liebowitz *et al.*, 1986) (Abb. 5).

Der Aminoterminus ist für die korrekte Insertion des Moleküls in die Plasmamembran, für die Lokalisation in sphingolipid- und cholesterolreichen Membrandomänen („lipid rafts“) und für die Assoziation mit dem Zytoskelett verantwortlich (Coffin *et al.*, 2001; Izumi *et al.*, 1994; Liebowitz *et al.*, 1987; Rothenberger *et al.*, 2002). Die Transmembrandomänen von LMP1 vermitteln eine ligandenunabhängige, spontane Autoaggregation von LMP1 in der Plasmamembran, die nötige und ausreichende Voraussetzung, um in der carboxyterminalen Domäne Signaltransduktionsvorgänge auszulösen. LMP1 entspricht damit funktional einem konstitutiv aktiven Rezeptor (Floettmann und Rowe, 1997; Gires *et al.*, 1997; Liebowitz *et al.*, 1986). Der Carboxyterminus von LMP1 enthält zwei sogenannte C-terminale Transaktivierungsdomänen (CTAR1 und -2), die als Plattform für die Bindung von Adaptorproteinen verschiedener Signaltransduktionsketten dienen und die Aktivierung der NF- κ B-, p38 MAPK (p38 Mitogen-aktivierte Proteinkinase)- und JNK1 (c-Jun N-terminale Kinase 1)-Signaltransduktionswege vermitteln. CTAR1 und -2 kooperieren in der Induktion von NF- κ B und p38 MAPK, wobei etwa 70% der NF- κ B-Aktivität auf CTAR2 und etwa 30% auf CTAR1 zurückzuführen sind (Eliopoulos *et al.*, 1999; Huen *et al.*, 1995; Mitchell und Sugden, 1995;

Vockerodt *et al.*, 2001). Die Induktion von JNK1 durch LMP1 erfolgt ausgehend von der CTAR2-Domäne (Eliopoulos und Young, 1998; Kieser *et al.*, 1997).

CTAR1 bindet über das Konsensusmotiv PxQxT (AS 204-208) die Adaptorproteine TRAF1, -2, -3 und -5 (Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor-assoziierte Faktoren), CTAR2 interagiert mit den Adaptorproteinen RIP (Rezeptor-interagierendes Protein) und über die Aminosäuren 384 bis 386 mit TRADD (Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor-assoziiertes „death domain“ Protein) (Brodeur *et al.*, 1997; Devergne *et al.*, 1996; Izumi und Kieff, 1997; Izumi *et al.*, 1999; Kieser *et al.*, 1999; Mosialos *et al.*, 1995; Sandberg *et al.*, 1997). Die Funktion der verschiedenen Adaptorproteine in der Signaltransduktion von LMP1 ist trotz intensiver Untersuchungen noch nicht vollständig aufgeklärt. Die Aktivierung von NF- κ B und p38 MAPK sowohl durch CTAR1 als auch durch CTAR2 ist von TRAF2 abhängig, das einerseits mit CTAR1 und andererseits mit dem an CTAR2 gebundenen TRADD interagiert (Izumi und Kieff, 1997; Kaye *et al.*, 1996). TRAF2 vermittelt über die Aktivierung von NIK (NF- κ B induzierende Kinase) die Phosphorylierung von IKK (I- κ B-Kinase), den Abbau von I- κ B und somit die Aktivierung von NF- κ B (Sylla *et al.*, 1998); in einem TRAF6- und MKK6 (MAPK Kinase 6)-abhängigen Signaltransduktionsweg führt TRAF2 außerdem zur Aktivierung der p38 MAPK und damit des Transkriptionsfaktors ATF-2 (Eliopoulos *et al.*, 1999; Schultheiss *et al.*, 2001). Unabhängig von bisher identifizierten Adaptorproteinen kann CTAR2 über die JNK-Aktivierungsdomäne (AS 379-384) in einem SEK1-vermittelten Signalweg JNK1 und damit den Transkriptionsfaktor AP-1 (Aktivatorprotein-1) aktivieren (Kieser *et al.*, 1997 und 1999) (Abb. 5).

Zwei häufig für Untersuchungen von LMP1 *in vitro* verwendete Mutationen betreffen das PxQxT-Motiv in CTAR1, das für die direkte Assoziation von LMP1 mit TRAF1, -2, -3 und -5 essentiell ist, und die Aminosäure Tyrosin 384, die die Interaktion von LMP1 mit TRADD vermittelt, sowie essentieller Bestandteil der JNK1-Aktivierungsregion ist. So verliert LMP1 im Falle einer Mutation des PxQxT-Motivs einen Teil seiner NF- κ B- und p38 MAPK-Aktivierungskapazität und im Falle einer Punktmutation des Tyrosin 384 neben einem Teil der NF- κ B- und p38 MAPK-Aktivität auch die komplette JNK1-Aktivität. Die Doppelmutation von CTAR1 und CTAR2 bedeutet einen vollständigen Verlust der NF- κ B-, p38 MAPK- und JNK1-Induktion durch LMP1 (Abb. 5).

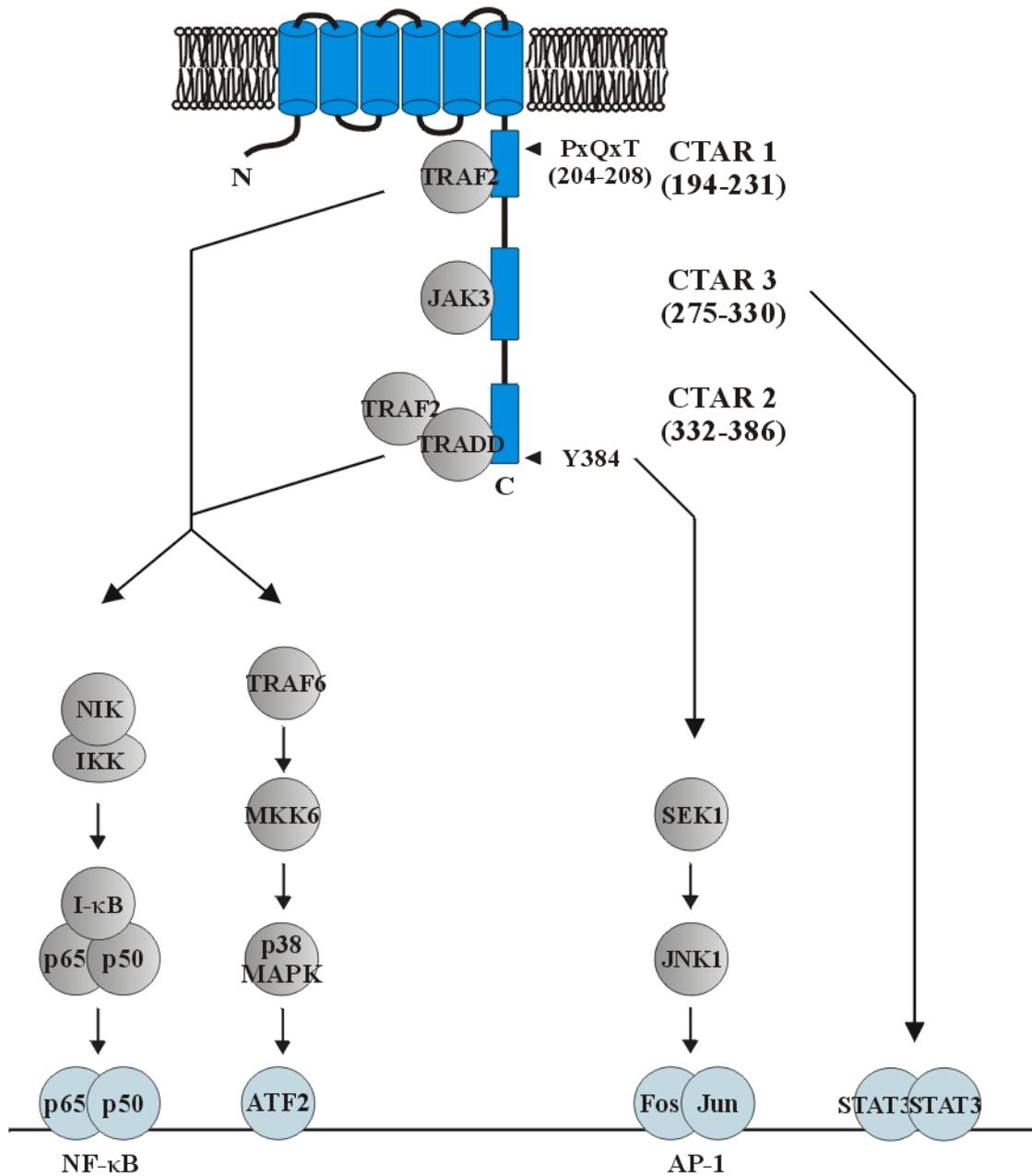


Abbildung 5: Schematische Darstellung des LMP1-Moleküls mit Signaldomänen und induzierten Signalwegen.

Neben NF-κB, p38 MAPK und JNK1 aktiviert LMP1 wahrscheinlich einen weiteren Signaltransduktionsweg, nämlich über JAK3 (Janus Kinase 3) den Transkriptionsfaktor STAT3 („signal transducer and activator of transcription 3“) (Gires *et al.*, 1999). Ob die Aktivierung von STAT3 allerdings tatsächlich von der postulierten dritten C-terminalen Transaktivierungsdomäne (CTAR3, AS 275-330) vermittelt wird, erscheint derzeit eher fragwürdig (Gires *et al.*, 1999; Higuchi *et al.*, 2002).

1.6.3 Vergleich von LMP1 mit CD40

LMP1 teilt viele Eigenschaften mit dem aktivierten zellulären CD40-Molekül. CD40, ein Mitglied der Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor-Familie (TNFR), ist auf Antigen-präsentierenden Zellen wie B-Zellen exprimiert (Clark und Ledbetter, 1986; Paulie *et al.*, 1985). Seine Aktivierung erfolgt durch Bindung des trimeren CD40-Liganden (CD40L) auf der Oberfläche von aktivierten T-Zellen (Noelle *et al.*, 1992). Die CD40-CD40L-Wechselwirkung ist essentiell für eine funktionale Immunantwort.

LMP1 und aktiviertes CD40 führen in B-Zellen zu einem ähnlichen Phänotyp. Beide induzieren die Expression von B-Zell-Aktivierungsmarkern (Goldstein und Watts, 1996; Kennedy *et al.*, 1994), Zelladhäsionsmolekülen (Barrett *et al.*, 1991) sowie der Zytokine IL-6 und IL-10 (Grammer *et al.*, 1998; Schultze *et al.*, 1999) und schützen vor Apoptose (Holder *et al.*, 1993; Sarma *et al.*, 1995). Daneben verlängert die Expression von exogenem LMP1 wie die Kokultivierung mit CD40L exprimierenden Zellen die Überlebensdauer und den Zeitraum der DNA-Synthese von B-Zellen (Zimmer-Strobl *et al.*, 1996). Außerdem kann CD40 zwar das LMP1-Protein nicht bei dem Transformationsprozess ersetzen, aber anschließend die essentielle Rolle von LMP1 für die Proliferation EBV-immortalisierter B-Zellen übernehmen (Kilger *et al.*, 1998). Auch LMP1 kann in CD40^{-/-}-Mäusen, die LMP1 in B-Zellen als Transgen exprimieren, die Funktionen von CD40 in der B-Zellaktivierung nur teilweise übernehmen (Uchida *et al.*, 1999). Die extrafollikuläre B-Zelldifferenzierung kann durch LMP1 zwar wiederhergestellt werden, aber die Bildung funktionaler Keimzentren, in denen die abschließende B-Zelldifferenzierung stattfindet, bleibt auch in Gegenwart von LMP1 blockiert.

Die Gemeinsamkeiten und Unterschiede der phänotypischen Effekte von LMP1 und CD40 spiegeln sich teilweise auf der Ebene der Signaltransduktion wider. Beide Moleküle besitzen keine intrinsische Enzymaktivität, sind aber in der Lage, die NF-κB-, p38 MAPK- und JNK1-Signalwege zu aktivieren (Lalmanach-Girard *et al.*, 1993; Sakata *et al.*, 1995; Sutherland *et al.*, 1996). Im Gegensatz zu LMP1 gilt die Aktivierung des JAK3-Signalweges durch CD40 als sicher (Hanissian und Geha, 1997). Obwohl die Aminosäuresequenzen nur einen geringen Prozentsatz an Identität aufweisen, binden beide Moleküle TRAFs: LMP1 und CD40 binden über ihre PxQxT-Motive TRAF1, -2, -3 und -5; CD40 ist allerdings über das Konsensusmotiv QxPxExxE/F direkt mit TRAF6 assoziiert, während LMP1 über TRAF2 indirekt mit TRAF6

interagiert (Cheng *et al.*, 1995; Hu *et al.*, 1994; Ishida *et al.*, 1996; Pullen *et al.*, 1998 und 1999; Sato *et al.*, 1995). Dagegen ist nur LMP1 in der Lage, die Adaptorproteine TRADD und RIP zu binden.

1.7 Das Latente Membranprotein 2A (LMP2A)

1.7.1 Struktureller Aufbau von LMP2A

Die Latenten Membranproteine 2A und -2B von EBV, auch terminale Proteine 1 und -2 (TP1, -2) genannt, unterscheiden sich nur im ersten von acht Exons voneinander. Die gemeinsamen Exons kodieren für einen Transmembranbereich aus 12 hydrophoben Transmembrandomänen und einen zytoplasmatischen Carboxyterminus aus 27 Aminosäuren. Das erste Exon von LMP2A kodiert für einen 119 Aminosäuren langen zytoplasmatischen Aminoterminus, dem ersten Exon von LMP2B fehlt hingegen ein Methionin-Startkodon, so dass die Translation von LMP2B am Methionin zu Beginn des gemeinsamen zweiten Exons startet (Longnecker und Kieff, 1990).

In der Zelle unterliegt LMP2A einer starken Phosphorylierung an den acht Tyrosin-Resten der N-terminalen Domäne. Jedes dieser Tyrosine liegt in einer potentiellen Bindestelle zellulärer Proteine, die die Src-Homologie-Domäne 2 (SH2) enthalten (Longnecker *et al.*, 1991). Lyn und Fyn, Phosphotyrosinkinasen der Src-Familie (Src-PTKs), interagieren beispielsweise mit Y112, die Syk-PTK bindet an Y74 und Y85, die zusammen ein sogenanntes Immunorezeptor-Tyrosin-basiertes Aktivierungsmotiv (ITAM, (YxxL/I)₂) bilden (Burkhardt *et al.*, 1992; Fruehling und Longnecker, 1997; Fruehling *et al.*, 1998) (Abb. 6).

LMP2A lagert sich in Sphingolipid- und Cholesterol-reichen Mikrodomänen der Zytoplasmamembran („lipid rafts“) zu Oligomeren zusammen, die mit LMP1-Oligomeren kolokalisieren (Higuchi *et al.*, 2001; Longnecker und Kieff, 1990).

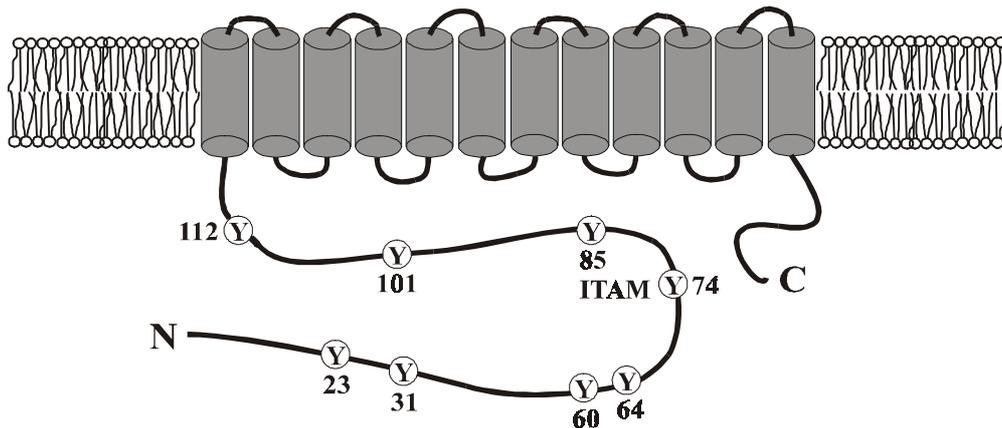


Abbildung 6: Schematische Darstellung von LMP2A.

1.7.2 LMP2A und der B-Zell-Rezeptor

ITAM-Motive, wie sie auch LMP2A enthält, sind aus den zyttoplasmatischen Domänen von Antigen-Rezeptoren bekannt (Reth, 1989). Die Bindung von multivalentem Antigen an den B-Zell-Rezeptor löst zum Beispiel eine Oligomerisierung des Rezeptors und eine damit verbundene Phosphorylierung der ITAM-Tyrosine aus, die daraufhin PTKs rekrutieren und eine Reihe nachfolgender Signalwege induzieren (Cambier, 1995).

Mithilfe eines chimären Moleküls aus dem extrazellulären Teil und dem Transmembranteil von CD8 und dem N-terminalen, zyttoplasmatischen Teil von LMP2A konnte gezeigt werden, dass oligomerisiertes LMP2A abhängig von einem funktionalen ITAM die Expression von Zytokinen und die Freisetzung von Calcium aus dem endoplasmatischen Retikulum induzieren kann (Alber *et al.*, 1993; Beaufils *et al.*, 1993). Einen weiteren Hinweis für B-Zell-Rezeptor-ähnliche LMP2A-Signale lieferten transgene Mäuse mit einer B-Zell-spezifischen LMP2A-Expression. In diesen Mäusen führt die Expression von LMP2A zu der Umgehung eines wichtigen Kontrollpunktes der B-Zell-Entwicklung, das heißt, LMP2A kann den B-Zell-Rezeptor ligandenunabhängig partiell substituieren (Caldwell *et al.*, 1998).

Andererseits kann LMP2A in LCLs mit der Stimulation des B-Zell-Rezeptors interferieren. In Gegenwart von LMP2A ist die Calcium-Mobilisierung und die Reaktivierung von EBV durch Immunglobulin-Antikörper blockiert (Miller *et al.*, 1993 und 1994). Dieser Effekt beruht unter anderem auf einer dominant-negativen Wirkung von LMP2A auf die PTKs, die, einmal

an LMP2A gebunden, nicht mehr für den aktivierten B-Zell-Rezeptor zur Verfügung stehen (Miller *et al.*, 1995). Daneben resultiert die Assoziation von LMP2A mit Ubiquitin-Ligasen der Nedd4-Familie in einem Abbau der gleichzeitig an LMP2A gebundenen PTKs (Ikeda *et al.*, 2000). Schließlich blockiert die Anwesenheit von LMP2A in den „lipid rafts“ die Antigen-induzierte Translokation des B-Zell-Rezeptors in diese Bereiche der Plasmamembran (Dykstra *et al.*, 2001). Im Gegensatz zu LCLs kann die Inhibition des durch Immunglobulin-Antikörper induzierten lytischen Zyklus durch LMP2A in Akata-Zellen mit niedriger LMP2A-Expression nicht beobachtet werden (Konishi *et al.*, 2001). Die Konzentration von LMP2A muss also eine bestimmte Höhe übersteigen, um einen konstitutiv desensibilisierenden Effekt auf die Stimulierbarkeit des B-Zell-Rezeptors ausüben zu können.

1.8 Fragestellung der Arbeit

In gesunden Personen unterliegt die Reaktivierung der lebenslang latent persistierenden Herpesviren einer strikten Kontrolle durch das Immunsystem. Immundefiziente Personen hingegen tragen ein erhöhtes Risiko, mit der Reaktivierung von Herpesviren verbundene Krankheiten zu entwickeln. Das Zytomegalievirus (CMV) beispielsweise verursacht bei immungeschwächten Personen zum Teil letale Entzündungserkrankungen in mehreren Organen. EBV kann bei Immunschwäche die Ursache von Tumorerkrankungen sein. Die Kontrolle der Latenz der Herpesviren ist demnach für immunsupprimierte Patienten von großer klinischer Bedeutung. Andererseits ist auch eine gezielte Reaktivierung von EBV bei EBV-assoziierten Tumorerkrankungen wie dem Hodgkin-Lymphom und dem Nasopharynx-Karzinom, die nicht mit einer Immunsuppression korrelieren, klinisch interessant, da durch Reaktivierung und Lyse das EBV-infizierte, transformierte Tumorgewebe eliminiert werden könnte. Für EBV konnte gezeigt werden, dass die Virusreaktivierung durch verschiedene Faktoren blockiert werden kann. Die viralen Proteine LMP1 und LMP2A sowie der zelluläre aktivierte CD40-Rezeptor sind in der Lage, die Induktion der lytischen Phase zu hemmen (Miller *et al.*, 1994; Adler *et al.*, 2002). Ausgehend von diesem Befund soll in dem bereits etablierten Zellkultursystem der EREB-Zellen die Regulation der Reaktivierung weiter untersucht werden (Kempkes *et al.*, 1995). Die Aufklärung der an der Hemmung des lytischen Zyklus beteiligten Signalwege wäre sowohl für die Aufrechterhaltung der Latenz als auch für die gezielte Reaktivierung zur Behandlung der verschiedenen EBV-assoziierten Erkrankungen sehr hilfreich.

In der vorliegenden Arbeit sollen erstens die Signaltransduktionswege, die bei der Kontrolle der Latenz durch LMP1 und CD40 eine Rolle spielen, charakterisiert werden. Es muss zunächst geklärt werden, mit welchem Schritt der Expressionskaskade des lytischen Zyklus LMP1 und CD40 interferieren. Daneben muss die Frage beantwortet werden, welche der von LMP1 und CD40 angeschalteten Signalwege für diesen Einfluss auf die Induktion des lytischen Zyklus verantwortlich sind. Dazu sollen LMP1-Mutanten und chemische Inhibitoren verwendet werden, die den Ablauf spezifischer Signalwege unterbinden.

Zweitens soll die Wirkung von LMP2A auf ruhende B-Zellen untersucht werden. Es soll analysiert werden, ob LMP2A auch in dem verwendeten EREB-System die Induktion des lytischen Zyklus hemmt und ob LMP2A auch unter nicht stimulatorischen Bedingungen einen Effekt auf die Zellen besitzt.

2 *Material*

2.1 **Zelllinien**

Die konditional lymphoblastoiden Zelllinien EREB2-1, EREB2-5, pHEBo-1A, SVLMP1-11C und SVLMP1-13C:

EREB-Zellen stammen von primären, peripheren B-Lymphozyten ab, die mit dem EBV-Stamm P3HR1 infiziert wurden. Durch Komplementation des EBNA2- und transformationsdefizienten P3HR1-Virus mit einem Fusionsprotein aus der Hormonbindedomäne des Östrogenrezeptors und EBNA2 (ER/EB) wurden Östrogen-abhängige B-Zelllinien etabliert (Kempkes *et al.*, 1995). EREB2-1 und EREB2-5 stellen zwei der erhaltenen Zellklone dar. In Gegenwart von Östrogen exprimieren diese Zellen EBNA2 und EBNA2-abhängige Gene und proliferieren. Sie zeigen einen Phänotyp wie *in vitro* EBV-immortalisierte lymphoblastoide Zelllinien. Nach Östrogen-Entzug, der mit einem Abschalten von EBNA2 verbunden ist, gehen die Zellen in einen ruhenden Zustand über, der eher mit latent EBV-infizierten Zellen *in vivo* als mit LCLs vergleichbar ist.

pHEBo-1A, SVLMP1-11C und SVLMP1-13C sind aus der stabilen Transfektion von EREB2-5-Zellen mit den Plasmiden pHEBo bzw. SVLMP1 hervorgegangen (Zimmer-Strobl *et al.*, 1996). SVLMP1-11C und SVLMP1-13C zeigen unter Hygromycin-Selektion unabhängig von Östrogen eine konstitutive Expression des LMP1-Proteins.

Die Burkitt-Lymphom-Zelllinien Akata, P3HR1 und Ramos:

Die EBV-positive Zelllinie Akata gehört zu den Typ I-BL-Zelllinien, die in Kultur ein stabiles Latenz I-Genexpressionsmuster zeigen (Takada *et al.*, 1991).

Die Zelllinie P3HR1 wurde aus einem EBV-positiven BL etabliert. Das P3HR1-Virus hat *in vitro* eine Deletion erworben, die das EBNA2-Gen sowie Teile des EBNA-LP-Gens betrifft (Bornkamm *et al.*, 1982; Hinuma *et al.*, 1967).

Bei der Zelllinie Ramos handelt es sich um eine EBV-negative BL-Zelllinie (Klein *et al.*, 1975). Sie wurde von Samuel Speck aus St. Louis/MO/USA erhalten.

Die Zelllinie B95-8:

B95-8-Zellen wurden durch Infektion von B-Zellen eines Krallenaffen („marmoset monkey“) mit EBV von einer Person mit Infektiöser Mononukleose etabliert (Miller *et al.*, 1972).

Die Zelllinie 293:

293-Zellen sind embryonale, humane Epithelzellen aus der Niere, die mit Adenovirus Typ 5-DNA transformiert wurden (Graham *et al.*, 1977). Sie wurden von Arnd Kieser zur Verfügung gestellt.

Die Zelllinien LTK⁻ und CD40L:

Die Zelllinie CD40L ist aus der Maus-Fibroblasten-Zelllinie LTK⁻ durch stabile Transfektion mit einem Expressionsvektor für den humanen CD40-Liganden hervorgegangen (Banchereau *et al.*, 1994).

Bis auf die Zelllinien Ramos und 293 standen die beschriebenen Zelllinien in der Arbeitsgruppe Bornkamm zur Verfügung.

2.2 Bakterienstämme

Der Bakterienstamm *E.coli* XLI-Blue (*supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46 thi relA1 lac⁻ F' [proAB⁺ lacI^q lacZΔM15 Tn10(*tet^r)*]*) wurde der Stammsammlung der Arbeitsgruppe Bornkamm entnommen.

2.3 Plasmide

Die Vektoren pHEBo (Sugden *et al.*, 1985), pSG5 (Stratagene, Amsterdam/NL) und pBLuc5 (Laux *et al.*, 1994) standen in der Arbeitsgruppe Bornkamm zur Verfügung.

Die Konstrukte SVLMP1 (p581), HA-SVLMP1, SVLMP1-ΔC (p2133), HA-SVLMP1-ΔC, SVLMP1-PQT>AAA (p2134), SVLMP1-Y384G (p2178), SVLMP1-PQT>AAA/Y384G (p2131) und SVLMP1:CD40 erhielten wir von Wolfgang Hammerschmidt und Arnd Kieser (Kieser *et al.*, 1999; Schultheiss *et al.*, 2001). SVLMP2A und pHEBop5 wurden von Barbara Adler bereitgestellt (Adler *et al.*, 2002).

Die BZLF1-Expressionsplasmide CMVBZLF1 (pCMV-BZLF1-wt) und LPVBZLF1 (pLPV-BZLF1-wt) sowie das BZLF1-Promotor/Chloramphenicolacetyltransferase-Konstrukt Zp-1164/CAT (p1418) überließ uns Wolfgang Hammerschmidt (Baumann *et al.*, 1998).

Die Mutanten $\text{I}\kappa\text{B}\alpha_{32/36\text{A}}$ (pCMV- $\text{I}\kappa\text{B}\alpha_{32/36\text{A}}$), dnMKK6 (TRAF6(300-524)) und dnSEK1 (SEK1-AL (S220>A, T224>L)) sowie das Konstrukt 3xNF- κB /luc (p1768wt) erhielten wir von Arnd Kieser (Mitchell und Sugden, 1995; Schultheiss *et al.*, 2001; Traenckner *et al.*, 1995; Yan *et al.*, 1994).

pEGFP-C1 („enhanced green fluorescent protein“) bezogen wir bei BD Clontech (Heidelberg). Das Plasmid pNGFR (p92-11), das für den humanen NGF-Rezeptor (NGFR, „nerve growth factor receptor“) mit einer Deletion der intrazellulären Signaltransduktionsdomäne kodiert, überließ uns Markus Brielmeier.

2.4 Antikörper

Folgende Primärantikörper fanden in der vorliegenden Arbeit in der jeweils im Text angegebenen Verdünnung Verwendung:

anti-Aktin	Maus IgG ₁ , monoklonal, C-2	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz/CA/USA)
anti-BZLF1	Maus IgG ₁ , monoklonal, BZ.1	Martin Rowe, Cardiff/UK
anti-EA	Mensch, polyklonal, 8272/EA512	Nikolaus Müller-Lantzsch, Homburg/Saar
anti-GFP	Maus IgG ₁ , polyklonal, 7.1 + 13.1	Roche Diagnostics (Mannheim)
anti-HA	Ratte IgG ₁ , monoklonal, 12CA5	Elisabeth Kremmer, München
anti-IgM	Maus IgG1, monoklonal, RVS-M	Chemicon (Hofheim/Taunus)
anti- $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$	Kaninchen IgG, monoklonal, C-21	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz/CA/USA)
anti-LMP1	Maus IgG ₁ , polyklonal, CS1-4	Dako (Hamburg)
anti-LMP2A	Ratte IgG, monoklonal, 14B6	Elisabeth Kremmer, München
anti-NGFR	Maus IgG, monoklonal, HB8737	American Type Culture Collection (ATCC)
anti-VCA	Maus IgG _{2a} , monoklonal, 10-92	Chemicon (Hofheim/Taunus)

Daneben wurden folgende Sekundärantikörper in den angegebenen Verdünnungen eingesetzt:

anti-Kaninchen IgG-HRP	Promega (Mannheim)	1:1500
anti-Maus IgG-FITC	Sigma-Aldrich Chemie (Taufkirchen)	1:500
anti-Maus IgG-MicroBeads	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)	1:5
anti-Maus IgG-PE	Dianova (Hamburg)	1:100

anti-Maus IgG-HRP	Sigma-Aldrich Chemie (Taufkirchen)	1:1000
anti-Mensch poly Ig-HRP	Sigma-Aldrich Chemie (Taufkirchen)	1:500
anti-Ratte IgG-Cy3	Dianova (Hamburg)	1:1000
anti-Ratte IgG-HRP	Sigma-Aldrich Chemie (Taufkirchen)	1:1000

Als Isotyp-Kontrollen für die FACS-Analysen wurden die Maus IgG₁-Negativkontrolle (Chemicon, Hofheim/Taunus) und die Maus IgG_{2a}-Negativkontrolle (BD PharMingen, San Diego/CA/USA) verwendet.

Die Stimulation des B-Zell-Rezeptors erfolgte mithilfe der gegen humane Immunglobuline gerichteten Antikörper anti-IgM (Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen) bzw. anti-IgG (ICN Biomedicals, Eschwege).

2.5 Enzyme

Die verwendeten Restriktionsenzyme wurden von New England Biolabs (Frankfurt/Main) und MBI Fermentas (St.Leon-Rot) bezogen.

Alkalische Kälberdarm-Phosphatase (CIP) und Taq-DNA-Polymerase wurden bei Promega (Mannheim), T4-DNA-Ligase, T4-DNA-Polymerase und Vent-DNA-Polymerase bei New England Biolabs (Frankfurt/Main) eingekauft.

In allen Fällen wurden die benötigten Puffer als zehnfache Konzentrate mitgeliefert.

2.6 Radioaktive Isotope

α -³²P-dCTP wurde von Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg) bezogen.

2.7 Chemikalien und andere Materialien

Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg: ECL Western Blot Detektionssystem, Ficoll-Paque Plus, Hybond-ECL-Nitrozellulosemembran, Hybond-N⁺-Nylonmembran, Luziferin, Rediprime II DNA labelling System, Sephadex G-50 NICK Säulen

Becton & Dickinson, Franklin Lakes/NJ/USA: FACS-Polystyren-Röhrchen, Polypropylen-Röhrchen 15 ml und 50 ml, 6-, 48- und 96-Loch-Platten

Biochrom, Berlin: Seromed Fötale Kälberserum

Bio-Rad Laboratories, München: Bradford Protein Assay, Gene-pulser-Küvetten 0,4 cm

Braun Melsungen, Melsungen: 19G-Einmalkanülen, Einmalspritzen

Calbiochem, Frankfurt/Main: SB203580, PD98059

Eppendorf, Hamburg: Reaktionsgefäße à 1,5 ml und 2,0 ml

Genomed, Bad Oeynhausen: Jetstar Plasmid-Miniprep-Kit

GibcoBRL Life Technologies, Karlsruhe: Agarose, vorgefärbte Proteinleiter Benchmark, Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), 1 kb DNA-Leiter, Hygromycin B, LB-Medium, L-Glutamin, Lipofektamin, Natriumpyruvat, Optimem 1-Medium, PBS, Penicillin/Streptomycin, Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1), RPMI 1640-Medium, 0,24–9,5 kb RNA-Leiter, Trypsin, Versen

Greiner, Frickenhausen: Einmalpipetten, Schalen, Zellkulturflaschen, 24-Loch-Platten

ICN Biomedicals, Eschwege: DL-Dithiothreitol (DTT), Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), Glycin, Glycerin, Natriumdodecylsulfat (SDS), Tween 20

K & K Laborbedarf, München: Whatman 3MM-Papier

Kodak, Stuttgart: Diafilm ISO 400, Röntgenfilme X-OMAT

Metabion, Martinsried: Oligonukleotide

Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach: LS-Trennsäulen

Nunc, Wiesbaden: Einfrierampullen für Zellen (Cryotubes)

PAN Biotech, Aidenbach: Fötale Kälberserum

Polaroid, Cambridge/MA/USA: Filme Polapan 57

Qiagen, Hilden: Gelextraktions-Kit Qiaquick, Plasmid-Maxiprep-Kit, RNeasy-Midiprep-Kit

r-biopharm, Darmstadt: Ridascreen Mycoplasma IFA

Roche Diagnostics, Mannheim: Adenosin-5'-Triphosphat (ATP), Ampicillin, Kanamycin, 3-N-Morpholino-propansulfonsäure (MOPS), PCR-Nukleotid-Mix

Roth, Karlsruhe: 30% Acrylamid/0,8% Bisacrylamid

Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen: β -Glycerophosphat, β -Mercaptoethanol, Monothio-glycerol, Natriumfluorid, Natriummolybdat, Natriumorthovanadat, Natriumpyrophosphat, N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED), Östrogen, Phenylmethansulfonyl-fluorid (PMSF), Phorbol-12-myristat-13-acetat (TPA), Ponceau S-Färbelösung, Propidiumjodid (PI), Rinderserumalbumin (BSA), Saponin, Trypanblau-Lösung

USB, Cleveland/OH/USA: Tris

Alle hier nicht aufgeführten Chemikalien wurden bei der Firma Merck (Darmstadt) in der höchsten Reinheitsform bezogen.

2.8 Geräte

Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg: Proteingelektrophorese-Apparatur Hoefer SE250

Mighty Small, Western Blot-Apparatur Hoefer TE22 Mighty Small

Beckman Coulter, Fullerton/CA/USA: Spektrophotometer DU-64, Zellzählgerät Z1

Becton & Dickinson, Franklin Lakes/NJ/USA: FACScan-Durchflußzytometer

Bio-Flow Technik, Meckenheim: Flow-Hood-Werkbank

Bio-Rad Laboratories, München: Capacitance Extender Plus, DNA-Gelelektrophorese-kammer Wide Mini-Sub Cell, Gene-pulser-II, Stromgerät Power Supply 1000/500

Bioscan, Washington DC/USA: Szintillationszähler QC-4000

Carl Zeiss, Göttingen: Lichtmikroskop ID02, Fluoreszenzmikroskop Axiovert 10

Colora Messtechnik, Lorch: Gefrierschrank (-80°C) UF80-450S

DuPont, Bad Homburg: Zentrifuge Sorvall RC5C, Rotoren GS3, HS4 und SS34

EG&G Berthold, Bad Wildbad: Microlumat LB96P, Perkin-Elmer PCR-Gerät 9600

Eppendorf, Hamburg: Biophotometer, Heiz- und Schüttelblock Thermomixer 5436

GFL, Burgwedel: Wasserbad

Heidolph Elektro, Kelheim: Vortex REAX 2000

Heinemann, Schwäbisch Gmünd: Ultraschallgerät Branson Sonifier W-250

Helmut Saur Laborbedarf, Reutlingen: Vakuumpumpe

Heraeus Instruments, Osterode: Bakterien-Brutschrank, CO₂-Inkubator für Zellkultur, Zentrifuge Sepatech Varifuge 3.2 RS

H. Hölzel, Dorfen: gefelderte Objektträger

Kodak, Stuttgart: Entwicklermaschine, Expositions-kassetten mit Verstärkerfolie, Rotlicht-filter Wratten Nr. 23A

Knick, Berlin: pH-Meter Multi-Calimatic 763

Labortechnik Fröbel, Lindau: Consort Power Supply E443

Membrapure, Bodenheim: Reinstwasser-Aufbereitungssystem

Merck Eurolab, Darmstadt: Neubauer-Zählkammer

Mettler-Toledo, Giessen: Feinwaage PJ3000, Analysenwaage AE260

Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach: MidiMACS Magnet

MWG-Biotech, Ebersberg: Hybridisierungsöfen Mini 10, Minioven MKII

M. Zipperer, Staufen: CAT Rotationsmixer

New Brunswick Scientific, Nürtingen: Bakterienschüttler

Panasonic Deutschland, Berlin: Mikrowellenherd

Polaroid, Cambridge/MA/USA: Polaroidkamera MP4

Savant Instruments, Holbrook/NY/USA: Speed-Vac-Konzentrator SVC100H

Sigma Laborzentrifugen, Taufkirchen: Zentrifuge Sigma 2K15

Stratagene, Amsterdam/NL: UV Stratalinker 1800

UVP, Upland/CA/USA: UV-Transilluminatoren TL-33 und TS-40

Ziegra, Isernhagen: Eismaschine

3 Methoden

Einige grundlegende Methoden der Molekularbiologie werden in diesem Methodenteil nicht erneut aufgeführt. Alle nicht beschriebenen bzw. nicht zitierten Methoden wurden nach Sambrook *et al.* (1989) durchgeführt.

3.1 Zellkultur

3.1.1 Kultivierung von Zelllinien

3.1.1.1 Kultivierung von in Suspension wachsenden Zellen

B-Zelllinien wurden als Suspensionskulturen in RPMI 1640-Medium gehalten, dem 10% (v/v) Hitze-inaktiviertes fötales Kälberserum (FKS), 2 mM L-Glutamin, 1 mM Natriumpyruvat und 100 U/ml Penicillin/100 µg/ml Streptomycin zugesetzt wurden. Zum Zellkulturmedium von EREB-Zellen und deren Abkömmlingen wurde das Östrogen β -Östradiol in einer finalen Konzentration von 1 µM zugegeben. pHEBo-1A, SVLMP1-11C und SVLMP1-13C wuchsen unter Selektion mit Hygromycin B (200 µg/ml). Alle Zellen wurden bei 37°C und einem CO₂-Partialdruck von 5% inkubiert. Sobald die Zellen dicht gewachsen waren (etwa 10⁶ Zellen/ml), wurde das Volumen der Kultur durch Zugabe von frischem Medium verdoppelt bis versechsfacht.

3.1.1.2 Kultivierung adhärent wachsender Zellen

Die adhärent wachsenden LTK⁻- und CD40L-Zellen wurden ebenfalls in RPMI 1640-Medium mit den Zusätzen 10% FKS, 2 mM L-Glutamin, 1 mM Natriumpyruvat und 100 U/ml Penicillin/100 µg/ml Streptomycin kultiviert. Zweimal pro Woche wurden die dicht gewachsenen Zellen nach Behandlung mit dem Chelatbildner Versen von dem Flaschenboden abgelöst, zweimal mit PBS gewaschen und auf eine 6- bis 14-fach größere Fläche ausgesät.

Die adhärent wachsende 293-Zelllinie wurde in Schalen mit DMEM-Medium gehalten, dem 10% FKS, 2 mM L-Glutamin und 100 U/ml Penicillin/100 µg/ml Streptomycin zugesetzt

wurden. Die Zellen wurden dreimal pro Woche mit Trypsin von dem Schalenboden abgelöst, in vorgewärmtem Medium aufgenommen und auf eine 6- bis 12-fach größeren Fläche ausgebracht.

Alle Zelllinien wurden bei 37°C und 5% CO₂-Partialdruck inkubiert.

10x PBS: 2 g/l KCl; 2 g/l KH₂PO₄; 80 g/l NaCl; 14,3 g/l Na₂HPO₄; pH 7,4

3.1.2 Aufbewahren von Zellen

In Gegenwart von Dimethylsulfoxid (DMSO) und in flüssigem Stickstoff eingefroren können Zellen über längere Zeit gelagert werden.

Zum Einfrieren wurden etwa 1×10^7 Zellen durch fünfminütige Zentrifugation bei 1200 Upm geerntet, in 1 ml des entsprechenden, vorgekühlten Mediums, das zusätzlich mit 10% FKS und 10% DMSO versetzt wurde, aufgenommen und in eine Einfrierampulle überführt. Die Abkühlung der Zellen erfolgte schrittweise für 24 h in einer Styroporbox bei -70°C, die anschließende Lagerung bei -196°C (flüssiger Stickstoff).

Um die Zellen wieder in Kultur zu nehmen, wurden sie im Wasserbad bei 37°C aufgetaut, mit 10 ml vorgewärmtem Medium gewaschen und abzentrifugiert. Die Suspensionszellen wurden in 12 ml Medium, die adhären Zellen in 25 ml Medium aufgenommen und kultiviert. Den unter Selektion wachsenden Zellen wurde der Selektionsmarker Hygromycin B zwei Tage nach dem Auftauen zunächst in einer Konzentration von 100 µg/ml und abhängig vom Zustand der Zellen nach etwa vier Tagen in der Endkonzentration von 200 µg/ml zugegeben.

3.1.3 Auswaschen von Zellen

Um Zellen Östrogen zu entziehen, wurden sie 5 min bei 1200 Upm abzentrifugiert und dreimal mit Östrogen-freiem Medium gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in dem entsprechenden Medium ohne Östrogen aufgenommen und unter Standardbedingungen weiter inkubiert.

3.1.4 Bestimmung der Lebendzellzahl

Die Dichte einer Kultur wurde über Zellzählung in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Um tote von lebenden Zellen zu unterscheiden, wurde die Zellsuspension mit 1 Volumen 0,5% Trypanblau-Lösung gemischt. Die toten Zellen nehmen aufgrund ihrer durchlässigen Plasmamembran das Trypanblau auf und erscheinen deshalb im Mikroskop dunkler als lebende Zellen.

3.1.5 Transfektion von Zellen

3.1.5.1 Transfektion mittels Elektroporation (nach Cann *et al.*, 1988)

DNA wurde durch Elektroporation mit dem Gerät Gene-pulser-II in B-Zellen transfiziert. Hierzu wurden 1×10^7 bis 2×10^7 Zellen, die am Vortag mit frischem Medium gefüttert worden waren, 10 min bei 1200 Upm abzentrifugiert und einmal in 37°C warmem Medium ohne FKS gewaschen. Danach wurden die Zellen in 250 µl 37°C warmem, FKS-freien Medium aufgenommen, in Gene-pulser-Küvetten überführt, in die die zu transfizierende DNA vorgelegt worden war, und 10 min inkubiert. Die Gesamtmenge der DNA in den Ansätzen einer Transfektionsreihe wurde durch Zugabe von Leervektor angeglichen und betrug je nach Experiment zwischen 10 und 35 µg. Ein Kondensator mit der Kapazität von 975 µF wurde mit 220 V (alle EREB-Zelllinien) bzw. 250 V (Zelllinien Akata, P3HR1 und Ramos) aufgeladen und über die Küvette mit dem Transfektionsansatz entladen. Unmittelbar nach der Transfektion wurden 500 µl FKS zu den Zellen gegeben. Anschließend wurden die Zellen in 10 ml 37°C warmes Medium überführt und unter Standardbedingungen inkubiert.

3.1.5.2 Transfektion mittels Lipofektamin

In 293-Zellen wurde DNA mithilfe von Lipofektamin transfiziert. Dazu wurden die Zellen einen Tag vor der Transfektion auf Sechs-Loch-Platten ausgebracht und über Nacht inkubiert. Für jede Transfektion wurde eine Lösung aus der zu transfizierenden DNA mit der Gesamtmenge von 1 µg in 100 µl des serumfreien Mediums Optimem 1 hergestellt, die dann mit einer Lösung aus 4 µl Lipofektamin und 96 µl Optimem 1 versetzt und 30 bis 45 min bei

Raumtemperatur inkubiert wurde. In der Zwischenzeit wurden die zu 50% bis 80% konfluenten Zellen in 1,5 ml vorgewärmtem Optimum 1 vorinkubiert. Anschließend wurden die DNA-Liposom-Komplexe mit 800 µl Optimum 1 auf ein Volumen von 1 ml aufgefüllt und die Zellen damit vorsichtig überschichtet. Nach 4 h Inkubation wurde die Transfektionslösung gegen vorgewärmtes DMEM-Medium mit 1% FKS ausgetauscht, und die Zellen unter Standardbedingungen weiter inkubiert.

3.1.6 Aufreinigung transfizierter Zellen

3.1.6.1 „MicroBeads assisted cell sorting“ (MACS)

Mit dem Transfektionsmarker pNGFR kotransfizierte Zellen können über die MACS-Methode aufgereinigt werden.

48 h nach der Transfektion von 8×10^7 EREB-Zellen wurden diese in 5 ml SBO aufgenommen, über 5 ml einer Ficoll-Lösung geschichtet und bei 2000 Upm einer zehnmütigen Dichtegradientenzentrifugation unterzogen. Die von Zelltrümmern befreite Zellsuspension der Interphase wurde zweimal mit SBO gewaschen. Danach wurden die transfizierten Zellen 20 min auf Eis mit dem anti-NGFR-Antikörper HB8737 (1:400 in SBO) markiert und einmal mit MP gewaschen. In einem zweiten Schritt wurden die Zellen 20 min bei 4°C mit dem Antikörper anti-Maus IgG-MicroBeads (1:5 in MP) inkubiert, erneut mit MP gewaschen und in 500 µl MP resuspendiert. Die Zellen konnten nun auf die in einem Magneten befindliche LS-Trennsäule aufgetragen werden. Nachdem die Säule dreimal mit je 3 ml MP gespült worden war, konnten die markierten Zellen außerhalb des magnetischen Feldes mit 5 ml MP eluiert werden. Durchfluss (D)- und Eluat (E)-Fraktion wurden abzentrifugiert, gezählt und je nach Weiterbehandlung in entsprechendem Medium oder PBS aufgenommen.

SBO: PBS mit 2% FKS

MP: PBS mit 0,5% FKS und 2 mM EDTA

3.1.6.2 „Fluorescence assisted cell sorting“ (FACS)

Zellen, die mit dem Transfektionsmarker pEGFP-C1 kotransfiziert wurden, können durch ein FACS-Gerät isoliert werden.

Die Aufreinigung der GFP exprimierenden Zellen wurde 48 h nach der Transfektion von Dr. Joachim Ellwart durchgeführt. Ausgehend von der Transfektion von 20×10^7 Zellen konnten etwa 5×10^6 Zellen isoliert werden, die von anfangs ca. 8% nach der Sortierung auf ca. 75% GFP-positive Zellen angereichert waren. Die erhaltenen Zellen wurden in PBS aufgenommen.

3.1.7 Einzelzellklonierung zur Gewinnung stabil transfizierter Zellklone

Für Einzelzellklonierungen wurden EREB2-5-Zellen fünf Tage nach der Transfektion von 1×10^7 Zellen in eine 96-Loch-Platte ausgesät. Als Selektionsmarker wurde zunächst 75 µg/ml Hygromycin B, später 125 µg/ml Hygromycin B zu dem mit 20% FKS versetzten Zellkulturmedium hinzugegeben. Auswachsene Klone wurden expandiert und auf die Expression des transfizierten Konstrukts geprüft.

3.1.8 Stimulation von B-Zellen mit TPA und anti-Immunglobulin-Antikörpern

Für Induktionsexperimente mit TPA wurde dem Medium TPA in einer finalen Konzentration von 20 ng/ml zugegeben.

Um eine Stimulation des B-Zell-Rezeptors durch anti-Immunglobulin-Antikörper zu erreichen, wurden die Zellen in mit anti-IgG (Zelllinie Akata) oder anti-IgM (alle EREB-Zelllinien) beschichtete Platten gegeben. Die Beschichtung mit anti-IgG (72 µg/Loch einer Sechs-Loch-Platte) oder anti-IgM (20 µg/Loch einer Sechs-Loch-Platte, 5 µg/Loch einer 24-Loch-Platte) erfolgte zuvor über Nacht in PBS pH 8,5 und wurde vor Zugabe der Zellen dreimal mit PBS (pH 7,4) gespült.

3.1.9 Bestimmung der Luziferase-Aktivität nach Transfektion von Promotor/Luziferase-Konstrukten

Herstellung der Gesamtzellextrakte:

Die mit Promotor/Luziferase-Konstrukten transfizierten Zellen wurden 48 h (Zelllinien 293 und Ramos) bzw. 72 h (Zelllinien EREB2-1 und EREB2-5) nach der Transfektion geerntet. Hierzu wurden die Zellen in 25 ml vorgekühltes PBS gegeben, 10 min bei 1200 Upm abzentrifugiert und nochmals mit 1 ml PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen eines Transfektionsansatzes in 100 µl Extraktionspuffer resuspendiert. Unlösliche Zellbestandteile wurden 10 min bei 15000 Upm abzentrifugiert. Der Überstand wurde direkt zur Messung verwendet oder bei -70°C eingefroren.

Biolumineszenz-Messung:

10 µl des Gesamtzellextrakts wurden mit 150 µl Testpuffer auf 96-Loch-Platten pipettiert. Die Biolumineszenz wurde durch Zugabe von 100 µl Luziferin-Lösung durch das Gerät Microlumat LB96 in „relativen Lichteinheiten“ (RLU) gemessen.

Extraktionspuffer: 100 mM Kaliumphosphat (pH 7,8); 1 mM DTT; 1% (v/v) TritonX-100
Testpuffer: 25 mM Glycylglycin (pH 7,8); 15 mM MgSO₄; 5 mM ATP
Luziferin-Lösung: 0,5 M Tris/HCl (pH 7,5); 0,3 mg/ml Luziferin

3.2 Bakterienkultur

3.2.1 Vermehrung und Aufbewahrung von Bakterien

Der *E.coli*-Stamm *XLI-Blue* wurde aerob bei 37°C auf Agarplatten oder in Flüssigmedium kultiviert. Die Selektion Plasmid-tragender Bakterien erfolgte in der Regel durch Zugabe von Ampicillin (100 µg/ml) bzw. im Fall von pEGFP-C1 durch Zugabe von Kanamycin (50 µg/ml).

Zur längeren Aufbewahrung wurden 2 ml dichte Bakteriensuspensionskultur mit 50 µl DMSO versetzt und bei -80°C eingefroren.

LB-Flüssigmedium: 10 g/l Bacto-Trypton; 5 g/l Hefeextrakt; 5 g/l NaCl
LB-Agarplatten: LB-Flüssigmedium mit 12 g/l Bacto-Agar

3.2.2 Herstellung transformationskompetenter Bakterien (nach Hanahan, 1983)

100 ml LB-Medium wurden mit einer Übernachtskultur von *E.coli XL1-Blue* angeimpft und bis zum Erreichen einer optischen Dichte von 0,4 bis 0,6 (Wellenlänge 600 nm, Schichtdicke der Küvette 1 cm), also etwa 2,5 h bei 37°C geschüttelt (exponentielle Wachstumsphase). Die Zellen wurden mindestens 10 min auf Eis abgekühlt, pelletiert und vorsichtig in 30 ml eiskaltem TfBI resuspendiert. Nach weiteren 5 min auf Eis wurden die Zellen erneut 10 min bei 3000 Upm abzentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen vorsichtig in 4 ml eiskaltem TfBII aufgenommen, aliquotiert und bei -80°C eingefroren.

TfBI: 10 mM CaCl₂; 30 mM KAc; 50 mM MnCl₂; 100 mM RbCl; 15% (v/v) Glycerin; pH 5,8 mit 0,2 M HAc

TfBII: 10 mM MOPS/NaOH (pH 7,0); 75 mM CaCl₂; 10 mM RbCl; 15% (v/v) Glycerin

3.2.3 Transformation von Bakterien

Ein Aliquot von 100 µl kompetenten Bakterien wurde auf Eis aufgetaut, mit etwa 20 ng Plasmid-DNA oder bis zu 250 ng DNA aus einer Plasmidligierung vermischt und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein zweiminütiger Hitzeschock bei 42°C. Nachdem der Ansatz wieder auf Eis abgekühlt war, wurden die Bakterien in 1 ml LB-Medium überführt und 1 h bei 37°C inkubiert. Ein Aliquot der Bakterienlösung wurde auf mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum versetzte LB-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C bebrütet.

3.3 Charakterisierung von DNA

3.3.1 Plasmidschnellaufarbeitung

Aus Einzelzellkolonien wurden Übernachtskulturen angesetzt. Die Aufreinigung der Plasmid-DNA aus 1,5 ml Übernachtskultur erfolgte mit dem Jetstar-Miniprep-Kit (Genomed) nach dem vorgegebenen Protokoll. Nach dem Trocknen wurde die isolierte DNA in 30 µl TE-Puffer aufgenommen.

TE-Puffer: 10 mM Tris/HCl (pH 8,0); 1 mM EDTA (pH 8,0)

3.3.2 Präparative Plasmidaufarbeitung

Die Plasmidaufarbeitung aus 400 ml Bakterienkultur wurde mit dem Maxiprep-Kit der Firma Qiagen nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Durch die Verwendung von Anionen-Austauscher-Säulen wurde eine sehr saubere und schnelle Plasmidpräparation erreicht. Nach der Aufarbeitung wurde die DNA in einem einer Endkonzentration von 1,0 µg/µl DNA entsprechenden Volumen TE-Puffer aufgenommen.

3.3.3 Spaltung mit Restriktionsenzymen

DNA wurde mit Restriktionsenzymen unter den vom Hersteller empfohlenen Bedingungen gespalten. Die eingesetzte Enzymmenge richtete sich nach DNA-Konzentration und Enzymaktivität, betrug aber höchstens 1/10 des gesamten Reaktionsvolumens.

3.3.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Ein PCR-Ansatz wurde wie folgt aus den einzelnen Bestandteilen zusammengemischt und anschließend in einem PCR-Gerät inkubiert:

PCR-Ansatz:

10 µl 10x Taq-DNA-Polymerase-Puffer
 8 µl 25 mM MgCl₂
 1 µl 10 mM dNTP-Mix
 100 ng Template-DNA
 2 µl 10 µM 5'-Primer
 2 µl 10 µM 3'-Primer
 2 U Taq-DNA-Polymerase
 ad 100 µl H₂O

Reaktionsbedingungen:

Denaturierung 4 min 94°C
 30 Zyklen:
 Denaturierung 30 sec 94°C
 Hybridisierung 60 sec 55°C
 Synthese 60 sec 72°C
 Synthese 10 min 72°C

3.3.5 Agarose-Gelelektrophorese

Durch Spaltung mit Restriktionsendonukleasen entstandene DNA-Fragmente wurden in horizontalen Agarose-Flachbettgelen bei einer Feldstärke von 5 bis 7 V/cm elektrophoretisch aufgetrennt. Als Gel- und Laufpuffer wurde TAE-Puffer verwendet. Die Agarosekonzentration richtete sich nach der zu erwartenden Größe der DNA-Fragmente. Bevor die DNA-Proben in die Geltaschen gefüllt wurden, wurden sie mit 1/5 Volumen DNA-Ladepuffer versetzt. Nach der Auftrennung wurde die DNA mit einer UV-Lampe bei einer Wellenlänge von 254 nm sichtbar gemacht und durch einen Rotfilter fotografiert.

TAE-Puffer:	40 mM Tris/HCl (pH 7,8); 5 mM NaAc; 1 mM EDTA
5x DNA-Ladepuffer:	50 mM Tris/HCl (pH 7,5); 50 mM EDTA; 0,25% (w/v) Bromphenolblau; 40% (v/v) Glycerin
Agarosegel:	0,6% bis 2,0% (w/v) Agarose; 0,5 µg/ml Ethidiumbromid; TAE-Puffer

3.3.6 Isolierung und Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Präparation einzelner DNA-Fragmente wurden 10 bis 20 µg DNA gespalten und in einem Agarosegel mit präparativen Taschen aufgetrennt. Die zu isolierenden Fragmente wurden unter langwelligem UV-Licht (Wellenlänge 360 nm) aus dem Gel ausgeschnitten. Für die Elution der Fragmente aus den Agarosegelstücken wurde der Gelextraktions-Kit Qiaquick (Qiagen) nach dem vom Hersteller vorgegebenen Protokoll verwendet.

3.3.7 Herstellung stumpfer Enden

Um DNA-Fragmente mit nicht kompatiblen Überhängen ligieren zu können, wurden sie mit stumpfen Enden versehen. Dazu wurden die Fragmente mit 3 U T4-DNA-Polymerase, die sowohl eine 5'→3'-Polymeraseaktivität als auch eine 3'→5'-Exonukleaseaktivität besitzt, und mit 1/100 Volumen 10 mM dNTPs in 1x T4-DNA-Polymerase-Puffer 20 min bei 12°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch zehnmündige Inkubation bei 75°C gestoppt. Anschließend wurden die Fragmente zur Reinigung einer Phenol/Chloroform-Extraktion unterzogen.

3.3.8 Ligierung von DNA-Fragmenten

Die 5'-endständigen Phosphatgruppen der linearisierten Vektor-DNA wurden vor der Ligierung mit der alkalischen Kälberdarm-Phosphatase (CIP) entfernt, um eine Religierung zu verhindern. 2 µg DNA wurden mit 10 U CIP in 1x CIP-Puffer 30 min und nach erneuter Zugabe von 10 U CIP weitere 30 min bei 37°C inkubiert. Durch eine anschließende Phenol/Chloroform-Extraktion wurde die Reaktion gestoppt.

Zur Ligierung wurden der linearisierte und dephosphorylierte Vektor und das kompatible Restriktionsfragment in etwa äquimolaren Mengen vermischt und nach Zugabe von 1 µl T4-DNA-Ligase in 1x T4-DNA-Ligase-Puffer über Nacht bei 16°C inkubiert. Der Erfolg der Ligation wurde durch Auftrennung eines Aliquots des Ansatzes in einem Agarosegel kontrolliert.

3.3.9 Radioaktive Markierung

Für die Herstellung radioaktiver Sonden für die Hybridisierung von Northern Blots wurde der Rediprime II-Kit von Amersham Pharmacia Biotech verwendet. Die Markierung wurde nach dem Protokoll des Herstellers mit 30 ng Hitze-denaturierter DNA und 50 µCi $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP (3000 Ci/mMol; 10 mCi/ml) durchgeführt. Die nicht eingebauten Nukleotide wurden über eine Sephadex G50-Säule abgetrennt.

Eine radioaktive Markierung wurde mit dem 0,9 kb großen ApoI-Fragment der BZLF1-cDNA durchgeführt.

3.4 Charakterisierung von RNA

3.4.1 Präparation von Gesamt-RNA aus Zellen

30 ml Zellen aus einer Suspensionskultur mit der Dichte von etwa $0,3 \times 10^6$ Zellen/ml wurden 5 min bei 1200 Upm abzentrifugiert, einmal mit PBS gewaschen und wieder abzentrifugiert. Aus den pelletierten Zellen wurde die Gesamt-RNA mit dem RNeasy-Midiprep-Kit (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers isoliert. Die erhaltene, in H₂O gelöste RNA wurde einer Konzentrationsbestimmung unterzogen und bei -80°C eingefroren.

3.4.2 Auftrennung von RNA in Formaldehydgelen (nach Seed, 1982)

Zum späteren Transfer der RNA auf eine Nylonmembran (Northern Blot) und anschließender Hybridisierung mit einer Sonde wurde die gesamtzelluläre RNA elektrophoretisch aufgetrennt. 10 µg RNA wurden lyophilisiert und in 20 µl RNA-Ladepuffer aufgenommen, 20 min auf 65°C erhitzt und auf ein 1%iges Formaldehyd-Agarosegel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 25 V für 16 h in 1x MOPS-Puffer. Nach dem Lauf wurde die RNA unter UV-Licht sichtbar gemacht und durch einen Rotfilter photographiert.

RNA-Ladepuffer: 50% Formamid; 2,2 M Formaldehyd; 1x MOPS-Puffer; 10% (w/v) Ficoll; 0,2% (w/v) Bromphenolblau; 50 µg/ml Ethidiumbromid
1x MOPS-Puffer: 20 mM MOPS (pH 7,0); 5 mM NaAc; 1 mM EDTA
Formaldehyd-Agarosegel: 1% (w/v) Agarose; 2,2 mM Formaldehyd; 1x MOPS-Puffer

3.4.3 Northern Blot

Die im denaturierenden Formaldehyd-Agarosegel aufgetrennte RNA wurde durch Saugtransfer auf eine Nylonmembran geblottet. Dazu wurden zwischen zwei Glasplatten von unten nach oben drei Lagen Whatman-Papier, das Gel, die Membran, erneut drei Lagen Whatman-Papier und schließlich mehrere Lagen Zellstoff übereinander geschichtet. Die unteren Whatman-Papiere reichten in zwei Vorratsbehälter mit 10x SSC, auf der oberen Glasplatte stand zur Beschwerung eine gefüllte Glasflasche. Nach dem Transfer über Nacht wurde die RNA durch den UV-Stratalinker irreversibel an die Membran gebunden.

1x SSC: 150 mM NaCl; 15 mM Natriumcitrat

3.4.4 Hybridisierung der RNA-Filter

Die Nylonmembran mit der RNA wurde zweimal 20 min bei 65°C mit 1% (w/v) SDS/0,1% (v/v) SSC gewaschen und 1 h bei 65°C in einer Hybridisierungsröhre mit 20 ml Church-Puffer vorinkubiert. Danach wurde der Puffer gegen 20 ml neuen Church-Puffer, der 10⁷ cpm/ml der Hitze-denaturierten Sonde (siehe 3.3.9) enthielt, ausgetauscht. Die Filter wurden über Nacht bei 65°C unter ständiger Rotation in einem Hybridisierungsofen inkubiert.

Nach der Hybridisierung wurden die Filter zweimal 20 min bei 65°C in 1% (w/v) SDS/0,1% (v/v) SSC gewaschen. Die luftgetrockneten Filter wurden dann in Haushaltsfolie eingewickelt und in Expositionskassetten mit Verstärkerfolie autoradiographiert.

Church-Puffer: 400 mM Na₂HPO₄; 100 mM NaH₂PO₄; 7% (w/v) SDS; 1 mM EDTA; pH 7,2

3.5 Charakterisierung von Proteinen

3.5.1 Präparation von Proteinextrakten für Protein-Immunoblots

Gesamtzellextrakte:

Zur Gewinnung von Gesamtzellextrakten wurden 1×10^6 Suspensionszellen 5 min bei 1200 Upm abzentrifugiert und einmal mit PBS gewaschen. Das Pellet wurde in 50 bis 100 µl Gesamtzell-Extraktionspuffer aufgenommen, mit einem Ultraschallgerät sonifiziert und 5 min gekocht. Nach der Proteinmessung (siehe 3.5.2) wurden die Extrakte mit Bromphenolblau versetzt und bei -20°C aufbewahrt.

Membran- und DNA-freie Zellextrakte:

Zur Herstellung von Membran- und DNA-freien Zellextrakten, die für den Nachweis von LMP1 geeignet sind, wurden 1×10^6 Suspensionszellen 5 min bei 1200 Upm abzentrifugiert und einmal mit PBS gewaschen. Das Pellet wurde in 40 bis 80 µl LMP1-Extraktionspuffer aufgenommen und von unlöslichen Bestandteilen durch zehnminütige Zentrifugation bei 15000 Upm befreit. Der Überstand wurde einer Bestimmung des Proteingehalts unterzogen (siehe 3.5.2), mit 1/5 Volumen 5x Laemmli-Auftragspuffer versetzt und bei -20°C gelagert.

Gesamtzell-Extraktionspuffer: 125 mM Tris/HCl (pH 6,8); 6% (w/v) SDS; 10% (v/v) Monothioglycerol; 10% (v/v) Glycerol

LMP1-Extraktionspuffer: TBST-T; 0,5 mM Natriumorthovanadat; 1mM PMSF; 1% Phosphatase-Inhibitor-Mix

TBS-T: 20 mM Tris/HCl (pH 7,4); 150 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1% TritonX-100

Phosphatase-Inhibitor-Mix: 50 mM β-Glycerophosphat; 50 mM Natriumfluorid; 50 mM Natriummolybdat; 50 mM Natriumpyrophosphat

5x Laemmli-Auftragspuffer: 55 mM Tris/HCl (pH 6,8); 5% (w/v) SDS; 2% (v/v) β-Mercaptoethanol; 0,25% (w/v) Bromphenolblau; 40% (v/v) Glycerin

3.5.2 Proteinbestimmung

Die Bestimmung des Proteingehalts der Zellextrakte erfolgte nicht quantitativ, sondern nur vergleichend, um die Verwendung untereinander gleicher Proteinmengen im einzelnen Experiment sicherzustellen. Die eingesetzten Proteinkonzentrationen lagen in den verschiedenen Experimenten zwischen 10 und 40 µg.

Im Fall der Gesamtzellextrakte wurde eine empirische Methode angewandt, um den relativen Proteingehalt zu bestimmen. Danach wurden 5 µl Extrakt mit 100 µl 1 M NaOH und 900 µl H₂O vermischt und im Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von 280 nm vermessen.

Die relative Proteinkonzentration in den LMP1-Zellextrakten wurde mithilfe einer Fertiglösung von Bio-Rad bestimmt, die auf der Bradford-Methode beruht. Hierzu wurde die optische Dichte einer Mischung aus 4 µl Extrakt, 800 µl PBS und 200 µl Reagenz bei einer Wellenlänge von 600 nm gemessen.

3.5.3 Auftrennung von Proteinen durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Proteine wurden mit der diskontinuierlichen Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) mit SDS als denaturierendem Detergenz aufgetrennt.

Nach dem Auftauen und dem fünfminütigen Kochen der Extrakte wurden gleiche Proteinmengen auf ein 10%iges SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Die Elektrophorese mithilfe der Apparatur Hoefer SE250 Mighty Small erfolgte bei 150 V für ca. 1,5 h in Laufpuffer, bis die Bromphenolblau-Lauffront das untere Ende des Gels erreicht hatte. Durch die Koelektrophorese eines Markerproteingemischs mit bekannten Molekulargewichten konnte das relative Molekulargewicht der aufgetrennten Proteine ungefähr bestimmt werden.

Gellösungen:	<u>10 ml Trenngel</u>	<u>5 ml Sammelgel</u>
H ₂ O	4,0 ml	2,81 ml
1,5 M Tris (pH 8,8)	2,5 ml	
0,5 M Tris (pH 6,8)		1,25 ml
10% SDS	100 µl	50 µl
30% Acrylamid/0,8% Bisacrylamid	3,33 ml	840 µl
10% Ammoniumperoxodisulfat (APS)	100 µl	100 µl
TEMED	6 µl	6 µl
Laufpuffer:	25 mM Tris; 192 mM Glycin; 0,1% SDS	

3.5.4 Western Blot und Chemolumineszenz-Detektion

Im Anschluss an die SDS-PAGE wurden die aufgetrennten Proteine über einen Elektrottransfer auf eine Nitrozellulosemembran geblottet. Der Transfer erfolgte in der Apparatur Hoefer TE22 Mighty Small für 45 bis 60 min bei $0,8 \text{ A/cm}^2$ in Transferpuffer. Zur Kontrolle der Übertragung der Proteine wurde die Membran etwa 2 min mit Ponceau S-Lösung gefärbt. Nach der Entfärbung der Membran in Wasser wurden noch unbesetzte Proteinbindungsstellen durch 60minütige Inkubation in Blockierungslösung blockiert. Die Markierung mit dem spezifischen, in der Blockierungslösung verdünnten Primärantikörper erfolgte über Nacht bei 4°C auf einem Rotationsmixer. Der gebundene Erstantikörper wurde über einen gegen seinen Isotyp gerichteten Zweitantikörper, der mit dem Enzym Meerrettich-Peroxidase (HRP) gekoppelt war, und eine anschließende HRP-abhängige, chemische Reaktion nachgewiesen. Das mithilfe des ECL-Systems oxidierte Luminol führt zu einer Freisetzung von Licht, die durch die Exposition der Membran auf einem Röntgenfilm nachgewiesen werden kann. Nach dem ECL-Nachweis kann die Nitrozellulosemembran von den gebundenen Antikörpern befreit und mit anderen Antikörpern markiert werden. Hierzu wurde sie 20 min in einer 50°C warmen „Strip“-Lösung geschüttelt und anschließend dreimal 20 min in PBS-T gewaschen. Die Membran konnte nun wie zuvor blockiert, mit Primär- und Sekundärantikörpern markiert und in einer ECL-Reaktion untersucht werden.

Transferpuffer:	25 mM Tris; 192 mM Glycin; 20% (v/v) Methanol
Blockierungslösung:	PBS; 5% (w/v) Magermilchpulver
„Strip“-Lösung:	125 mM Tris/HCl (pH 6,8); 0,4% (w/v) SDS; 10 mM DTT
PBS-T:	PBS; 1% (v/v) Tween 20

3.5.5 FACS-Analyse

3.5.5.1 Untersuchung von Oberflächenproteinen

Für die FACS-Untersuchung von Proteinen der Zelloberfläche wurden etwa $0,5 \times 10^6$ Zellen 5 min bei 1200 Upm abzentrifugiert, einmal in 1 ml SBO (siehe 3.1.6.1) gewaschen, in 100 μl in SBO verdünntem Primärantikörper 20 min auf Eis inkubiert und erneut gewaschen. Danach wurden die Zellen in 100 μl Fluoreszein-Isothiozyanat (FITC)-markiertem Sekundärantikörper 20 min auf Eis inkubiert, einmal gewaschen und in 500 μl FACS-Puffer

resuspendiert. Nach der Analyse von 15000 Zellen durch das FACS-Gerät wurden die Daten mithilfe des Cellquest-Programms als Histogramme ausgewertet und die mittlere Fluoreszenz der Ansätze bestimmt.

FACS-Puffer: PBS; 1% (w/v) Paraformaldehyd (PFA)

3.5.5.2 Untersuchung intrazellulärer Proteine

Für die Färbung intrazellulärer Proteine wurden die Zellen nach der Ernte einmal in PBS gewaschen, in 100 µl PBS/4% (w/v) PFA 20 min auf Eis fixiert und einmal mit SBi gewaschen. Es folgten ein 20minütiger Färbeschritt auf Eis in 100 µl in SBi verdünntem Erstantikörper, ein Waschschrift in SBi, ein zweiter Färbeschritt in 100 µl in SBi verdünntem Zweitantikörper und wieder ein Waschschrift in SBi. Anschließend wurden die Zellen in 500 µl FACS-Puffer aufgenommen und auf ihre Fluoreszenz untersucht.

War die Auswertung der FACS-Daten auf die transfizierten Zellen des Ansatzes beschränkt, stoppte die Datenaufnahme durch das FACS-Gerät erst nach der Detektion von 10000 GFP-positiven Zellen (zwei-Farben-FACS-Analyse). Ansonsten wurde die Aufnahme nach den ersten 15000 Zellen abgebrochen. In Abbildung 7 sind die für eine zwei-Farben-Analyse mitgeführten Kontrollfärbungen eines Experiments wie in Abbildung 21 beschrieben als Dot Blots dargestellt.

SBi: PBS; 1% (w/v) BSA; 0,03% (w/v) Saponin

3.5.6 Indirekte Immunfluoreszenz

Die zu untersuchenden Zellen wurden abzentrifugiert, einmal in PBS gewaschen und auf gefelderte Objektträger aufgetropft. Die Objektträger wurden an der Luft getrocknet, 5 min bei -20°C in vorgekühltem Aceton/Methanol (1:1) fixiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt. Pro Feld wurden 25 µl Primärantikörper aufgetropft, und der Objektträger 60 min bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach Waschen in PBS wurde er weitere 60 min mit einem in PBS verdünnten, Zyaninfarbstoff (Cy3)-markierten Sekundärantikörper inkubiert, wieder in PBS gewaschen, mit Kaisers Glyzeringelatine überschichtet

und mit einem Deckglas abgedeckt. Auswertung und Photographien erfolgten unter einem Fluoreszenzmikroskop bei einer Anregungswellenlänge zwischen 512 und 552 nm.

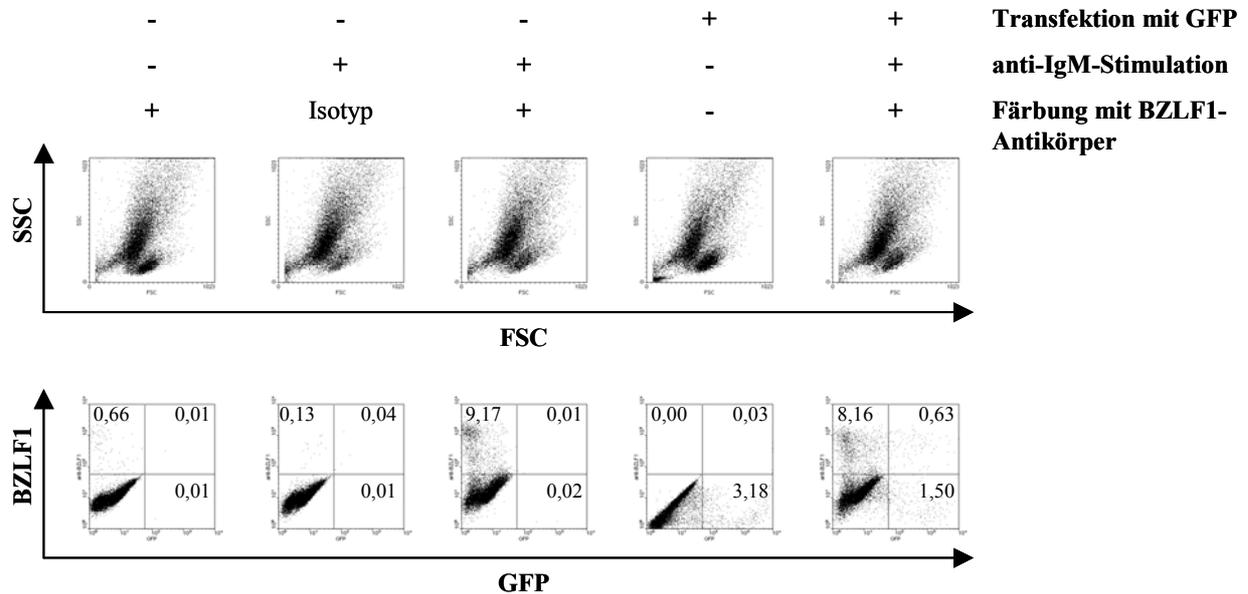


Abbildung 7: Kontrollfärbungen einer zwei-Farben-FACS-Analyse.

Mit Leervektor oder pEGFP-C1 in Abwesenheit von Östrogen transfizierte EREB2-1-Zellen wurden 48 h nach der Transfektion mit anti-IgM stimuliert oder blieben unbehandelt. Weitere 24 h später wurden Aliquots der Ansätze nach dem dargestellten Schema ohne Erstantikörper, mit der Isotyp-Kontrolle Maus IgG₁ (1:20) oder mit einem anti-BZLF1-Antikörper (1:800) gefärbt und anschließend mit einem sekundären, Phycoerythrin (PE)-gekoppelten anti-Maus IgG-Antikörper (1:100) markiert. Die Diagramme zeigen die Verteilung von 15000 Zellen hinsichtlich ihrer Zellgröße und Granularität, die linear auf der x- und y-Achse aufgetragen sind („forward scatter“, FSC und „sideward scatter“, SSC) und hinsichtlich ihrer GFP- und PE-Fluoreszenz, die logarithmisch auf der x- und y-Achse aufgetragen sind (GFP und BZLF1).

3.6 Plasmidkonstruktionen

3.6.1 Klonierung der pSG5LMP1-Expressionsplasmide

Die Konstrukte pSG5LMP1, pSG5LMP1-ΔC, pSG5-LMP1-PQT>AAA, pSG5LMP1-Y384G und pSG5LMP1-PQT>AAA/Y384G entstanden, indem die *Bam*HI-Fragmente aus den entsprechenden pHEBo-Konstrukten in den durch *Bam*HI-Verdau linearisierten pSG5-Vektor kloniert wurden.

3.6.2 Klonierung des SVBZLF1-Expressionsplasmids

Um ein BZLF1-Expresionsplasmid zu klonieren, in dem die BZLF1-Expression von einem SV40-Promotor kontrolliert wird, wurde aus LPVBZLF1 durch *Bam*HI- und *Eco*RI-Verdau das 1031 bp große Fragment mit der BZLF1-Sequenz herausgeschnitten und in die *Bam*HI-Schnittstelle des pSG5-Vektors ligiert.

3.6.3 Klonierung des BZLF1-Promotor/Luziferase-Konstrukts Zp/luc

Für die Klonierung von Zp/luc wurde aus Zp-1164/CAT mit *Bam*HI und *Sph*I ein Fragment herausgeschnitten, das für den BZLF1-Promotor im Bereich -225 bis +13 kodierte. Dieses wurde in einem Zwischenschritt in die multiple Klonierungsstelle des Vektors pHEBo gebracht. Das aus der Spaltung mit *Bam*HI und *Hind*III erhaltene Fragment wurde nun vor das Luziferasegen in das mit *Bam*HI und *Hind*III linearisierte Plasmid pBLuc5 kloniert. Der Erfolg der Klonierung wurde durch Sequenzierung (Sequiserie, München) überprüft.

4 *Ergebnisse*

4.1 **LMP1 und aktiviertes CD40 hemmen die Reaktivierung von EBV über die Regulation des unmittelbar frühen Proteins BZLF1**

4.1.1 **LMP1 und aktiviertes CD40 hemmen die Expression des BZLF1-Proteins**

Das Zellkultursystem der EREB-Zellen stellt ein *in vitro*-Modell nicht proliferierender B-Zellen dar. Zur Etablierung dieses Systems wurde der EBNA2-defekte EBV-Stamm P3HR1 mit einem Östrogenrezeptor-EBNA2-Fusionsprotein komplementiert, um damit primäre B-Zellen zu transformieren. Die Proliferation der entstandenen konditional lymphoblastoiden Zelllinien hängt von der Anwesenheit von Östrogen bzw. EBNA2 ab, dem zentralen Regulator viraler und zellulärer Gene, die an der Wachstumstransformation EBV-infizierter B-Zellen beteiligt sind. Nach dem Entzug von Östrogen aus dem Zellkulturmedium nehmen EREB-Zellen einen Phänotyp an, der eher den Zellen, in denen EBV *in vivo* persistiert, vergleichbar ist als LCLs. Die Östrogen-entzogenen EREB-Zellen stellen die Proliferation ein und sterben schließlich (Kempkes *et al.*, 1995). Die Reaktivierung von EBV aus dem Zustand der Latenz wurde im EREB-System in Gegenwart und Abwesenheit von EBNA2 und EBNA2-abhängigen Genprodukten bzw. in proliferierenden und nicht proliferierenden Zellen untersucht.

Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit war der Befund, dass die Induktion des lytischen Zyklus durch TPA oder anti-Immunglobulin-Antikörper in EREB-Zellen nur nach Abschalten von EBNA2 möglich ist. Weitere Experimente zeigten, dass das virale Protein LMP1 unabhängig von EBNA2 die Virusreaktivierung hemmen kann und dass aktiviertes CD40, dem LMP1 sehr ähnlich ist, den gleichen Effekt ausübt. Die Induktion des lytischen Zyklus war in diesen Experimenten über die Expression des viralen Kapsidproteins VCA gemessen worden.

Für die weitere Untersuchung der Regulation der EBV-Reaktivierung und der daran beteiligten Signaltransduktionswege in dieser Arbeit war es zunächst wichtig, den Schritt in der lytischen Expressionskaskade zu finden, mit dem LMP1 und aktiviertes CD40 interferieren können. Ein potentielles Zielgen war BZLF1, ein unmittelbar frühes Gen des

lytischen Zyklus, dessen Expression alleine ausreichend ist, die lytische Phase einzuleiten. Um den Einfluss von LMP1 auf die BZLF1-Expression nach der Induktion des lytischen Zyklus zu untersuchen, wurden neben der Mutterzelllinie EREB2-5 deren Abkömmlinge pHEBo-1A und SVLMP1-11C verwendet, die unter Hygromycin-Selektion den Leervektor pHEBo bzw. pHEBo mit LMP1 unter der Kontrolle des SV40-Promotors tragen (Zimmer-Strobl *et al.*, 1996). In diesen Zellen wurde zwei Tage nach Östrogen-Entzug der lytische Zyklus induziert, indem die Zellen auf einer Sechs-Loch-Platte entweder mit dem Phorbolster TPA oder mit dem anti-Immunglobulin-Antikörper anti-IgM, mit dem die Platten beschichtet waren, stimuliert wurden. Einen Tag später wurden Totalzelllysate gewonnen und die Extrakte mittels Western Blot auf die BZLF1-Expression untersucht (Abb. 8A). Um den Einfluss von CD40 auf die BZLF1-Expression zu analysieren, wurden EREB2-1-Zellen zwei Tage nach Östrogen-Entzug für zwei Stunden durch die Kokultivierung mit Kontrollzellen (LTK⁻) oder CD40-Ligand exprimierenden Zellen (CD40L) in den Verhältnissen 5:1 oder 1:1 vorbehandelt; anschließend wurden die Kokulturen mit TPA oder anti-IgM für einen Tag stimuliert, wonach von den Zellen ebenfalls Gesamtzelllysate gewonnen wurden, die mittels Western Blot auf die BZLF1-Expression untersucht wurden (Abb. 8B).

Bei EREB2-5 und EREB2-1 handelt es sich um zwei unterschiedliche Klone des EREB-Systems, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden, um spezifische klonale Effekte einer einzelnen Linie auszuschließen. In Vorarbeiten war die IgM-Expression der verwendeten Zelllinien überprüft worden, um eine vergleichbare Expression des B-Zell-Rezeptors zum Zeitpunkt der Stimulation sicherzustellen.

Wie in den Abbildungen 8A und 8B gezeigt, induzierten beide Stimuli, TPA und anti-IgM, in EREB2-5- und pHEBo-1A-Zellen sowie in EREB2-1-Zellen und mit LTK⁻-Zellen kokultivierten EREB2-1-Zellen die BZLF1-Expression und damit den lytischen Zyklus. In konstitutiv LMP1 exprimierenden EREB2-5-Zellen (SVLMP1-11C) hingegen war die Induktion der BZLF1-Expression durch TPA und anti-IgM im Vergleich zu den Leervektor tragenden Zellen (pHEBo-1A) vollständig blockiert. Desgleichen führte in EREB2-1-Zellen die Kokultur mit CD40L exprimierenden Zellen im Verhältnis 1:5 zu einer teilweisen Aufhebung und im Verhältnis 1:1 zu einer nahezu vollständigen Aufhebung der TPA- und anti-IgM-induzierten BZLF1-Expression.

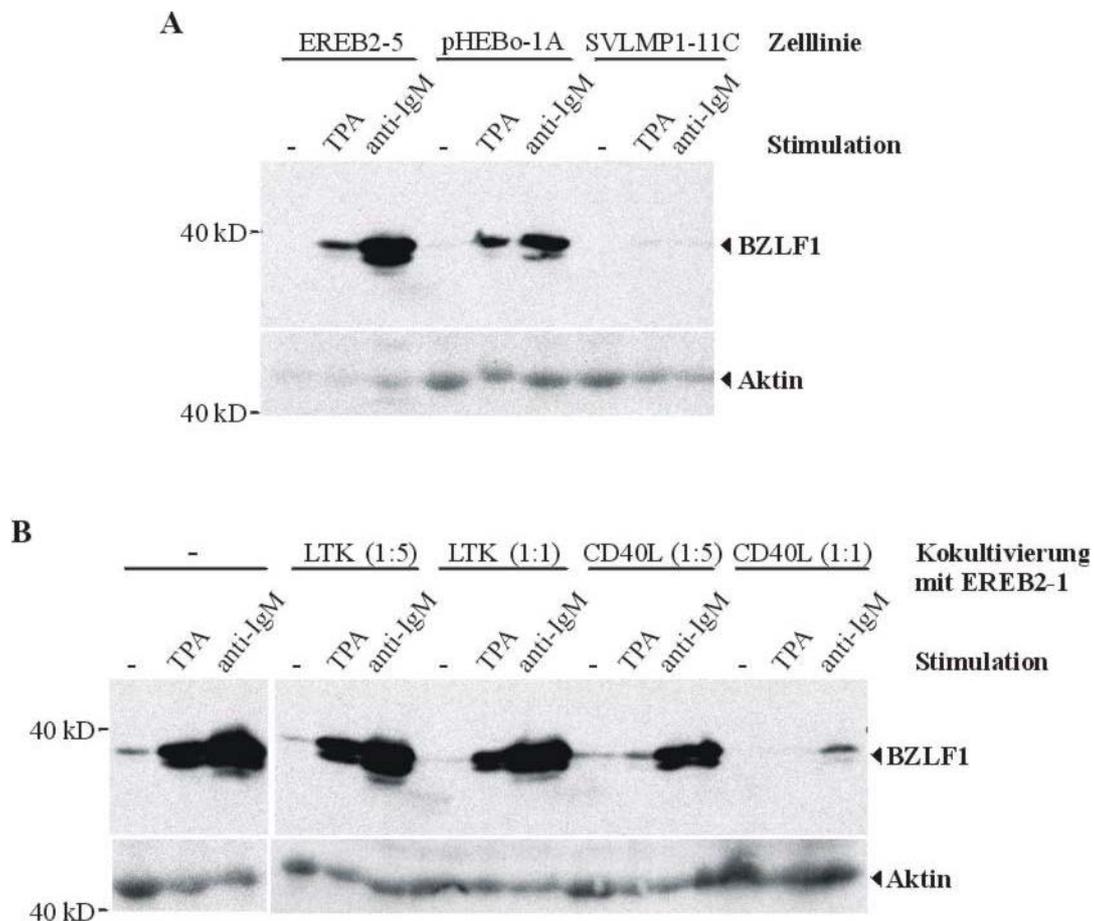


Abbildung 8: LMP1 und aktiviertes CD40 hemmen die durch TPA und anti-IgM induzierte BZLF1-Expression.

A: Je 1×10^6 Zellen EREB2-5, pHEBo-1A und SVLMP1-11C wurden 2 d nach Östrogen-Entzug in 1,5 ml Medium auf Sechs-Loch-Platten gegeben und unbehandelt gelassen oder mit TPA oder auf die Platte geschichtetem anti-IgM stimuliert.

B: Zu je 1×10^6 EREB2-1-Zellen wurden 2 d nach Östrogen-Entzug $0,0 \times 10^6$, $0,2 \times 10^6$ oder 1×10^6 LTK⁻ oder CD40L-Zellen gegeben und diese in einem Gesamtvolumen von 1 ml 2 h inkubiert. Danach wurden die Kokulturen in 1,5 ml Medium auf Sechs-Loch-Platten gegeben und unbehandelt gelassen oder mit TPA oder auf die Platte geschichtetem anti-IgM stimuliert.

24 h nach der Stimulation wurden die Zellen in 50 μ l Gesamtzell-Extraktionspuffer lysiert. 12,5 μ l Extrakt wurden in einer Western Blot-Analyse mit dem anti-BZLF1-Antikörper (1:2000) untersucht. Zur Ladekontrolle wurde die Blots „gestrippt“ und mit einem anti-Aktin-Antikörper (1:400) gefärbt.

Die im Western Blot zu erkennende Abhängigkeit der Stärke der Hemmung des lytischen Zyklus von der Anzahl kokultivierter CD40L-Zellen war nicht auf eine dosisabhängige Senkung der Stärke der BZLF1-Expression pro Zelle, sondern auf eine Abnahme der Zahl von der TPA- oder anti-IgM- Stimulation betroffener Zellen nach einer alles-oder-nichts-Reaktion zurückzuführen. Dies ergab die Auswertung von FACS-Analysen, in denen die

VCA-Expression von EREB2-1-Zellen gemessen wurde, die in verschiedenen Verhältnissen mit LTK⁻- oder CD40L-Zellen kokultiviert und mit TPA stimuliert worden waren (Abb. 9).

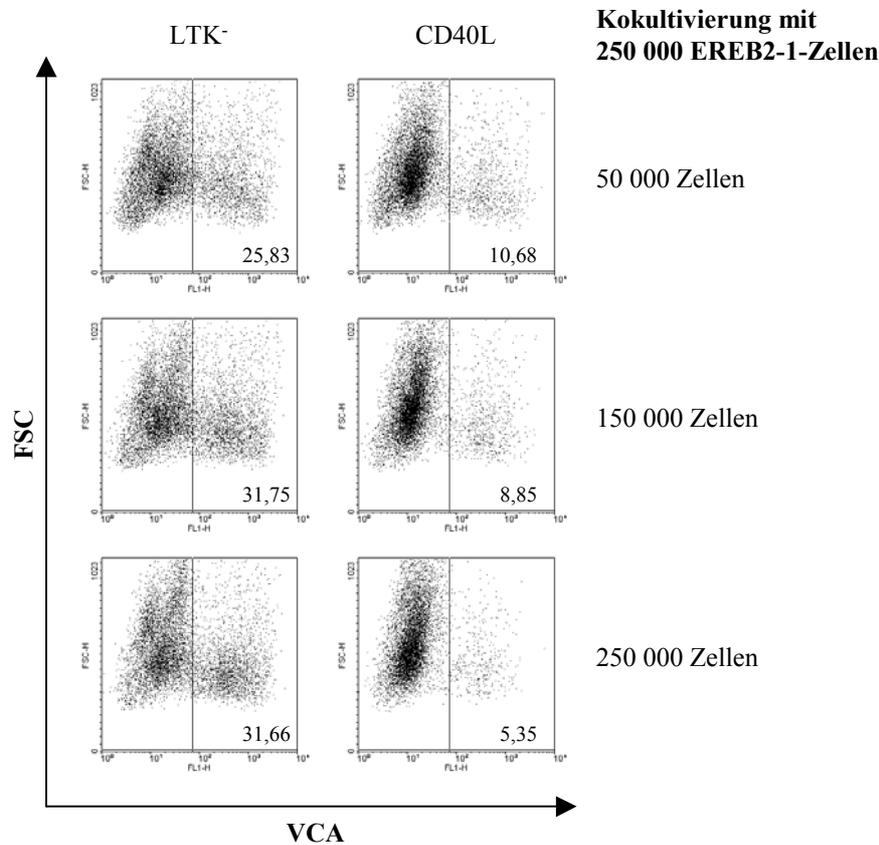


Abbildung 9: Hemmung der TPA-induzierten VCA-Expression durch aktiviertes CD40.

Je $0,25 \times 10^6$ EREB2-1-Zellen wurden 24 h nach Östrogen-Entzug mit $0,05 \times 10^6$, $0,15 \times 10^6$ oder $0,25 \times 10^6$ LTK⁻- oder CD40L-Zellen in einem Gesamtvolumen von 1 ml versetzt und mit TPA stimuliert. Nach 3 d wurden die Kokulturen mit LTK⁻-Zellen auf eine Gesamtzellzahl von $0,5 \times 10^6$ aufgefüllt und nach einer intrazellulären Färbung mit einem anti-VCA-Antikörper (1:1000) und einem sekundären, FITC-markierten Antikörper einer FACS-Analyse unterzogen.

Bei einer zunehmenden Zahl kokultivierter CD40L-Zellen kam es nicht zu einer schwächeren VCA-Expression in einer gleichbleibenden Zahl stimulierter Zellen, sondern zu einer Erniedrigung der Zahl überhaupt von der Stimulation betroffener Zellen, die allerdings die gleiche Expressionsstärke von VCA zeigten wie die Ansätze mit weniger CD40L-Zellen oder LTK⁻-Zellen.

4.1.2 LMP1 und aktiviertes CD40 erniedrigen die Menge der BZLF1-mRNA

Um zu testen, ob die Hemmung der BZLF1-Expression durch LMP1 und aktiviertes CD40 auf der Ebene der mRNA-Konzentration erfolgt, wurden Northern Blot-Analysen durchgeführt. Es wurden mit einer BZLF1-spezifischen Sonde RNA-Proben untersucht, die aus Östrogen-entzogenen und TPA-stimulierten pHEBo-1A- und SVLMP1-11C-Zellen isoliert worden waren (Abb. 10A), sowie RNA-Proben, die aus TPA-stimulierten Kokulturen von LTK-Kontrollzellen oder CD40L exprimierenden Zellen mit Östrogen-entzogenen EREB2-1-Zellen im Verhältnis 1:5 und 1:1 gewonnen worden waren (Abb. 10B). Die BZLF1-Sonde detektierte ein 1,0 kb großes, monozistronisches BZLF1-Transkript und ein schwächeres, 2,8 kb großes, bizistronisches BRLF1/BZLF1-Transkript (siehe auch 1.5.2, Abb. 3).

Die Ergebnisse der Northern Blot-Analyse zeigten, dass die in pHEBo-1A-Zellen nach 16 Stunden TPA-Stimulation deutlich sichtbare Zunahme der BZLF1-mRNA-Konzentration in den konstitutiv LMP1 exprimierenden SVLMP1-11C-Zellen blockiert war. Auch bei der Kokultivierung von EREB2-1-Zellen mit CD40L exprimierenden Zellen war im Gegensatz zur Kokultivierung mit LTK-Kontrollzellen eine Inhibierung des durch TPA induzierten Anstiegs der BZLF1-mRNA-Konzentration zu beobachten.

4.1.3 LMP1 und konstitutiv aktives CD40 hemmen den BZLF1-Promotor

Um zu zeigen, dass die Wirkung von LMP1 und von aktiviertem CD40, einen Konzentrationsanstieg der BZLF1-mRNA zu inhibieren, auf eine Hemmung der BZLF1-Transkription und nicht auf eine Erniedrigung der Stabilität der mRNA zurückzuführen ist, wurde der Einfluss von LMP1 und CD40 auf den BZLF1-Promotor untersucht. Dazu wurde ein BZLF1-Promotor/Luziferase-Konstrukt kloniert (Zp/luc), das den BZLF1-Promotor im Bereich von -225 bis +13 und das Luziferasegen als Reportergen enthält (siehe auch 1.5.2, Abb. 4). Bereits publizierte Daten hatten gezeigt, dass die Aktivität des BZLF1-Promotors in dem ausgewählten Bereich gut mit TPA und anti-Immunglobulin-Antikörpern stimulierbar ist (Daibata *et al.*, 1994; Flemington und Speck, 1990b). Transfektionsexperimente mit dem Zp/luc-Konstrukt und anschließende Luziferase-Tests in EREB-Zellen bestätigten dies (Abb. 11).

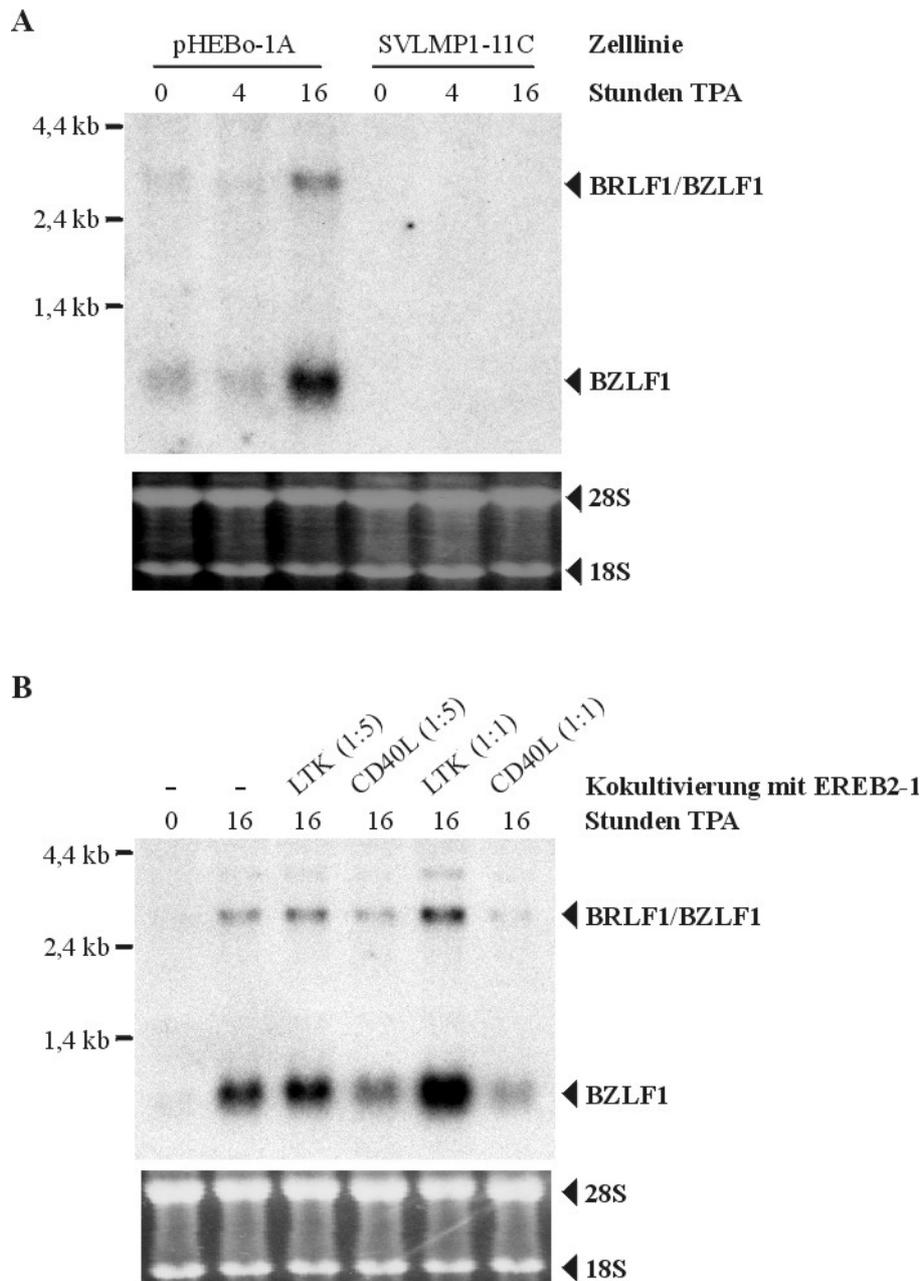


Abbildung 10: LMP1 und aktiviertes CD40 hemmen die durch TPA induzierte Zunahme der BZLF1-mRNA-Konzentration.

A: Je 1×10^7 Zellen pHEBo-1A und SVLMP1-11C in 25 ml Medium wurden 24 h nach Östrogen-Entzug für 0, 4 oder 16 h mit TPA stimuliert.

B: Je 1×10^7 Zellen EREB2-1 wurden 24 h nach Östrogen-Entzug mit $0,0 \times 10^7$, $0,2 \times 10^7$ oder 1×10^7 LTK⁻- oder CD40L-Zellen in einem Gesamtvolumen von 25 ml kokultiviert und für 0 oder 16 h mit TPA stimuliert.

Je 10 µg gesamtzelluläre RNA der Ansätze wurden in einer Northern Blot-Analyse mit einer BZLF1-Sonde untersucht. Als Ladekontrolle dienten die 28S- und 18S-Banden des mit Ethidiumbromid gefärbten RNA-Gels.

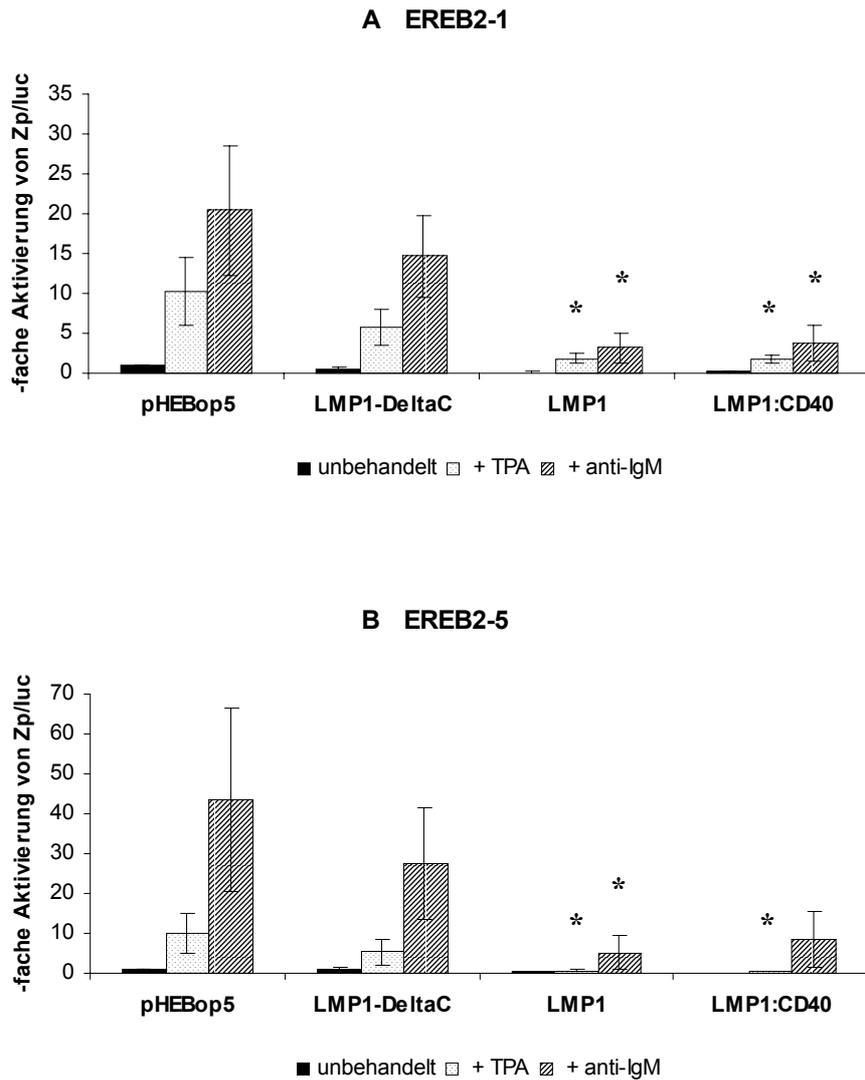


Abbildung 11: LMP1 und konstitutiv aktives CD40 hemmen die Induktion des BZLF1-Promotors durch TPA und anti-IgM.

Je 1×10^7 EREB-Zellen wurden direkt nach Östrogen-Entzug mit $10 \mu\text{g}$ Zp/luc und $5 \mu\text{g}$ pHEBop5, SVLMP1- ΔC , SVLMP1 oder SVLMP1:CD40 transfiziert. Nach 24 h wurde jeder Transfektionsansatz auf drei Löcher einer Sechs-Loch-Platte verteilt und unbehandelt gelassen oder mit TPA oder auf die Platte geschichtetem anti-IgM stimuliert. Weitere 48 h später wurden die Zellen für einen Luziferase-Test geerntet. Die erhaltenen Daten sind als x-fache Aktivierung bezogen auf den Wert der unbehandelten pHEBop5-Transfektion dargestellt. Signifikante Werte gegenüber der entsprechend behandelten pHEBop5-Transfektion mit einem Wert von $p < 0,05$ nach dem Student'schen t-Test sind mit „*“ gekennzeichnet.

A: EREB2-1. Gezeigt sind Mittelwerte +/- Standardabweichung aus sieben unabhängigen Experimenten.

B: EREB2-5. Gezeigt sind Mittelwerte +/- Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten.

In EREB2-1-Zellen konnte bezogen auf unbehandelte Zellen mit TPA eine 10-fache Stimulation und mit anti-IgM eine 20-fache Stimulation der Luziferase-Aktivität erreicht werden (Abb. 11A), während in EREB2-5-Zellen eine 10-fache TPA-Stimulation und eine 44-fache anti-IgM-Stimulation gemessen wurde (Abb. 11B).

Anschließend wurde die Stimulierbarkeit des Zp/luc-Konstrukts bei der Kotransfektion verschiedener LMP1-Konstrukte, die hinter den SV40-Promotor in den pHEBop5-Vektor kloniert waren, untersucht. Bei der Transfektion von 5 µg der LMP1-Mutante SVLMP1-ΔC, der mit den Aminosäuren 194 bis 386 die gesamte C-terminale Signaltransduktionsdomäne von LMP1 fehlte, anstatt des Leervektors pHEBop5 mit Zp/luc, zeigte sich in beiden Zelllinien ein leichter, aber nicht signifikanter Rückgang der Stimulierbarkeit des BZLF1-Promotors mit TPA und anti-IgM. 5 µg SVLMP1-Wildtyp konnten die Induzierbarkeit des Promotors sowohl durch TPA als auch durch anti-IgM jedoch deutlich auf nur noch zweifach bzw. dreifach in EREB2-1 und einfach bzw. fünffach in EREB2-5 hemmen. Die Transfektion von 5 µg eines Fusionskonstruktes, das für ein chimäres Protein aus dem Aminoterminus und der Transmembrandomäne von LMP1 und der zytoplasmatischen Signaltransduktionsdomäne von CD40, also für ein konstitutiv aktives CD40-Molekül kodiert (SVLMP1:CD40), führte zu einer der Transfektion des LMP1-Plasmids entsprechenden Inhibition der TPA- und anti-IgM-stimulierten Promotoraktivität (Abb. 11A und 11B). Der in der Northern Blot-Analyse beobachtete Rückgang der TPA-induzierten BZLF1-mRNA-Menge in Anwesenheit von LMP1 oder aktiviertem CD40 ist nach den BZLF1-Promotorstudien somit auf eine Hemmung der BZLF1-Transkription zurückzuführen.

4.2 Charakterisierung der Signaltransduktionswege des lytischen Zyklus, die von LMP1 beeinflusst werden

4.2.1 LMP1 hemmt die autoregulatorische Aktivierung des BZLF1-Promotors durch das BZLF1-Protein in der Zelllinie Ramos

Die Aktivierung des BZLF1-Promotors durch Induktoren des lytischen Zyklus wie TPA und anti-Immunglobulin-Antikörper verläuft in EBV-positiven B-Zellen in zwei Schritten: Die Aktivierung der für exogene Stimuli responsiven ZI- und ZII-Elemente des Promotors verursacht eine schwache BZLF1-Expression, die nach Erreichen einer bestimmten

Schwellenkonzentration über die BZLF1-responsiven ZIII-Elemente des Promotors zu einer starken Expression des BZLF1-Proteins führt (siehe auch 1.5.2, Abb. 4). Um zu untersuchen, ob LMP1 spezifisch nur den ersten Aktivierungsschritt, die initiale Promotoraktivierung durch exogene Faktoren, oder nur den zweiten Aktivierungsschritt, den positiven Rückkopplungsmechanismus des BZLF1-Proteins, hemmen kann, wurde ein Modellsystem für die Untersuchung des BZLF1-Promotors, die EBV-negative (und damit BZLF1-negative) BL-Zelllinie Ramos verwendet (Flemington und Speck, 1990a und b; Daibata *et al.*, 1994). In diesen Zellen kann im Gegensatz zu EBV-positiven Zellen die Induktion des BZLF1-Promotors durch TPA und BZLF1 unabhängig voneinander betrachtet werden.

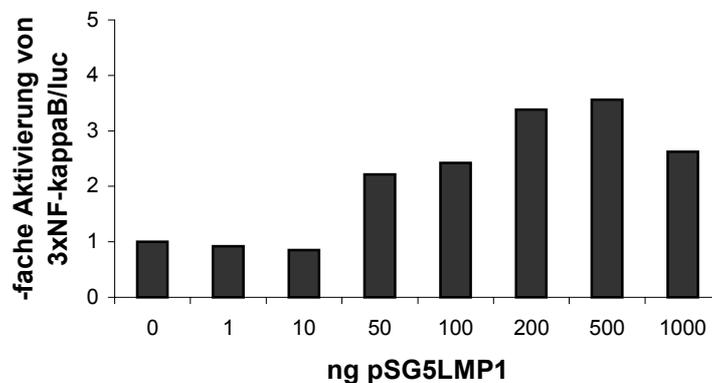


Abbildung 12: Titration von LMP1 anhand der NF- κ B-Aktivierbarkeit.

Je 1×10^7 Ramos-Zellen wurden mit $1,5 \mu\text{g}$ $3 \times \text{NF-}\kappa\text{B/luc}$ und steigenden Mengen pSG5LMP1 transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen für einen Luziferase-Test geerntet. Die gemessenen Luziferase-Aktivitäten wurden auf die der Transfektion des Leervektors pSG5 bezogen.

Verschiedene Quellen beschreiben, dass LMP1 in höheren Konzentrationen zytostatisch wirkt und unspezifisch Promotoren abschaltet (Kaykas und Sugden, 2000; Sandberg *et al.*, 2000). Deshalb war es wichtig, die für Ramos-Zellen geeignete LMP1-Konzentration zu bestimmen. In der gesuchten Konzentration sollte LMP1 die LMP1-abhängigen Signalwege möglichst stark anschalten, aber noch nicht zytostatisch wirken. Um diese Konzentration zu finden, wurden transiente Transfektionsexperimente mit anschließenden Luziferase-Tests durchgeführt, in denen die Aktivierung eines künstlichen Promotors mit drei NF- κ B-Bindestellen ($3 \times \text{NF-}\kappa\text{B/luc}$) in Abhängigkeit von der kotransfizierten Menge eines Expressionsplasmids

für LMP1 (pSG5LMP1) gemessen wurde (Abb. 12). Bei pSG5LMP1 handelt es sich um den Vektor pSG5 mit der für LMP1 kodierenden Sequenz, die ausgehend vom SV40-Promotor abgelesen wird.

Es zeigte sich, dass 200 bis 500 ng pSG5LMP1 das 3xNF- κ B/luc-Konstrukt am besten aktivieren konnten, die damit erreichte drei- bis vierfache NF- κ B-Aktivierung durch LMP1 in Ramos-Zellen aber relativ schwach ausfiel.

In den anschließenden Experimenten, in denen der Effekt von LMP1 auf den durch TPA oder durch kotransfiziertes BZLF1 aktivierten BZLF1-Promotor analysiert wurde, wurden 300 ng pSG5LMP1 eingesetzt. 24 Stunden nach der Transfektion des Zp/luc-Konstrukts und der Plasmide pSG5 oder pSG5LMP1 mit oder ohne dem BZLF1-Expressionsplasmid pSG5BZLF1 wurden die Zellen mit TPA stimuliert; nach weiteren 24 Stunden Inkubation der Zellen wurde die Aktivität des BZLF1-Promotors im Luziferase-Test bestimmt (Abb. 13).

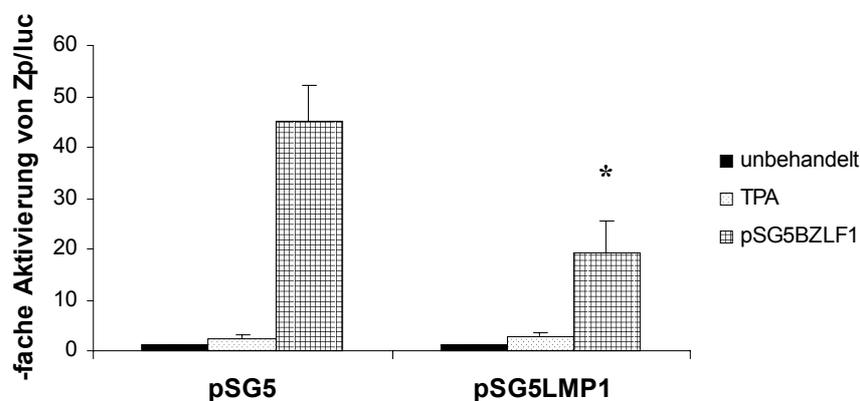


Abbildung 13: Effekt von LMP1 auf die Aktivierung des BZLF1-Promotors durch TPA und BZLF1 in Ramos-Zellen.

Je 1×10^7 Ramos-Zellen wurden mit $5,0 \mu\text{g}$ Zp/luc, $0,3 \mu\text{g}$ pSG5 oder pSG5LMP1 und $1,0 \mu\text{g}$ pSG5 oder pSG5BZLF1 transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Ansätze geteilt. Ein Teil blieb unbehandelt, der andere Teil wurde mit TPA versetzt. Nach weiteren 24 h wurden die Zellen für einen Luziferase-Test und eine Proteinmessung geerntet. Die anhand des Proteingehalts normalisierten Daten sind als x-fache Aktivierung bezogen auf den Wert der unbehandelten pSG5-Transfektion und als Mittelwerte \pm Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten dargestellt. Signifikante Werte gegenüber der entsprechend behandelten pSG5-Transfektion mit $p < 0,05$ nach dem Student'schen t-Test sind mit „*“ gekennzeichnet.

Mit TPA ließ sich der BZLF1-Promotor in Ramos-Zellen unabhängig von LMP1 etwa zweifach induzieren. Durch die Transfektion von BZLF1 kam es zu einer etwa 45-fachen Aktivierung des Promotors. Diese Promotoraktivierung durch BZLF1 konnte durch LMP1 auf etwa 45% gesenkt werden.

In Ramos-Zellen konnte LMP1 also die Autostimulation des exogenen BZLF1-Promotors durch das exogene BZLF1-Protein teilweise hemmen. Über den Einfluss von LMP1 auf die initiale Stimulation des BZLF1-Promotors konnte aufgrund der extrem niedrigen TPA-Stimulation in dem verwendeten System keine Aussage getroffen werden.

4.2.2 LMP1 hemmt die Aktivierung des BZLF1-Promotors durch TPA und durch das BZLF1-Protein in der Zelllinie 293

Als Alternative zu den Ramos-Zellen wurde die Regulation des BZLF1-Promotors auch in der humanen Epithelzelllinie 293 analysiert. Diese Zelllinie ist ein Modellsystem für die Untersuchung der Signaltransduktion von LMP1 (Huen *et al.*, 1995; Kieser *et al.*, 1997; Mitchell und Sugden, 1995).

Wie in den Versuchen mit Ramos-Zellen wurden 293-Zellen mit Zp/luc und Leervektor (pHEBop5) oder LMP1-Expressionsplasmid (SVLMP1) transfiziert. Der Promotor wurde entweder durch Kotransfektion mit CMVBZLF1 oder 24 Stunden später durch TPA stimuliert. 48 Stunden nach der Transfektion wurde die BZLF1-Promotoraktivität mittels Luziferase-Test bestimmt (Abb. 14). Die eingesetzte SVLMP1-Menge von 500 ng SVLMP1 lag im unteren Bereich der in der Literatur in diesem System verwendeten LMP1-Konzentrationen.

Der BZLF1-Promotor ließ sich in 293-Zellen gut aktivieren. Die Behandlung der transfizierten Zellen mit TPA erhöhte die Luziferase-Aktivität 3,8-fach, die Kotransfektion von BZLF1 führte zu einer 14-fachen Induktion der Luziferase-Aktivität. Diese Promotoraktivierung war durch LMP1 hemmbar. Die TPA-Induktion ging um 70% auf 1,2-fach zurück, der BZLF1-Effekt um 60% auf 5,7-fach, während die basale Aktivität des Promotors in Gegenwart von LMP1 nahezu unverändert blieb.

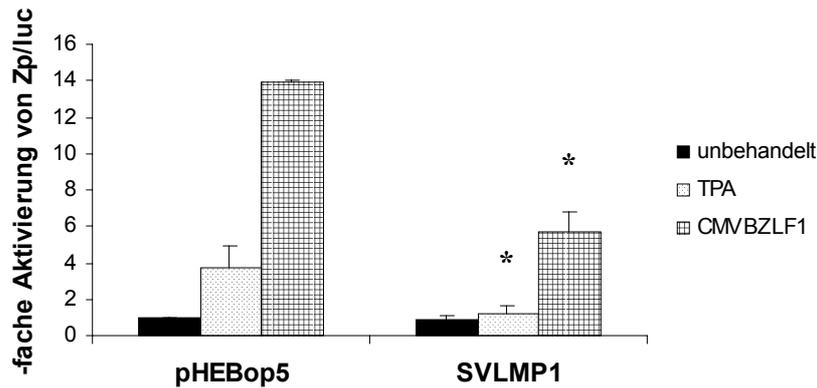


Abbildung 14: Effekt von LMP1 auf die Aktivierung des BZLF1-Promotors durch TPA und BZLF1 in 293-Zellen.

293-Zellen wurden mit 50 ng Zp/luc, 500 ng pHEBop5 oder SVLMP1 und 50 ng pHEBop5 oder CMVBZLF1 transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurde ein Teil der Ansätze mit TPA versetzt. Nach weiteren 24 h wurden die Zellen für einen Luciferase-Test geerntet. Die erhaltenen Messwerte sind als x-fache Aktivierung bezogen auf den Wert der unbehandelten pHEBop5-Transfektion und als Mittelwerte \pm Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten dargestellt. Signifikante Werte mit $p < 0,05$ nach dem Student'schen t-Test sind mit „*“ gekennzeichnet.

In der Epithelzelllinie 293 konnte LMP1 also die initiale Aktivierung des BZLF1-Promotors durch den exogenen Faktor TPA inhibieren, was nach der Untersuchung der B-Zelllinie Ramos offen geblieben war. Die Aktivierung des BZLF1-Promotors durch das BZLF1-Protein selbst konnte in 293-Zellen wie in Ramos-Zellen gut durch LMP1 gehemmt werden.

4.3 Charakterisierung der Signaltransduktionswege von LMP1, die für die Hemmung des lytischen Zyklus verantwortlich sind

4.3.1 LMP1 hemmt die Aktivierung des BZLF1-Promotors durch das BZLF1-Protein in der Zelllinie Ramos unabhängig von CTAR1 und CTAR2

Die Aktivierung der Signaltransduktionswege NF- κ B, p38 MAPK und JNK1 durch LMP1 ist gut charakterisiert (Eliopoulos und Young, 1998; Eliopoulos *et al.*, 1999; Huen *et al.*, 1995; Kieser *et al.*, 1997 und 1999; Mitchell und Sugden, 1995; Schultheiss *et al.*, 2001). Eine Aktivierung des JAK3-Weges durch LMP1 wird diskutiert (Gires *et al.*, 1999; Higuchi *et al.*,

2002). Um herauszufinden, ob die Fähigkeit von LMP1, die Induktion des lytischen Zyklus zu blockieren, einem dieser Signalweg zugeordnet werden kann, wurden BZLF1-Promotorstudien mit spezifischen LMP1-Mutanten durchgeführt. Neben der LMP1- Δ C-Mutante, der die gesamte C-terminale Signaltransduktionsdomäne fehlt, wurden die Mutanten LMP1-PQT>AAA, LMP1-Y384G und LMP1-PQT>AAA/Y384G eingesetzt (siehe auch 1.6.2, Abb. 5). Die PQT>AAA-Mutation betrifft die CTAR1-Region von LMP1, die etwa 30% der NF- κ B- und p38 MAPK-Aktivität vermittelt; durch die Y384G-Mutation in der CTAR2-Region verliert LMP1 etwa 70% der NF- κ B- und p38 MAPK-Aktivität und die komplette JNK1-Aktivität (Huen *et al.*, 1995; Kieser *et al.*, 1997).

Bevor der Effekt der LMP1-Mutanten auf die Aktivierung des BZLF1-Promotors in Ramos-Zellen untersucht wurde, wurden die NF- κ B-Aktivierungskapazität der Mutanten überprüft (Abb. 15). Die Aktivierung des NF- κ B-Signalweges durch LMP1 fiel zwar sehr niedrig aus (vergleiche Abb. 12), das Verhältnis der Mutanten zueinander entsprach aber etwa den in der Literatur zu findenden relativen NF- κ B-Aktivierungskapazitäten der LMP1-Mutanten in 293-Zellen.

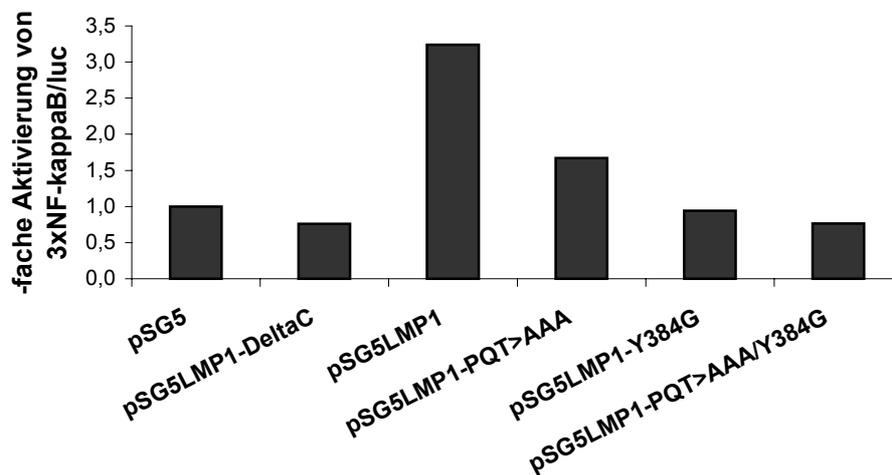


Abbildung 15: Aktivierung des 3xNF- κ B/luc-Konstrukts durch spezifische LMP1-Mutanten.

Je 1×10^7 Ramos-Zellen wurden mit $2,0 \mu\text{g}$ 3xNF- κ B/luc und $0,3 \mu\text{g}$ pSG5, pSG5LMP1- Δ C, pSG5LMP1, pSG5LMP1-PQT>AAA, pSG5LMP1-Y384G oder pSG5LMP1-PQT>AAA/Y384G transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen für einen Luziferase-Test geerntet. Die Luziferase-Aktivität wurde auf die Aktivität der Transfektion des Leervektors pSG5 bezogen.

Um den/die Signaltransduktionsweg(e), über den/die LMP1 die Aktivierung des BZLF1-Promotors hemmen kann, zu identifizieren, wurden nun Ramos-Zellen mit Zp/luc, den verschiedenen pSG5LMP1-Mutanten und pSG5BZLF1 transfiziert. Nach 48 Stunden wurde die Aktivität des BZLF1-Promotors im Luziferase-Test bestimmt (Abb. 16). Die erhaltenen Werte wurden auf die Aktivität der Leervektor-Transfektion bezogen, die auf 100% gesetzt wurde. Da die Aktivierung des BZLF1-Promotors durch TPA extrem gering war und deshalb keine Aussagen über die Effekte der LMP1-Mutanten bezüglich der TPA-Aktivierung möglich waren, wurden nur die Effekte der LMP1-Mutanten auf die wesentlich stärkere BZLF1-Stimulation dargestellt (vergleiche Abb. 13).

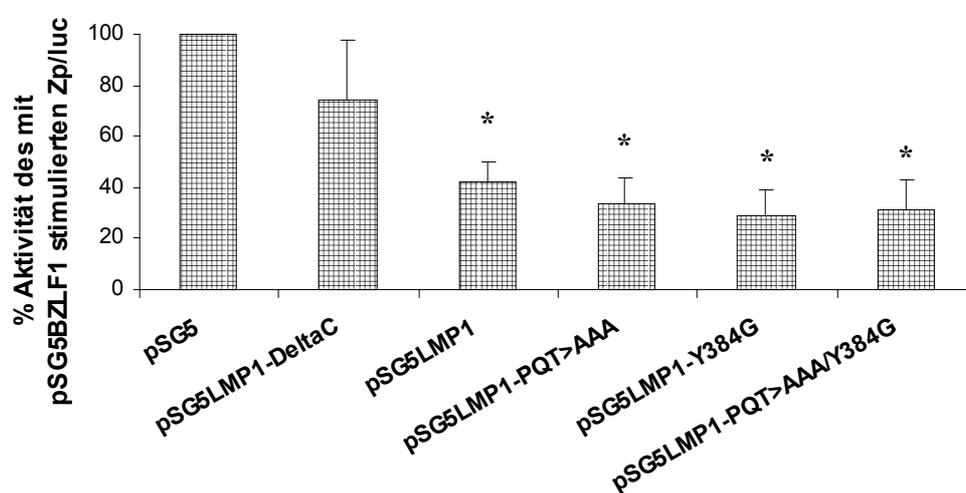


Abbildung 16: Effekt der LMP1-Mutanten auf die Aktivierung des BZLF1-Promotors durch BZLF1 in Ramos-Zellen.

Je 1×10^7 Ramos-Zellen wurden mit $5,0 \mu\text{g}$ Zp/luc, $0,3 \mu\text{g}$ pSG5, pSG5LMP1- ΔC , pSG5LMP1, pSG5LMP1-PQT>AAA, pSG5LMP1-Y384G oder pSG5LMP1-PQT>AAA/Y384G und $1,0 \mu\text{g}$ pSG5BZLF1 transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen für einen Luziferase-Test und eine Proteinmessung geerntet. Die anhand des Proteingehalts normalisierten Daten sind als % Aktivität bezogen auf die auf 100% gesetzte Aktivität der pSG5-Transfektion und als Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten \pm Standardabweichung dargestellt. Signifikante Werte gegenüber der pSG5-Transfektion mit $p < 0,05$ nach dem Student'schen t-Test sind mit „*“ gekennzeichnet.

Wie in Abbildung 16 gezeigt, konnte die durch das BZLF1-Protein induzierte Promotoraktivität durch alle eingesetzten LMP1-Konstrukte mit Ausnahme von LMP1- ΔC signifikant

auf 30% bis 40% relativ zum Leervektor gehemmt werden. In Gegenwart von LMP1- Δ C ging die stimulierte BZLF1-Promotoraktivität wie in einem der vorangegangenen Experimente leicht, aber nicht signifikant zurück (vergleiche Abb. 11). Weder LMP1-Wildtyp noch eine der untersuchten LMP1-Mutanten hatte im Vergleich zum Leervektor pSG5 eine signifikante Wirkung auf die Aktivität des unbehandelten BZLF1-Promotors.

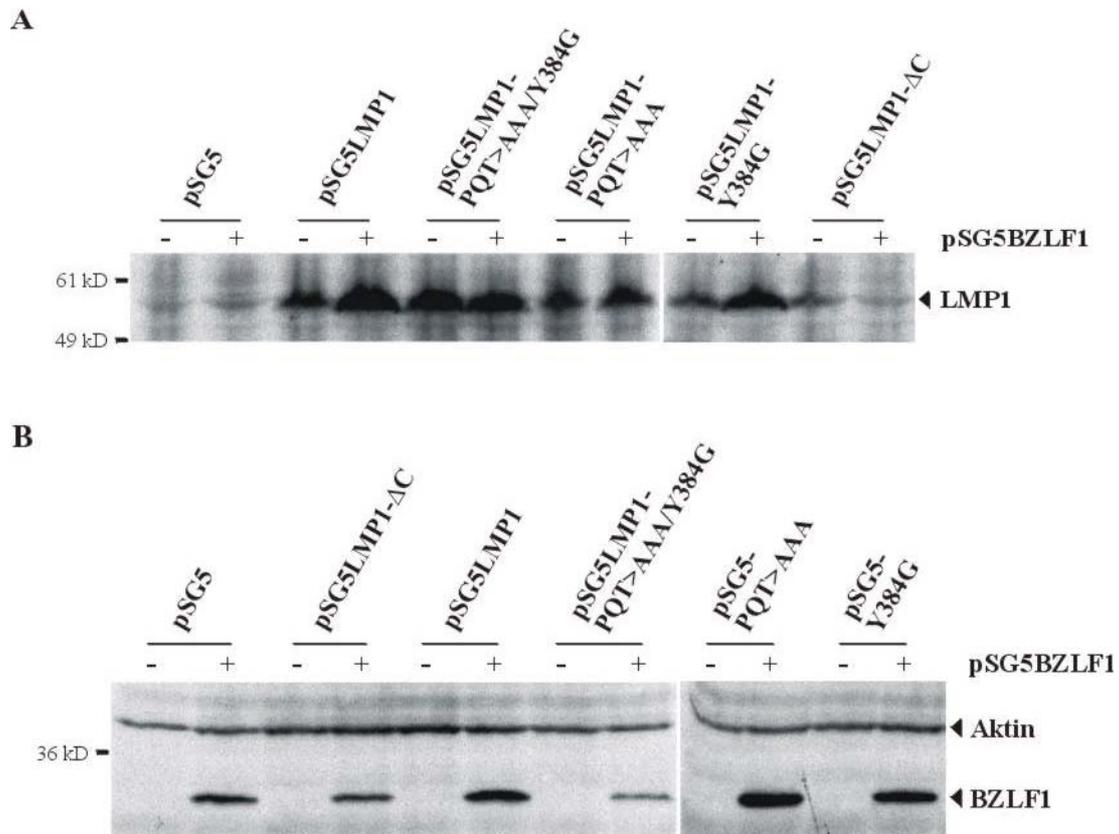


Abbildung 17: Kontrolle der LMP1- und BZLF1-Expression in den transfizierten Ramos-Zellen.

Für die Expressionskontrolle von LMP1 bzw. BZLF1 wurden die Ramos-Zellen 48 h nach der Transfektion in 60 μ l LMP1-Extraktionspuffer bzw. 50 μ l Gesamtzell-Extraktionspuffer aufgenommen. Gleiche Mengen Protein wurden in einer Western Blot-Analyse mit einem anti-LMP1-Antikörper (1:500) (**A**) bzw. einem anti-BZLF1-Antikörper (1:2000) (**B**) untersucht. Zur Ladekontrolle wurde ein Blot nach dem „Strippen“ mit einem anti-Aktin-Antikörper (1:400) (**B**) gefärbt.

In den gezeigten Experimenten konnte mit Ausnahme von LMP1- Δ C, das von dem anti-LMP1-Antikörper nicht erkannt wird, mittels Western Blot-Analyse eine etwa vergleichbare und von der BZLF1-Expression unabhängige Expression der verschiedenen LMP1-Proteine nachgewiesen werden (Abb. 17A). Die BZLF1-Expression variierte zwar zwischen den

verschiedenen Experimenten, war aber unter den Bedingungen, unter denen eine Hemmung des durch das BZLF1-Protein stimulierten BZLF1-Promotors beobachtet werden konnte, gegenüber den Versuchen ohne einen solchen Hemmeffekt eher stärker (Abb. 17B). Die Hemmung des durch das BZLF1-Protein induzierten BZLF1-Promotors beruhte also nicht auf einer Erniedrigung der vom SV40-Promotor getriebenen BZLF1-Expression durch LMP1. Der zytostatische Effekt von LMP1 wird allein von dessen N-terminaler und Transmembrandomäne ausgeübt (Kaykas und Sugden, 2000). Da die LMP1- Δ C-Mutante keinen signifikanten Einfluss auf die durch das BZLF1-Protein aktivierte BZLF1-Promotoraktivität hatte (Abb. 16), konnte dieser Effekt von LMP1 als Ursache für die Hemmung des BZLF1-Promotors durch LMP1 ebenfalls ausgeschlossen werden. In Ramos-Zellen war die Inhibition der Aktivierung des BZLF1-Promotors durch das BZLF1-Protein folglich auf einen spezifischen Effekt, der der C-terminalen Domäne von LMP1 (AS 194 bis 386) zugeordnet werden konnte, zurückzuführen. Dieser Effekt von LMP1 stellte sich im Ramos-System als unabhängig von den beiden C-terminalen Signaldomänen von LMP1, CTAR1 und CTAR2, heraus. Der Einfluss von LMP1 auf den ersten Schritt der BZLF1-Promotoraktivierung durch exogene Faktoren konnte wegen mangelnder Stimulierbarkeit des Promotors in Ramos-Zellen nicht untersucht werden.

4.3.2 LMP1 hemmt die Aktivierung der BZLF1-Expression durch anti-IgM in transient transfizierten EREB-Zellen abhängig von CTAR1 und CTAR2

In den EBV-negativen Ramos-Zellen konnte anhand des artifiziellen BZLF1-Promotor/luc-Konstrukts, das durch exogenes BZLF1-Proteins aktiviert wurde, keine vollständige Aussage über den die Hemmung des lytischen Zyklus vermittelnden Signalweg von LMP1 getroffen werden. Deshalb wurden die LMP1-Mutanten hinsichtlich ihres Einflusses auf die durch anti-IgM induzierte BZLF1-Expression auch in den EBV-positiven EREB-Zellen untersucht. EREB-Zellen besitzen gegenüber Ramos-Zellen den Vorteil, dass sie nach Östrogen-Entzug ihre NF- κ B-Aktivität senken, im Zellzyklus arretieren und damit das der *in vivo*-Situation der latent EBV-infizierten B-Zellen nähere System darstellen (Kempkes *et al.*, 1995; Zimmer-Strobl, unveröffentlichte Daten). Der Effekt der LMP1-Konstrukte auf die Induktion der BZLF1-Expression wurde allerdings nicht durch Untersuchung eines exogenen BZLF1-Promotor/luc-Konstrukts ermittelt, sondern indem die Stärke der durch anti-IgM stimulierten

Expression des endogenen BZLF1-Proteins in Abhängigkeit von der transfizierten LMP1-Mutante gemessen wurde.

Da EREB-Zellen nur mit einer Effizienz von 4% bis 10% transfizierbar waren und ein Effekt der transfizierten LMP1-Proteine auf die anti-IgM-stimulierte BZLF1-Expression vor dem hohen Hintergrund nicht transfizierter Zellen nicht zu erkennen gewesen wäre, mussten die transfizierten von den nicht transfizierten Zellen getrennt werden. Dazu wurde wie in Abbildung 18 dargestellt vorgegangen. Durch das beschriebene MACS-Verfahren konnten die transfizierten Zellen in der Eluat-Fraktion auf 70% bis 90% angereichert werden. Der Anteil transfizierter Zellen in der Durchfluss-Fraktion betrug in der Regel <1%.

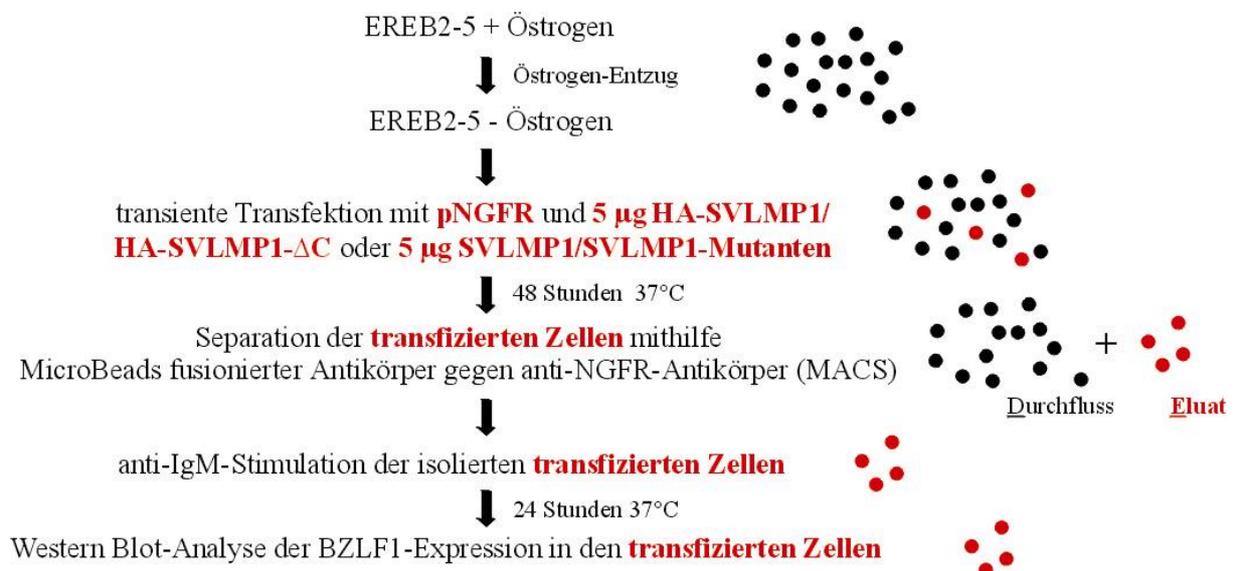


Abbildung 18: Schematische Darstellung der Durchführung der Experimente, deren Daten in den Abbildungen 19 und 20 gezeigt sind.

Vor der Behandlung der transfizierten Zellen mit anti-IgM waren diese von den nicht transfizierten Zellen mit der MACS-Methode getrennt worden.

Die Abbildungen 19 und 20 zeigen das Ergebnis der Western Blot-Analyse der BZLF1-Expression in mit LMP1 oder mit LMP1-Mutanten transfizierten EREB2-5-Zellen.

Für den Vergleich von LMP1-Wildtyp mit LMP1-ΔC, das von dem anti-LMP1-Antikörper nicht erkannt wird, wurden Konstrukte eingesetzt, die für mit Hämagglutinin (HA)-Epitopen versehene Proteine kodieren, und deren Expression mit einem HA-Antikörper nachgewiesen

werden kann (Abb. 19). Für den Vergleich von LMP1-Wildtyp mit den übrigen LMP1-Mutanten fanden wie bisher die mit dem LMP1-Antikörper detektierbaren Konstrukte SVLMP1, SVLMP1-PQT>AAA, SVLMP1-Y384G und SVLMP1-PQT>AAA/Y384G Verwendung (Abb. 20B).

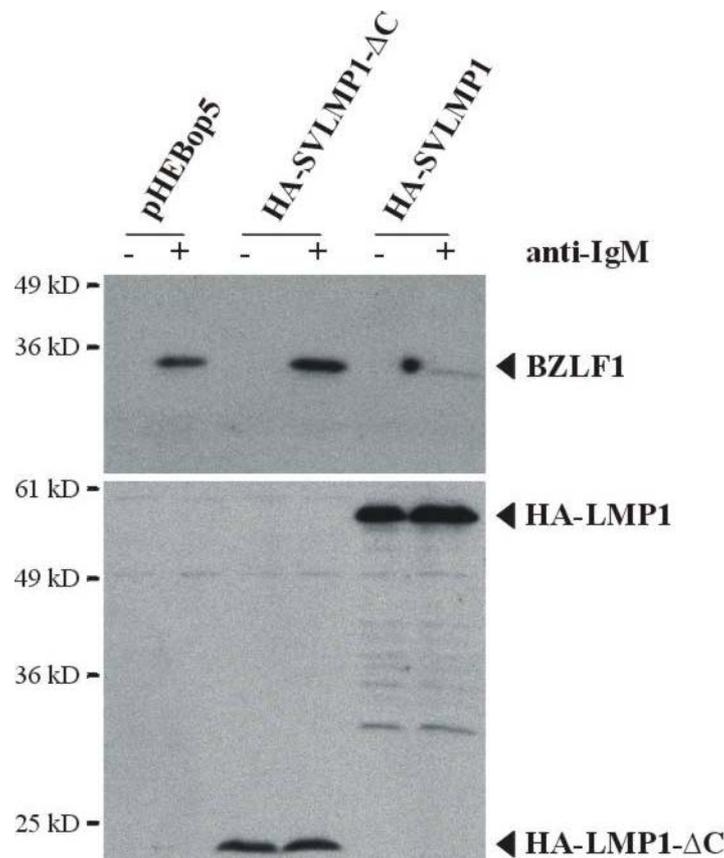


Abbildung 19: Hemmung der anti-IgM-stimulierten BZLF1-Expression durch 5 μ g SVLMP1. Western Blot-Analyse.

Je 9×10^7 EREB2-5-Zellen wurden direkt nach Östrogen-Entzug mit 5 μ g pNGFR und 5 μ g pHEBop5, HA-SVLMP1 oder HA-SVLMP1- Δ C transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen nach der MACS-Methode in NGFR-negative (Durchfluss, D) und NGFR-positive (Eluat, E) Zellen aufgetrennt. Pro Transfektionsansatz wurden anschließend 1×10^6 NGFR-positive Zellen in je zwei unbehandelte oder mit anti-IgM beschichtete Löcher einer Sechs-Loch-Platte gegeben. Weitere 24 h später wurden die Zellen geerntet und in 100 μ l Gesamtzell-Extraktionspuffer lysiert. Je 9 μ l Extrakt wurden in einer Western Blot-Analyse mit einem anti-BZLF1-Antikörper (1:2000) untersucht. Der Blot wurde dann „gestrippt“ und mit einem anti-HA-Antikörper (unverdünnt) gefärbt.

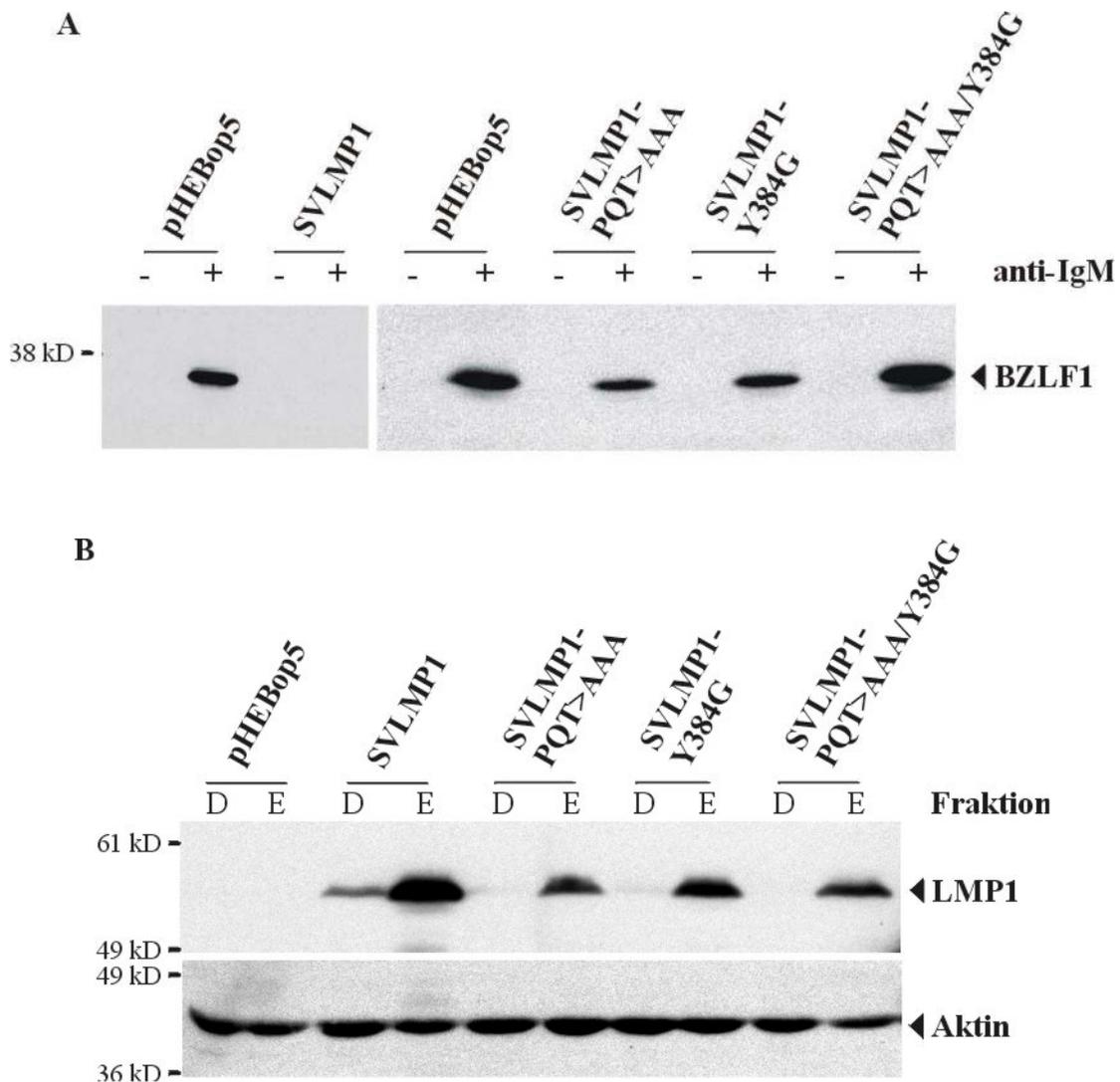


Abbildung 20: Hemmung der anti-IgM-stimulierten BZLF1-Expression durch 5 μ g SVLMP1-Mutanten. Western Blot-Analyse.

Je 5×10^7 EREB2-5-Zellen wurden direkt nach Östrogen-Entzug mit 5 μ g pNGFR und 5 μ g pHEBop5, SVLMP1, SVLMP1-PQT>AAA, SVLMP1-Y384G oder SVLMP1-PQT>AAA/Y384G transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen nach der MACS-Methode in NGFR-negative (D) und NGFR-positive (E) Zellen aufgetrennt. Pro Transfektionsansatz wurden anschließend je 1×10^6 NGFR-negative und NGFR-positive Zellen in je ein unbehandeltes oder mit anti-IgM beschichtetes Loch einer Sechs-Loch-Platte gegeben. Weitere 24 h später wurden die Zellen geerntet und in 75 μ l Gesamtzell-Extraktionspuffer lysiert.

A: Von den Eluat-Fractionen (E) wurden je 12 μ l Extrakt in einer Western Blot-Analyse mit einem anti-BZLF1-Antikörper (1:2000) gefärbt.

B: Von den mit anti-IgM behandelten Durchfluss- (D) und Eluat-Fractionen (E) wurden je 12 μ l Extrakt in einer Western Blot-Analyse mit einem anti-LMP1-Antikörper (1:500) gefärbt. Zur Ladekontrolle wurde der Blot „gestrippt“ und mit einem anti-Aktin-Antikörper (1:400) gefärbt.

Es konnte nachgewiesen werden, dass die deutliche Induktion der BZLF1-Expression durch anti-IgM, die in den mit dem Leervektor pHEBop5 oder mit HA-SVLMP1- Δ C transfizierten Zellen zu beobachten war, in den mit HA-SVLMP1 transfizierten Zellen inhibiert war (Abb. 19). Auch die Mutanten LMP1-PQT>AAA und LMP1-Y384G konnten die Induktion der BZLF1-Expression hemmen, allerdings deutlich schwächer als LMP1-Wildtyp. In den mit der Doppelmutante SVLMP1-PQT>AAA/Y384G transfizierten Zellen hingegen wurde eine mit der pHEBop5-Transfektion vergleichbare Induktion der BZLF1-Expression erreicht (Abb. 20A). Dieses Ergebnis unterschied sich von den Daten der BZLF1-Promotorstudien in proliferierenden Ramos-Zellen, in denen ein artifizielles BZLF1-Promotor/luc-Konstrukt und exogenes BZLF1-Protein für die Stimulation verwendet worden waren (Abb. 16).

In den durchgeführten Experimenten variierte das Ausmaß der Hemmung der BZLF1-Expression durch LMP1. Dies war darauf zurückzuführen, dass der Anteil NGFR-positiver Zellen in der Eluat-Fraktion nach der Anreicherung zwischen 70% und 90% schwankte. In den verbleibenden 10% bis 30% nicht transfizierten Zellen wurde die BZLF1-Expression durch anti-IgM „normal“ induziert, was zu einer von der Anreicherung abhängigen Hintergrundaktivität führte. Die ohnehin schwierige quantitative Auswertung von Western Blot-Analysen wurde durch diese variierende Hintergrundaktivität weiter erschwert.

Um die Effekte der verschiedenen LMP1-Proteine quantitativ auswerten zu können, wurde das Protokoll für die Untersuchung der Hemmung der anti-IgM-induzierten BZLF1-Expression durch LMP1 abgewandelt. Statt die transfizierten Zellen mit der MACS-Methode zu isolieren und im Western Blot zu analysieren, wurden in einer FACS-Analyse die transfizierten Zellen, die den Transfektionsmarker GFP exprimierten, auf die Expression des BZLF1-Proteins untersucht. Die Vorgehensweise ist in Abbildung 21 schematisch dargestellt.

Zunächst wurde die Hemmung der durch anti-IgM induzierten Expression des BZLF1-Proteins in Gegenwart verschiedener LMP1-Mengen bestimmt. Abbildung 22 zeigt, dass zunehmende Mengen LMP1 immer effektiver hemmen konnten: In Abwesenheit von SVLMP1 exprimierten 30% der mit pEGFP-C1 transfizierten, Östrogen-entzogenen EREB2-1-Zellen nach anti-IgM-Behandlung BZLF1. Die Kotransfektion von 0,25 μ g SVLMP1 konnte den Anteil BZLF1 exprimierender Zellen nach anti-IgM-Stimulation in der GFP-positiven Population bereits auf 10% senken, während 5,0 μ g SVLMP1 eine Absenkung auf 5% erreichten. Der Anteil BZLF1 exprimierender Zellen in der unstimulierten GFP-positiven Fraktion betrug 1,1%.

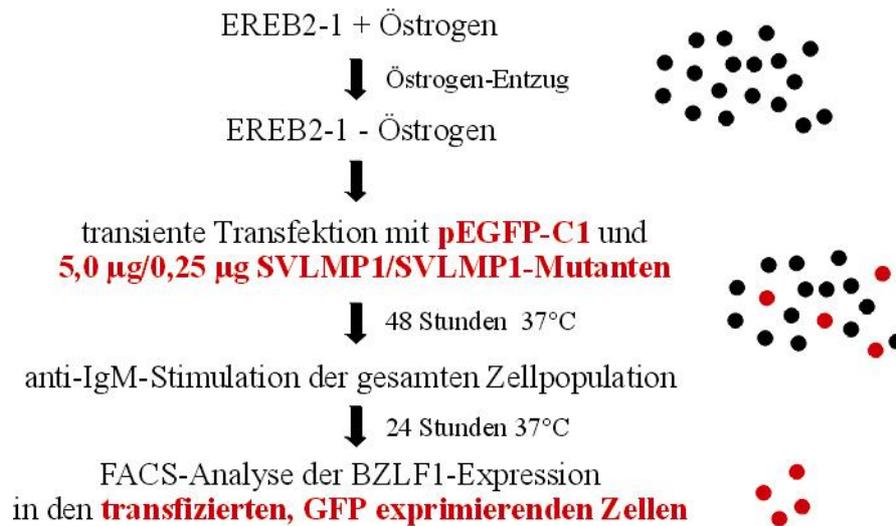


Abbildung 21: Schematische Darstellung der Durchführung der Experimente, deren Daten in den Abbildungen 22 bis 27 gezeigt sind.

Die transfizierten und anti-IgM-behandelten Zellen wurden mittels einer zwei-Farben-FACS-Analyse auf die BZLF1-Expression in der GFP-positiven Zellfraktion untersucht.

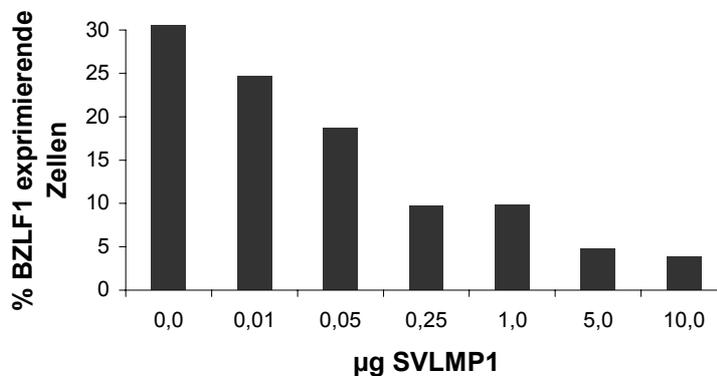


Abbildung 22: Titration von LMP1 anhand der Hemmung der Anzahl BZLF1 exprimierender Zellen.

Je 2×10^7 EREB2-1-Zellen wurden direkt nach Östrogen-Entzug mit $5 \mu\text{g}$ pEGFP-C1 und steigenden Mengen SVLMP1 transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurde jeder Transfektionsansatz auf drei Löcher einer Sechslöch-Platte verteilt, von denen jeweils drei Löcher unbehandelt und drei Löcher mit anti-IgM beschichtet waren. Weitere 24 h später wurden die Zellen mit einem anti-BZLF1-Antikörper (1:800) und einem sekundären, PE-markierten Antikörper intrazellulär gefärbt. In der FACS-Analyse wurde die BZLF1-Expression von 10000 GFP-positiven Zellen untersucht. Dargestellt ist der Anteil BZLF1 exprimierender Zellen an der GFP-positiven, das heißt transfizierten Zellpopulation nach anti-IgM-Stimulation.

Aufgrund der unterschiedlich starken Effekte, die LMP1 bei verschiedenen Konzentrationen zeigte, und um einen konzentrationsabhängigen Effekt der LMP1-Mutanten ausschließen zu können, wurden die SVLMP1-Konstrukte in den folgenden Experimenten in zwei Konzentrationen eingesetzt, 0,25 μg und 5,0 μg .

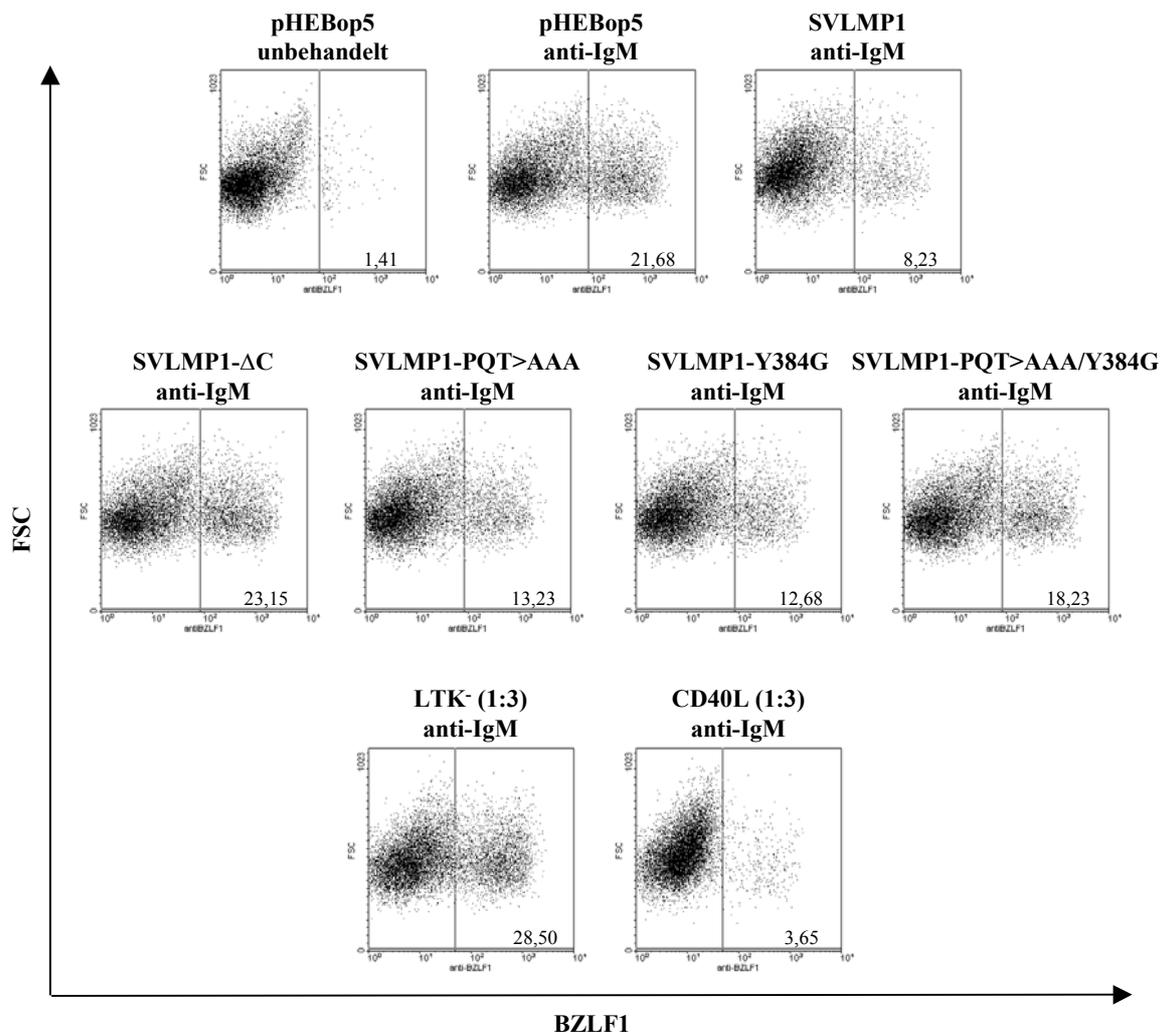


Abbildung 23: Hemmung der anti-IgM-stimulierten BZLF1-Expression durch 5,0 μg SVLMP1 und SVLMP1-Mutanten und durch aktiviertes CD40. FACS-Analyse.

Je 2×10^7 EREB2-1-Zellen wurden direkt nach Östrogen-Entzug mit 5 μg pEGFP-C1 und 5 μg pHEBop5, SVLMP1, SVLMP1- Δ C, SVLMP1-PQT>AAA, SVLMP1-Y384G oder SVLMP1-PQT>AAA/Y384G transfiziert. 48 h später wurden die Zellen zweier der drei pHEBop5-Ansätze mit $0,7 \times 10^7$ LTK⁻- oder CD40L-Zellen in einem Gesamtvolumen von 6 ml für 2 h inkubiert. Anschließend wurde je die Hälfte der Zellen der Transfektionsansätze und der Kokulturen unbehandelt gelassen oder mit anti-IgM stimuliert. Nach weiteren 24 h wurden die Zellen mit einem anti-BZLF1-Antikörper (1:800) und einem sekundären, PE-markierten Antikörper intrazellulär gefärbt. In der FACS-Analyse wurde die BZLF1-Expression von 10000 GFP-positiven Zellen untersucht.

Die Schaubilder einer zwei-Farben-FACS-Analyse eines Experiments, in dem EREB-Zellen mit 5,0 μg der SVLMP1-Konstrukte transfiziert wurden, sind beispielhaft in Abbildung 23 gezeigt, die ausgewerteten Daten mehrerer solcher Experimente sind in dem Diagramm der Abbildung 25 dargestellt. Abbildung 24 weist anhand eines der Experimente die vergleichbare Expression der verschiedenen LMP1-Proteine nach. Die gemittelten Daten der Experimente, in denen die SVLMP1-Konstrukte in einer Menge von 0,25 μg eingesetzt wurden, sind in Abbildung 26 gezeigt.

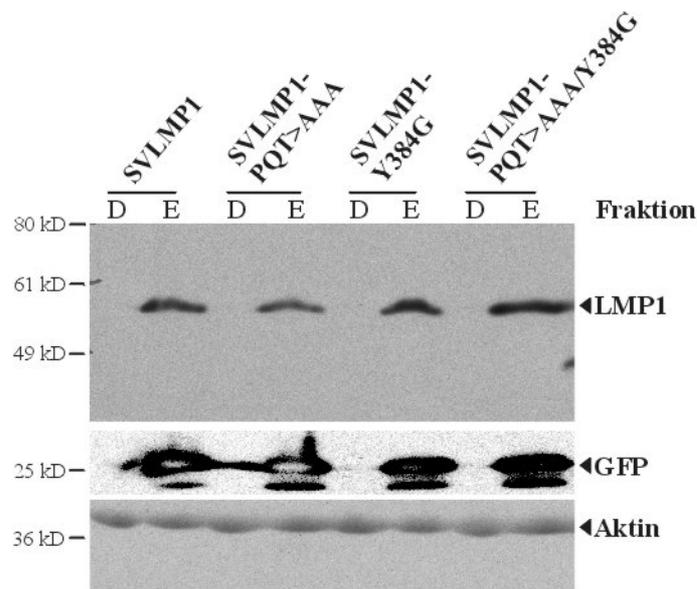


Abbildung 24: Kontrolle der LMP1-Expression in für eine FACS-Analyse transfizierten EREB2-1-Zellen. Je 8×10^7 EREB2-1-Zellen wurden direkt nach Östrogen-Entzug mit 5 μg pEGFP-C1, 4 μg pNGFR und 5 μg pHEBop5, SVLMP1, SVLMP1- Δ C, SVLMP1-PQT>AAA, SVLMP1-Y384G oder SVLMP1-PQT>AAA/Y384G transfiziert. Nach 48 h wurden aus 6×10^7 Zellen die transfizierten Zellen mithilfe der MACS-Methode isoliert. Die abgetrennten nicht transfizierten Zellen (D) wurden in 300 μl , die angereicherten transfizierten Zellen (E) in 60 μl LMP1-Extraktionspuffer lysiert. Gleiche Proteinmengen wurden in einer Western Blot-Analyse mit einem anti-LMP1-Antikörper (1:500) gefärbt. Zur Überprüfung der Anreicherung wurde der Blot „gestrippt“ und mit einem anti-GFP-Antikörper (1:1000) gefärbt. Zur Ladekontrolle wurde der Blot ein weiteres Mal „gestrippt“ und mit einem anti-Aktin-Antikörper (1:400) gefärbt.

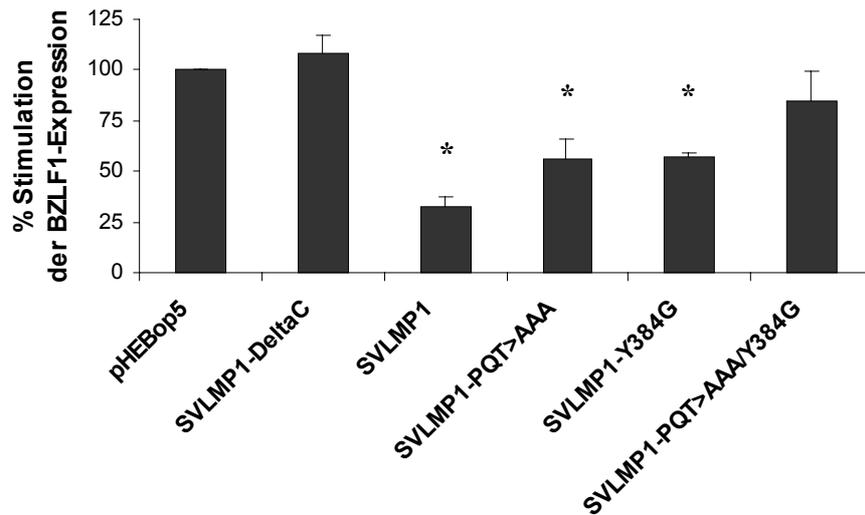


Abbildung 25: Hemmung der anti-IgM-stimulierten BZLF1-Expression durch 5,0 µg SVLMP1 und SVLMP1-Mutanten.

Für die Auswertung der FACS-Daten aus Experimenten wie in Abbildung 23 wurde der Anteil BZLF1-exprimierender Zellen, der in mit pHEBop5 transfizierten EREB2-1-Zellen durch die anti-IgM-Stimulation erreicht wurde, auf 100% gesetzt. Auf diesen Wert wurde der Anteil BZLF1-exprimierender Zellen in den mit 5,0 µg SVLMP1-Konstrukten transfizierten Zellen bezogen. Die Mittelwerte +/- Standardabweichung aus vier unabhängigen Experimenten sind gezeigt. Signifikante Werte gegenüber LMP1-ΔC mit $p < 0,05$ nach dem Student'schen t-Test sind mit „*“ gekennzeichnet.

Weder die Transfektion von 0,25 µg noch die von 5,0 µg SVLMP1-ΔC hatte gegenüber der Transfektion des Leervektors pHEBop5 einen signifikanten Effekt auf die Anzahl der Zellen, die nach der Induktion mit anti-IgM in den lytischen Zyklus eintraten. Verglichen mit der Transfektion von pHEBop5 und SVLMP1-ΔC konnte durch die Transfektion von 0,25 µg oder 5,0 µg SVLMP1 die Zahl BZLF1-exprimierender Zellen nach der anti-IgM-Stimulation signifikant auf etwa 50% bzw. 30% gesenkt werden. Durch die Kokultivierung mit CD40-Ligand exprimierenden Zellen war die Reaktivierung im Vergleich zur Kokultivierung mit LTK⁻-Kontrollzellen sogar auf 10% der Zellen beschränkt. Die Untersuchung der LMP1-Mutanten ergab, dass die Doppelmutante LMP1-PQT>AAA/Y384G in keiner der eingesetzten Konzentrationen gegenüber LMP1-ΔC einen eindeutigen Einfluss auf die Stimulierbarkeit der BZLF1-Expression durch anti-IgM besaß. In den Experimenten, in denen 5,0 µg der SVLMP1-Konstrukte LMP1-PQT>AAA oder LMP1-Y384G eingesetzt wurden, wurde die durch anti-IgM induzierte BZLF1-Expression gegenüber LMP1-Wildtyp und LMP1-PQT>AAA/Y384G signifikant auf etwa 55% gehemmt. Im Fall der Transfektion von 0,25 µg

dieser Mutanten zeigte dagegen LMP1-PQT>AAA einen etwas stärkeren hemmenden Effekt als LMP1-Y384G. Die Transfektion von 0,25 μ g SVLMP1-PQT>AAA führte zu einer gegenüber der Doppelmutante signifikanten Absenkung der Zahl BZLF1 exprimierender Zellen auf 66%. LMP1-Y384G hemmte die Zahl BZLF1 exprimierender Zellen nur auf 83%.

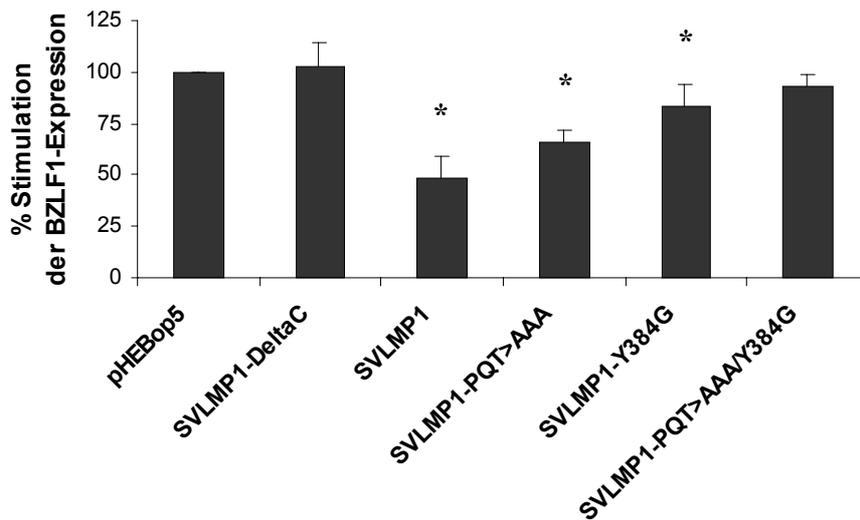


Abbildung 26: Hemmung der anti-IgM-stimulierten BZLF1-Expression durch 0,25 μ g SVLMP1 und SVLMP1-Mutanten.

Je 2×10^7 EREB2-1-Zellen wurden direkt nach Östrogen-Entzug mit 5 μ g pEGFP-C1 und 0,25 μ g pHEBop5, SVLMP1, SVLMP1- Δ C, SVLMP1-PQT>AAA, SVLMP1-Y384G oder SVLMP1-PQT>AAA/Y384G transfiziert. 48 h später wurden die Hälfte der Zellen mit anti-IgM stimuliert. Nach weiteren 24 h wurden die Zellen mit einem anti-BZLF1-Antikörper (1:800) und einem sekundären, PE-markierten Antikörper intrazellulär gefärbt. In der FACS-Analyse wurde die BZLF1-Expression von 10000 GFP-positiven Zellen untersucht. Für die Auswertung der FACS-Daten wurde der in mit pHEBop5 transfizierten Zellen durch die anti-IgM-Stimulation erreichte Anteil BZLF1-exprimierender Zellen auf 100% gesetzt. Auf diesen Wert wurde der Anteil BZLF1-exprimierender Zellen in den mit 0,25 μ g LMP1-Konstrukten transfizierten Zellen bezogen. Die Mittelwerte \pm Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten sind gezeigt. Signifikante Werte gegenüber LMP1- Δ C mit $p < 0,05$ nach dem Student'schen t-Test sind mit „*“ gekennzeichnet.

Für die Hemmung der durch anti-IgM stimulierten BZLF1-Expression durch LMP1 in EREB-Zellen waren also beide von den Mutationen betroffenen Domänen von LMP1 von Bedeutung. Der Bedarf von CTAR1 sprach für die Beteiligung mindestens einer der beiden Signalwege NF- κ B oder p38 MAPK. Da auch CTAR2 für die hemmende Wirkung auf die

Virusreaktivierung nötig war, war auch eine zusätzliche Beteiligung des JNK1-Signalweges möglich.

Bei der Untersuchung der LMP1-Mutanten konnte eine weitere interessante Beobachtung gemacht werden. Ein Nebenprodukt der zwei-Farben-FACS-Analyse der mit pEGFP-C1 kotransfizierten und auf BZLF1 gefärbten Zellen war die Erhebung von Daten über den Anteil GFP-positiver Zellen an der Gesamtpopulation drei Tage nach der Transfektion in Abhängigkeit von dem kotransfizierten SVLMP1-Konstrukt (Abb. 27).

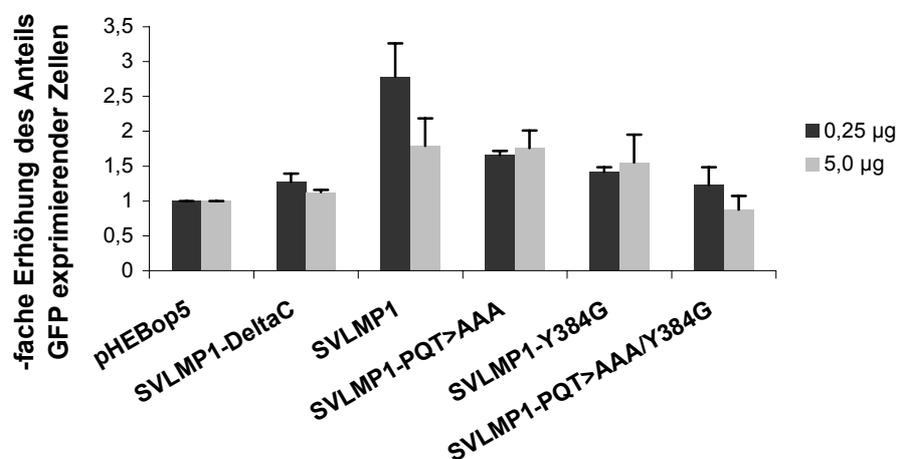


Abbildung 27: Effekt der LMP1-Konstrukte auf die Anzahl transfizierter Zellen.

Die zwei-Farben-FACS-Analysen der Abbildungen 25 und 26 lieferten den Anteil transfizierter, das heißt GFP-positiver EREB2-1-Zellen an der Gesamtpopulation 3 d nach der Transfektion in Abwesenheit von Östrogen. Die erhaltenen Werte unstimulierter und mit anti-IgM stimulierter Ansätze der gleichen Transfektion wurden gemittelt und auf den in der pHEBop5-Transfektion gemessenen Anteil bezogen. Die Mittelwerte +/- Standardabweichung aus drei (0,25 µg) bzw. vier (5,0 µg) unabhängigen Experimenten sind gezeigt.

Es zeigte sich, dass bei transienter LMP1-Expression der Anteil der GFP-positiven, Östrogenentzogenen EREB-Zellen an der Gesamtpopulation drei Tage nach der Transfektion um das 2,8-fache (0,25 µg SVLMP1) bzw. das 1,8-fache (5,0 µg SVLMP1) erhöht werden konnte. Im Fall der niedrigeren transfizierten Plasmidmenge war dieser Effekt nur bei LMP1-Wildtyp zu sehen und bei keiner der LMP1-Mutanten, während bei der transfizierten Plasmidmenge von 5 µg auch die Einzelmutanten noch einen leichte Steigerung des Anteils transfizierter Zellen gegenüber dem Leervektor zeigten.

Durch Untersuchungen der DNA-Syntheserate (^3H -Thymidin-Einbau) und der Stoffwechselaktivität („MTT-Assay“) war bereits gezeigt worden, dass konstitutiv exprimiertes LMP1 zwar nicht die Proliferation, aber das Überleben Östrogen-entzogener EREB-Zellen verlängern kann (Zimber-Strobl *et al.*, 1996). Die hier mit den LMP1-Mutanten gewonnenen Daten weisen darauf hin, dass der Effekt von LMP1, das Überleben von EREB-Zellen in Abwesenheit von Östrogen zu unterstützen, hauptsächlich über CTAR1- und CTAR2-abhängige Signalwege vermittelt wird.

4.3.3 LMP1 hemmt die Aktivierung der VCA-Expression durch anti-IgM in stabil transfizierten EREB-Zellen abhängig von CTAR1 und CTAR2

Neben den transienten Transfektionsexperimenten wurde für die Analyse der LMP1-Mutanten ein weiterer Ansatz versucht. Dazu wurden stabil mit den SVLMP1-Konstrukten transfizierte EREB-Zellklone etabliert und in diesem System die Induzierbarkeit des lytischen Zyklus untersucht. Derartige Zelllinien besaßen den Vorteil der stabilen, konstitutiven Expression des jeweiligen Konstrukts in einer Konzentration, die das kontinuierliche Wachstum der Zellen nicht beeinflusste, eine Aussage, die für die transienten Transfektionsversuche nicht gemacht werden konnte. Ein weiterer Vorteil bestand darin, dass die Zelllinien nach einer zwar aufwendigen Etablierungsphase keiner weiteren Transfektionen mehr bedurften.

Nach der Transfektion der Konstrukte SVLMP1-PQT>AAA, SVLMP1-Y384G und SVLMP1-PQT>AAA/Y384G in EREB2-5-Zellen wurden die unter Hygromycin-Selektion heranwachsenden Klone auf die Expression von LMP1 in Abwesenheit von Östrogen getestet. In den insgesamt 67 erhaltenen, hygromycinresistenten Klonen wurden zwei Klone gefunden, die stabil SVLMP1-PQT>AAA trugen (1G2, 2F11), und sechs Klone, die stabil SVLMP1-Y384G trugen (1A3, 1B12, 1D5, 1F6, 2C10, 2D10), aber kein Klon, der stabil mit dem SVLMP1-PQT>AAA/Y384G-Konstrukt transfiziert war (Abb. 28A). Alle acht Klone exprimierten etwa die gleiche Menge an LMP1-Protein.

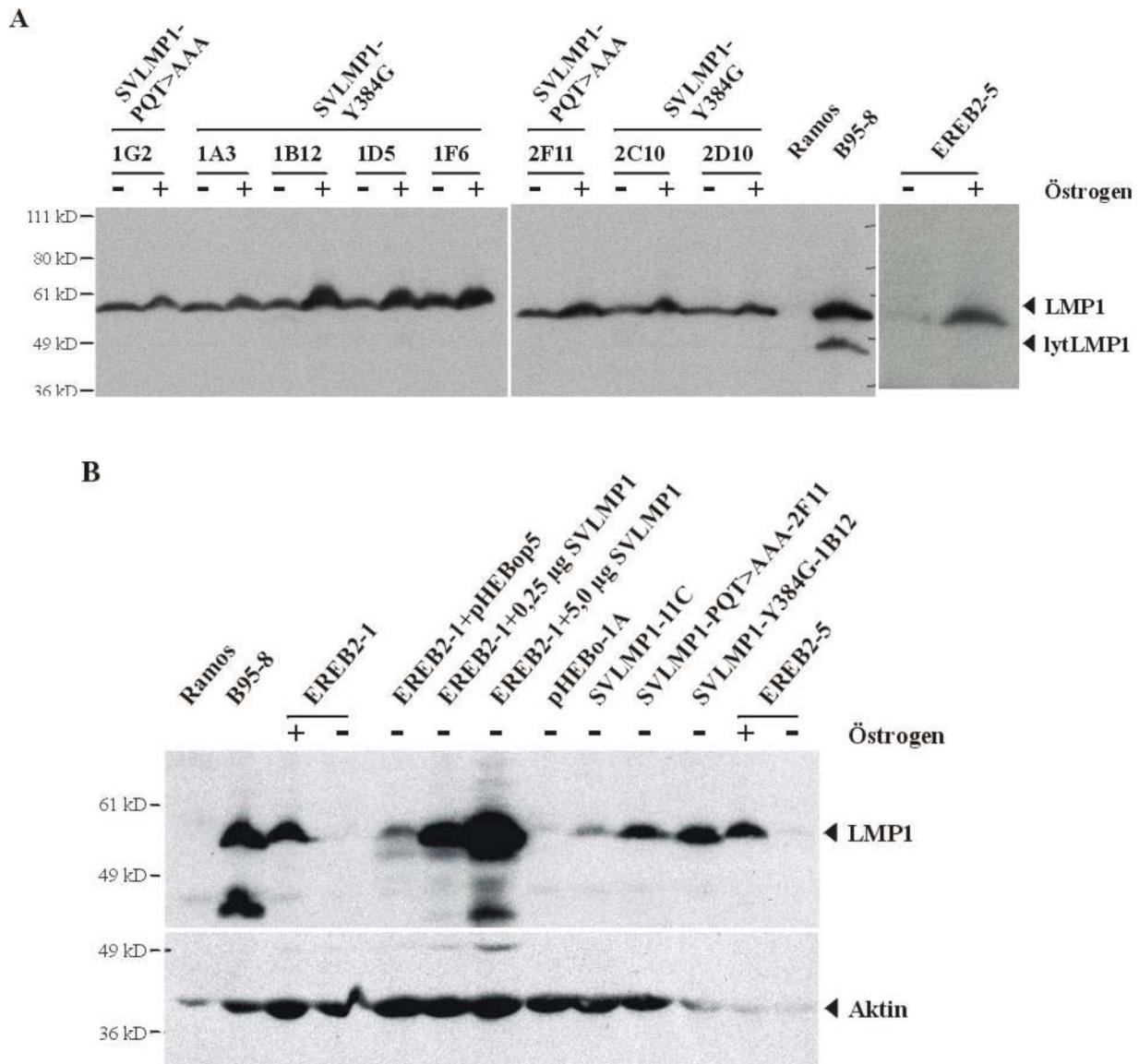


Abbildung 28: Expression von LMP1 in stabil transfizierten EREB2-5-Klonen.

A: Je 1×10^6 Zellen der Klone SVLMP1-PQT>AAA-1G2, -2F11 und SVLMP1-Y384G-1A3, -1B12, -1D5, -1F6, -2C10, -2D10 und der Mutterlinie EREB2-5 wurden nach Östrogen-Entzug 3 d in 1,5 ml Medium mit oder ohne Östrogen inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in 60 μ l LMP1-Extraktionspuffer lysiert. Zusätzlich wurden Extrakte der negativen Kontrolle Ramos und der positiven Kontrolle B95-8 hergestellt. Gleiche Proteinmengen wurden in einer Western Blot-Analyse mit einem anti-LMP1-Antikörper (1:500) untersucht.

B: Proteinextrakte in LMP1-Extraktionspuffer aus den Zellen EREB2-1, EREB2-5, pHEBo-1A, SVLMP1-11C, SVLMP1-PQT>AAA-2F11 und SVLMP1-Y384G-1B12, denen für 3 d Östrogen aus dem Medium entzogen worden war, daneben Extrakte aus Ramos- und B95-8-Zellen sowie aus mit pHEBop5, 0,25 μ g SVLMP1 oder 5,0 μ g SVLMP1 transfizierten, Östrogen-entzogenen EREB2-1-Zellen (Abb. 23 bis 26) wurden in einer Western Blot-Analyse mit einem anti-LMP1-Antikörper (1:500) untersucht. Zur Ladekontrolle wurde der Blot „gestrippt“ und mit einem anti-Aktin-Antikörper (1:400) gefärbt.

Ein Vergleich der Expressionsstärken von LMP1 in Östrogen-entzogenen EREB-Zellen, die stabil LMP1, LMP1-PQT>AAA oder LMP1-Y384G exprimierten, mit EREB-Zellen in Anwesenheit von Östrogen und mit Östrogen-entzogenen EREB-Zellen, die transient mit 0,25 µg oder 5,0 µg SVLMP1 transfiziert worden waren, zeigte, dass die stabil transfizierten Zellklone etwa vergleichbare Mengen an LMP1 exprimierten wie in Gegenwart von Östrogen proliferierende EREB-Zellen und wie in Abwesenheit von Östrogen transient mit 0,25 µg SVLMP1 transfizierte Zellen (Abb. 28B).

Die erhaltenen LMP1-PQT>AAA oder LMP1-Y384G exprimierenden Zellklone wurden anschließend auf die Expression von IgM auf der Zelloberfläche zwei Tage nach Östrogen-Entzug untersucht. Alle Klone zeigten eine niedrigere mittlere Expression von IgM als die Mutterlinie EREB2-5 und die Konrolllinie pHEBo-1A, was sowohl an einer geringeren Zahl IgM-positiver Zellen als auch an einer geringeren IgM-Expression der positiven Zellen lag (Tab. 1).

	mittlere IgM-Expression
EREB2-5	25,95
pHEBo-1A	26,72
SVLMP1-11C	32,03
SVLMP1-13C	49,15
SVLMP1-PQT>AAA-1G2	15,09
SVLMP1-PQT>AAA-2F11	22,21
SVLMP1-Y384G-1A3	22,57
SVLMP1-Y384G-1B12	17,86
SVLMP1-Y384G-1D5	8,39
SVLMP1-Y384G-1F6	19,41
SVLMP1-Y384G-2C10	8,21
SVLMP1-Y384G-2D10	12,19

Tabelle 1: Expression von IgM auf den stabil transfizierten EREB2-5-Klonen.

Etwa 1×10^6 Zellen der Mutterlinie EREB2-5 und der Klone pHEBo-1A, SVLMP1-11C, -13C, SVLMP1-PQT>AAA-1G2, -2F11, SVLMP1-Y384G-1A3, -1B12, -1D5, -1F6, -2C10 und -2D10 wurden 2 d nach Östrogen-Entzug mit einem anti-IgM-Antikörper (1:20) und einem sekundären, FITC-markierten Antikörper extrazellulär gefärbt und mittels FACS-Analyse auf die IgM-Expression untersucht. Gezeigt ist die mittlere Fluoreszenz der Zellen.

Drei der Klone, deren mittlere Fluoreszenz nach der Färbung von IgM in der FACS-Analyse um mehr als die Hälfte niedriger war als die von pHEBo-1A, wurden ausgeschlossen. In den verbliebenen fünf Klonen lag die mittlere Fluoreszenz zwischen 15% und 23% und damit etwa im Bereich der von pHEBo-1A (27%), was die für die geplanten Experimente notwendige Voraussetzung einer vergleichbaren Stimulation des B-Zell-Rezeptors durch anti-IgM erfüllte. Bei den nun zur Verfügung stehenden Klone handelte es sich um SVLMP1-PQT>AAA-1G2 und -2F11 sowie SVLMP1-Y384G-1A3, -1B12 und -1D5.

Die verbliebenen Klone, einer, der den Leervektor pHEBop5 exprimiert, je zwei, die LMP1-Wildtyp bzw. LMP1-PQT>AAA exprimierten und drei, die LMP1-Y384G exprimierten, konnten nun nach Östrogen-Entzug auf Unterschiede in der Induzierbarkeit des lytischen Zyklus durch anti-IgM untersucht werden (Abb. 29). Als Marker für die Virusreaktivierung wurde wie in früheren Versuchen die Expression des viralen Kapsidantigens VCA bestimmt (vergleiche Abb. 9 und Adler *et al.*, 2002).

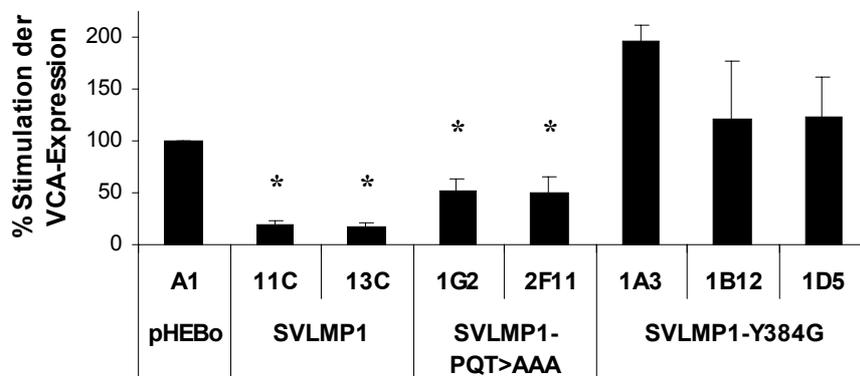


Abbildung 29: Hemmung der anti-IgM-stimulierten VCA-Expression in stabil LMP1 oder LMP1-Mutanten exprimierenden EREB2-5-Zellen.

Je $0,25 \times 10^6$ Zellen der Klone pHEBo-1A, SVLMP1-11C, -13C, SVLMP1-PQT>AAA-1G2, -2F11 und SVLMP1-1A3, -1B12, -1D5 wurden 24 h nach Östrogen-Entzug unbehandelt gelassen oder mit auf eine 24-Loch-Platte geschichtetem anti-IgM stimuliert. Nach 48 h wurden die Zellen intrazellulär mit einem anti-VCA-Antikörper (1:1000) und einem sekundären, FITC-markierten Antikörper gefärbt und mittels FACS-Analyse untersucht. Der durch die anti-IgM-Stimulation erreichte Anteil VCA-exprimierender Zellen wurde auf den auf 100% gesetzten Anteil in anti-IgM-stimulierten pHEBo-1A-Zellen bezogen. Die Mittelwerte +/- Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten sind gezeigt. Signifikante Werte gegenüber pHEBo-1A mit $p < 0,05$ nach dem Student'schen t-Test sind mit „*“ gekennzeichnet.

Bezogen auf die Stimulierbarkeit der VCA-Expression durch anti-IgM in pHEBo-1A-Zellen war die Induktion des lytischen Zyklus in den SV-LMP1-11C- und -13C-Zellen auf etwa 20% gehemmt. In den beiden SVLMP1-PQT>AAA-Zellklonen 1G2 und 2F11 konnte die Induktion des lytischen Zyklus hingegen nicht mehr ganz so gut blockiert werden wie in den LMP1-Wildtyp exprimierenden Zellen, nämlich nur noch auf etwa 50% gegenüber pHEBo-1A. In den drei SVLMP1-Y384G-Klonen 1A3, 1B12 und 1D5 war der Hemmeffekt von LMP1 völlig aufgehoben, die Klone zeigten sogar eher eine Verstärkung der Aktivierung der VCA-Expression nach anti-IgM-Stimulation verglichen mit pHEBo-1A. In Abwesenheit von anti-IgM waren keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Klonen in dem basalen Anteil VCA-exprimierender Zellen festzustellen, der in allen Fällen weniger als 1% betrug. Die nach der IgM-Expressionskontrolle ausgeschlossenen Zellklone wurden in diesem Experiment parallel mitgetestet, sie zeigten aber in der Tat keine Induktion der VCA-Expression durch anti-IgM.

Bezüglich der PQT>AAA-Mutation kamen also die transienten und stabilen Transfektionsexperimente zu dem übereinstimmenden Ergebnis, dass LMP1 mit einer Mutation im PxQxT-Motiv in CTAR1 zwar nicht mehr so gut wie Wildtyp, aber immer noch deutlich die Induktion des lytischen Zyklus hemmen kann. Der Y384G-Mutation in CTAR2 hingegen schien in den stabilen Transfektionsexperimenten eine größere Bedeutung zuzukommen als in den transienten Versuchen. In den stabil mit SVLMP1-Y384G transfizierten Zellklonen, die eine mit der transienten Transfektion von 0,25 µg Plasmid vergleichbare Expressionsstärke zeigten, war die hemmende Wirkung von LMP1 auf die durch anti-IgM stimulierte BZLF1-Expression vollständig aufgehoben (Abb. 29). Die transienten Experimente zeigten zwar bei der Transfektion von 0,25 µg der Expressionsplasmide einen leicht stärkeren Verlust des Hemmeffektes von LMP1-Y284G gegenüber LMP1-PQT>AAA (Abb. 26), bei der Transfektion von 5,0 µg der Konstrukte war aber kein Unterschied zwischen den beiden Einzelmutanten feststellbar (Abb. 25).

Bei der Etablierung von Zellklonen können große klonale Varianzen auftreten, was beispielhaft an der stark variierenden Expression des Oberflächenproteins IgM in den gewonnenen Klonen zu sehen war (Tab. 1). Die Vergleichbarkeit von mit verschiedenen Konstrukten transfizierten Zellklonen erfordert daher eine große Gruppe stabiler Klone, so dass die spezifischen Eigenschaften jedes Zellklons relativiert werden. Unter Berücksichtigung der verhältnismäßig niedrigen Zahl untersuchter Klone kann dennoch tendenziell von der

gleichen Schlussfolgerung ausgegangen werden wie nach den transienten Experimenten: Mindestens einer der beiden CTAR1- und CTAR2-abhängigen Signalwege NF- κ B oder p38 MAPK könnte an dem die Virusreaktivierung hemmenden Effekt von LMP1 beteiligt sein. Daneben wäre auch eine Mitwirkung des nur von CTAR2 vermittelten JNK1-Signalweges möglich. Eine Beteiligung weiterer, CTAR1- und CTAR2-unabhängiger Signalwege schien dagegen eher unwahrscheinlich.

Die weitere Aufklärung der Signaltransduktionswege, die für die Hemmung des lytischen Zyklus durch LMP1 verantwortlich sind, konnte nicht mithilfe der LMP1-Mutanten erfolgen, sondern bedurfte anderer spezifischer Inhibitionen der in Frage kommenden Signalwege.

4.3.4 Die Hemmung der durch anti-IgM aktivierten BZLF1-Expression in EREB-Zellen ist unabhängig von p38 MAPK und JNK1

Um die Bedeutung des p38 MAPK-Signalweges für die Regulation des lytischen Zyklus durch LMP1 zu prüfen, wurden Experimente mit dem spezifischen chemischen Inhibitor der p38-Kinase (SB203580) und mit einer dominant-negativ wirkenden Mutante der die p38-Kinase phosphorylierenden Kinase MKK6 (dnMKK6) durchgeführt (siehe auch 1.6.2, Abb. 5).

Für die Untersuchung der Signaltransduktion von LMP1 in B-Zellen und Epithelzellen wurde der Inhibitor SB203580 in der Regel in einer Konzentration von 20 μ M eingesetzt (Eliopoulos *et al.*, 1999; Mehl *et al.*, 2001). Um die Verwendung einer optimalen Konzentration sicherzustellen, wurde SB203580 in dem folgenden Experiment zusätzlich in den Konzentrationen 10 μ M und 40 μ M verwendet. Wie in Abbildung 30A gezeigt, wurde der Hemmeffekt von LMP1 in Gegenwart des Lösemittels DMSO oder von SB203580 in verschiedenen Konzentrationen im Vergleich zu mit pHEBop5 transfizierten Zellen nicht beeinflusst. In allen Fällen betrug der Anteil BZLF1 exprimierender Zellen im Vergleich zur entsprechend behandelten pHEBop5-Transfektion etwa 60%.

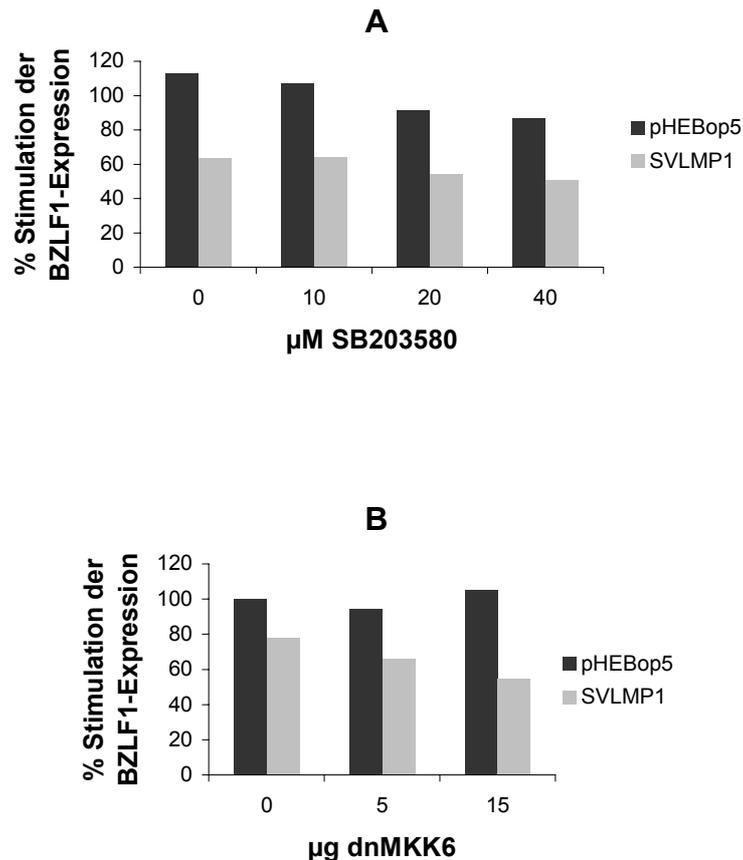


Abbildung 30: Die Inhibition des p38 MAPK-Signalweges hat keinen Einfluss auf den hemmenden Effekt von LMP1 auf die Induktion des lytischen Zyklus.

A: Je 4×10^7 EREB2-1-Zellen wurden direkt nach Östrogen-Entzug mit $5,0 \mu\text{g}$ pEGFP-C1 und $0,0$ oder $0,25 \mu\text{g}$ SVLMP1 transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurde jeweils 1/5 der Zellen jedes Ansatzes unbehandelt gelassen, mit DMSO (1:500) oder mit SB203580 in einer Endkonzentration von 10, 20 oder $40 \mu\text{M}$ versetzt. Nach einer Vorinkubation von 2 h wurde die Hälfte der Zellen mit anti-IgM stimuliert.

B: Je 2×10^7 EREB2-1-Zellen wurden direkt nach Östrogen-Entzug mit $5,0 \mu\text{g}$ pEGFP-C1, $0,0$, $5,0$ oder $15,0 \mu\text{g}$ dnMKK6 und $0,0$ oder $0,25 \mu\text{g}$ SVLMP1 transfiziert. Nach 48 h wurde die Hälfte der Zellen mit anti-IgM stimuliert.

24 h nach der anti-IgM-Stimulation wurden die Zellen mit einem anti-BZLF1-Antikörper (1:800) und einem sekundären, PE-markierten Antikörper intrazellulär gefärbt. In der FACS-Analyse wurden 10000 GFP-positive Zellen auf ihre BZLF1-Expression untersucht. Der in mit unbehandelten pHEBop5 transfizierten Zellen durch die anti-IgM-Stimulation erreichte Anteil BZLF1-exprimierender Zellen wurde auf 100% gesetzt, worauf die in den übrigen Ansätzen erhaltenen Werte bezogen wurden.

Zu dem gleichen Ergebnis kamen auch Untersuchungen mit dem dominant-negativen Inhibitor dnMKK6. Die Kotransfektion von SVLMP1 und unterschiedlichen Mengen dnMKK6 führte ebenfalls zu keiner Verminderung der von LMP1 vermittelten Hemmung des

lytischen Zyklus durch LMP1 (Abb. 30B). DnMKK6 verstärkte eher die hemmende Wirkung von LMP1 auf die durch anti-IgM induzierte BZLF1-Expression. Ein ähnlicher Rückgang der Zahl BZLF1 exprimierender Zellen nach anti-IgM-Stimulation war auch in Gegenwart des Inhibitors SB203580 zu beobachten (Abb. 30A). Dieser Effekt beruhte darauf, dass der durch anti-Immunglobulin-Antikörper aktivierte B-Zell-Rezeptor unter anderem den p38 MAPK-Signalweg anschaltet (Sutherland *et al.*, 1996) und somit in Gegenwart von p38 MAPK-Inhibitoren die Induktion der BZLF1-Expression durch anti-IgM zum Teil blockiert ist.

Durch die eingesetzten Inhibitoren des p38 MAPK-Signalweges konnte somit die Wirkung von LMP1 auf die Induktion des lytischen Zyklus nicht aufgehoben werden, was gegen eine Beteiligung dieses Weges an der Hemmung des lytischen Zyklus durch LMP1 sprach.

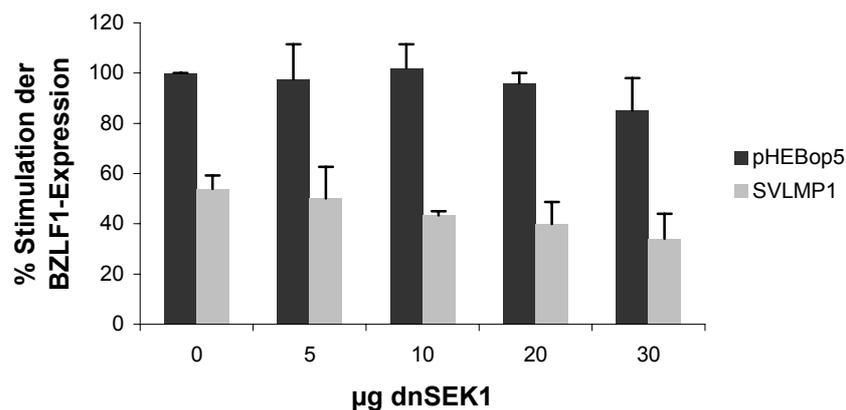


Abbildung 31: Die Inhibition des JNK1-Signalweges hat keinen Einfluss auf den hemmenden Effekt von LMP1 auf die Induktion des lytischen Zyklus.

Je 2×10^7 EREB2-1-Zellen wurden direkt nach Östrogen-Entzug mit 5,0 µg pEGFP-C1, 0,0, 5,0, 10,0, 20,0 oder 30,0 µg dnSEK1 und 0,0 oder 0,25 µg SVLMP1 transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurde die Hälfte der Zellen jedes Ansatzes mit anti-IgM stimuliert. 24 h später wurden die Zellen mit einem anti-BZLF1-Antikörper (1:800) und einem sekundären, PE-markierten Antikörper intrazellulär gefärbt. In der FACS-Analyse wurden 10000 GFP-positive Zellen auf ihre BZLF1-Expression untersucht. Der Anteil BZLF1-exprimierender Zellen wurde auf den auf 100% gesetzten Anteil BZLF1-positiver Zellen in der anti-IgM-stimulierten pHEBop5-Transfektion bezogen. Gezeigt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten.

Nach den Ergebnissen der Mutationsanalyse von LMP1 konnte auch der JNK1-Signalweg in Betracht gezogen werden, an der Hemmung der Virusreaktivierung durch LMP1 beteiligt zu

sein. Diese Möglichkeit wurde mithilfe einer dominant-negativ wirkenden Mutante der JNK1 phosphorylierenden Kinase SEK1 (dnSEK1) überprüft (siehe auch 1.6.2, Abb. 5).

Abbildung 31 zeigt das Ergebnis von Untersuchungen der Zahl BZLF1 exprimierender Zellen nach anti-IgM-Stimulation Östrogen-entzogener EREB2-1-Zellen, die mit SVLMP1 und unterschiedlichen Mengen dnSEK1 kotransfiziert worden waren. In Gegenwart steigender Mengen dnSEK1 kam es zu einer leichten, aber nicht signifikanten Verstärkung der Hemmung der BZLF1-Expression durch LMP1 von etwa 50% in Abwesenheit von dnSEK1 auf etwa 40% bei Kotransfektion von 30 µg dnSEK1.

Ebenso wie p38 MAPK konnte also auch der JNK1-Signalweg als Vermittler der den lytischen Zyklus hemmenden Wirkung von LMP1 ausgeschlossen werden.

4.3.5 Die Hemmung der durch anti-IgM aktivierten BZLF1-Expression in EREB-Zellen ist abhängig von NF-κB

Schließlich könnte nach den Ergebnissen der Untersuchung der LMP1-Mutanten noch der NF-κB-Signalweg für die Regulation des lytischen Zyklus durch LMP1 verantwortlich sein. Um dies zu überprüfen, wurden Experimente mit einem dominant-negativen Inhibitor von NF-κB durchgeführt (IκBα_{32/36A}). Mitglieder der NF-κB-Familie befinden sich normalerweise als Dimere im Zytoplasma der Zelle im Komplex mit inhibitorischen Proteinen der IκB-Familie. Die Aktivierung von NF-κB hängt von der Phosphorylierung und dem Abbau der IκBs ab, was zur Freisetzung der Kernlokalisationssequenz der NF-κB-Proteine und zur Translokation der Dimere in den Zellkern führt. Der Effekt des dominant-negativen Inhibitors, der Mutante IκBα_{32/36A} beruht darauf, dass die Serine 32 und 36 von IκBα nach dem Austausch gegen Alanine nicht mehr phosphoryliert werden können und somit IκBα_{32/36A} nicht mehr abgebaut werden kann (Traenckner *et al.*, 1995). Damit ist eine Translokation des Transkriptionsfaktors NF-κB in den Kern inhibiert (siehe auch 1.6.2, Abb. 5).

Für die Untersuchung des Einflusses von IκBα_{32/36A} auf die Hemmung der anti-IgM-induzierten BZLF1-Expression durch 0,25 µg SVLMP1 in Östrogen-entzogenen EREB2-1-Zellen wurden in dem folgenden Experiment 5 µg IκBα_{32/36A} eingesetzt, eine Menge, die im

Bereich der in der Literatur in B-Zellen verwendeten Konzentration lag (Devergne *et al.*, 1998) und keine auffallende Zytotoxizität zeigte.

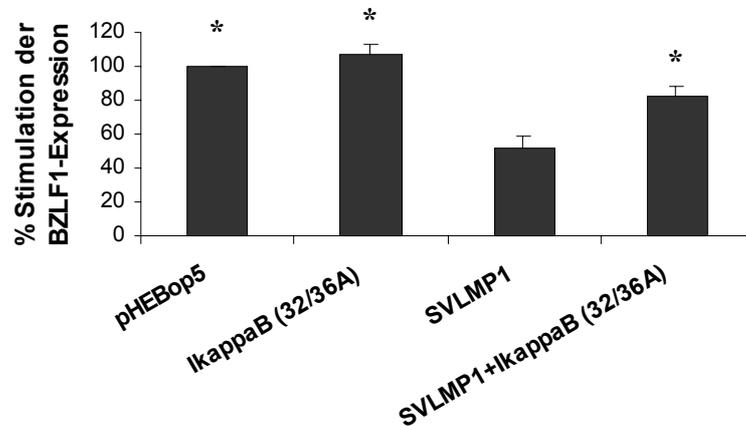


Abbildung 32: Durch die Wirkung von $I\kappa B\alpha_{32/36A}$ kann der hemmende Effekt von LMP1 auf die Induktion des lytischen Zyklus teilweise aufgehoben werden.

Je 2×10^7 EREB2-1-Zellen wurden direkt nach Östrogen-Entzug mit $5,0 \mu\text{g}$ pEGFP-C1, $5,0 \mu\text{g}$ pHEBop5 oder $I\kappa B\alpha_{32/36A}$ und $0,25 \mu\text{g}$ pHEBop5 oder SVLMP1 transfiziert. Nach 48 h wurden die Hälfte der Zellen jedes Ansatzes unbehandelt gelassen oder mit anti-IgM stimuliert. Weitere 24 h später wurden die Zellen mit einem anti-BZLF1-Antikörper (1:800) und einem sekundären, PE-markierten Antikörper intrazellulär gefärbt. In der FACS-Analyse wurden 10000 GFP-positive Zellen auf ihre BZLF1-Expression untersucht. Der durch die anti-IgM-Stimulation erreichte Anteil BZLF1-exprimierender Zellen wurde auf den auf 100% gesetzten Anteil in mit pHEBop5 transfizierten und mit anti-IgM stimulierten Zellen bezogen. Gezeigt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten. Signifikante Werte gegenüber SVLMP1 mit $p < 0,05$ nach dem Student'schen t-Test sind mit „*“ gekennzeichnet.

Während $5 \mu\text{g}$ $I\kappa B\alpha_{32/36A}$ alleine keinen Einfluss auf die Stimulierbarkeit des lytischen Zyklus durch anti-IgM hatten, betrug die Erniedrigung des Anteils BZLF1-exprimierender Zellen durch $0,25 \mu\text{g}$ SVLMP1 50%, nach der Kofunktion von $0,25 \mu\text{g}$ SVLMP1 und $5,0 \mu\text{g}$ $I\kappa B\alpha_{32/36A}$ jedoch nur noch 20% (Abb. 32). Diese Wirkung von $I\kappa B\alpha_{32/36A}$, die Inhibition der Virusreaktivierung durch LMP1 zum großen Teil aufheben zu können, war nicht auf einen Einfluss von $I\kappa B\alpha_{32/36A}$ auf die Expression von LMP1 zurückzuführen (Abb. 33).

Mit dem NF- κ B-Weg war somit ein Signaltransduktionsweg gefunden, über den LMP1 die Hemmung des lytischen Zyklus vermittelte.

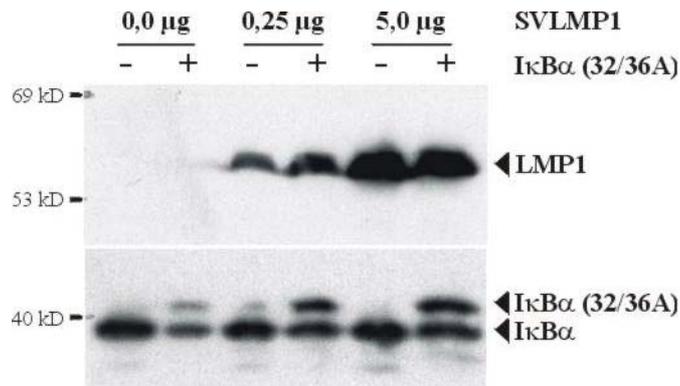


Abbildung 33: Kontrolle der LMP1-Expression in Gegenwart und Abwesenheit von IκBα_{32/36A}.

Je 4×10^7 EREB2-1-Zellen wurden direkt nach Östrogen-Entzug mit 5,0 μg pNGFR, 0,0 μg oder 5,0 μg IκBα_{32/36A} und 0,0 μg, 0,25 μg oder 5,0 μg SVLMP1 transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden aus den Transfektionsansätzen die transfizierten Zellen mithilfe der MACS-Methode isoliert. $0,5 \times 10^6$ angereicherte transfizierte Zellen (E) wurden in 35 μl LMP1-Extraktionspuffer lysiert. Je 12,5 μl Extrakt wurden in einer Western Blot-Analyse mit einem anti-LMP1-Antikörper (1:500) untersucht. Zum Nachweis des transfizierten IκBα_{32/36A} wurde der Blot „gestript“ und mit einem anti-IκBα-Antikörper (1:1000) gefärbt.

Zusammenfassend deutete die Analyse der Virusreaktivierung in Gegenwart der LMP1-Mutanten oder der spezifischen Inhibitoren darauf hin, dass die Aktivierung des NF-κB-Signaltransduktionsweges durch LMP1 bei der Hemmung des lytischen Zyklus eine entscheidende Rolle spielt. Im Gegensatz dazu schienen die p38 MAPK- und JNK1-Wege für diesen Prozess nicht relevant zu sein.

4.4 Regulation von latenter und lytischer Phase durch LMP2A

4.4.1 LMP2A hemmt die Aktivierung der BZLF1-Expression durch anti-IgM in der Zelllinie EREB

Schon bevor LMP1 und CD40 als Regulatoren der Viruslatenz entdeckt worden waren, war bekannt, dass das virale Protein LMP2A die Induktion des lytischen Zyklus inhibieren kann. Bei der Untersuchung von LCLs, die mit rekombinanten Viren transformiert worden waren, war entdeckt worden, dass das virale Protein LMP2A mit der Aktivierung des B-Zell-Rezeptors interferiert und auf diese Weise die Virusreaktivierung durch anti-Immunglobulin-

Antikörper blockiert (Miller *et al.*, 1993 und 1994). Diese Eigenschaft von LMP2A sollte in dem in dieser Arbeit verwendeten Zellsystem überprüft werden.

Hierzu wurden Experimente durchgeführt, in denen der Einfluss von LMP1 und LMP2A auf die Induktion des lytischen Zyklus durch anti-IgM in Östrogen-entzogenen EREB2-1-Zellen verglichen wurde. Es zeigte sich, dass durch die Transfektion von 5 µg SVLMP2A die anti-IgM-induzierte VCA-Expression in der Tat gehemmt werden konnte, wenn auch nicht so stark wie durch 5 µg SVLMP1 (Abb. 34). Der bereits bekannte Effekt von LMP2A, die Stimulation des lytischen Zyklus durch anti-IgM zu inhibieren, konnte also auch für das in der vorliegenden Arbeit verwendete EREB-System bestätigt werden.

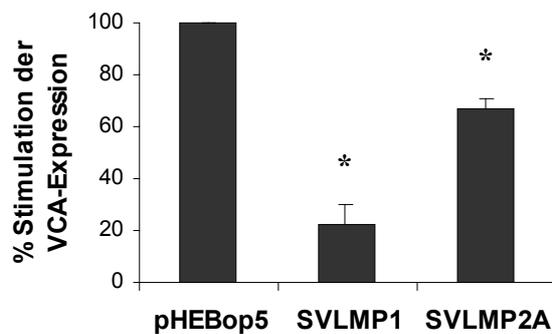


Abbildung 34: Einfluss von LMP2A auf die anti-IgM-induzierte VCA-Expression.

Je 2×10^7 EREB2-1-Zellen wurden direkt nach Östrogen-Entzug mit 5 µg pEGFP-C1, 5 µg pHEBop5, SVLMP1 oder SVLMP2A transfiziert. 48 h später wurden die Zellen jedes Ansatzes in jeweils drei unbehandelte oder mit anti-IgM beschichtete Löcher einer Sechs-Loch-Platte gegeben. Nach weiteren 48 h wurden die Zellen intrazellulär mit einem anti-VCA-Antikörper (1:1000) und mit einem sekundären, PE-markierten Antikörper gefärbt. In der FACS-Analyse wurden 10000 GFP-positive Zellen auf ihre PE-Fluoreszenz untersucht. Der in mit pHEBop5 transfizierten Zellen durch die anti-IgM-Stimulation erreichte Anteil VCA-exprimierender Zellen wurde auf 100% gesetzt, worauf die in den übrigen Ansätzen erhaltenen Werte bezogen wurden. Gezeigt sind Mittelwerte +/- Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten. Signifikante Werte gegenüber pHEBop5 mit $p < 0,05$ nach dem Student'schen t-Test sind mit „*“ gekennzeichnet.

4.4.2 LMP2A aktiviert die BZLF1-Expression in unstimulierten EREB-Zellen

Neben der Fähigkeit, mit der Stimulation des B-Zell-Rezeptors zu interferieren und somit die Induktion des lytischen Zyklus durch anti-Immunglobulin-Antikörper zu hemmen, ist von LMP2A auch bekannt, dass es selbst die Freisetzung von Calcium induzieren und Signale des B-Zell-Rezeptors partiell substituieren kann (Alber *et al.*, 1993; Beaufils *et al.*, 1993; Caldwell *et al.*, 1998). Aufgrund dieser Ähnlichkeit von LMP2A mit dem B-Zell-Rezeptor schien es möglich zu sein, dass LMP2A in unstimulierten Zellen ein B-Zell-Rezeptor-Signal nachahmen könnte, das heißt selbst eine Reaktivierung von EBV induzieren könnte. Deshalb sollte nun untersucht werden, ob der Zustand der Latenz in nicht stimulierten, Östrogen-entzogenen EREB- Zellen durch LMP2A beeinflusst werden kann.

Dazu wurde zunächst die Aktivität des BZLF1-Promotors in Östrogen-entzogenen EREB2-5-Zellen in Gegenwart und Abwesenheit von LMP2A analysiert. Wie in Abbildung 35 zu sehen ist, konnte die Aktivität des Zp/luc-Konstrukts in EREB2-5-Zellen durch 5 µg SVLMP2A stark aktiviert werden.

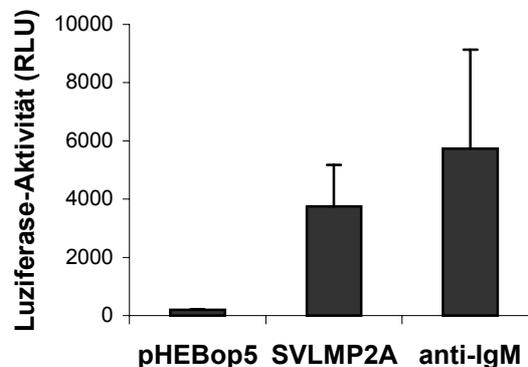


Abbildung 35: Aktivierung des BZLF1-Promotors durch LMP2A und anti-IgM.

Je 1×10^7 EREB2-5-Zellen wurden direkt nach Östrogen-Entzug mit 10 µg Zp/luc und 5 µg pHEBop5 oder SVLMP2A transfiziert. Nach 24 h wurde 1/3 des pHEBop5-Ansatzes mit anti-IgM stimuliert. Weitere 48 h später wurden die Zellen für einen Luziferase-Test geerntet. Dargestellt sind die Mittelwerte +/- Standardabweichung der absoluten Luziferase-Aktivitäten in relativen Lichteinheit (RLU) aus drei unabhängigen Experimenten.

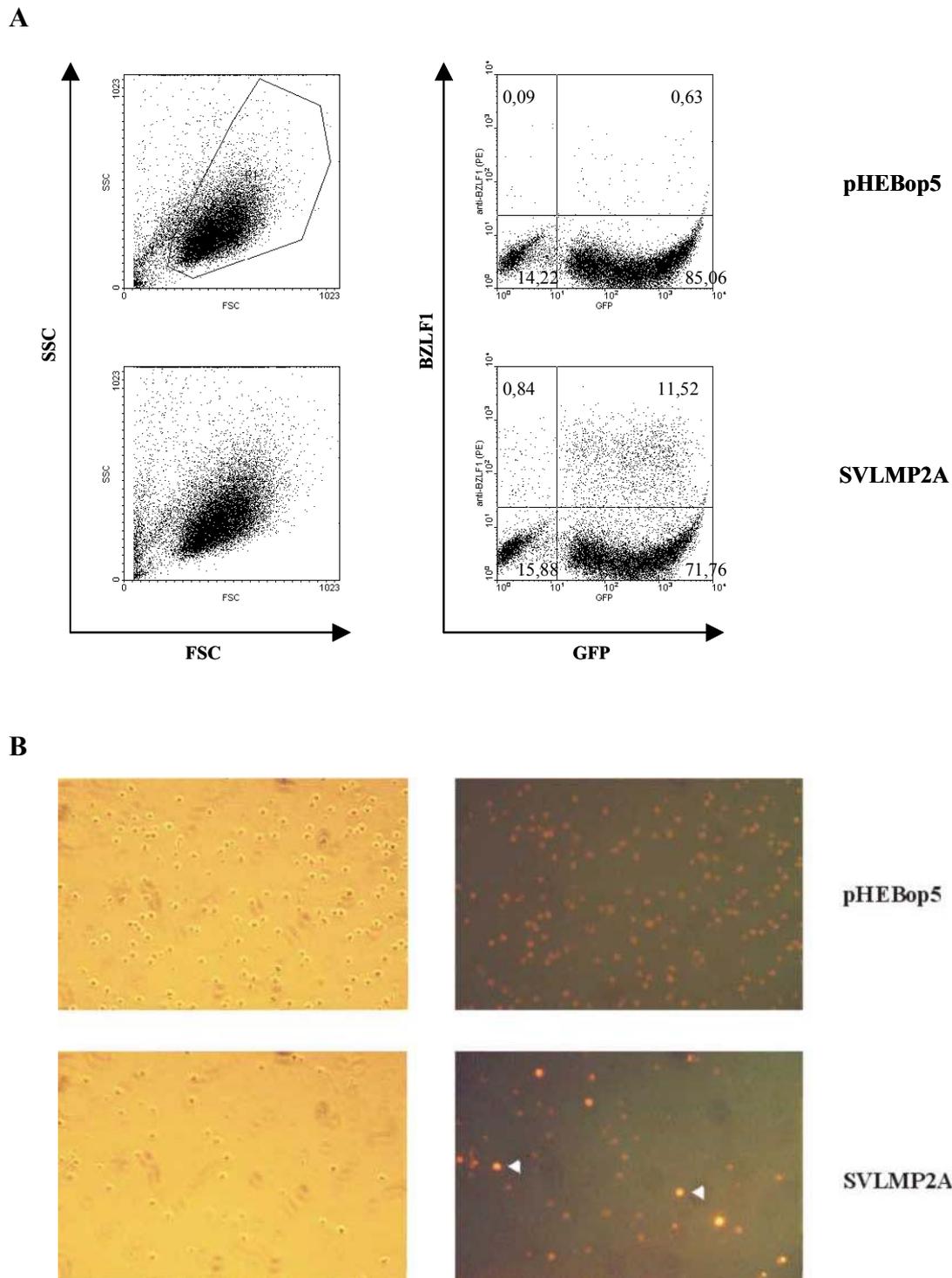


Abbildung 36: Aktivierung der BZLF1-Expression durch LMP2A.

Je 20×10^7 EREB2-1-Zellen wurden direkt nach Östrogen-Entzug mit $5 \mu\text{g}$ pEGFP-C1 und $5 \mu\text{g}$ pHEBop5 oder SVLMP2A transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die transfizierten, GFP-positiven Zellen durch die FACS-Methode isoliert, was etwa 6×10^6 aufgereinigte, GFP-positive Zellen pro Ansatz lieferte.

A: Je $0,5 \times 10^6$ dieser Zellen wurden intrazellulär mit einem anti-BZLF1-Antikörper (1:800) und einem sekundären, PE-markierten Antikörper gefärbt und in einer der FACS-Analyse untersucht. Die Diagramme zeigen die Verteilung von 15000 Zellen hinsichtlich ihrer Zellgröße (FSC) und Granularität (SSC) sowie ihrer GFP- und BZLF1-Expression.

B: Einige der isolierten Zellen wurden auf einem Objektträger fixiert, mit einem anti-LMP2A-Antikörper (unverdünnt) und einem sekundären, Cy3-markierten Antikörper für Immunfluoreszenz-Aufnahmen gefärbt. Gezeigt sind Durchlicht- und Fluoreszenz-Aufnahmen der mit pHEBop5 oder SVLMP2A transfizierten Zellen. Zwei der LMP2A exprimierenden Zellen sind beispielhaft durch eine weiße Pfeilspitze markiert.

Anschließend wurde untersucht, ob LMP2A auch die Proteinexpression von BZLF1 aktivieren kann. Der Anteil BZLF1-exprimierender EREB2-1-Zellen stieg in Abwesenheit von Östrogen nach der Transfektion von 5 µg SVLMP2A in der Tat gegenüber den mit pHEBop5 transfizierten Zellen von 0,6% auf 11,5% an (Abb. 36).

Transfektionsexperimente mit 0,25 bis 5,0 µg SVLMP2A zeigten weiter, dass die Expression des späten lytischen Gens VCA ebenfalls durch LMP2A aktiviert werden konnte (Abb. 37). Im Vergleich zu der Induktion des lytischen Zyklus durch anti-IgM fiel die durch LMP2A erreichte Induktion der BZLF1- und VCA-Expression allerdings etwas niedriger aus (Abb. 35 und 37).

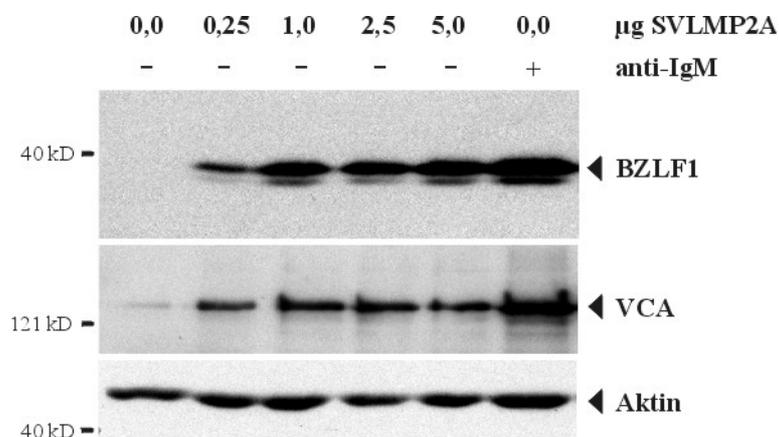


Abbildung 37: Aktivierung der BZLF1- und VCA-Expression durch LMP2A und anti-IgM.

Je 8×10^7 EREB2-1-Zellen wurden direkt nach Östrogen-Entzug mit 5,0 µg pNGFR und 0,0 µg, 0,25 µg, 1,0 µg, 2,5 µg oder 5,0 µg SVLMP2A transfiziert. 48 h später wurden aus den Transfektionsansätzen die transfizierten Zellen mithilfe der MACS-Methode isoliert. Je $0,5 \times 10^6$ angereicherte transfizierte Zellen (E) wurden in Sechslöch-Platten gegeben und weitere 24 h inkubiert. Außerdem wurden je $0,5 \times 10^6$ angereicherte Zellen des SVLMP2A-freien Ansatzes für 24 h (BZLF1-Nachweis) bzw. 48 h (VCA-Nachweis) in zwei mit anti-IgM beschichtete Löcher gegeben. Danach wurden alle Zellen in 40 µl Gesamtzell-Extraktionspuffer lysiert. Gleiche Proteinmengen wurden in einer Western Blot-Analyse mit einem anti-BZLF1-Antikörper (1:2000) oder einem anti-EA-Antikörper (1:100) untersucht. Zur Ladekontrolle wurde der Blot „gestrippt“ und mit einem anti-Aktin-Antikörper (1:400) gefärbt.

4.4.3 LMP2A aktiviert die BZLF1-Expression in unstimulierten Akata- und P3HR1-Zellen

Um einen zellspezifischen, auf EREB-Zellen beschränkten Effekt von LMP2A auszuschließen, wurden auch die Burkitt-Lymphom-Zelllinien Akata und P3HR1 transient mit SVLMP2A transfiziert und die Expression von BZLF1 untersucht. Akata gehört zu den Typ I-BL-Zelllinien, die kein EBNA2 und LMP1 exprimieren (Rowe *et al.*, 1987). Bei P3HR1 handelt es sich um eine BL-Zelllinie mit einem defekten EBNA2, in der das EBNA2-abhängige Gen LMP1 ebenfalls nicht exprimiert wird (Murray *et al.*, 1988). Im Gegensatz zu EREB-Zellen, die in Abwesenheit von Östrogen kein funktionales EBNA2 und kein LMP1 exprimieren und im Zellzyklus arretieren, proliferieren diese beiden BL-Linien.

Es stellte sich heraus, dass in beiden Zelllinien Akata und P3HR1 die Transfektion von SVLMP2A ebenfalls zu einer Aktivierung der BZLF1-Expression führte (Abb. 38 und 39).

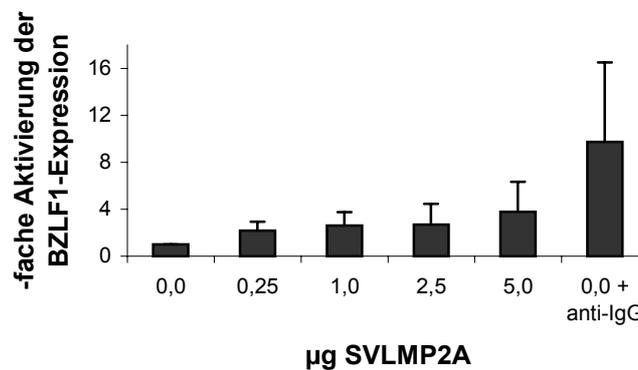


Abbildung 38: Aktivierung der BZLF1-Expression durch LMP2A in Akata-Zellen.

Je 1×10^7 Akata-Zellen wurden mit $5,0 \mu\text{g}$ pEGFP-C1 und $0,0$, $0,25$, $1,0$, $2,5$ oder $5,0 \mu\text{g}$ SVLMP2A transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurde die Hälfte der Zellen des SVLMP2A-freien Ansatzes mit auf die Platte geschichtetem anti-IgG stimuliert. Weitere 24 h später wurden die Zellen intrazellulär mit einem anti-BZLF1-Antikörper (1:800) und einem sekundären, PE-markierten Antikörper gefärbt. In der FACS-Analyse wurden 10000 GFP-positive Zellen auf ihre PE-Fluoreszenz untersucht. Die erhaltenen Daten sind als x-fache Aktivierung bezogen auf die Anzahl BZLF1-exprimierender Zellen in der mit pHEBop5 transfizierten und unstimulierten Population dargestellt. Gezeigt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Experimenten.

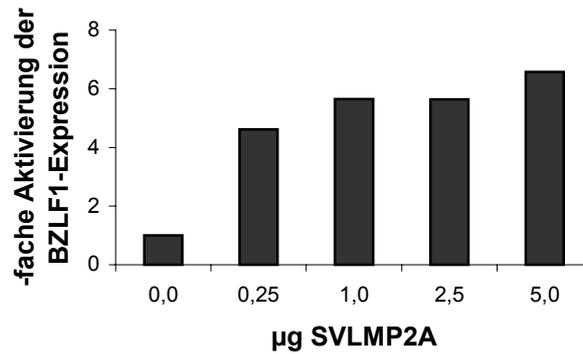


Abbildung 39: Aktivierung der BZLF1-Expression durch LMP2A in P3HR1-Zellen.

Je 1×10^7 P3HR1-Zellen wurden mit 5,0 µg pEGFP-C1 und 0,0, 0,25, 1,0, 2,5 oder 5,0 µg SVLMP2A transfiziert. 72 h nach der Transfektion wurden die Zellen intrazellulär mit einem anti-BZLF1-Antikörper (1:800) und einem sekundären, PE-markierten Antikörper gefärbt. In der FACS-Analyse wurden 10000 GFP-positive Zellen auf ihre PE-Fluoreszenz untersucht. Die erhaltenen Daten sind als x-fache Aktivierung bezogen auf die Anzahl BZLF1-exprimierender Zellen in der mit pHEBop5 transfizierten und unstimulierten Population dargestellt.

Es konnte also ausgeschlossen werden, dass der Induktion des lytischen Zyklus durch LMP2A, einer Eigenschaft, die LMP2A mit dem B-Zell-Rezeptor teilt, ein zellspezifischer Effekt zugrunde lag.

4.4.4 Die Induktion der BZLF1-Expression durch LMP2A und den aktivierten B-Zell-Rezeptor ist abhängig von ERK1/2

Es wurde gezeigt, dass neben dem bereits bekannten Stimulus der anti-Immunglobulin-Antikörper auch LMP2A die Expression des BZLF1-Proteins und damit den Eintritt in den lytischen Zyklus induzieren kann. Ein wichtiger Signaltransduktionsweg, der bei der Aktivierung des B-Zell-Rezeptors durch anti-Immunglobulin-Antikörper angeschaltet wird, ist der ERK1/2 (extrazelluläres Signal-regulierte Kinase 1/2, p44/42 MAPK)-Weg, der unter anderem zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren c-myc und Elk-1 führt (Sutherland *et al.*, 1996).

Um zu testen, ob LMP2A und der aktivierte B-Zell-Rezeptor die Reaktivierung von EBV nach einem ähnlichen Mechanismus erreichen, wurden Östrogen-entzogene EREB2-1-Zellen in Gegenwart und Abwesenheit eines chemischen Inhibitors der ERK1/2 phosphorylierenden

Kinasen MEK1/2 (PD98059) mit SVLMP2A transfiziert oder mit anti-IgM behandelt (Abb. 40).

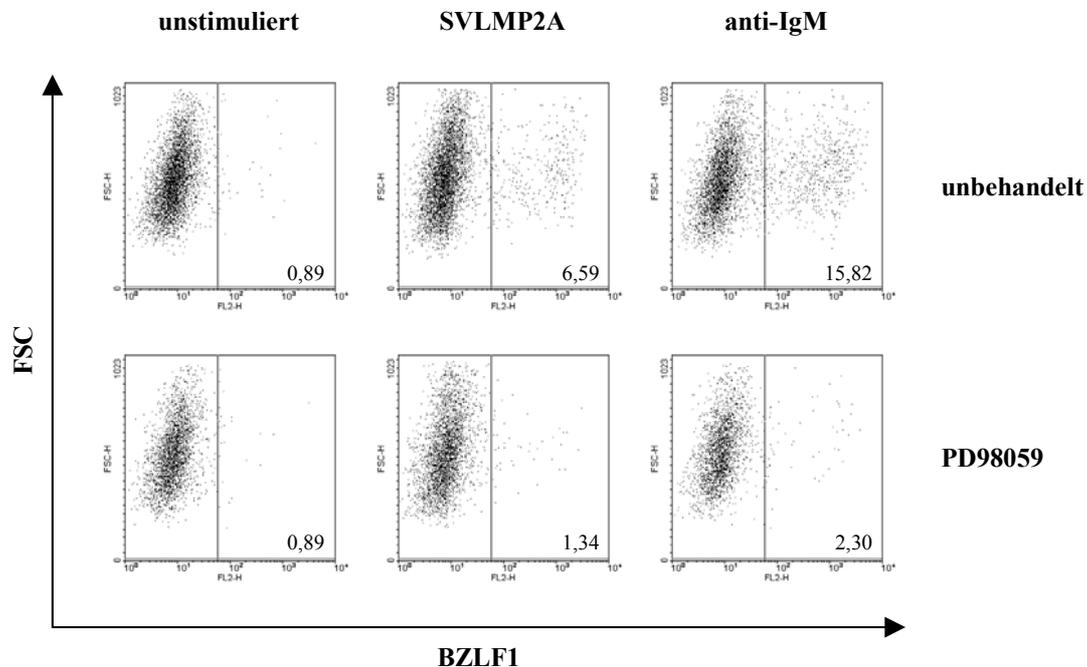


Abbildung 40: PD98059 hemmt die durch LMP2A und anti-IgM induzierte BZLF1-Expression.

Je 2×10^7 EREB2-1-Zellen wurden direkt nach Östrogen-Entzug mit $5 \mu\text{g}$ pEGFP-C1 und $5 \mu\text{g}$ pHEBop5 oder SVLMP2A transfiziert und mit $50 \mu\text{M}$ PD98059 versetzt. 48 h später wurde die Hälfte der Zellen der pHEBop5-Transfektion mit anti-IgM stimuliert. Nach weiteren 24 h wurden die Zellen mit einem anti-BZLF1-Antikörper (1:800) und einem sekundären, PE-markierten Antikörper intrazellulär gefärbt. In der FACS-Analyse wurde die BZLF1-Expression von 10000 GFP-positiven Zellen untersucht.

Es stellte sich heraus, dass in Gegenwart des ERK1/2-Inhibitors PD98059 in einer Konzentration von $50 \mu\text{M}$ die Induktion der BZLF1-Expression sowohl durch LMP2A als auch durch anti-IgM nahezu vollständig blockiert ist. $50 \mu\text{M}$ PD98059 hatten keinen Einfluss auf die basale BZLF1-Expression in EREB2-1-Zellen in Abwesenheit von Östrogen.

4.4.5 Die Induktion der BZLF1-Expression durch LMP2A und den aktivierten B-Zell-Rezeptor wird von LMP1 gehemmt

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass LMP1 die Fähigkeit besitzt, den durch TPA und anti-Immunglobulin-Antikörper induzierten lytischen Zyklus zu blockieren. Es stellte sich nun die Frage, ob LMP1 auch die durch LMP2A aktivierte BZLF1-Expression hemmen kann.

Um dies herauszufinden, wurden EREB2-1 Zellen, denen Östrogen aus dem Medium entzogen worden war, mit SVLMP2A und SVLMP1 kotransfiziert und die BZLF1-Expression untersucht (Abb. 41).

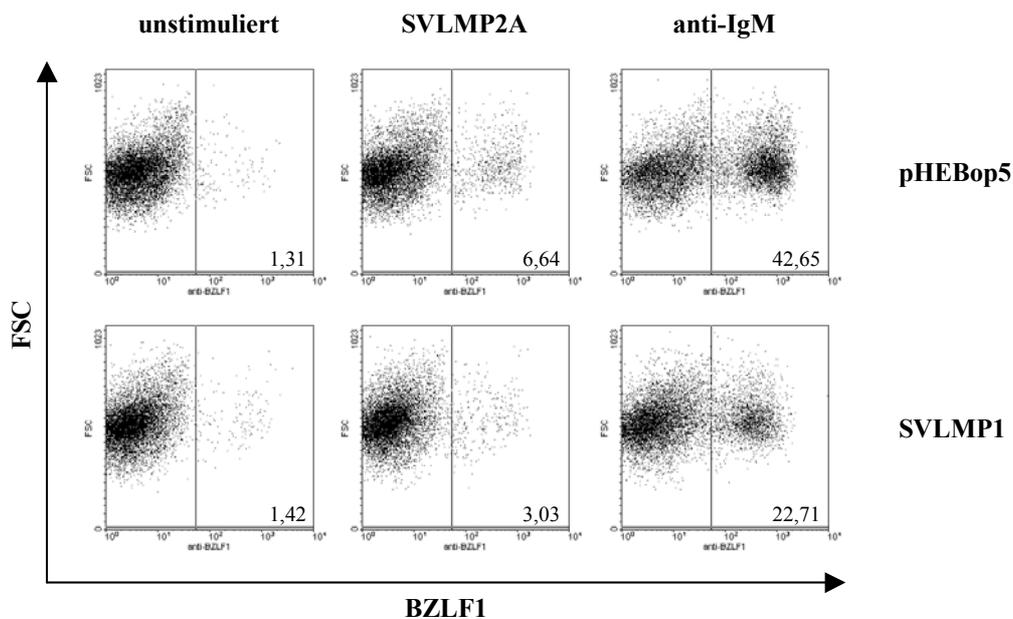


Abbildung 41: LMP1 hemmt die durch LMP2A und anti-IgM induzierte BZLF1-Expression.

Je 1×10^7 EREB2-1-Zellen wurden direkt nach Östrogen-Entzug mit $5,0 \mu\text{g}$ pEGFP-C1, $0,25 \mu\text{g}$ pHEBop5 oder SVLMP2A und $0,0$ oder $0,25 \mu\text{g}$ SVLMP1 transfiziert. 48 h später wurde die Hälfte der Zellen der pHEBop5-Transfektionen mit anti-IgM stimuliert. Nach weiteren 24 h wurden die Zellen mit einem anti-BZLF1-Antikörper (1:800) und einem sekundären, PE-markierten Antikörper gefärbt. In der FACS-Analyse wurden 10000 GFP-positive Zellen auf ihre PE-Fluoreszenz untersucht.

0,25 µg SVLMP1 hatten keinen Einfluss auf den Anteil BZLF1-exprimierender Zellen in der transfizierten Zellpopulation, 0,25 µg SVLMP2A hingegen führten zu einer Erhöhung der Zahl BZLF1-exprimierender Zellen von 1,2% auf 6,6%. Durch die Kotransfektion von 0,25 µg SVLMP1 konnte dieser Anteil um mehr als 50% auf 3,0% gesenkt werden. Die Induktion der BZLF1-Expression durch anti-IgM konnte im gleichen Experiment durch LMP1 von 42,7% auf 22,7% gehemmt werden.

Zusammenfassend kann also gesagt werden, dass LMP2A wie anti-Immunglobulin-Antikörper in mehreren Zelllinien den lytischen Zyklus induzieren konnte, dass die Virusreaktivierung durch LMP2A wie die durch die Aktivierung des B-Zell-Rezeptors über den ERK1/2-Signalweg läuft, und dass diese Reaktivierung durch LMP1 gehemmt werden kann.

5 *Diskussion*

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, wie die Latenz von EBV in humanen B-Lymphozyten reguliert wird. Als *in vitro*-Modell der *in vivo* latent EBV-infizierten B-Zellen wurde das Zellkultursystem der EREB-Zellen verwendet. In der Arbeitsgruppe Bornkamm war entdeckt worden, dass das virale Protein LMP1 und der zelluläre aktivierte CD40-Rezeptor die Reaktivierung von EBV hemmen können. In meiner Arbeit sollten die Signaltransduktionswege, die an der Hemmung des lytischen Zyklus durch diese beiden Faktoren beteiligt sind, charakterisiert werden. Daneben sollte die Rolle von LMP2A, von dem ebenfalls bekannt war, mit der Virusreaktivierung interferieren zu können, bei der Regulation der Latenz von EBV weiter untersucht werden.

5.1 **Hemmung der Reaktivierung von EBV durch LMP1 und aktiviertes CD40**

EBV persistiert *in vivo* lebenslang latent in ruhenden Memory-B-Zellen (Babcock *et al.*, 1998; Miyashita *et al.*, 1997). Der Eintritt des Virus in den lytischen Zyklus ist unmittelbar mit dem Tod der infizierten Zelle verbunden. Um die lebenslange Persistenz in einem nicht proliferierenden Zelltyp zu sichern, muss zum Erhalt der Population latent infizierter Zellen also entweder die Reaktivierung des Virus unterdrückt oder ein Gleichgewicht zwischen Virusproduktion und kontinuierlicher Neuinfektion eingestellt werden. Bei gesunden Personen konnte bislang in den Zellen des peripheren Bluts keine Reaktivierung festgestellt werden, weshalb letztere Möglichkeit der Virusproduktion und Neuinfektion eher unwahrscheinlich ist (Decker *et al.*, 1996). In den zirkulierenden, latent infizierten B-Zellen des peripheren Bluts ist die Virusreaktivierung also unterdrückt. Die zur Verbreitung des Virus in der menschlichen Population notwendige Virusproduktion findet wahrscheinlich ausschließlich im Lymphgewebe des Oropharynx statt (Tao *et al.*, 1995a und b).

Um herauszufinden, welche viralen oder zellulären Faktoren an der Unterdrückung der Virusreaktivierung in den Zellen des peripheren Bluts beteiligt sind, wurde die Regulation der EBV-Reaktivierung mithilfe des EREB-Systems untersucht. Abhängig von Östrogen besitzen EREB-Zellen ein funktionales EBNA2, exprimieren EBNA2-abhängige virale und zelluläre

Genprodukte und proliferieren. In Abwesenheit von Östrogen verlieren EREB-Zellen das funktionale EBNA2 und folglich auch den Phänotyp von LCLs. Sie nehmen einen Phänotyp an, der eher den *in vivo* latent infizierten, ruhenden B-Zellen vergleichbar ist. Es stellte sich heraus, dass eine Induktion des lytischen Zyklus durch TPA und anti-Immunglobulin-Antikörper in EREB-Zellen nur in Abwesenheit von Östrogen möglich ist, und dass diese Hemmung der Reaktivierung in Gegenwart von Östrogen auf das EBNA2-Zielgen LMP1 zurückzuführen ist. Außerdem wurde entdeckt, dass auch der zelluläre CD40-Rezeptor, dem LMP1 sehr ähnlich ist, in Östrogen-entzogenen EREB-Zellen sowie in den Typ I-BL-Zelllinien Akata, Elijah und Mutu I die Induktion des lytischen Zyklus ebenfalls hemmen kann (Adler *et al.*, 2002).

Ausgehend von dieser Beobachtung begann die vorliegende Arbeit damit, den Schritt in der lytischen Expressionskaskade zu suchen, mit dem LMP1 und aktiviertes CD40 interferieren. Als Indikator für eine Virusreaktivierung war in den oben beschriebenen Versuchen die Produktion des viralen Kapsidproteins VCA, eines späten Proteins des lytischen Zyklus, gemessen worden. Mittels Northern Blot- und BZLF1-Promotorstudien konnte gezeigt werden, dass LMP1 und aktiviertes CD40 die Induktion des lytischen Zyklus auf der Ebene der Transkription des BZLF1-Gens, einem unmittelbar frühen Gen des lytischen Zyklus, hemmen (Abb. 10 und 11).

Die FACS-Analyse der BZLF1-Expression von EREB-Zellen, die nach Entzug von Östrogen und transienter Transfektion von LMP1 mit anti-IgM stimuliert worden waren, zeigte, dass die Anzahl BZLF1 exprimierender Zellen, nicht aber die BZLF1-Expression in der einzelnen betroffenen Zelle, von der Menge an eingesetztem LMP1 und von der verwendeten LMP1-Mutation abhängt. Abnehmende Mengen an transfiziertem LMP1-Plasmid sowie die verschiedenen LMP1-Mutationen führten im Vergleich zur Transfektion von 5 µg LMP1-Wildtyp zu einem Anstieg der Zahl BZLF1 exprimierender Zellen nach anti-IgM-Stimulation (Abb. 23 und 41). Ebenso stieg bei einer Abnahme des stöchiometrischen Verhältnisses von CD40L exprimierenden Zellen zu EREB-Zellen die Anzahl der nach TPA-Stimulation VCA-exprimierenden EREB-Zellen, wobei aber die Höhe der VCA-Expression in den einzelnen betroffenen Zellen unverändert blieb (Abb. 9). Zu einer Hemmung des lytischen Zyklus kommt es also wahrscheinlich nur, wenn die Zelle ein ausreichend starkes LMP1-Signal oder ein CD40-Signal erhält, um die Aktivierung der BZLF1-Expression unterdrücken zu können (alles-oder-nichts-Reaktion). Die Wahrscheinlichkeit, ein LMP1-Signal in der erforderlichen

Stärke zu erhalten, sinkt mit abnehmender Menge an transfiziertem LMP1-Plasmid und mit der Bedeutung der eingeführten Mutation im LMP1-Molekül. Desgleichen nimmt auch mit sinkender Anzahl kokultivierter CD40L-Zellen die Zahl der EREB-Zellen ab, die ein CD40-Signal erhalten, und damit die Anzahl der Zellen, in denen die Aktivierung der BZLF1-Expression inhibiert wird.

Bei BZLF1 handelt sich um ein unmittelbar frühes Gen des lytischen Zyklus, dessen Expression notwendig und ausreichend ist, die Virusreaktivierung in infizierten Zellen einzuleiten (Chevallier-Greco *et al.*, 1986; Countryman und Miller, 1985; Takada *et al.*, 1986). Nach Erreichen einer Schwellenkonzentration des BZLF1-Proteins verstärkt sich die BZLF1-Expression in einer positiven Rückkopplungsschleife selbst und leitet im Anschluss daran die sequentielle Aktivierung der etwa 100 Gene des lytischen Zyklus ein (Flemington und Speck, 1990a). LMP1 und aktiviertes CD40 sind durch die Hemmung der BZLF1-Transkription in der Lage, die Reaktivierung von EBV bereits in ihrer Anfangsphase zu unterbinden. Dabei könnte entscheidend sein, dass die Konzentration des BZLF1-Proteins eine bestimmte Schwelle nicht überschreitet. Es ist vorstellbar, dass wenn es LMP1 und CD40 nicht gelingt, die Expression von BZLF1 ausreichend zu unterdrücken, um sie unter der kritischen Konzentration zu halten, trotz LMP1- oder CD40-Signals eine Einleitung des lytischen Zyklus erfolgt (alles-oder-nichts-Reaktion). Mit steigender Menge an transfiziertem LMP1 sowie mit steigender Anzahl kokultivierter CD40L-Zellen wäre der Eintritt in den lytischen Zyklus in einer zunehmenden Zellzahl inhibiert.

In vivo könnte die Hemmung der BZLF1-Expression durch LMP1 und aktiviertes CD40 folgende Bedeutung für die Regulation der Latenz von EBV besitzen: Nach der Primärinfektion exprimieren die infizierten B-Zellen zunächst wie LCLs die Gene des Wachstumsprogramms, darunter auch LMP1. Dadurch wäre die Virusreaktivierung in diesen Zellen unterdrückt. Ohne eine solche Inhibition der Reaktivierung in einem Teil der infizierten Zellen könnte keine latente Infektion etabliert werden. Im anschließenden Differenzierungsprozess erreicht ein Teil der infizierten Zellen den Phänotyp ruhender Memory-B-Zellen, in denen bis auf LMP2A, dessen mRNA-Transkript in einigen, aber nicht allen Studien nachgewiesen werden konnte, kein virales Gen exprimiert wird (Babcock *et al.*, 1998 und 1999; Miyashita *et al.*, 1997; Qu und Rowe, 1992; Tierney *et al.*, 1994). Eine Virusreaktivierung aus diesen Zellen durch Bindung von Antigenen an den B-Zell-Rezeptor könnte durch eine Interaktion des CD40-Rezeptors der B-Zelle mit dem CD40-Liganden auf einer

kostimulatorischen T-Zelle inhibiert werden. Ein ähnlicher Effekt von CD40 konnte kürzlich *in vivo* beobachtet werden: Die Reaktivierung des latenten murinen γ -Herpesvirus MHV-68, dem EBV in seiner Biologie sehr ähnlich ist, konnte durch CD40-Stimulation ebenfalls inhibiert werden (Sarawar *et al.*, 2001). Die Beteiligung von CD40 bei der Kontrolle der Latenz von EBV könnte zudem das Risiko für EBV-assoziierte Erkrankungen wie das Burkitt-Lymphom und die lymphoproliferative Erkrankung PTLD weiter erklären. Bei einem defizienten Immunsystem, wie es durch künstliche Immunsuppression bei Transplantationspatienten und krankheitsbedingt bei AIDS- und Malaria-Patienten auftritt, ist zum einen die zytotoxische T-Zell-Antwort (CTL) auf Antigene des lytischen Zyklus nach einer spontanen oder Antigen-induzierten Reaktivierung von EBV beeinträchtigt. Zum anderen gibt es unter diesen Bedingungen keine T-Zell-Hilfe, die über die Expression des CD40-Liganden den CD40-Rezeptor der B-Zelle aktiviert und in EBV-infizierten Memory-B-Zellen die Induktion des lytischen Zyklus durch Antigen unterdrückt. Bei dem Ausbleiben der Kontrolle von spontaner und Antigen-induzierter Reaktivierung durch diesen doppelten Sicherheitsmechanismus von CTL und CD40-vermittelter T-Zell-Hilfe kann es zur viralen Replikation und zu einer erhöhten Anzahl EBV-infizierter Zellen im Blut kommen. Dies konnte bei immunsupprimierten Transplantationspatienten und bei Patienten mit akuter Malaria tatsächlich beobachtet werden (Babcock *et al.*, 1999; Lam *et al.*, 1991). Damit könnte das Risiko für die Patienten, eine der EBV-assoziierten Erkrankungen wie BL oder PTLD zu entwickeln, steigen (Gaidano und Dalla-Favera, 1995; Magrath, 1990; Nalesnik und Starzl, 1994).

5.2 Hemmung der BZLF1-Expression durch LMP1

Der BZLF1-Promotor ist gut charakterisiert. Er enthält sowohl positive als auch negative Elemente, die für die Regulation der Promotoraktivität entscheidend sind. Im unstimulierten Zustand der Zellen sorgen die negativen Elemente dafür, dass das BZLF1-Gen nicht transkribiert und die Latenz aufrechterhalten wird. Induktoren des lytischen Zyklus wie TPA und anti-Immunglobulin-Antikörper aktivieren über die positiven Elemente den BZLF1-Promotor und damit die Virusproduktion. Für die Aktivierung des BZLF1-Promotors wurde ein zwei-Schritt-Modell postuliert: TPA und anti-Immunglobulin-Antikörper führen zur Aktivierung der ZI- und ZII-Elemente des BZLF1-Promotors. Übersteigt die Menge des daraufhin exprimierten BZLF1-Proteins eine kritische Konzentration, kommt es über die

BZLF1-Protein-responsiven ZIII-Elemente des Promotors zu einer starken Aktivierung der BZLF1-Expression, was dann unwiderruflich den lytischen Zyklus einleitet (siehe auch Abb. 4).

Um herauszufinden, mit welchem der beschriebenen Schritte der Aktivierung des BZLF1-Promotors LMP1 interferiert, wurden BZLF1-Promotorstudien in EBV-negativen Zelllinien durchgeführt, in denen die Promotorstimulation durch TPA und BZLF1 unabhängig voneinander betrachtet werden konnte. Hierzu wurden die Zelllinie Ramos, eine EBV-negative BL-Zelllinie und ein Modellsystem für die Untersuchung des BZLF1-Promotors, sowie die Zelllinie 293, eine EBV-negative Epithelzelllinie und ein Modellsystem für Untersuchungen der Signaltransduktion von LMP1, eingesetzt. Im Gegensatz zu zwar sehr heterogenen publizierten Daten war in Ramos-Zellen keine Stimulation des Promotors mit TPA und anti-IgM möglich, sondern nur durch die Kotransfektion eines BZLF1-Expressionsplasmids. In 293-Zellen konnte der BZLF1-Promotor sowohl durch TPA als auch durch das BZLF1-Protein induziert werden. LMP1 konnte die Promotoraktivierung durch BZLF1 sowohl in Ramos als auch in 293 auf mindestens 50% hemmen, die Restaktivität des Promotors lag aber immer noch deutlich über der basalen Aktivität. Die gegenüber der Induktion durch BZLF1 deutlich niedrigere TPA-Induktion des BZLF1-Promotors, die in 293-Zellen beobachtet wurde, konnte durch LMP1 ebenfalls inhibiert werden, und zwar um etwa 70% und damit zurück auf die basale Aktivität (Abb. 13 und 14).

Die in 293-Zellen erhaltenen Daten sprechen dafür, dass LMP1 den ersten Schritt der Aktivierung des BZLF1-Promotors durch exogene Faktoren inhibieren kann. Nach gleichen Ergebnissen in Ramos und 293 kann außerdem davon ausgegangen werden, dass LMP1 in der Lage ist, den zweiten Schritt der BZLF1-Promotoraktivierung, den autoregulatorischen Rückkopplungsmechanismus, zu hemmen. Dies deckt sich mit hier nicht gezeigten Daten, dass LMP1 die BZLF1-induzierte VCA-Expression in Östrogen-entzogenen EREB-Zellen inhibieren kann.

Welcher der beiden Hemmeffekte *in vivo* entscheidend ist, kann nicht gesagt werden. Möglicherweise ist der Einfluss von LMP1 auf die initiale Aktivierung des BZLF1-Promotors durch exogene Faktoren bereits ausreichend, die Reaktivierung von EBV zu unterbinden. Die Wirkung von LMP1 auf den zweiten Schritt der Aktivierung des BZLF1-Promotors würde dann nur einen zusätzlichen Sicherheitsmechanismus darstellen.

5.3 Signaltransduktionswege von LMP1, die für die Hemmung der BZLF1-Expression verantwortlich sind

Um den/die LMP1-abhängigen Signaltransduktionsweg(e) aufzuklären, die die hemmende Wirkung von LMP1 auf die Virusreaktivierung vermitteln, wurden zwei verschiedene Systeme verwendet. Zum einen wurde der Effekt spezifischer LMP1-Mutanten auf die Aktivierung des künstlichen BZLF1-Promotor/Luziferase-Konstrukts (Zp/luc) durch ein transfiziertes BZLF1-Expressionsplasmid in den EBV-negativen Ramos-Zellen untersucht. Zum andern wurde in transienten und stabilen Transfektionsversuchen analysiert, welche Wirkung die gleichen LMP1-Mutanten und spezifische Inhibitoren von LMP1-induzierten Signalwegen auf die durch anti-IgM induzierte Expression der endogenen BZLF1- und VCA-Proteine in EBV-positiven EREB-Zellen haben.

Die BZLF1-Promotorstudien in Ramos-Zellen zeigten, dass bis auf die LMP1- Δ C-Mutante alle eingesetzten Mutanten die Aktivierung des BZLF1-Promotors durch das BZLF1-Protein, also den zweiten Schritt im Aktivierungsmodell, gleich stark hemmen konnten (Abb. 16). Dies konnte nicht auf eine unspezifische Hemmung aufgrund zytostatischer Effekte dieser Mutanten zurückgeführt werden, da die LMP1-Mutante LMP1- Δ C, die nur aus dem N-Terminus und der Transmembrandomäne von LMP1 besteht (AS 1-193) und ausreicht, den zytostatischen Effekt von LMP1 zu vermitteln (Kaykas und Sugden, 2000), keine Hemmung zeigte. In dem System der proliferierenden und EBV-negativen Ramos-Zellen war also die Hemmung des durch exogenes BZLF1-Protein induzierten, artifiziellen BZLF1-Promotors durch LMP1 abhängig von der C-terminalen Domäne, aber unabhängig von den bisher am besten charakterisierten Signaltransduktionsdomänen von LMP1, CTAR1 und CTAR2.

Transiente Transfektionsversuche in Östrogen-entzogenen EREB-Zellen mit 0,25 μ g und 5 μ g der LMP1-Konstrukte und die Auswertung der Expression des endogenen BZLF1-Proteins in FACS-Analysen einen Tag nach der Induktion des lytischen Zyklus mit anti-IgM zeigten deutliche Unterschiede in der Hemmung des lytischen Zyklus durch die verschiedenen LMP1-Konstrukte. Während die eingesetzte LMP1-Doppelmutante LMP1-PQT>AAA/Y384G, die Punktmutationen in den Regionen CTAR1 und CTAR2 trug, wie die LMP1- Δ C-Mutante keine Hemmwirkung zeigte, konnten die beiden Einzelmutanten mit einer Punktmutation entweder in CTAR1 oder in CTAR2 den lytischen Zyklus noch etwas blockieren, aber nicht mehr so gut wie LMP1-Wildtyp (Abb. 25 und 26). Beim Einsatz von 0,25 μ g Plasmid zeigte

LMP1-PQT>AAA eine etwas stärkere Resthemmung als LMP1-Y384G; bei der Transfektion von 5 µg Plasmid hingegen war der gegenüber LMP1 verbliebene Hemmeffekt bei beiden Einzelmutanten gleich.

Neben den transienten Transfektionsversuchen wurden stabil transfizierte EREB-Linien hergestellt, um die Induzierbarkeit des lytischen Zyklus auch in konstitutiv die LMP1-Konstrukte exprimierenden Zellen zu messen. Nach der aufwendigen Etablierungsphase der stabilen Klone wurden unter den heranwachsenden 67 hygromycinresistenten Klonen leider nur fünf Klone gefunden, die stabil eines der LMP1-Konstrukte LMP1-PQT>AAA oder LMP1-Y384G exprimierten (Abb. 28A) und vergleichbare Expressionsstärken von IgM auf der Oberfläche zeigten (Tab. 1). Übereinstimmend mit den transienten Versuchen war in Zellklonen, die konstitutiv die Mutante LMP1-PQT>AAA exprimierten, die hemmende Wirkung von LMP1 um etwa die Hälfte aufgehoben. Im Gegensatz zu den transienten Experimenten zeigten hingegen Zellklone mit einer konstitutiven Expression von LMP1-Y384G keinen Hemmeffekt mehr (Abb. 29).

Bei einem Vergleich der Expressionsstärken der LMP1-Konstrukte in den transienten und stabilen Versuchen stellte sich heraus, dass in den stabil transfizierten Zellen die Expressionsstärke niedriger war als in den transient transfizierten Zellen. Eine gegenüber den stabilen Zellklonen nur leicht stärkere Expression zeigten die transient mit 0,25 µg Plasmid transfizierten Zellen. Bei der transienten Transfektion von 5 µg Plasmid hingegen lag die Expressionsstärke der Konstrukte deutlich über der unter den zuvor beschriebenen Bedingungen erreichten und auch deutlich über dem Expressionsniveau von LMP1 in in Gegenwart von Östrogen proliferierenden EREB-Zellen (Abb. 28B). Die Stärke der hemmenden Wirkung von LMP1 korrespondierte nicht mit diesen Expressionsdaten. Obwohl die Expression von LMP1 in den stabilen EREB-Zellklonen am niedrigsten war, fand in diesen Zellen die stärkste Inhibition der Reaktivierung statt. Dies lässt sich dadurch erklären, dass die Zellen der stabilen Klone wahrscheinlich in allen Zellen eine vergleichbare Menge an LMP1 exprimierten, während die LMP1-Expression in den transient transfizierten Zellen deutlich variierte und somit unter diesen Bedingungen vielleicht nicht alle Zellen ausreichende Mengen an LMP1 exprimierten, um den lytischen Zyklus zu unterdrücken. Hinzu kommt, dass die transienten und stabilen Versuche in verschiedenen Zellklonen (ERE2-1 und ERE2-5) durchgeführt wurden, was die beobachteten Unterschiede ebenfalls erklären könnte.

Die erhaltenen Daten deuteten zusammenfassend darauf hin, dass die Bedeutung der CTAR2-Region für den inhibierenden Effekt von LMP1 mit zunehmender Expressionsstärke leicht sinkt. Die Mutante LMP1-PQT>AAA in CTAR1 sowie die Doppelmutante LMP1-PQT>AAA/Y384G zeigten unabhängig von der Expressionsstärke immer etwa den gleichen Effekt relativ zu LMP1, nämlich einen Rückgang der Hemmung um etwa 50% durch die PQT>AAA-Mutation bzw. eine vollständige Aufhebung der Wirkung von LMP1 durch die Doppelmutation. Die Hemmung der anti-IgM-induzierten Virusreaktivierung durch LMP1 in EREB-Zellen wird also allein durch die CTAR1- und CTAR2-Regionen von LMP1 vermittelt. Dabei übernimmt CTAR2 gegenüber CTAR1 vor allem bei niedrigeren Konzentrationen, das heißt niedrigeren Aktivierungskapazitäten, eventuell eine größere Rolle, was auf die höhere NF- κ B-Aktivierungsfähigkeit und auf die JNK1-Aktivierungsfähigkeit von CTAR2 zurückgeführt werden könnte.

Zu einer weiteren Unterscheidung der von CTAR1 und CTAR2 vermittelten Signalwege NF- κ B, p38 MAPK und JNK1 wurden spezifische Inhibitoren dieser Signalwege untersucht. Als Inhibitoren fanden I κ B $\alpha_{32/36A}$ für NF- κ B, dnMKK6 und SB203580 für p38 MAPK und dnSEK1 für JNK1 Verwendung. Die Hemmung der durch anti-IgM stimulierten BZLF1-Expression durch 0,25 μ g transient transfiziertes LMP1 wurde abhängig von der Gegenwart dieser Inhibitoren untersucht. Es zeigte sich, dass außer I κ B $\alpha_{32/36A}$ keiner der spezifischen Inhibitoren die Hemmung der Virusreaktivierung durch LMP1 beeinträchtigen konnte (Abb. 30 bis 32). I κ B $\alpha_{32/36A}$ konnte den hemmenden Effekt von LMP1 zu einem signifikanten Teil aufheben. Dass es zu keiner vollständigen Aufhebung der Wirkung von LMP1 kam, lag in Anbetracht der Ergebnisse der LMP1-Mutanten, die eine zusätzliche Beteiligung anderer Regionen von LMP1 ausschlossen, wahrscheinlich an einer verbliebenen Restaktivität von NF- κ B bei der eingesetzten Konzentration von I κ B $\alpha_{32/36A}$.

Zusammengefasst ergaben die Versuche in der Zelllinie EREB, dass die Hemmung der Virusreaktivierung durch LMP1 vor allem über den von LMP1 aktivierten NF- κ B-Signaltransduktionsweg vermittelt wird.

Nach den Ergebnissen der Untersuchungen der EREB-Zellen muss davon ausgegangen werden, dass das EBV-negative B-Zell-System der Ramos-Zellen mit dem exogenen BZLF1-Promotor und dem exogenen BZLF1-Protein nicht die Situation *in vivo* widerspiegelte. In Östrogen-entzogenen EREB-Zellen stellte sich der hemmende Effekt von LMP1 auf den

durch anti-IgM induzierten lytischen Zyklus als NF- κ B-abhängig heraus. Dabei konnte keine Aussage darüber getroffen werden, ob LMP1 nur einen der beiden oder beide Aktivierungsschritte des BZLF1-Promotors hemmt. Eine von CTAR1 und CTAR2 abhängige Hemmung eines der beiden Schritte und eine davon unabhängige Hemmung des anderen Schrittes konnte in EREB-Zellen allerdings ausgeschlossen werden. Eine NF- κ B-unabhängige Hemmung eines der beiden Schritte der Promotoraktivierung müsste auch bei der LMP1-Doppelmutante LMP1-PQT>AAA/Y384G sichtbar werden. Diese zeigte jedoch einen vollständigen Verlust der inhibierenden Wirkung von LMP1. Die in Ramos-Zellen beobachtete CTAR1- und CTAR2-unabhängige Hemmung der Aktivierung des BZLF1-Promotors durch das BZLF1-Protein konnte in EREB-Zellen also nicht bestätigt werden. Diese Diskrepanz des EREB-Systems mit dem Ramos-System könnte an der Verwendung von exogenem BZLF1-Protein und an der Verwendung des exogenen BZLF1-Promotors liegen, von dem bereits gezeigt wurde, dass er sich anders verhält als der endogene BZLF1-Promotor (Flemington und Speck, 1990a; Kolman *et al.*, 1996; Le Roux *et al.*, 1996). Daneben befinden sich proliferierende Ramos-Zellen wahrscheinlich durch ihre hohe NF- κ B-Aktivität in einem Zustand, der nicht mit der Situation in Östrogen-entzogenen EREB-Zellen und mit der Situation der *in vivo* latent EBV-infizierten B-Zellen, die eine eher niedrige NF- κ B-Aktivität besitzen, vergleichbar ist.

Die Untersuchung des Einflusses von LMP1 auf die BZLF1-Promotoraktivierung in 293-Zellen hatte ergeben, dass LMP1 mit beiden Ebenen der Aktivierung interferieren kann, sowohl mit dem ersten Schritt der initialen Aktivierung durch exogene Faktoren als auch mit dem zweiten Schritt der Aktivierung durch das BZLF1-Protein selbst, wobei auch hier der exogene BZLF1-Promotor und das exogene BZLF1-Protein verwendet wurden. Auf welchem Mechanismus die NF- κ B-abhängige Hemmung des ersten Aktivierungsschrittes beruht, kann nicht erklärt werden. Eventuell bindet NF- κ B an den BZLF1-Promotor oder es fängt an der Promotoraktivierung beteiligte Faktoren ab, so dass es mit der initialen Aktivierung des BZLF1-Promotors interferieren würde. Bisher ist allerdings keine Bindestelle für NF- κ B im BZLF1-Promotor beschrieben. Die durch NF- κ B vermittelte hemmende Wirkung von LMP1 auf den zweiten Schritt der Aktivierung des BZLF1-Promotors könnte durch eine Wechselwirkung von NF- κ B mit BZLF1 erklärt werden. Gutsch *et al.* (1994) konnten in transienten Transfektionsversuchen und anschließenden Immunpräzipitationen zeigen, dass die p65-Untereinheit von NF- κ B direkt mit dem BZLF1-Protein interagieren kann. Außerdem wurde in dieser Publikation nachgewiesen, dass die Aktivierung von exogenen Promotoren mit

ZREs durch exogenes BZLF1 in Gegenwart von kotransfiziertem p65 inhibiert und in Gegenwart von kotransfiziertem I κ B gesteigert werden kann. LMP1 könnte also über die Aktivierung von NF- κ B eine Inaktivierung des BZLF1-Proteins erreichen und damit die Transkription BZLF1-abhängiger Promotoren von Genen der lytischen Expressionskaskade inhibieren, was zu einer Hemmung des lytischen Zyklus führen würde. Die Hemmung welcher der beiden Schritte *in vivo* relevant ist, bleibt offen, da kein geeignetes EBV-negatives System gefunden werden konnte, um die beiden Aktivierungsschritte unabhängig voneinander betrachten zu können.

Die Kenntnis des Signalweges, durch dessen Aktivierung LMP1 und aktiviertes CD40 die Induktion des lytischen Zyklus hemmen können, könnte für die klinische Behandlung von EBV-Erkrankungen von Bedeutung sein. Bei immunsupprimierten Patienten stellt die unkontrollierte Reaktivierung von EBV und die damit verbundene Entwicklung lebensbedrohlicher Lymphome ein großes Problem dar. Durch den Einsatz von Inhibitoren des lytischen Zyklus könnte die Reaktivierung von EBV und damit die unkontrollierte Proliferation neuinfizierter B-Zellen verhindert werden. Dabei wäre der Einsatz eines Medikaments, das spezifisch den Effekt von LMP1 und CD40 nachahmen würde, denkbar. Auf der anderen Seite wird im Fall EBV-positiver Tumoren ein Therapieansatz diskutiert, bei dem man durch eine gezielte Reaktivierung von EBV den Tumor beseitigen könnte. In vielen EBV-assoziierten Tumoren wie dem Hodgkin-Lymphom oder dem Nasopharynx-Karzinom wird neben anderen viralen Proteinen auch LMP1 exprimiert (Latenz II-Genexpressionsmuster), was zur Unterdrückung der Virusreaktivierung führt. Würde in allen infizierten Zellen des Tumors der lytische Zyklus ausgelöst, käme es zur Lyse der infizierten transformierten Zellen und damit zu einem Verschwinden des transformierten Tumorgewebes. In dieser Situation kämen als Behandlung Inhibitoren der Signalwege in Frage, die eine Hemmung der Virusreaktivierung vermitteln. Die Kenntnis des für die Unterdrückung der Reaktivierung entscheidenden Signaltransduktionswegs von LMP1 wäre für beide Therapieansätze sehr hilfreich.

5.4 Bedeutung von LMP2A für die Regulation der Latenz von EBV

Bereits bevor die Bedeutung von LMP1 und aktiviertem CD40 für die Regulation der Latenz von EBV diskutiert wurde, war bekannt, dass LMP2A in LCLs die Induktion des lytischen Zyklus durch anti-Immunglobulin-Antikörper hemmen kann (Miller *et al.*, 1994). LMP2A gelingt dies, indem es mit der Aktivierung des B-Zell-Rezeptors interferiert. Durch seine konstitutive Wechselwirkung mit PTKs übt es einen dominant-negativen Effekt auf PTKs aus, die einmal an LMP2A gebunden, nicht mehr für die Signaltransduktion des aktivierten B-Zell-Rezeptors zur Verfügung stehen (Miller *et al.*, 1995). Außerdem resultiert die Assoziation von LMP2A mit Ubiquitin-Ligasen der Nedd4-Familie in einem Abbau der gleichzeitig an LMP2A gebundenen PTKs (Ikeda *et al.*, 2000). Zudem blockiert die Anwesenheit von LMP2A in den „lipid rafts“ die antigeninduzierte Translokation des B-Zell-Rezeptors in diese Bereiche der Plasmamembran (Dykstra *et al.*, 2001). Neben der Wechselwirkung von LMP2A mit dem aktivierten B-Zell-Rezeptor kann LMP2A in unstimulierten Zellen auch B-Zell-Rezeptor-ähnliche Signale geben. Es konnte gezeigt werden, dass oligomerisiertes LMP2A abhängig von einem funktionalen ITAM die Expression von Zytokinen und die Freisetzung von Calcium aus dem endoplasmatischen Retikulum induzieren kann (Alber *et al.*, 1993; Beaufils *et al.*, 1993). Daneben führt in transgenen Mäusen mit einer B-Zell-spezifischen LMP2A-Expression die Expression von LMP2A zu der Umgehung eines wichtigen Kontrollpunktes der B-Zell-Entwicklung, das heißt, LMP2A kann den B-Zell-Rezeptor ligandenunabhängig partiell substituieren (Caldwell *et al.*, 1998).

In dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten Zellsystem der EREB-Zellen wurde zunächst untersucht, ob die Daten, die eine Inhibition des aktivierten B-Zell-Rezeptor-Signals durch LMP2A zeigten, bestätigt werden können. Bei der transienten Transfektion von LMP2A in EREB-Zellen in Abwesenheit von Östrogen war die anti-IgM-induzierte Expression des späten lytischen Gens VCA in der Tat reduziert (Abb. 34). Daneben wurde in dieser Arbeit der Effekt von LMP2A mit dem des durch anti-Immunglobulin-Antikörper aktivierten B-Zell-Rezeptors verglichen. Es zeigte sich, dass LMP2A nach transients Transfektion sowohl in Östrogen-entzogenen EREB-Zellen als auch in den BL-Zelllinien Akata und P3HR1 in ähnlicher Weise wie anti-Immunglobulin-Antikörper die Reaktivierung von EBV induzieren kann (Abb. 36 bis 39). Außerdem wird von beiden, von LMP2A und vom aktivierten B-Zell-Rezeptor, für die Induktion der BZLF1-Expression ein funktionaler ERK1/2-Signalweg benötigt (Abb. 40). Schließlich wurde gezeigt, dass sowohl die durch LMP2A als auch die

durch anti-IgM induzierte BZLF1-Expression durch Kotransfektion von 0,25 µg LMP1 auf die Hälfte gesenkt werden kann (Abb. 41). Die Signale von LMP2A und dem aktivierten B-Zell-Rezeptor scheinen also über die gleichen Signaltransduktionswege zu verlaufen.

LMP2A interferierte einerseits in stimulierten Zellen mit dem durch anti-Immunglobulin-Antikörper aktivierten B-Zell-Rezeptor, ahmte aber andererseits in unstimulierten Zellen Signale des aktivierten B-Zell-Rezeptors nach. Dies könnte darauf zurückgeführt werden, dass LMP2A in der Zelle zwar qualitativ gleiche, aber quantitativ schwächere Signale auslöst wie der B-Zell-Rezeptor nach Aktivierung. Ein ähnlicher Effekt wurde in T-Zellen für die Aktivierung des Integrin $\alpha_V\beta_3$ -Rezeptors, der kostimulatorische Signale für den T-Zell-Rezeptor liefert, beschrieben (Adler *et al.*, 2001). Hier kann in Gegenwart eines T-Zell-Rezeptor-Signals Osteopontin, ein Ligand des Integrin-Rezeptors, allein zwar die Sekretion von IL-2 induzieren, in Gegenwart von Vitronektin, eines anderen Liganden des Integrin-Rezeptors, interferiert es aber mit der stärkeren IL-2-Sekretion, die durch Vitronektin ausgelöst wird. Im Fall der Aktivierung des B-Zell-Rezeptors bedeutet dies, dass dessen Signale in Anwesenheit des konstitutiv aktiven LMP2A-Proteins abgeschwächt werden, da es mit LMP2A um die Bindung derselben PTKs konkurrieren muss. Dabei ist der Effekt von LMP2A konzentrationsabhängig: Kürzlich konnte gezeigt werden, dass LMP2A den durch anti-Immunglobulin-Antikörper induzierten lytischen Zyklus im Gegensatz zu LCLs in Akata-Zellen nicht inhibieren kann (Konishi *et al.*, 2001). Im Unterschied zur relativ hohen Expressionsstärke von LMP2A in LCLs, die alle Gene des Latenz III-Expressionsprogramms exprimieren, ist die Konzentration von LMP2A in Akata-Zellen, die ein Latenz I-Expressionsmuster zeigen, deutlich niedriger. Die Konzentration von LMP2A muss also eine bestimmte Höhe übersteigen, um einen Effekt auf die Stimulierbarkeit des B-Zell-Rezeptors ausüben zu können. Zudem kann durch LMP2A die Induktion der Virusreaktivierung zwar vermindert, aber nicht vollständig gehemmt werden (Abb. 34 und Konishi *et al.*, 2001; Miller *et al.*, 1994). Dies deckt sich ebenfalls mit den oben beschriebenen Daten des Integrin-Rezeptors, die zeigten, dass Osteopontin die durch Vitronektin induzierte IL-2-Sekretion zwar erniedrigt, es aber aufgrund der auch von Osteopontin induzierten, schwächeren IL-2-Sekretion zur Einstellung eines intermediären Zustands kommt (Adler *et al.*, 2001).

Basierend auf den Ergebnissen von Miller *et al.* (1994) und Konishi *et al.* (2001), wonach LMP2A in LCLs den durch anti-Immunglobulin-Antikörper stimulierten lytischen Zyklus unterdrücken konnte, wird diskutiert, dass LMP2A diese Rolle in latent infizierten Memory-

B-Zellen übernehmen könnte. Nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit ist es jedoch auch möglich, dass LMP2A in unstimulierten Zellen die Reaktivierung von EBV induzieren könnte.

Über die *in vivo*-Bedeutung des Effekts von LMP2A, das B-Zell-Rezeptor-Signal nachzuahmen, kann nur spekuliert werden. Nach dem Modell von Babcock *et al.* (2000) führt die EBV-Infektion von B-Zellen nach einer proliferativen Phase (Latenz III) und nach einem Differenzierungsprozess der infizierten Zellen über die Expression eines Latenz II-Expressionsmusters in den Keimzentren der Lymphknoten zur Etablierung der Latenz in ruhenden Memory-B-Zellen (Latenz 0). Ruhende B-Zellen benötigen für ihr dauerhaftes Überleben allerdings periodisch B-Zell-Rezeptor-Signale sowie T-Zell-Signale, die sie bei der Zirkulation durch sekundäre Lymphgewebe erhalten (Gray und Skarvall, 1988; Gray *et al.*, 1996; Lam *et al.*, 1997). Es konnte gezeigt werden, dass EBV-infizierte Memory-B-Zellen in den Tonsillen eine Wiederaufnahme der viralen Genexpression nach dem Muster der Latenz II-Genexpression zeigen (Babcock und Thorley-Lawson, 2000). Durch diese „Reaktivierung“, die zur Expression der beiden viralen Proteine LMP1 und LMP2A führen würde, könnte EBV das Langzeit-Überleben der infizierten Memory-B-Zellen sichern. LMP1 könnte durch Nachahmung einer CD40-CD40L-Wechselwirkung das nötige Antigen-spezifische T-Zell-Signal geben, LMP2A könnte durch Nachahmung des aktivierten B-Zell-Rezeptors das nötige B-Zell-Rezeptor-Signal liefern. Neben der beschriebenen Strategie von EBV, das Langzeit-Überleben der latent infizierten Memory-B-Zellen zu sichern, könnte LMP2A auch an der Aufrechterhaltung des Vorrats EBV-infizierter Zellen beteiligt sein. Im peripheren Blut von EBV-seropositiven Personen konnten Zellen nachgewiesen werden, die als einziges virales Transkript LMP2A exprimierten (Babcock *et al.*, 1999 und 2000; Qu und Rowe, 1992). In diesen Zellen mit singulärer LMP2A-Expression könnte eine ausreichend starke Expression von LMP2A das Signal zum Eintritt in den lytischen Zyklus liefern, um durch die Produktion neuer Viruspartikel und die Neuinfektion von B-Zellen die Zahl EBV-infizierter Zellen aufrechtzuerhalten und die lebenslange Persistenz zu sichern. In EBV-assoziierten Tumoren, die das Latenz II-Genexpressionsmuster zeigen, wäre eine derartige Reaktivierung durch LMP1 unterdrückt. LMP2A könnte allerdings, indem es das Überlebenssignal des B-Zell-Rezeptors ersetzt, zum Überleben EBV-infizierter B-Zellen ohne funktionalen B-Zell-Rezeptor und damit zur Pathogenese des Hodgkin-Lymphoms (Latenz II) beitragen.

6 Zusammenfassung

Das Epstein-Barr-Virus, ein B-lymphotropes, humanes Herpesvirus, persistiert nach der Primärinfektion lebenslang latent in ruhenden Memory-B-Zellen des Wirts. Zugang zu dem Zelltyp der Memory-B-Zellen erhält das Virus, indem es nach der Infektion von B-Zellen zunächst alle neun latenten Proteine exprimiert und dadurch die Proliferation der infizierten Zellen induziert. Durch einen anschließenden Differenzierungsprozess eines Teils der infizierten Zellen zu Memory-B-Zellen, in denen bis auf LMP2A-Transkripte keine virale Genexpression nachweisbar ist, entgeht das Virus der Kontrolle durch das Immunsystem. Die Unterdrückung der Reaktivierung des Virus ist Voraussetzung für das Erreichen und die Aufrechterhaltung des Zustands der Latenz. *In vitro*-Studien zeigten, dass sowohl der zelluläre CD40-Rezeptor als auch die Latenten Membranproteine LMP1 und LMP2A von EBV die Virusreaktivierung hemmen können. Bei LMP1 handelt es sich um ein dem CD40-Molekül sehr ähnliches Protein, das über seinen zytoplasmatischen C-Terminus die Signaltransduktionswege NF- κ B, p38 MAPK und JNK1 aktiviert. LMP2A weist in seinem zytoplasmatischen N-Terminus Ähnlichkeiten zum zellulären B-Zell-Rezeptor auf, durch den es wie dieser Proteintyrosinkinasen rekrutiert.

Um die Signaltransduktionswege von LMP1, die die Latenz von EBV regulieren, und die Rolle von LMP2A bei der Regulation der Latenz weiter zu untersuchen, wurde in der vorliegenden Arbeit das Zellkultursystem der EREB-Zellen verwendet. Hierbei handelt es sich um konditional lymphoblastoide Zelllinien, die in Gegenwart von Östrogen wie LCLs alle neun latenten Proteine exprimieren und proliferieren, und in denen der Entzug von Östrogen aus dem Zellkulturmedium von einem Verlust der viralen Genexpression und einem Proliferationsstopp begleitet ist. In Östrogen-entzogenen EREB-Zellen lässt sich der lytische Zyklus von EBV durch Phorbolester wie TPA und anti-Immunglobulin-Antikörper stimulieren. Es zeigte sich, dass LMP1 und aktiviertes CD40 die Virusreaktivierung bereits auf der Höhe der Transkription des unmittelbar frühen viralen Gens BZLF1 inhibieren. Die Hemmung der BZLF1-Transkription durch LMP1 stellte sich als unabhängig von den Signaltransduktionswegen p38 MAPK und JNK1 heraus. Die Unterdrückung des lytischen Zyklus wird vielmehr durch den dritten von LMP1 aktivierten Signaltransduktionsweg vermittelt, den NF- κ B-Weg. Offen bleibt, ob LMP1 mit der initialen Aktivierung des BZLF1-Promotors durch exogene Faktoren oder mit dem zweiten Schritt der Promotoraktivierung, der positiven Rückkopplungsschleife durch das BZLF1-Protein, interferiert.

Die Untersuchung von LMP2A in Östrogen-entzogenen EREB-Zellen ergab, dass LMP2A die Virusreaktivierung in stimulierten Zellen, das heißt in Zellen, in denen der B-Zell-Rezeptor durch anti-IgM aktiviert wurde, analog bereits publizierter Daten inhibieren kann. Andererseits wurde die neue Beobachtung gemacht, dass LMP2A in unstimulierten Zellen in der Lage war, selbst die Virusreaktivierung zu induzieren, allerdings in einem geringeren Ausmaß als anti-IgM. Dies ist mit der Hypothese vereinbar, dass LMP2A ein qualitativ vergleichbares, aber quantitativ schwächeres Signal als der B-Zell-Rezeptor liefert.

In vivo könnte die singuläre Expression von LMP2A den Eintritt der infizierten Zelle in den lytischen Zyklus induzieren und durch die Neuinfektion von Zellen zur Erhaltung der lebenslangen Persistenz beitragen. Die Expression von LMP1 könnte hingegen direkt nach der Primärinfektion von B-Zellen und in EBV-assoziierten Tumoren zu einer Unterdrückung der Virusreaktivierung führen. Da die Kontrolle der Latenz durch LMP1 von dem NF- κ B-Signalweg vermittelt wird, bietet sich dieser Weg als Ziel einer Therapie EBV-assoziiierter Tumorerkrankungen an.

7 *Literaturverzeichnis*

A

Abbot S. D., Rowe M., Cadwallader K., Ricksten A., Gordon J., Wang F., Rymo L. und Rickinson A. B. (1990): Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 induces expression of the virus-encoded latent membrane protein. *J. VIROL.* 64, 2126-2134

Adamson A. L., Darr D., Holley-Guthrie E., Johnson R. A., Mauser A., Swenson J. und Kenney S. (2000): Epstein-Barr virus immediate-early proteins BZLF1 and BRLF1 activate the ATF2 transcription factor by increasing the levels of phosphorylated p38 and c-Jun N-terminal kinases. *J. VIROL.* 74, 1224-1233

Adamson A. L. und Kenney S. (1999): The Epstein-Barr virus BZLF1 protein interacts physically and functionally with the histone acetylase CREB-binding protein. *J. VIROL.* 73, 6551-6558

Adler B., Ashkar S., Cantor H. und Weber G. F. (2001): Costimulation by extracellular matrix proteins determines the response to TCR ligation. *CELL. IMMUNOL.* 210, 30-40

Adler B., Schaadt E., Kempkes B., Zimmer-Strobl U., Baier B. und Bornkamm G. W. (2002): Control of Epstein-Barr virus reactivation by activated CD40 and viral latent membrane protein 1. *PNAS* 99, 437-442

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

Alber G., Kim K.-M., Weiser P., Riesterer C., Carsetti R. und Reth M. (1993): Molecular mimicry of the antigen receptor signalling motif by transmembrane proteins of the Epstein-Barr virus and the bovine leukaemia virus. *CURRENT BIOLOGY* 3, 333-339

Allday M. J., Crawford D. H. und Griffin B. E. (1989): Epstein-Barr virus latent gene expression during the initiation of B cell immortalization. *J. GEN. VIROL.* 70, 1755-1764

Arrand J. R., Rymo L., Walsh J. E., Bjorck E., Lindahl T. und Griffin B.E. (1981): Molecular cloning of the complete Epstein-Barr virus genome as a set of overlapping restriction endonuclease fragments. *NUCLEIC ACIDS RES.* 9, 2999-3014

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

B

Babcock G. J., Decker L. L., Freeman R. B. und Thorley-Lawson D. A. (1999): Epstein-Barr virus-infected resting memory B cells, not proliferating lymphoblasts, accumulate in the peripheral blood of immunosuppressed patients. *J. EXP. MED.* 190, 567-576

- Babcock G. J., Decker L. L., Volk M. und Thorley-Lawson D. A. (1998): EBV persistence in memory B cells in vivo. *IMMUNITY* 9, 395-404
- Babcock G. J., Hochberg D. und Thorley-Lawson D. A. (2000): The expression pattern of Epstein-Barr virus latent genes in vivo is dependent upon the differentiation stage of the infected B cell. *IMMUNITY* 13, 497-506
- Babcock G. J. und Thorley-Lawson D. A. (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. *PNAS* 97, 12250-12255
- Baer R., Bankier A. T., Biggin M. D., Deininger P. L., Farrell P. J., Gibson T. J., Hatfull G., Hudson G. S., Satchwell S. C., Seguin C. *et al.* (1984): DNA sequence and expression of the B95-8 Epstein-Barr virus genome. *NATURE* 310, 207-211
- Baichwal V. R. und Sugden B. (1987): Posttranslational processing of an Epstein-Barr virus-encoded membrane protein expressed in cells transformed by Epstein-Barr virus. *J. VIROL.* 61, 866-875
- Banchereau J., Bazan F., Blanchard D., Brière F., Galizzi J. P., van Kooten C., Liu Y. J., Rousset F. und Saeland S. (1994): The CD40 antigen and its ligand. *ANNU. REV. IMMUNOL.* 12, 881-922
- Barrett T. B., Shu G. und Clark E. A. (1991): CD40 signaling activates CD11a/CD18 (LFA-1)-mediated adhesion in B cells. *J. IMMUNOL.* 146, 1722-1729
- Baumann M., Mischak H., Dammeier S., Kolch W., Gires O., Pich D., Zeidler R., Delecluse H.-J. und Hammerschmidt W. (1998): Activation of the Epstein-Barr virus transcription factor BZLF1 by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced phosphorylation. *J. VIROL.* 72, 8105-8114
- Beaufils P., Choquet D., Mamoun R. Z. und Malissen B. (1993): The (YXXL/I)₂ signalling motif found in the cytoplasmic segments of the bovine leukaemia virus envelope protein and Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A can elicit early and late lymphocyte activation events. *EMBO J.* 12, 5105-5112
- Biggin M., Bodescot M., Perricaudet M. und Farrell P. (1987): Epstein-Barr virus gene expression in P3HR1-superinfected Raji cells. *J. VIROL.* 61, 3120-3132
- Bornkamm G. W., Hudewentz J., Freese U. K. und Zimmer U. (1982): Deletion of the nontransforming Epstein-Barr virus strain P3HR-1 causes fusion of the large internal repeat to the DS_L region. *J. VIROL.* 43, 952-968
- Brielmeier M., Mautner J., Laux G. und Hammerschmidt W. (1996): The latent membrane protein 2 gene of Epstein-Barr virus is important for efficient B cell immortalization. *J. GEN. VIROL.* 77, 2807-2818
- Brodeur S. R., Cheng G., Baltimore D. und Thorley-Lawson D. A. (1997): Localization of the major NF- κ B-activating site and the sole TRAF3 binding site of LMP-1 defines two distinct signaling motifs. *J. BIOL. CHEM.* 272, 19777-19784

Brooks L., Yao Q. Y., Rickinson A. B. und Young L. S. (1992): Epstein-Barr virus latent gene transcription in nasopharyngeal carcinoma cells: coexpression of EBNA1, LMP1, and LMP2 transcripts. *J. VIROL.* 66, 2689-2697

Burkhardt A. L., Bolen J. B., Kieff E. und Longnecker R. (1992): An Epstein-Barr virus transformation-associated membrane protein interacts with src family tyrosine kinases. *J. VIROL.* 66, 5161-5167

C

Caldwell R. G., Wilson J. B., Anderson S. J. und Longnecker R. (1998): Epstein-Barr virus LMP2A drives B cell development and survival in the absence of normal B cell receptor signals. *IMMUNITY* 9, 405-411

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

Cambier J. C. (1995): Antigen and Fc receptor signaling. The awesome power of the immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM). *J. IMMUNOL.* 155, 3281-3285

Cann A. J., Koyanagi Y. und Chen I. S. Y. (1988): High efficiency transfection of primary human lymphocytes and studies of gene expression. *ONCOGENE* 3, 123-128

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

Cheng G., Cleary A. M., Ye Z.-S., Hong D. I., Lederman S. und Baltimore D. (1995): Involvement of CRAF1, a relative of TRAF, in CD40 signaling. *SCIENCE* 267, 1494-1498

Chevallier-Greco A., Manet E., Chavrier P., Mosnier C., Daillie J. und Sergeant A. (1986): Both Epstein-Barr virus (EBV)-encoded trans-acting factors, EB1 and EB2, are required to activate transcription from an EBV early promoter. *EMBO J.* 5, 3243-3249

Clark E. A. und Ledbetter J. A. (1986): Activation of human B cells mediated through two distinct cell surface differentiation antigens, Bp35 and Bp50. *PNAS* 83, 4494-4498

Coffin W. F. 3rd, Erickson K. D., Hoedt-Miller M. und Martin J. M. (2001): The cytoplasmic amino-terminus of the latent membrane protein-1 of Epstein-Barr virus: relationship between transmembrane orientation and effector functions of the carboxy-terminus and transmembrane domain. *ONCOGENE* 20, 5313-5330

Cohen J. I., Wang F., Mannick J. und Kieff E. (1989): Epstein-Barr virus nuclear protein 2 is a key determinant of lymphocyte transformation. *PNAS* 86, 9558-9562

Cordier M., Calender A., Billaud M., Zimmer U., Rousselet G., Pavlish O., Banchereau J., Tursz T., Bornkamm G. und Lenoir G. M. (1990): Stable transfection of Epstein-Barr virus (EBV) nuclear antigen 2 in lymphoma cells containing the EBV P3HR1 genome induces expression of B-cell activation molecules CD21 and CD23. *J. VIROL.* 64, 1002-1013

Countryman J. und Miller G. (1985): Activation of expression of latent Epstein-Barr herpesvirus after gene transfer with a small cloned subfragment of heterogeneous viral DNA. PNAS 82, 4085-4089

Craig F. E., Gulley M. L. und Banks P. M. (1993): Posttransplantation lymphoproliferative disorders. AM. J. CLIN. PATHOL. 99, 265-276

D

Daibata M., Speck S. H., Mulder C. und Sairenji T. (1994): Regulation of the BZLF1 promoter of Epstein-Barr virus by second messengers in anti-immunoglobulin-treated B cells. VIROLOGY 198, 446-454

Dawson C. W., Rickinson A. B. und Young L. S. (1990): Epstein-Barr virus latent membrane protein inhibits human epithelial cell differentiation. NATURE 344, 777-780

Deacon E. M., Pallesen G., Niedobitek G., Crocker J., Brooks L., Rickinson A. B. und Young L. S. (1993): Epstein-Barr virus and Hodgkin's disease: transcriptional analysis of virus latency in the malignant cells. J. EXP. MED. 177, 339-349

Decker L. L., Klamon L. D. und Thorley-Lawson D. A. (1996): Detection of the latent form of Epstein-Barr virus DNA in the peripheral blood of healthy individuals. J. VIROL. 70, 3286-3289

Devergne O., Cahir McFarland E. D., Mosialos G., Izumi K. M., Ware C. F. und Kieff E. (1998): Role of the TRAF binding site and NF- κ B activation in Epstein-Barr virus latent membrane protein 1-induced cell gene expression. J. VIROL. 72, 7900-7908

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

Dhar S. K., Yoshida K., Machida Y., Khaira P., Chaudhuri B., Wohlschlegel J. A., Leffak M., Yates J. und Dutta A. (2001): Replication from oriP of Epstein-Barr virus requires human ORC and is inhibited by geminin. CELL 106, 287-296

Dykstra M. L., Longnecker R. und Pierce S. K. (2001): Epstein-Barr virus coopts lipid rafts to block the signaling and antigen transport functions of the BCR. IMMUNITY 14, 57-67

E

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

Eliopoulos A. G., Stack M., Dawson C. W., Kaye K. M., Hodgkin L., Sihota S., Rowe M. und Young L. S. (1997): Epstein-Barr virus-encoded LMP1 and CD40 mediate IL-6 production in

epithelial cells via an NF- κ B pathway involving TNF receptor-associated factors. *ONCOGENE* 14, 2899-2916

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

Epstein M. A. und Barr Y. M. (1964): Cultivation in vitro of human lymphoblasts from Burkitt's malignant lymphoma. *LANCET* 1, 252-253

Epstein M. A., Barr Y. M. und Achong B. G. (1964): Virus particles in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. *LANCET* 1, 702-703

F

Faggioni A., Zompetta C., Grimaldi S., Barile G., Frati L. und Lazdins J. (1986): Calcium modulation activates Epstein-Barr virus genome in latently infected cells. *SCIENCE* 232, 1554-1556

Fahraeus R., Jansson A., Ricksten A., Sjoblom A. und Rymo L. (1990): Epstein-Barr virus-encoded nuclear antigen 2 activates the viral latent membrane protein promoter by modulating the activity of a negative regulatory element. *PNAS* 87, 7390-7394

Fahraeus R., Rymo L., Rhim J. S. und Klein G. (1990): Morphological transformation of human keratinocytes expressing the LMP gene of Epstein-Barr virus. *NATURE* 345, 447-449

Falk K., Ernberg I., Sakthivel R., Davis J., Christensson B., Luka J., Okano M., Grierson H. L., Klein G. und Purtilo D. T. (1990): Expression of Epstein-Barr virus-encoded proteins and B-cell markers in fatal infectious mononucleosis. *INT. J. CANCER* 46, 976-984.

Farrell P. J., Rowe D. T., Rooney C. M. und Kouzarides T. (1989): Epstein-Barr virus BZLF1 trans-activator specifically binds to a consensus AP-1 site and is related to c-fos. *EMBO J.* 8, 127-132

Fennewald S., van Santen V. und Kieff E. (1984): Nucleotide sequence of an mRNA transcribed in latent growth-transforming virus infection indicates that it may encode a membrane protein. *J. VIROL.* 51, 411-419

Fingeroth J. D., Weis J. J., Tedder T. F., Strominger J. L., Biro P. A. und Fearon D. T. (1984): Epstein-Barr virus receptor of human B lymphocytes is the C3d receptor CR2. *PNAS* 81, 4510-4514

Flemington E. K., Borrás A. M., Lytle J. P. und Speck S. H. (1992): Characterization of the Epstein-Barr virus BZLF1 protein transactivation domain. *J. VIROL.* 66, 922-929

Flemington E. K., Goldfeld A. E. und Speck S. H. (1991): Efficient transcription of the Epstein-Barr virus immediate-early BZLF1 and BRLF1 genes requires protein synthesis. *J. VIROL.* 65, 7073-7077

Flemington E. und Speck S. H. (1990): Autoregulation of Epstein-Barr virus putative lytic switch gene BZLF1. *J. VIROL.* 64, 1227-1232

Flemington E. und Speck S. H. (1990): Identification of phorbol ester response elements in the promoter of Epstein-Barr virus putative lytic switch gene BZLF1. *J. VIROL.* 64, 1217-1226

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

Freter C. E. (1990): Acquired immunodeficiency syndrome-associated lymphomas. *J. NATL. CANCER INST. MONOGR.* 10, 45-54

Fruehling S. und Longnecker R. (1997): The immunoreceptor tyrosine-based activation motif of Epstein-Barr virus LMP2A is essential for blocking BCR-mediated signal transduction. *VIROLOGY* 235, 241-251

Fruehling S., Swart R., Dolwick K. M., Kremmer E. und Longnecker R. (1998): Tyrosine 112 of latent membrane protein 2A is essential for protein tyrosine kinase loading and regulation of Epstein-Barr virus latency. *J. VIROL.* 72, 7796-7806

G

Gaidano G. und Dalla-Favera R. (1995): Molecular pathogenesis of AIDS-related lymphomas. *ADV. CANCER RES.* 67, 113-153

Gerber P., Lucas S., Nonoyama M., Perlin E. und Goldstein L. I. (1972): Oral excretion of Epstein-Barr virus by healthy subjects and patients with infectious mononucleosis. *LANCET* 2, 988-989

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

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

Goldstein M. D. und Watts T. H. (1996): Identification of distinct domains in CD40 involved in B7-1 induction or growth inhibition. *J. IMMUNOL.* 157, 2837-2843

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

Grammer A. C., Swantek J. L., McFarland R. D., Miura Y., Geppert T. und Lipsky P. E. (1998): TNF receptor-associated factor-3 signaling mediates activation of p38 and Jun N-terminal kinase, cytokine secretion, and Ig production following ligation of CD40 on human B cells. *J. IMMUNOL.* 161, 1183-1193

Gratama J. W., Zutter M. M., Minarovits J., Oosterveer M. A., Thomas E. D., Klein G. und Ernberg I. (1991): Expression of Epstein-Barr virus-encoded growth-transformation-associated proteins in lymphoproliferations of bone-marrow transplant recipients. *INT. J. CANCER* 47, 188-192

Gray D., Siepmann K., van Essen D., Poudrier J., Wykes M., Jainandunsing S., Bergthorsdottir S. und Dullforce P. (1996): B-T lymphocyte interactions in the generation and survival of memory cells. *IMMUNOL. REV.* 150, 45-61

Gray D. und Skarvall H. (1988): B-cell memory is short-lived in the absence of antigen. *NATURE* 336, 70-73

Greenspan J. S., Greenspan D., Lennette E. T., Abrams D. I., Conant M. A., Petersen V. und Freese U. K. (1985): Replication of Epstein-Barr virus within the epithelial cells of oral "hairy" leukoplakia, an AIDS-associated lesion. *N. ENGL. J. MED.* 313, 1564-1571

Grossman S. R., Johannsen E., Tong X., Yalamanchili R. und Kieff E. (1994): The Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 transactivator is directed to response elements by the J κ recombination signal binding protein. *PNAS* 91, 7568-7572

Gruffat H., Manet E. und Sergeant A. (2002): MEF2-mediated recruitment of class II HDAC at the EBV immediate early gene BZLF1 links latency and chromatin remodeling. *EMBO REP.* 3, 141-146

Gutsch D. E., Holley-Guthrie E. A., Zhang Q., Stein B., Blonar M. A., Baldwin A. S. und Kenney S. C. (1994): The bZIP transactivator of Epstein-Barr virus, BZLF1, functionally and physically interacts with the p65 subunit of NF- κ B. *MOL. CELL. BIOL.* 14, 1939-1948

H

Hamilton-Dutoit S. J., Pallesen G., Franzmann M. B., Karkov J., Black F., Skinhoj P. und Pedersen C. (1991): AIDS-related lymphoma. Histopathology, immunophenotype, and association with Epstein-Barr virus as demonstrated by in situ nucleic acid hybridization. *AM. J. PATHOL.* 138, 149-163

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

Hammerschmidt W. und Sugden B. (1989): Genetic analysis of immortalizing functions of Epstein-Barr virus in human B lymphocytes. *NATURE* 340, 393-397

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

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

Hanissian S. H. und Geha R. S. (1997): Jak3 is associated with CD40 and is critical for CD40 induction of gene expression in B cells. *IMMUNITY* 6, 379-387

- Henkel T., Ling P. D., Hayward S. D. und Peterson M. G. (1994): Mediation of Epstein-Barr virus EBNA2 transactivation by recombination signal-binding protein J κ . *SCIENCE* 265, 92-95
- Henle G. und Henle W. (1966): Immunofluorescence in cells derived from Burkitt's lymphoma. *J. BACTERIOL.* 91, 1248-1256
- Henle G., Henle W. und Diehl V. (1968): Relation of Burkitt's tumor-associated herpes-type virus to infectious mononucleosis. *PNAS* 59, 94-101
- Henle W., Diehl V., Kohn G., Zur Hausen H. und Henle G (1967): Herpes-type virus and chromosome marker in normal leukocytes after growth with irradiated Burkitt cells. *SCIENCE* 157, 1064-1065
- Henle W., Henle G., Zajac B. A., Pearson G., Waubke R. und Scriba M. (1970): Differential reactivity of human serums with early antigens induced by Epstein-Barr virus. *SCIENCE* 169, 188-190
- Hennessey K., Fennewald S., Hummel M., Cole T. und Kieff E. (1984): A membrane protein encoded by Epstein-Barr virus in latent growth-transforming infection. *PNAS* 81, 7207-7211
- Higuchi M., Izumi K. M. und Kieff E. (2001): Epstein-Barr virus latent-infection membrane proteins are palmitoylated and raft-associated: protein 1 binds to the cytoskeleton through TNF receptor cytoplasmic factors. *PNAS* 98, 4675-4680
- Higuchi M., Kieff E. und Izumi K. M. (2002): The Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 putative Janus kinase 3 (JAK3) binding domain does not mediate JAK3 association or activation in B-lymphoma or lymphoblastoid cell lines. *J. VIROL.* 76, 455-459
- Hinuma Y., Konn M., Yamaguchi J., Wudarski D. J., Blakeslee J. R. und Grace J. T. (1967): Immunofluorescence and herpes-type virus particles in the P3HR-1 Burkitt lymphoma cell line. *J. VIROL.* 1, 1045-1051
- Holder M. J., Wang H., Milner A. E., Casamayor M., Armitage R., Spriggs M. K., Fanslow W. C., MacLennan I. C., Gregory C. D., Gordon J. *et al.* (1993): Suppression of apoptosis in normal and neoplastic human B lymphocytes by CD40 ligand is independent of Bcl-2 induction. *EUR. J. IMMUNOL.* 23, 2368-2371
- Hu H. M., O'Rourke K., Boguski M. S. und Dixit V. M. (1994): A novel RING finger protein interacts with the cytoplasmic domain of CD40. *J. BIOL. CHEM.* 269, 30069-30072
- Hudewentz J., Bornkamm G. W. und zur Hausen H. (1980): Effect of the diterpene ester TPA on Epstein-Barr virus antigen- and DNA synthesis in producer and nonproducer cell lines. *VIROLOGY* 100, 175-178
- Huen D. S., Henderson S. A., Croom-Carter D. und Rowe M. (1995): The Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 (LMP1) mediates activation of NF- κ B and cell surface phenotype via two effector regions in its carboxy-terminal cytoplasmic domain. *ONCOGENE* 10, 549-560

I

Ikeda M., Ikeda A., Longan L. C. und Longnecker R. (2000): The Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A PY motif recruits WW domain-containing ubiquitin-protein ligases. *VIROLOGY* 268, 178-191

Ishida T., Mizushima S., Azuma S., Kobayashi N., Tojo T., Suzuki K., Aizawa S., Watanabe T., Mosialos G., Kieff E., Yamamoto T. und Inoue J. (1996): Identification of TRAF6, a novel tumor necrosis factor receptor-associated factor protein that mediates signaling from an amino-terminal domain of the CD40 cytoplasmic region. *J. BIOL. CHEM.* 271, 28745-28748

Izumi K. M., Cahir McFarland E. D., Ting A. T., Riley E. A., Seed B. und Kieff E. D. (1999): The Epstein-Barr virus oncoprotein latent membrane protein 1 engages the tumor necrosis factor receptor-associated proteins TRADD and receptor-interacting protein (RIP) but does not induce apoptosis or require RIP for NF- κ B activation. *MOL. CELL. BIOL.* 19, 5759-5767

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

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

J

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

Jenkins P. J., Binné U. K. und Farrell P. J. (2000): Histone acetylation and reactivation of Epstein-Barr virus from latency. *J. VIROL.* 74, 710-720

Joseph A. M., Babcock G. J. und Thorley-Lawson D. A. (2000): EBV persistence involves strict selection of latently infected B cells. *J. IMMUNOL.* 165, 2975-2981

K

Kaiser C., Laux G., Eick D., Jochner N., Bornkamm G. W. und Kempkes B. (1999): The proto-oncogene c-myc is a direct target gene of Epstein-Barr virus nuclear antigen 2. *J. VIROL.* 73, 4481-4484

Karajannis M. A., Hummel M., Anagnostopoulos I. und Stein H. (1997): Strict lymphotropism of Epstein-Barr virus during acute infectious mononucleosis in nonimmunocompromised individuals. *BLOOD* 89, 2856-2862

- Kaye K. M., Devergne O., Harada J. N., Izumi K. M., Yalamanchili R., Kieff E. und Mosialos G. (1996): Tumor necrosis factor receptor associated factor 2 is a mediator of NF- κ B activation by latent infection membrane protein 1, the Epstein-Barr virus transforming protein. PNAS 93, 11085-11090
- Kaye K. M., Izumi K. M. und Kieff E. (1993): Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 is essential for B-lymphocyte growth transformation. PNAS 90, 9150-9154
- Kaye K. M., Izumi K. M., Mosialos G. und Kieff E. (1995): The Epstein-Barr virus LMP1 cytoplasmic carboxy terminus is essential for B-lymphocyte transformation; fibroblast cocultivation complements a critical function within the terminal 155 residues. J. VIROL. 69, 675-683
- Kaykas A. und Sugden B. (2000): The amino-terminus and membrane-spanning domains of LMP-1 inhibit cell proliferation. ONCOGENE 19, 1400-1410
- Kempkes B., Spitkovsky D., Jansen-Dürr P., Ellwart J. W., Kremmer E., Delecluse H.-J., Rottenberger C., Bornkamm G. W. und Hammerschmidt W. (1995): B-cell proliferation and induction of early G₁-regulating proteins by Epstein-Barr virus mutants conditional for EBNA2. EMBO J. 14, 88-96
- Kennedy M. K., Mohler K. M., Shanebeck K. D., Baum P. R., Picha K. S., Otten-Evans C. A., Janeway C. A. Jr. und Grabstein K. H. (1994): Induction of B cell costimulatory function by recombinant murine CD40 ligand. EUR. J. IMMUNOL. 24, 116-123
- Kieff E. und Rickinson A. B. (2001): Epstein-Barr virus and its replication. In Fields Virology, 4th edition, edited by Knipe D. M., Howley P. M., Griffin D. E., Lamb R. A., Martin M. A., Roizman B. und Straus S. E., Lippincott Williams & Wilkins, chapter 74
- Kieser A., Kaiser C. und Hammerschmidt W. (1999): LMP1 signal transduction differs substantially from TNF receptor 1 signaling in the molecular functions of TRADD and TRAF2. EMBO J. 18, 2511-2521
- Kieser A., Kilger E., Gires O., Ueffing M., Kolch W. und Hammerschmidt W. (1997): Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 triggers AP-1 activity via the c-Jun N-terminal kinase cascade. EMBO J. 16, 6478-6485
- Kilger E., Kieser A., Baumann M. und Hammerschmidt W. (1998): Epstein-Barr virus-mediated B-cell proliferation is dependent upon latent membrane protein 1, which simulates an activated CD40 receptor. EMBO J. 17, 1700-1709
- Klein G., Giovanella B., Westman A., Stehlin J. S. und Mumford D. (1975): An EBV-genome-negative cell line established from an american Burkitt lymphoma; receptor characteristics. EBV infectibility and permanent conversion into EBV-positive sublines by in vitro infection. INTERVIROLOGY 5, 319-334
- Knutson J. C. (1990): The level of c-fgr RNA is increased by EBNA-2, an Epstein-Barr virus gene required for B-cell immortalization. J. VIROL. 64, 2530-2536

Kolman J. L., Taylor N., Gradoville L., Countryman J. und Miller G. (1996): Comparing transcriptional activation and autostimulation by ZEBRA and ZEBRA/c-Fos chimeras. *J. VIROL.* 70, 1493-1504

Konishi K., Maruo S., Kato H. und Takada K. (2001): Role of Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 2A on virus-induced immortalization and virus activation. *J. GEN. VIROL.* 82, 1451-1456

Kouzarides T., Packham G., Cook A. und Farrell P. J. (1991): The BZLF1 protein of EBV has a coiled coil dimerisation domain without a heptad leucine repeat but with homology to the C/EBP leucine zipper. *ONCOGENE* 6, 195-204

Kraus R. J., Mirocha S. J., Stephany H. M., Puchalski J. R. und Mertz J. E. (2001): Identification of a novel element involved in regulation of the lytic switch BZLF1 gene promoter of Epstein-Barr virus. *J. VIROL.* 75, 867-877

Kulwichit W., Edwards R. H., Davenport E. M., Baskar J. F., Godfrey V. und Raab-Traub N. (1998): Expression of the Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 induces B cell lymphoma in transgenic mice. *PNAS* 95, 11963-11968

L

Laherty C. D., Hu H. M., Opiari A. W., Wang F. und Dixit V. M. (1992): The Epstein-Barr virus LMP1 gene product induces A20 zinc finger protein expression by activating nuclear factor κ B. *J. BIOL. CHEM.* 267, 24157-24160

Lalmanach-Girard A. C., Chiles T. C., Parker D. C. und Rothstein T. L. (1993): T cell-dependent induction of NF- κ B in B cells. *J. EXP. MED.* 177, 1215-1219

Lam K. M., Syed N., Whittle H. und Crawford D. H. (1991): Circulating Epstein-Barr virus-carrying B cells in acute malaria. *LANCET* 337, 876-878

Lam K. P., Kuhn R. und Rajewsky K. (1997): In vivo ablation of surface immunoglobulin on mature B cells by inducible gene targeting results in rapid cell death. *CELL* 90, 1073-1083

Laux G., Dugrillon F., Eckert C., Adam B., Zimmer-Strobl U. und Bornkamm G. W. (1994): Identification and characterization of an Epstein-Barr virus nuclear antigen 2-responsive cis element in the bidirectional promoter region of latent membrane protein and terminal protein 2 genes. *J. VIROL.* 68, 6947-6958

Laux G., Freese U. K., Fischer R., Polack A., Kofler E. und Bornkamm G. W. (1988): TPA-inducible Epstein-Barr virus genes in Raji cells and their regulation. *VIROLOGY* 162, 503-507

Lee M. A., Diamond M. E. und Yates J. L. (1999): Genetic evidence that EBNA-1 is needed for efficient, stable latent infection by Epstein-Barr virus. *J. VIROL.* 73, 2974-2982

Le Roux F., Sergeant A. und Corbo L. (1996): Epstein-Barr virus (EBV) EB1/Zta protein provided in trans and competent for the activation of productive cycle genes does not activate the BZLF1 gene in the EBV genome. *J. GEN. VIROL.* 77, 501-509

- Levitskaya J., Coram M., Levitsky V., Imreh S., Steigerwald-Mullen P. M., Klein G., Kurilla M. G. und Masucci M. G. (1995): Inhibition of antigen processing by the internal repeat region of the Epstein-Barr virus nuclear antigen-1. *NATURE* 375, 685-688
- Lieberman P. M. und Berk A. J. (1991): The Zta trans-activator protein stabilizes TFIID association with promoter DNA by direct protein-protein interaction. *GENES DEV.* 5, 2441-2454
- Lieberman P. M., Hardwick J. M., Sample J., Hayward G. S. und Hayward S. D. (1990): The zta transactivator involved in induction of lytic cycle gene expression in Epstein-Barr virus-infected lymphocytes binds to both AP-1 and ZRE sites in target promoter and enhancer regions. *J. VIROL.* 64, 1143-1155
- Liebowitz D., Kopan R., Fuchs E., Sample J. und Kieff E. (1987): An Epstein-Barr virus transforming protein associates with vimentin in lymphocytes. *MOL. CELL. BIOL.* 7, 2299-2308
- Liebowitz D., Wang D. und Kieff E. (1986): Orientation and patching of the latent infection membrane protein encoded by Epstein-Barr virus. *J. VIROL.* 58, 233-237
- Lindahl T., Adams A., Bjursell G., Bornkamm G. W., Kaschka-Dierich C. und Jehn U. (1976): Covalently closed circular duplex DNA of Epstein-Barr virus in a human lymphoid cell line. *J. MOL. BIOL.* 102, 511-530
- Liu P., Liu S. und Speck S. H. (1998): Identification of a negative cis element within the ZII domain of the Epstein-Barr virus lytic switch BZLF1 gene promoter. *J. VIROL.* 72, 8230-8239
- Liu S., Borrás A. M., Liu P., Suske G. und Speck S. H. (1997): Binding of the ubiquitous cellular transcription factors Sp1 and Sp3 to the ZI domains in the Epstein-Barr virus lytic switch BZLF1 gene promoter. *VIROLOGY* 228, 11-18
- Liu S., Liu P., Borrás A., Chatila T. und Speck S. H. (1997): Cyclosporin A-sensitive induction of the Epstein-Barr virus lytic switch is mediated via a novel pathway involving a MEF2 family member. *EMBO J.* 16, 143-153
- Longnecker R., Druker B., Roberts T. M. und Kieff E. (1991): An Epstein-Barr virus protein associated with cell growth transformation interacts with a tyrosine kinase. *J. VIROL.* 65, 3681-3692
- Longnecker R. und Kieff E. (1990): A second Epstein-Barr virus membrane protein (LMP2) is expressed in latent infection and colocalizes with LMP1. *J. VIROL.* 64, 2319-2326
- Longnecker R., Miller C. L., Miao X-Q., Marchini A. und Kieff E. (1992): The only domain which distinguishes Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A (LMP2A) from LMP2B is dispensable for lymphocyte infection and growth transformation in vitro; LMP2A is therefore nonessential. *J. VIROL.* 66, 6461-6469
- Longnecker R., Miller C. L., Miao X-Q., Tomkinson B. und Kieff E. (1993): 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, 2006-2013

Lu S. J., Day N. E., Degos L., Lepage V., Wang P. C., Chan S. H., Simons M., McKnight B., Easton D., Zeng Y. *et al.* (1990): Linkage of a nasopharyngeal carcinoma susceptibility locus to the HLA region. *NATURE* 346, 470-471

Luka J., Kallin B. und Klein G. (1979): Induction of the Epstein-Barr virus (EBV) cycle in latently infected cells by n-butyrate. *VIROLOGY* 94, 228-31

M

Magrath I. (1990): The pathogenesis of Burkitt's lymphoma. *ADV. CANCER RES.* 55, 133-270

Mann K. P. und Thorley-Lawson D. (1987): Posttranslational processing of the Epstein-Barr virus-encoded p63/LMP protein. *J. VIROL.* 61, 2100-2108

Mannick J. B., Asano K., Izumi K., Kieff E. und Stamler J. S. (1994): Nitric oxide produced by human B lymphocytes inhibits apoptosis and Epstein-Barr virus reactivation. *CELL* 79, 1137-1146

Mannick J. B., Cohen J. I., Birkenbach M., Marchini A. und Kieff E. (1991): The Epstein-Barr virus nuclear protein encoded by the leader of the EBNA RNAs is important in B-lymphocyte transformation. *J. VIROL.* 65, 6826-6837

Martin J. und Sugden B. (1991): Transformation by the oncogenic latent membrane protein correlates with its rapid turnover, membrane localization, and cytoskeletal association. *J. VIROL.* 65, 3246-3258

Mehl A. M., Floettmann J. E., Jones M., Brennan P. und Rowe M. (2001): Characterization of intercellular adhesion molecule-1 regulation by Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein-1 identifies pathways that cooperate with nuclear factor κ B to activate transcription. *J. BIOL. CHEM.* 276, 984-992

Miller C. L., Burkhardt A. L., Lee J. H., Stealey B., Longnecker R., Bolen J. B. und Kieff E. (1995): Integral membrane protein 2 of Epstein-Barr virus regulates reactivation from latency through dominant negative effects on protein-tyrosine kinases. *IMMUNITY* 2, 155-166

Miller C. L., Lee J. H., Kieff E. und Longnecker R. (1994): An integral membrane protein (LMP2) blocks reactivation of Epstein-Barr virus from latency following surface immunoglobulin crosslinking. *PNAS* 91, 772-776

Miller C. L., Longnecker R. und Kieff E. (1993): Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A blocks calcium mobilization in B lymphocytes. *J. VIROL.* 67, 3087-3094

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

- Mitchell T. und Sugden B. (1995): Stimulation of NF- κ B-mediated transcription by mutant derivatives of the latent membrane protein of Epstein-Barr virus. *J. VIROL.* 69, 2968-2976
- Miyashita E. M., Yang B., Babcock G. J. und Thorley-Lawson D. A. (1997): Identification of the site of Epstein-Barr virus persistence in vivo as a resting B cell. *J. VIROL.* 71, 4882-4891
- Miyashita E. M., Yang B., Lam K. M., Crawford D. H. und Thorley-Lawson D. A. (1995): A novel form of Epstein-Barr virus latency in normal B cells in vivo. *CELL* 80, 593-601
- Modrow S. und Falke D. (1998): *Molekulare Virologie*. Spektrum Akademischer Verlag
- Montalvo E. A., Shi Y., Shenk T. E. und Levine A. J. (1991): Negative regulation of the BZLF1 promoter of Epstein-Barr virus. *J. VIROL.* 65, 3647-3655
- Mosialos G., Birkenbach M., Yalamanchili R., VanArsdale T., Ware C. und Kieff E. (1995): The Epstein-Barr virus transforming protein LMP1 engages signaling proteins for the tumor necrosis factor receptor family. *CELL* 80, 389-399
- Murray R. J., Young L. S., Calender A., Gregory C. D., Rowe M., Lenoir G. M. und Rickinson A. B. (1988): Different patterns of Epstein-Barr virus gene expression and of cytotoxic T-cell recognition in B-cell lines infected with transforming (B95.8) or nontransforming (P3HR1) virus strains. *J. VIROL.* 62, 894-901

N

- Nakagomi H., Dolcetti R., Bejarano M. T., Pisa P., Kiessling R. und Masucci M. G. (1994): The Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 (LMP1) induces interleukin-10 production in Burkitt lymphoma lines. *INT. J. CANCER* 57, 240-244
- Nalesnik M. A. (1998): Clinical and pathological features of post-transplant lymphoproliferative disorders (PTLD). *SPRINGER SEMIN. IMMUNOPATHOL.* 20, 325-342
- Nalesnik M. A. und Starzl T. E. (1994): Epstein-Barr virus, infectious mononucleosis, and posttransplant lymphoproliferative disorders. *TRANSPLANT. SCI.* 4, 61-79
- Nemerow G. R., Mold C., Schwend V. K., Tollefson V. und Cooper N. R. (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, 1416-1420
- Niedermann J. C., McCollum R. W., Henle G. und Henle W. (1968): Infectious mononucleosis. Clinical manifestations in relation to EB virus antibodies. *JAMA* 203, 205-209
- Nilsson K., Klein G., Henle W. und Henle G. (1971): The establishment of lymphoblastoid lines from adult and fetal human lymphoid tissue and its dependence on EBV. *INT. J. CANCER* 8, 443-450

Noelle R. J., Roy M., Shepherd D. M., Stamenkovic I., Ledbetter J. A. und Aruffo A. (1992): A 39-kDa protein on activated helper T cells binds CD40 and transduces the signal for cognate activation of B cells. *PNAS* 89, 6550-6554

P

Packham G., Economou A., Rooney C. M., Rowe D. T. und Farrell P. J. (1990): Structure and function of the Epstein-Barr virus BZLF1 protein. *J. VIROL.* 64, 2110-2116

Paulie S., Ehlin-Henriksson B., Mellstedt H., Koho H., Ben-Aissa H. und Perlmann P. (1985): A p50 surface antigen restricted to human urinary bladder carcinomas and B lymphocytes. *CANCER IMMUNOL. IMMUNOTHER.* 20, 23-28

Peng M. und Lundgren E. (1992): Transient expression of the Epstein-Barr virus LMP1 gene in human primary B cells induces cellular activation and DNA synthesis. *ONCOGENE* 7, 1775-1782

Polack A., Hartl G., Zimmer U., Freese U. K., Laux G., Takaki K., Hohn B., Gissmann L. und Bornkamm G. W. (1984): A complete set of overlapping cosmid clones of M-ABA virus derived from nasopharyngeal carcinoma and its similarity to other Epstein-Barr virus isolates. *GENE* 27, 279-288

Pope J. H., Horne M. K. und Scott W. (1968): Transformation of foetal human leukocytes in vitro by filtrates of a human leukaemic cell line containing herpes-like virus. *INT. J. CANCER* 3, 857-866

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

Pullen S. S., Miller H. G., Everdeen D. S., Dang T. T., Crute J. J. und Kehry M. R. (1998): CD40-tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) interactions: regulation of CD40 signaling through multiple TRAF binding sites and TRAF hetero-oligomerization. *BIOCHEMISTRY* 37, 11836-11845

Pulvertaft R. J. V. (1964): Cytology of Burkitt's tumor (african lymphoma). *LANCET* 1, 238-240

Purtilo D. T., Cassel C. K., Yang J. P. und Harper R. (1975): X-linked recessive progressive combined variable immunodeficiency (Duncan's disease). *LANCET* 1, 935-940

Q

Qu L. und Rowe D. T. (1992): Epstein-Barr virus latent gene expression in uncultured peripheral blood lymphocytes. *J. VIROL.* 66, 3715-3724

R

- Rawlins D. R., Milman G., Hayward S. D. und Hayward G. S. (1985): Sequence-specific DNA binding of the Epstein-Barr virus nuclear antigen (EBNA-1) to clustered sites in the plasmid maintenance region. *CELL* 42, 859-868
- Reth M. (1989): Antigen receptor tail clue. *NATURE* 338, 383-384
- Rickinson A. B. und Kieff E. (2001): Epstein-Barr virus. In *Fields Virology*, 4th edition, edited by Knipe D. M., Howley P. M., Griffin D. E., Lamb R. A., Martin M. A., Roizman B. und Straus S. E., Lippincott Williams & Wilkins, chapter 75
- Rickinson A. B. und Moss D. J. (1997): Human cytotoxic T lymphocyte responses to Epstein-Barr virus infection. *ANNU. REV. IMMUNOL.* 15, 405-431
- Robertson E. S., Grossman S., Johannsen E., Miller C., Lin J., Tomkinson B. und Kieff E. (1995): Epstein-Barr virus nuclear protein 3C modulates transcription through interaction with the sequence-specific DNA-binding protein J κ . *J. VIROL.* 69, 3108-3116
- Robertson E. S., Lin J. und Kieff E. (1996): The amino-terminal domains of Epstein-Barr virus nuclear proteins 3A, 3B, and 3C interact with RBPJ κ . *J. VIROL.* 70, 3068-3074
- Robertson E. S., Tomkinson B. und Kieff E. (1994): An Epstein-Barr virus with a 58-kilobase-pair deletion that includes BARF0 transforms B lymphocytes in vitro. *J. VIROL.* 68, 1449-1458
- Robinson J., Smith D. und Niederman J. (1980): Mitotic EBNA-positive lymphocytes in peripheral blood during infectious mononucleosis. *NATURE* 287, 334-335
- Roizman B. und Pellett P. E. (2001): The family herpesviridae: A brief introduction. In *Fields Virology*, 4th edition, edited by Knipe D. M., Howley P. M., Griffin D. E., Lamb R. A., Martin M. A., Roizman B. und Straus S. E., Lippincott Williams & Wilkins, chapter 71
- Rothenberger S., Rousseaux M., Knecht H., Bender F. C., Legler D. F. und Bron C. (2002): Association of the Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 with lipid rafts is mediated through its N-terminal region. *CELL. MOL. LIFE SCI.* 59, 171-180
- Rowe M., Peng-Pilon M., Huen D. S., Hardy R., Croom-Carter D., Lundgren E. und Rickinson A. B. (1994): Upregulation of bcl-2 by the Epstein-Barr virus latent membrane protein LMP1: a B-cell-specific response that is delayed relative to NF- κ B activation and to induction of cell surface markers. *J. VIROL.* 68, 5602-5612
- Rowe M., Rowe D. T., Gregory C. D., Young L. S., Farrell P. J., Rupani H. und Rickinson A. B. (1987): Differences in B cell growth phenotype reflect novel paterRNA of Epstein-Barr virus latent gene expression in Burkitt's lymphoma cells. *EMBO J.* 6, 2743-2751

S

- Sakata N., Patel H. R., Terada N., Aruffo A., Johnson G. L. und Gelfand E. W. (1995): Selective activation of c-Jun kinase mitogen-activated protein kinase by CD40 on human B cells. *J. BIOL. CHEM.* 270, 30823-30828
- Sambrook J., Fritsch E. F. und Maniatis T. (1989): *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Sandberg M., Hammerschmidt W. und Sugden B. (1997): Characterization of LMP-1's association with TRAF1, TRAF2, and TRAF3. *J. VIROL.* 71, 4649-4656
- Sandberg M. L., Kaykas A. und Sugden B. (2000): Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus inhibits as well as stimulates gene expression. *J. VIROL.* 74, 9755-9761
- Sarawar S. R., Lee B. J., Reiter S. K. und Schoenberger S. P. (2001): Stimulation via CD40 can substitute for CD4 T cell function in preventing reactivation of a latent herpesvirus. *PNAS* 98, 6325-6329
- Sarma V., Lin Z., Clark L., Rust B. M., Tewari M., Noelle R. J. und Dixit V. M. (1995): Activation of the B-cell surface receptor CD40 induces A20, a novel zinc finger protein that inhibits apoptosis. *J. BIOL. CHEM.* 270, 12343-12346
- Sato T., Irie S. und Reed J. C. (1995): A novel member of the TRAF family of putative signal transducing proteins binds to the cytosolic domain of CD40. *FEBS LETT.* 358, 113-118
- Schepers A., Pich D. und Hammerschmidt W. (1993): A transcription factor with homology to the AP-1 family links RNA transcription and DNA replication in the lytic cycle of Epstein-Barr virus. *EMBO J.* 12, 3921-3929
- Schepers A., Ritzi M., Bousset K., Kremmer E., Yates J. L., Harwood J., Diffley J. F. und Hammerschmidt W. (2001): Human origin recognition complex binds to the region of the latent origin of DNA replication of Epstein-Barr virus. *EMBO J.* 20, 4588-4602
- Schultheiss U., Püschner S., Kremmer E., Mak T. W., Engelmann H., Hammerschmidt W. und Kieser A. (2001): TRAF6 is a critical mediator of signal transduction by the viral oncogene latent membrane protein 1. *EMBO J.* 20, 5678-5691
- Schultze J. L., Michalak S., Lowne J., Wong A., Gilleece M. H., Gribben J. G. und Nadler L. M. (1999): Human non-germinal center B cell interleukin (IL)-12 production is primarily regulated by T cell signals CD40 ligand, interferon gamma, and IL-10: role of B cells in the maintenance of T cell responses. *J. EXP. MED.* 189, 1-12
- Schuster V. und Kreth H. W. (2000): X-linked lymphoproliferative disease is caused by deficiency of a novel SH2 domain-containing signal transduction adaptor protein. *IMMUNOL. REV.* 178, 21-28
- Schwarzmann F., Prang N., Reichelt B., Rinkes B., Haist S., Marschall M. und Wolf H. (1994): Negatively cis-acting elements in the distal part of the promoter of Epstein-Barr virus trans-activator gene BZLF1. *J. GEN. VIROL.* 75, 1999-2006

Seed B. (1982): Diazotizable arylamine cellulose papers for the coupling and hybridization of nucleic acids. *NUCLEIC ACIDS RES.* 10, 1799-1810

Sinclair A. J., Brimmell M., Shanahan F. und Farrell P. J. (1991): Pathways of activation of the Epstein-Barr virus productive cycle. *J. VIROL.* 65, 2237-2244

Sixbey J. W., Vesterinen E. H., Nedrud J. G., Raab-Traub N., Walton L. A. und Pagano J. S. (1983): Replication of Epstein-Barr virus in human epithelial cells infected in vitro. *NATURE* 306, 480-483

Skare J. und Strominger J. L. (1980): Cloning and mapping of BamHI endonuclease fragments of DNA from the transforming B95-8 strain of Epstein-Barr virus. *PNAS* 77, 3860-3864

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

Sung N. S., Kenney S., Gutsch D. und Pagano J. S. (1991): EBNA-2 transactivates a lymphoid-specific enhancer in the BamHI C promoter of Epstein-Barr virus. *J. VIROL.* 65, 2164-2169

Sutherland C. L., Heath A. W., Pelech S. L., Young P. R. und Gold M. R. (1996): Differential activation of the ERK, JNK, and p38 mitogen-activated protein kinases by CD40 and the B cell antigen receptor. *J. IMMUNOL.* 157, 3381-3390

Swaminathan S., Tomkinson B. und Kieff E. (1991): Recombinant Epstein-Barr virus with small RNA (EBER) genes deleted transforms lymphocytes and replicates in vitro. *PNAS* 88, 1546-1550

Sylla B. S., Hung S. C., Davidson D. M., Hatzivassiliou E., Malinin N. L., Wallach D., Gilmore T. D., Kieff E. und Mosialos G. (1998): Epstein-Barr virus-transforming protein latent infection membrane protein 1 activates transcription factor NF- κ B through a pathway that includes the NF- κ B-inducing kinase and the I κ B kinases IKK α and IKK β . *PNAS* 95, 10106-10111

T

Takada K. (1984): Cross-linking of cell surface immunoglobulins induces Epstein-Barr virus in Burkitt lymphoma lines. *INT. J. CANCER* 33, 27-32

Takada K., Horinouchi K., Ono Y., Aya T., Osato T., Takahashi M. und Hayasaka S. (1991): An Epstein-Barr virus-producer line Akata: establishment of the cell line and analysis of viral DNA. *VIRUS GENES* 5, 147-156

Takada K. und Ono Y. (1989): Synchronous and sequential activation of latently infected Epstein-Barr virus genomes. *J. VIROL.* 63, 445-449

Takada K., Shimizu N., Sakuma S. und Ono Y. (1986): Trans activation of the latent Epstein-Barr virus (EBV) genome after transfection of the EBV DNA fragment. *J. VIROL.* 57, 1016-1022

Tao Q., Srivastava G., Chan A. C., Chung L. P., Loke S. L. und Ho F. C. (1995): Evidence for lytic infection by Epstein-Barr virus in mucosal lymphocytes instead of nasopharyngeal epithelial cells in normal individuals. *J. MED. VIROL.* 45, 71-77

Tao Q., Srivastava G., Chan A. C. und Ho F. C. (1995): Epstein-Barr-virus-infected nasopharyngeal intraepithelial lymphocytes. *LANCET* 345, 1309-1310

Thomas J. A., Hotchin N. A., Allday M. J., Amlot P., Rose M., Yacoub M. und Crawford D. H. (1990): Immunohistology of Epstein-Barr virus-associated antigens in B cell disorders from immunocompromised individuals. *TRANSPLANTATION* 49, 944-953

Thorley-Lawson D. A., Miyashita E. M. und Khan G. (1996): Epstein-Barr virus and the B cell: that's all it takes. *TRENDS MICROBIOL.* 4, 204-208

Tierney R. J., Steven N., Young L. S. und Rickinson A. B. (1994): Epstein-Barr virus latency in blood mononuclear cells: analysis of viral gene transcription during primary infection and in the carrier state. *J. VIROL.* 68, 7374-7385

Tomkinson B. und Kieff E. (1992): Use of second-site homologous recombination to demonstrate that Epstein-Barr virus nuclear protein 3B is not important for lymphocyte infection or growth transformation in vitro. *J. VIROL.* 66, 2893-2903

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

Tovey M. G., Lenoir G. und Begon-Lours J. (1978): Activation of latent Epstein-Barr virus by antibody to human IgM. *NATURE* 276, 270-272

Traenckner E. B.-M., Pahl H. L., Henkel T., Schmidt K. N., Wilk S. und Baeuerle P. A. (1995): Phosphorylation of human I κ B α on serines 32 and 36 controls I κ B α proteolysis and NF- κ B activation in response to diverse stimuli. *EMBO J.* 14, 2876-2883

U

Uchida J., Yasui T., Takaoka-Shichijo Y., Muraoka M., Kulwichit W., Raab-Traub N. und Kikutani H. (1999): Mimicry of CD40 signals by Epstein-Barr virus LMP1 in B lymphocyte responses. *SCIENCE* 286, 300-303

Uriet G., Buisson M., Chambard P. und Sergeant A. (1989): The Epstein-Barr virus early protein EB1 activates transcription from different responsive elements including AP-1 binding sites. *EMBO J.* 8, 1447-1453

V

Vockerodt M., Haier B., Buttgereit P., Tesch H. und Kube D. (2001): The Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 induces interleukin-10 in Burkitt's lymphoma cells but not in Hodgkin's cells involving the p38/SAPK2 pathway. *VIROLOGY* 280, 183-198

W

Waltzer L., Logeat F., Brou C., Israel A., Sergeant A. und Manet E. (1994): The human J κ recombination signal sequence binding protein (RBP-J κ) targets the Epstein-Barr virus EBNA2 protein to its DNA responsive elements. *EMBO J.* 13, 5633-5638

Wang D., Liebowitz D. und Kieff E. (1985): An EBV membrane protein expressed in immortalized lymphocytes transforms established rodent cells. *CELL* 43, 831-840

Wang D., Liebowitz D. und Kieff E. (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, 2337-2346

Wang D., Liebowitz D., Wang F., Gregory C., Rickinson A., Larson R., Springer T. und Kieff E. (1988): Epstein-Barr virus latent infection membrane protein alters the human B-lymphocyte phenotype: deletion of the amino terminus abolishes activity. *J. VIROL.* 62, 4173-4184

Wang F., Gregory C. D., Rowe M., Rickinson A. B., Wang D., Birkenbach M., Kikutani H., Kishimoto T. und Kieff E. (1987): Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 specifically induces expression of the B-cell activation antigen CD23. *PNAS* 84, 3452-3456

Wang F., Gregory C., Sample C., Rowe M., Liebowitz D., Murray R., Rickinson A. und Kieff E. (1990): Epstein-Barr virus latent membrane protein (LMP1) and nuclear proteins 2 and 3C are effectors of phenotypic changes in B lymphocytes: EBNA-2 and LMP1 cooperatively induce CD23. *J. VIROL.* 64, 2309-2318

Wang F., Tsang S. F., Kurilla M. G., Cohen J. I. und Kieff E. (1990): Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 transactivates latent membrane protein LMP1. *J. VIROL.* 64, 3407-3416

Wang Y. C., Huang J. M. und Montalvo E. A. (1997): Characterization of proteins binding to the ZII element in the Epstein-Barr virus BZLF1 promoter: transactivation by ATF1. *VIROLOGY* 227, 323-330

Woisetschlaeger M., Strominger J. L. und Speck S. H. (1989): Mutually exclusive use of viral promoters in Epstein-Barr virus latently infected lymphocytes. *PNAS* 86, 6498-6502

Woisetschlaeger M., Yandava C. N., Furmanski L. A., Strominger J. L. und Speck S. H. (1990): Promoter switching in Epstein-Barr virus during the initial stages of infection of B lymphocytes. *PNAS* 87, 1725-1729

Y

Yan M., Dai T., Deak J. C., Kyriakis J. M., Zon L. I., Woodgett J. R. und Templeton D. J. (1994): Activation of stress-activated protein kinase by MEKK1 phosphorylation of its activator SEK1. *NATURE* 372, 798-800

Yao Q. Y., Rickinson A. B. und Epstein M. A. (1985): A re-examination of the Epstein-Barr virus carrier state in healthy seropositive individuals. *INT. J. CANCER* 35, 35-42

Yates J., Warren N., Reisman D. und Sugden B. (1984): A cis-acting element from the Epstein-Barr viral genome that permits stable replication of recombinant plasmids in latently infected cells. *PNAS* 81, 3806-3810

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

Yu M. C., Ho J. H., Lai S. H. und Henderson B. E. (1986): Cantonese-style salted fish as a cause of nasopharyngeal carcinoma: report of a case-control study in Hong Kong. *CANCER RES.* 46, 956-961

Z

Zeng Y., Middeldorp J., Madjar J. J. und Ooka T. (1997): A major DNA binding protein encoded by BALF2 open reading frame of Epstein-Barr virus (EBV) forms a complex with other EBV DNA-binding proteins: DNAase, EA-D, and DNA polymerase. *VIROLOGY* 239, 285-295

Zhang Q., Gutsch D. und Kenney S. (1994): Functional and physical interaction between p53 and BZLF1: implications for Epstein-Barr virus latency. *MOL. CELL. BIOL.* 14, 1929-1938

Zhang Q., Wang Y. C. und Montalvo E. A. (1999): S_{ubp}-2 represses the Epstein-Barr virus lytic switch promoter. *VIROLOGY* 255, 160-170

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

Zimber-Strobl U., Strobl L. J., Meitinger C., Hinrichs R., Sakai T., Furukawa T., Honjo T. und Bornkamm G. W. (1994): Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 exerts its transactivating function through interaction with recombination signal binding protein RBP-J κ , the homologue of *Drosophila* Suppressor of Hairless. *EMBO J.* 13, 4973-4982

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

zur Hausen H., O'Neill F. J., Freese U. K. und Hecker E. (1978): Persisting oncogenic herpesvirus induced by the tumour promotor TPA. *NATURE* 272, 373-375

Anhang

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AIDS	„acquired immune deficiency syndrome“
AP-1	Aktivatorprotein-1
AS	Aminosäure
BL	Burkitt-Lymphom
BRLF1	„ <i>Bam</i> HI R fragment leftward open reading frame number 1“
BSA	Rinderserumalbumin
bZip	„basic leucine zipper“
BZLF1	„ <i>Bam</i> HI Z fragment leftward open reading frame number 1“
bzw.	beziehungsweise
CAT	Chloramphenicolacetyltransferase
CD40L	CD40-Ligand
cDNA	komplementäre DNA
CIP	„calf intestinal phosphatase“ (alkalische Kälberdarm-Phosphatase)
Cp	EBNA-Promotor im <i>Bam</i> HI-C-Fragment
CTAR	C-terminale Transaktivierungsdomäne
CTL	zytotoxische T-Zelle
dCTP	Desoxycytidin-5'-triphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
dn	dominant-negativ
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	DL-Dithiothreitol
EA	„early antigens“ (frühe Antigene)
EBNA	Epstein-Barr nukleäres Antigen
EBV	Epstein-Barr-Virus
ECL	„enhanced chemiluminescence“
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ERK	extrazelluläres Signal-regulierte Kinase
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (und andere)
FACS	„fluorescence assisted cell sorting“
FITC	Fluoreszein-Isothiozyanat
FKS	fötale Kälberserum
FSC	„forward scatter“
GFP	„green fluorescent protein“
HA	Hämagglutinin
HD	„Hodgkin's disease“
HRP	„horseradish peroxidase“ (Meerrettichperoxidase)
Ig	Immunglobulin
IKK	I- κ B-Kinase
IL	Interleukin

IR	interne Repetition
ITAM	Immunorezeptor-Tyrosin-basiertes Aktivierungsmotiv
JAK3	Janus Kinase 3
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
kb	kilobasenpaar(e)
kD	kilodalton
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LCL	lymphoblastoide Zelllinie
LMP1	Latentes Membranprotein 1
LMP2A/B	Latentes Membranprotein 2A/B
LP	„leader protein“
luc	Luziferase
MACS	„MicroBeads assisted cell sorting“
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MHC	„major histocompatibility complex“
MKK6	MAPK Kinase 6
MOPS	3-N-Morpholino-propansulfonsäure
mRNA	„messenger“ RNA
NF- κ B	nukleärer Faktor- κ B
NGFR	„nerve growth factor receptor“ (Nervenwachstumsfaktorrezeptor)
NIK	NF- κ B induzierende Kinase
NPC	„nasopharyngeal carcinoma“
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	„phosphate buffered saline“
PCR	Polymerasekettenreaktion
PE	R-Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
PTK	Proteintyrosinkinase
PTLD	„post-transplantant lymphoproliferative disease“
RBP-J κ	Rekombinationssignal-Bindeprotein-J κ
RIP	Rezeptor-interagierendes Protein
RLU	relative Lichteinheit
RNA	Ribonukleinsäure
Rp	BRLF1/BZLF1-Promotor
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSC	„sideward scatter“
STAT3	„signal transducer and activator of transcription 3“
Tab.	Tabelle
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
TNFR	Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor
TPA	Phorbol-12-myristat-13-acetat/12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat
TR	terminale Repetition
TRADD	TNFR-assoziiertes „death domain“ Protein
TRAF	TNFR-assoziiierter Faktor
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolett
VCA	virales Kapsidantigen
v/v	Volumen/Volumen

Wp	EBNA-Promotor im <i>Bam</i> HI-W-Fragment
w/v	Gewicht/Volumen
ZEBRA	„ <i>Bam</i> HI Z Epstein-Barr virus replication activator“
Zp	BZLF1-Promotor
ZRE	ZEBRA-responsives Element

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beitrugen.

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Georg Bornkamm, der es mir ermöglicht hat, unter hervorragenden Rahmenbedingungen an einem äußerst reizvollen Thema zu arbeiten, und der den Fortgang meiner Arbeit immer unterstützt hat.

Besonders möchte ich Frau Dr. Barbara Adler danken, von deren großem fachlichen Wissen ich sehr profitiert habe. Durch ihre zahlreichen Ideen, ihre ständige Diskussionsbereitschaft und ihre experimentelle Unterstützung war sie mir immer eine große Hilfe.

Mein Dank gilt ferner Herrn Dr. Arnd Kieser für sein Interesse an meiner Arbeit, anregende Diskussionen, viele Ratschläge und für die Bereitstellung zahlreicher Plasmide.

Jörg Nink und Sabine Kastner bin ich für ihre große Hilfsbereitschaft bei der Verfassung meiner Arbeit sehr dankbar.

Schließlich sei Frau Barbara Baier und allen anderen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Bornkamm für viele Hilfestellungen und die angenehme Zusammenarbeit gedankt.

Lebenslauf

Person

Name Eveline Schaadt
Geburtsdatum 6. Mai 1975
Geburtsort Saarbrücken

Schulbildung

09/81 – 07/85 Nikolaus-Obertreis-Grundschule St.Wendel
09/85 – 06/94 Staatliches Gymnasium Wendalinum St.Wendel
06/94 Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Hochschulausbildung

11/94 – 09/96 Grundstudium Diplom Biochemie an der Universität Regensburg
09/96 Vordiplomprüfungen
10/96 – 05/98 Hauptstudium Diplom Biochemie an der Universität Regensburg
05/98 Diplomprüfungen
06/98 – 01/99 Diplomarbeit am Institut für Physiologie der Universität Regensburg bei Prof. Dr. Armin Kurtz
Thema: „*Lokalisation und Regulation der Expression von Proteinphosphatasen in der Rattenniere*“
01/99 Abschluss: Diplom Biochemie
seit 05/99 Promotion am Institut für Klinische Molekularbiologie und Tumorgenetik der GSF in München bei Prof. Dr. Georg Bornkamm und Prof. Dr. Dirk Eick
Thema: „*Regulation der Latenz des Epstein-Barr-Virus in humanen B-Lymphozyten durch die viralen Latenten Membranproteine 1 und 2A*“