

Aus den Instituten für Infektionsmedizin,
Institut für Virologie,
Universitätskliniken, Gebäude 47, 66421 Homburg/Saar
Direktor: Prof. Dr. N. Müller-Lantzsch

**Analyse von Bindungspartnern des Epstein-Barr Virus Nukleären
Antigens 2 (EBNA2) mittels Bimolekularer
Fluoreszenzkomplementation (BiFC)**

Dissertation zur Erlangung eines Doktors der Medizin
der medizinischen Fakultät
der Universität Des Saarlandes

2008

Vorgelegt von: Arne Grün
Geboren am: 08.09.1976

INHALTSVERZEICHNIS

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	
1.1. Deutsch	1
1.2. Englisch	2
2. Einleitung	
2.1. Herpesviren	3
2.2. Das Epstein-Barr Virus	4
2.3. Die Epstein-Barr Virus Infektion	4
2.4. EBV-assoziierte Erkrankungen	5
2.5. Das EBV-Genom	6
2.6. Die latenten Kernantigene des EBV	7
2.6.1. Das Epstein-Barr Virus nukleäre Antigen 2 (EBNA2)	8
2.7. Die humanen nukleären Ribonukleoproteine (hnRNP)	12
2.7.1. Humane nukleäre Ribonukleoproteine der M-Gruppe	12
2.8. Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation (BiFC)	14
2.9. Ziele der Arbeit	16
3. Material	
3.1. Zelllinien	
3.1.1. Epitheliale Zelllinien	17
3.1.2. Bakterienstämme	17
3.2. Kulturmedien	
3.2.1. Kulturmedien für Bakterien	17
3.2.2. Kulturmedien für Säugerzellen	18
3.3. Größen- und Molekulargewichtsmarker	
3.3.1. DNS-Größenmarker	18
3.3.2. Protein Molekulargewichtsmarker	19
3.4. Allgemeine Puffer	
3.4.1. SDS-Probenpuffer (2x Sample Buffer)	19
3.4.2. PBS (für Proteine, mit Mg und Ca)	20
3.4.3. PBS (für Zellen, ohne Mg und Ca)	20

INHALTSVERZEICHNIS

3.4.4. TE-Puffer	20
3.5. Enzyme	20
3.6. Antikörper	
3.6.1. Primärantikörper	21
3.6.2. Sekundärantikörper	21
3.7. Oligonukleotide	22
3.8. Bezugsquelle anderer Materialien	22
4. Methoden	
4.1. DNS-Techniken	
4.1.1. Plasmid-DNS-Analysierung aus Bakterien (Mini- präparation)	23
4.1.2. Präparative DNS-Isolierung aus Bakterien	23
4.1.3. Reinigung von Nukleinsäuren durch Phenolisieren	25
4.1.4. Ethanolpräzipitation von Nukleinsäuren	26
4.1.5. Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren	26
4.1.6. Enzymatische Modifikation von DNS-Fragmenten	
4.1.6.1. Polymerase Kettenreaktion (PCR)	27
4.1.6.2. Spaltung von DNS durch Restriktions- endonukleasen	27
4.1.6.3. Dephosphorylierung von Vektor DNS	28
4.1.6.4. Ligation von DNS-Fragmenten	28
4.1.6.5. Ligationskontrolle mittels Blau-/Weiß-Selektion	28
4.1.7. Herstellung von Agarosegelen	29
4.1.7.1. Optimale Auftrennungsbereiche von Agarosegelen	30
4.1.8. Agarosegelelektrophorese doppelsträngiger DNS	30
4.1.9. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	30
4.2. Methoden bakterieller Zellkultur	
4.2.1. Herstellung transformationskompetenter Bakterien	31
4.2.2. Transformation kompetenter Bakterien	32
4.2.3. Kultivierung von E. coli	32

INHALTSVERZEICHNIS

4.3. Methoden eukaryoter Zellkultur	
4.3.1. Kultivierung von Säuger- und Insektenzellen	33
4.3.2. Qualitative Zellzahlbestimmung mit Hilfe des Casy Counters	33
4.4. Rekombinante Genexpression in eukaryoten Zellen	
4.4.1. Kalziumphosphat-Transektion adhärenter Zellkulturen	33
4.4.2. Transfektion eukaryotischer Zellen mit dem FuGene®-Kit	34
4.5. Protein-Techniken	
4.5.1. Herstellung von Proteinextrakten	34
4.5.2. Herstellung nativer Zellextrakte	35
4.5.3. Herstellung von sample-buffer-Extrakten	35
4.5.4. SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)	
4.5.4.1. Herstellung von Polyacrylamidgelen	36
4.5.4.2. SDS-PAGE Verfahren	37
4.5.4.3. Coomassieblau-Färbung	38
4.5.5. Immunblot (Western-Blot)	38
4.5.5.1. Proteintransfer (Western-Blot)	39
4.5.5.2. Immunologischer Nachweis membrangebundener Proteine	40
5. Ergebnisse	
5.1. Einleitung	41
5.2. Herstellung der Inserts	42
5.3. Verdau der BiFC-Vektoren, Ligation und Kontrollverdau	43
5.4. Orientierungsverdau	45
5.5. Transfektion der Konstrukte, SDS-PAGE und Western-Blot	45
5.6. Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation (BiFC)	47
6. Diskussion	
6.1. Diskussion	49
6.2. Ausblick	53
7. Literaturverzeichnis	55
8. Dank	67
9. Lebenslauf	68

Abbildungsverzeichnis

Abb. 2.1.	Schematischer Aufbau der Herpesviren am Beispiel des Herpes Simplex Virus.	3
Abb. 2.2.	Schematische Darstellung des EBV-Genoms.	7
Abb. 2.3.	Lage der latenten Gene auf dem episomalen EBV-Genom.	8
Abb. 2.4.	Schematischer Aufbau des EBNA2.	9
Abb. 2.5.	BiFC-Komplexbildung. Hypothetisches Modell des bFosYCbJunYN Heterodimers.	15
Abb. 2.6.	BiFC-Komplex, Bildung des intakten Fluorophors.	15
Abb. 5.1.	PCR-Amplifikation von EBNA2wt und EBNA2 Δ RG und Auftrennung der Amplifikate im 0,1 % Agarosegel. Färbung mit Ethidiumbromid.	43
Abb. 5.2.	PCR-Amplifikation von hnRNP-M2 und Auftrennung der Amplifikate im 0,1% Agarosegel. Färbung mit Ethidiumbromid.	43
Abb. 5.3.	Kontrollverdau des Klonierungsvektors pGEM mit dem Insert EBNA2 Wildtyp und Auftrennung im 0,1% Agarosegel. Färbung mit Ethidiumbromid.	43
Abb. 5.4.	Kontrollverdau des pGEM-Vektors mit dem Insert EBNA2 Δ RG und Auftrennung im 0,1% Agarosegel. Färbung mit Ethidiumbromid.	43
Abb. 5.5.	Restriktionsverdau von YC, dem C-terminalen Teil des BiFC-Systems, mit dem Restriktionsenzym EcoRI und Aufreinigung im 0,1% Agarosegel. Färbung mit Ethidiumbromid.	44
Abb. 5.6.	Restriktionsverdau von YN, dem N-terminalen Teil des BiFC Systems, mit der Restriktionsendonuklease Bam H1 und Auftrennung im 0,1% Agarosegel. Färbung mit Ethidiumbromid.	44
Abb. 5.7.	Kontrollverdau YC-EBNA2wt und Auftrennung im 0,1% Agarosegel. Färbung mit Ethidiumbromid.	44
Abb. 5.8.	Kontrollverdau von YC-EBNA2 Δ RG und Auftrennung im 0,1% Agarosegel. Färbung mit Ethidiumbromid.	44

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 5.9.	Kontrollverdau von YN-hnRNP-M2 und Auftrennung im 0,1% Agarosegel. Färbung mit Ethidiumbromid.	44
Abb. 5.10.	Expression von YC-EBNA2wt in GP 293 Zellen. Anschließender Western-Blot und Auftrennung im 10% Acrylamidgel. Als Primärantikörper diente α EBNA R3, als Sekundärantikörper α Ratte pox.	46
Abb. 5.11.	Expression von YC-EBNA2 Δ RG in GP 293 Zellen. Anschließender Western-Blot und Auftrennung im 10% Acrylamidgel. Als Primärantikörper diente α EBNA R3, als Sekundärantikörper α Ratte pox.	46
Abb. 5.12.	Expression von YC-EBNA2 Δ P in GP293 Zellen. Anschließender Western-Blot und Auftrennung im 10% Acrylamidgel. Als Primärantikörper diente α EBNA R3, als Sekundärantikörper α Ratte pox.	46
Abb. 5.13.	Expression von YN-hnRNP-M2 in GP293 Zellen. Anschließender Western Blot und Auftrennung im 10% Acrylamidgel. Als Primärantikörper diente α GFP, als Sekundärantikörper α Maus pox.	47
Abb. 5.14.	Negativkontrolle einer Bimolekularen Fluoreszenzkomplementation anhand der im Original Essay von Keppola et al. verwendeten Zellfaktoren jun und fos. Zur Verfügung gestellt von A.Schmid, Physiologisches Institut, Universität des Saarlandes.	48
Abb. 5.15.	Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation am Beispiel der Zellfaktoren jun und fos. Man erkennt deutlich das Fluoreszenzsignal der sich im Kern befindlichen Zellfaktoren.	48
Abb. 6.1.	Molekularstruktur der Aminosäure Prolin.	52

TABELLENVERZEICHNIS

Tabellenverzeichnis

Tab. 3.1.	Primärantikörper, deren Epitope und die verwendete Verdünnung	21
Tab. 3.2.	Sekundärantikörper und deren verwendete Verdünnung	21
Tab. 4.1.	Optimale Auftrennungsbereiche von Agarosegelen	30
Tab. 4.2.	Zusammenstellung eines 10% Polyacrylamidgels	36

ABKÜRZUNGEN

Abkürzungsverzeichnis

AS	Aminosäure
bp bzw. kbp	Basenpaare bzw. Kilobasenpaare
bZIP	<i>basic region leucine zipper domain</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CMV	Zytomegalovirus
C-Terminus	carboxyterminale Region
DNS	Desoxyribonukleinsäure
E.coli	Escherichia coli
EBNA	Epstein-Barr Virus nukleäres Antigen
EBV	Epstein-Barr Virus
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
gp	Glykoprotein
HHV	Humanes herpes Virus
hnRNP	humanes nukleäres Ribonukleoprotein
HSV	Herpes simplex Virus
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LB	<i>Luria broth</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
min	Minute
mRNS	<i>messenger-RNS</i>
nm	Nanometer
N-Terminus	aminoterminal Region
ori	<i>origin of replication</i> , Ursprung der Replikation
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
POX	Peroxidase

ABKÜRZUNGEN

RNS	Ribonukleinsäure
rpm	<i>rotations per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SB	<i>sample buffer</i>
SDS	Sodium-dodecyl-Sulfat
Sec	Sekunde
Tab.	Tabelle
v/v	<i>volume per volume</i>
VCA	<i>virus capsid antigene</i>
VZV	Varicella zoster Virus
w/v	<i>weight per volume</i>
WT o. wt	Wildtyp
Y2H	<i>Yeast-Two-Hybrid Screen</i> , Hefe-Zwei-Hybrid System
ZNS	Zentrales Nervensystem
α	anti (Antikörper) oder alpha
μ	Wellenlänge (nm)

1. Zusammenfassung

1.1. Deutsch

Das Epstein-Barr Virus gehört zur Familie der humanen Herpesviren. Es ist an der Entstehung gutartiger Infektionserkrankungen als auch an der menschlicher Tumorerkrankungen beteiligt. Viele Aspekte der EBV-assoziierten Tumorentstehung sind bis heute noch unverstanden. Das EBV ist fähig in infizierten Zellen in ein latentes Stadium überzugehen. Die Zelle entgeht der Zerstörung, das Genom des Virus liegt als Episom im Zellkern der Wirtszelle vor. Während des latenten Stadiums werden nur wenige virale Genprodukte, wie die Epstein-Barr Virus nukleären Antigene (EBNA), exprimiert. Das EBNA2 ist für die Etablierung und Aufrechterhaltung der Latenz essenziell. In letzter Zeit fanden sich daneben auch zunehmend Hinweise auf seine Teilhabe am Metabolismus von RNS. Dies spiegelt sich in der wachsenden Anzahl RNS-bindender Moleküle unter den Bindungspartnern von EBNA2 wider. Hierzu gehören unter anderen die heterogenen nukleären Ribonukleoproteine (hnRNP), eine Familie RNS-bindender Proteine, die in allen Stadien der Entstehung reifer RNS mit dieser assoziieren. In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe konnte nach Sichtung einer cDNS-Bank im Hinblick auf mögliche Interaktionspartner des EBNA2 die Bindung von EBNA2 an hnRNP-M2 im Hefe-Zwei-Hybrid-System gezeigt werden. Der Versuch die Interaktion in Präzipitationsverfahren zu bestätigen, gelang aufgrund der ausgeprägten *Klebrigkeit* des hnRNP-M2 nicht. Ziel dieser Arbeit ist der erneute Versuch des Nachweises der Interaktion von EBNA2 und hnRNP-M2. Das relativ neue Verfahren der Bimolekularen Fluoreszenz-Komplementation eröffnet die Möglichkeit, die durch die molekularen Eigenschaften des hnRNP-M2 bedingten Probleme zu umgehen, indem der Nachweis der Bindung *in vivo* gezeigt wird. In dieser Arbeit ergaben sich Schwierigkeiten mit dem fertigen hnRNP-M2-Klon, der in der SDS-Page nicht die erwartete Größe zeigte. Wir gehen davon aus, dass eine unerwartete Proteinfaltung die Tertiärstruktur, und somit die Oberflächeneigenschaften, des Proteins verändert. Die Ursache der Größenabweichung konnte nicht abschließend geklärt werden. Im folgenden Bindungsassay mittels Bimolekularer Fluoreszenz-Komplementation konnte die Interaktion von EBNA2 und hnRNP-M2 nicht nachgewiesen werden.

1.2. Englisch

Identification of Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 (EBNA2) interaction-partners via Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC).

The Epstein-Barr virus belongs to the family of human Herpes viruses. Apart from being the cause of benign diseases such as infectious mononucleosis it also plays a crucial role in the genesis of human malignancies. Many aspects of EBV-associated tumorigenesis are not yet fully understood. EBV is able to enter a latent stage in which the viral DNA is kept in episomal form in the nucleus of the host cell. During latency only a small number of viral proteins such as the Epstein-Barr nuclear antigens (EBNA) are being expressed. EBNA2 is essential for initiation and maintenance of viral transformation of B-cells, activates expression of viral and cellular genes but appears to also be involved in the metabolism of RNA. This is being reflected in the growing number of RNA-binding molecules in the group of EBNA2-interacting partners such as the heterogenous nuclear ribonucleoproteins (hnRNP), a family of RNA-binding proteins associated with RNA in all stages of its production.

After screening a cDNA bank for putative EBNA2 binding partners, we were able to show a possible interaction between EBNA2 and hnRNP-M2 via Yeast-Two-Hybrid Screen. Attempts at confirming the interaction in co-immunoprecipitation-assays failed. The goal of this work was the renewed attempt to demonstrate the interaction between EBNA2 and hnRNP-M2. Novel bimolecular fluorescence-complementation (BiFC) assay offered a way of bypassing the obstacles caused by the molecular characteristics of hnRNP-M2 by showing the interaction *in vivo*.

Although correct length and orientation of the DNA-construct was confirmed in various assays, Western-blotting of the hnRNP-M2 construct did not produce the expected results as the apparent molecular mass was lower than expected. We suspect occurrence of a posttranscriptional modification altering the surface-characteristics of the construct. In the following Bimolecular Fluorescence Complementation assay we were not able to detect any fluorescence excluding an interaction of the EBNA2- and hnRNP-M2- protein-constructs.

2. Einleitung

2.1. Herpesviren

Es existieren mehr als 100 verschiedene Herpesviren, die sich alle in Partikelmorphologie und grundlegenden Eigenschaften gleichen (s. Abb. 2.1). Die acht humanen Herpesviren haben einen charakteristischen Organotropismus. Betroffen sind im Einzelnen die Haut (HSV1, 2; VZV), das lymphatische System (EBV; HHV6, 7) und das ZNS (HHV6b). Die Cytomegalovirusinfektion tritt generalisiert auf. Das HHV8 findet man in Lymphozyten und Zellen des Karposi-Sarkoms (CHANG, 1994).

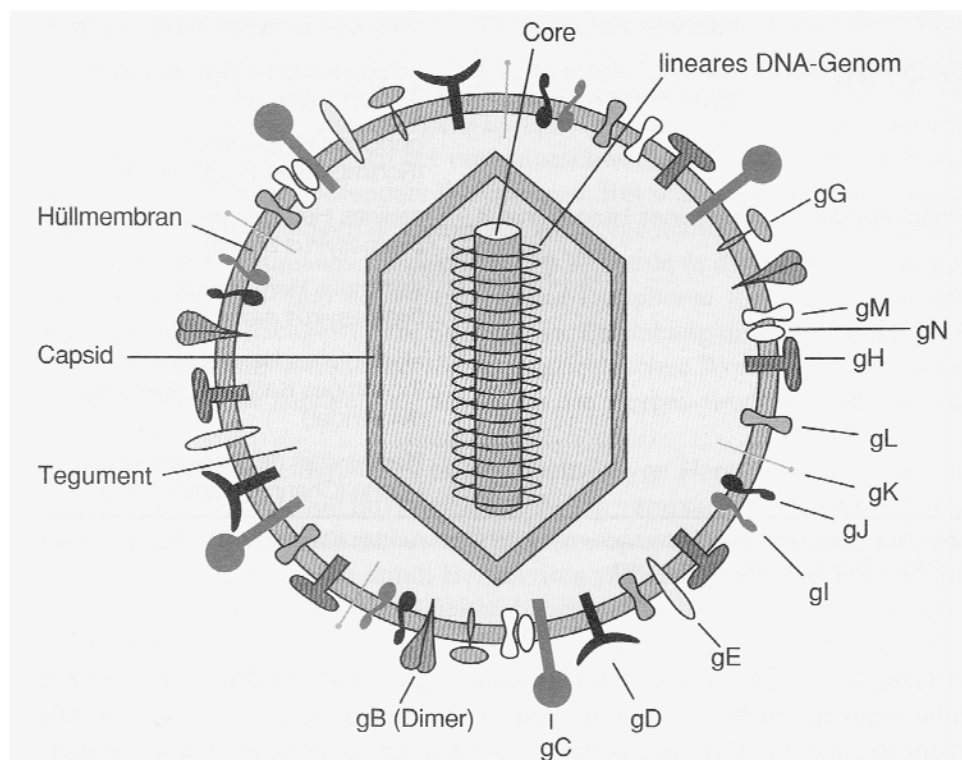


Abbildung 2.1. Schematischer Aufbau der Herpesviren am Beispiel des HSV (MODROW, FALKE, TRUYEN, 2003). In die äußere Lipid-Hüllmembran sind verschiedene Glykoproteine eingelagert. Die Hüllmembran enthält das vom Tegument umgebene Kapsid, in dem sich die spulenartig um das Core-Protein gewickelte Doppelstrang-DNS befindet. Das Tegument enthält wichtige Proteine für die Replikation. Die reifen Viruspartikel sind 120-220 nm groß.

EINLEITUNG

Die Einteilung in die drei Unterfamilien der α -, β - und γ -Herpesviren erfolgte in Bezug auf Pathogenität, Zielzellen und die Vermehrungseigenschaften *in vitro* (α : HSV, VZV; β : CMV, HHV6 und 7; γ : EBV, HHV8).

2.2. Das Epstein-Barr Virus (EBV)

Der englische Arzt Dennis Burkitt beschrieb in den Fünfziger Jahren des letzten Jahrhunderts erstmals klinische und epidemiologische Eigenschaften eines bei Kindern in Ost- und Zentralafrika endemischen Lymphoms (BURKITT, 1958). Aufgrund der auffälligen Verteilung der Erkrankung in Malaria- und Gelbfiebergebieten, vermutete er die Beteiligung eines infektiösen Agens an der Entstehung des Tumors. Wenige Jahre später gelang Tony Epstein, Yvonne Barr und Bud Achong der elektronenmikroskopische Nachweis eines herpesähnlichen Virus in *in vitro*-kultivierten Burkitt-Lymphomzellen (EPSTEIN, 1964). 1968 stellten Gertrude und Werner Henle den Zusammenhang zur infektiösen Mononukleose her und benannten das Virus nach seinen Entdeckern Epstein-Barr Virus (HENLE, 1968).

2.3. Die Epstein-Barr Virus Infektion

Der einzig bekannte Wirt des EBV ist der Mensch. EBV ist ubiquitär verbreitet, 95% der europäischen Erwachsenen sind seropositiv. Die Übertragung erfolgt horizontal über den Speichel auf CD21⁺ Zellen im Mund- und Rachenraum. Bei diesen Zellen handelt es sich vorwiegend um B-Lymphozyten in den Schleimhäuten. Der gp220/350-Komplex des EBV bindet an CD21, den Rezeptor der Komplementkomponente C3d. Es kommt zur polyklonalen B-Zell-Aktivierung mit massiver Immunantwort und der typischen generalisierten Lymphgewebshyperplasie. Im größten Teil der EBV-infizierten B-Zellen stellt sich das Latenzstadium ein. In Abhängigkeit der Expressionsmuster von EBNA1, EBNA2, LMP1 und LMP2, kann heute zwischen 3 Latenztypen unterschieden werden (KUBOTA, 2008).

2.4. EBV-assoziierte Erkrankungen

Die Infektiöse Mononukleose (IM) stellt die mit Frühjahrs- und Herbstgipfel auftretende, gutartige, selbstlimitierende Primärinfektion mit dem Epstein-Barr Virus dar (NIEDERMANN, 1968). Bei der typischen IM kommt es nach einer Inkubationszeit von 8-50 Tagen zu hohem Fieber, generalisierter Lymphgewebshyperplasie, einer Pharyngolaryngitis sowie einer diphterieähnlichen Tonsillitis (SCHAFFNER, RUEF, 1999). Die typischen lymphoproliferativen Blutbildveränderungen mit einem Überschuss an mononukleären weißen Blutzellen gaben der Krankheit den Namen.

Das zu den Non-Hodgkin-Lymphomen (NHL) zählende hochmaligne Burkitt-Lymphom (BURKITT, 1958) gehört zu den häufigsten kindlichen Krebserkrankungen in Äquatorialafrika, Lateinamerika und Neuguinea. Ursächlich kommt eine, aus einer chromosomalen Translokation resultierende, Dysregulation des Proto-Onkogens c-myc in Frage. Eine hiervon betroffene Zelle wird in einen Zustand permanenter Proliferation versetzt. Das Nasopharynxkarzinom (NPC, *nasopharyngeal carcinoma*) ist ein maligner, undifferenzierter Tumor des Nasen-Rachen-Epithels. Obwohl weltweit vorkommend, ist die Inzidenz in Südostasien und China bis zu 100-fach erhöht und stellt hier die häufigste maligne Erkrankung bei Männern zwischen 40-50 Jahren sowie die häufigste maligne Erkrankung bei Frauen dar. In 100% aller NPC-Biopsien konnte EBV-DNS nachgewiesen werden (ZUR HAUSEN, 1970; HENLE, 1972; NONOYAMA, 1973). Außerdem findet man fast ausschließlich bei Patienten mit Nasopharynxkarzinom einen hohen IgA-Antikörpertiter gegen die frühen und späten Virusproteine, was auf eine deutliche Korrelation der Infektion zur Tumorigenese deutet. Bestimmte EBNA2- und LMP1-Subtypen scheinen außerdem die Empfänglichkeit für NPC zu erhöhen (TIWAWECH, 2008).

Diskutiert wird die Teilhabe von EBV an der Entstehung des Hodgkin-Lymphoms (HODGKIN, 1973; KEEGAN, 2005) und der Multiplen Sklerose (CHRISTENSEN, 2006). In industrialisierten Ländern fand man in 50% der Fälle von Hodgkin-Lymphomen, in Entwicklungsländern sogar in bis zu 90% der Fälle EBV-DNS in den Tumorzellen. Das Risiko an einem HL zu erkranken, steigt nach IM um den Faktor 2-3. Neben Chlamydia-Bakterien, wird auch EBV als mitauslösendes Agens der Multiplen Sklerose diskutiert (GALE, MARTYN, 1995). Die genauen Mechanismen, die die Antikörperbildung auslösen, sind allerdings nicht gesichert und Gegenstand weiterer Forschung.

2.5. Das EBV-Genom

Das EBV besitzt eine lineare Doppelstrang-DNS von ca. 172 kbp Länge. Der G/C-Gehalt (Guanin, Cytosin) beträgt 60%. Die aus je ungefähr 500bp bestehenden terminalen Wiederholungseinheiten (TR, *terminal repeat*), die die Genomenden bilden, liegen vermutlich in räumlicher Nähe zueinander. Eine große Wiederholungseinheit, IR1 (*internal repeat 1*), teilt das Genom in eine kurze, US- (*unique short*), und eine lange, UL- (*unique long*) Region. Die kleineren IR2, 3 und 4 teilen die UL noch einmal in die U2, 3, 4, und 5 (s. Abb. 2.2.). An den jeweiligen Enden von UL finden sich zwei weitere konservierte Elemente, die direkten Wiederholungen (*direct repeats*) DR und DL von je 125 bp Länge, in deren unmittelbarer Nachbarschaft auch die beiden Replikationsursprünge des lytischen Zyklus (ori_{lyt}) liegen. Der Replikationsursprung des latenten Zustands dagegen liegt in U1. Die Genomlängen der einzelnen Stämme unterscheiden sich in Abhängigkeit ihrer Anzahl an IRs z.T. erheblich. Außerdem existieren Isolate mit z.T. funktionsbeeinträchtigenden Deletionen. Der Stamm B95-8 z.B., der eine 12kbp-Deletion in der IR4/DR-Region aufweist, zeigt eine hohe Tendenz B-Zellen latent zu infizieren. Der Stamm P3HR1 dagegen, er zeigt Deletionen in den U2- und den sie flankierenden IR1 und -2-Regionen, ist nicht zur Etablierung der Latenz im Stande.

Das Genom des EBV codiert für eine Vielzahl an Genprodukten, die aus unterschiedlichen, sich z.T. überlappenden, Leserahmen abgelesen werden (s. Abb. 2.3.). Fast jedes Gen besitzt einen eigenen ihm vorgelagerten Promotor, der als Bindungsstelle für zelluläre und virale Transaktivatoren fungiert. Viele Proteine werden von gespleißter mRNA translatiert. Die Spleißdonor- und Akzeptorstellen liegen verteilt über das ganze Genom. Im lytischen Zustand zirkularisiert das Genom über die hierfür essentiellen terminalen Wiederholungseinheiten. Es kann aber auch integriert in das Wirtsgenom vorliegen.

EINLEITUNG

Epstein-Barr-Virus

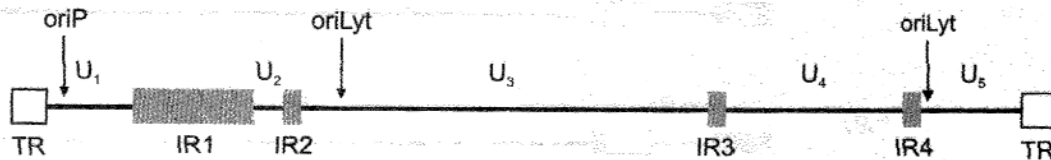


Abbildung 2.2. Schematische Darstellung des EBV-Genoms (MODROW, FALKE, TRUYEN, 2003). Das Genom wird von einer unterschiedlich großen Anzahl an 538 bp langen terminalen Wiederholungseinheiten (TR) flankiert. Zwei einheitliche Sequenzen, U (*unique*), werden von mehreren internen Wiederholungseinheiten (IR) unterbrochen. Die kurze einheitliche Sequenz wird als U₁ oder U_s (*U short*) bezeichnet. Sie wird durch die IR1 von der langen einheitlichen Sequenz U₁ (*U long*) getrennt. Diese wiederum wird durch die IR 2, 3 und 4 in die Sequenzen U₂, U₃, U₄ und U₅ geteilt. OriLyt bezeichnet die beiden Ursprungsstellen für die Genomreplikation während des lytischen Zyklus, OriP die Ursprungsstelle der Genomreplikation während des latenten Zustands.

2.6. Die latenten Kernantigene des EBV

In Zellen, die durch Epstein-Barr Virus immortalisiert wurden, werden nur wenige virale Genprodukte exprimiert. Zu diesen gehören die latenten Kernantigene (EBNA, *Epstein-Barr virus nuclear antigens*) des EBV (RICKINSON, KIEFF, 1996). Das für die Aktivierung des lytischen Zyklus essentielle Genprodukt des Leserahmens BZLF1 wird vermutlich mit Hilfe des zellulären Ku-Proteins reprimiert, wodurch die latenten Proteine ihre Wirkung entfalten können. Die Expression der EBNA wird außerdem von extrazellulären Faktoren wie dem Interleukin-21 mitbeeinflusst (KONFORTE, 2008). Über den C-Promotor (Cp) reguliert, werden die EBNA von einer gemeinsamen, über 100 kbp langen Vorläufer-RNS translatiert (s. Abb. 2.3). Wie bereits das wachstumsbeeinflussende Potential der EBNA vermuten lässt, erfolgt die Cp-Regulierung in enger Anbindung an den Zellzyklus und damit an die Differenzierungsprozesse der Wirtszelle (CHAU, 2008). Die EBNA unterliegen vielfachen, alternativen Spleißereignissen.

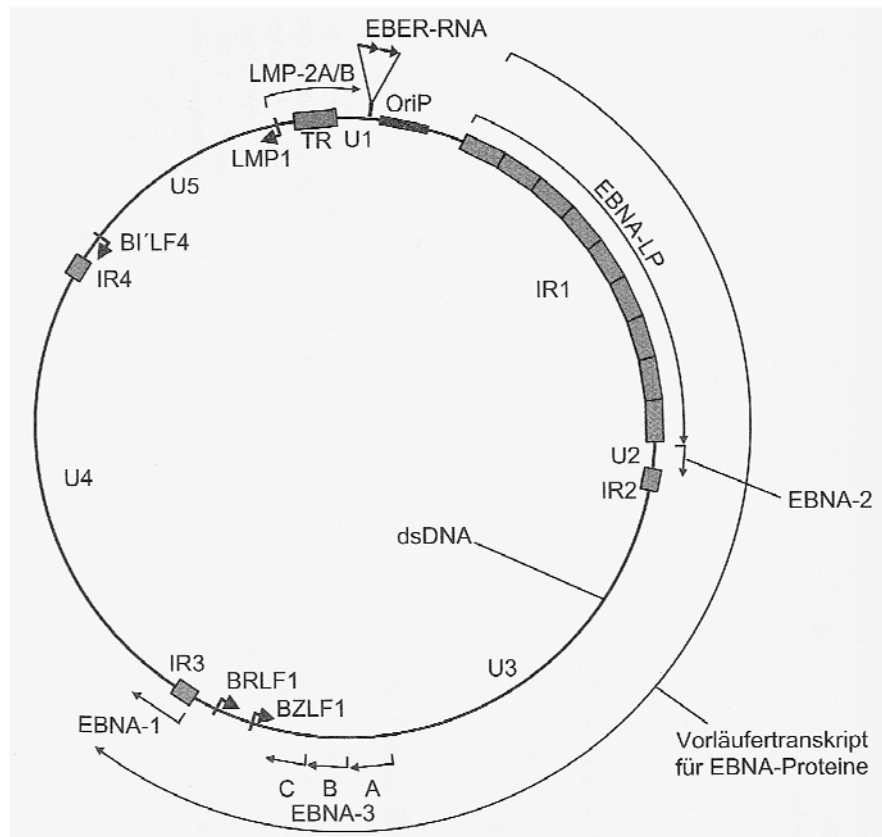


Abbildung 2.3. Lage der latenten Gene auf dem episomalen EBV-Genom (nach MODROW, FALKE, TRUYEN, 2003). Die EBNA-Vorläufertranskripte haben im c-Promotor alle den gleichen Ursprung. Durch alternative Spleißereignisse entstehen die, die verschiedenen Proteine kodierenden, Sequenzen. Ebenfalls gezeigt sind die Transkriptionsstartstellen der latenten Membranproteine (*latent membrane proteins*, LMP) sowie die Lage der internen Wiederholungseinheiten (*internal repeat*, IR).

2.6.1. Epstein-Barr Virus nukleäres Antigen 2 (EBNA2)

Das Epstein-Barr Virus nukleäre Antigen 2 (EBNA2) ist ein methyliertes Phosphoprotein von 75-88 kDa Größe (s. Abb. 2.4.), dessen Leserahmen BYRF1 am Übergang des ersten großen internen *Repeats* (IR1) zur langen *Unique Region* (U1) liegt. Es sammelt sich im Kern infizierter Zellen an, wo es oligomere Komplexe bildet. Obwohl die Sequenzhomologie der beiden EBV Subtypen 1 (Prototyp B95-8) und 2 (Prototyp Jijoye) nur ca. 50% beträgt und Differenzen auch in anderen Genen gefunden wurden, schreibt man die Unterschiede in ihren Transformations-Fähigkeiten den verschiedenen EBNA2-Typen und ihrer Genregulierung zu (TOMKINSON, KIEFF, 1992; LUCCHESI, 2008). Die verschiedenen Typen unterscheiden

EINLEITUNG

sich vor allem in der hydrophoben Region in der Mitte des Moleküls, was in unterschiedlichen Leserahmen BYRF1 begründet liegt. Typ 1 weist eine Länge von 487 AS, Typ 2 eine von 443 AS auf. Das EBNA2 der B95-8 Isolate enthält zwei Wiederholungseinheiten, eine Polyprolin-Region von 42 AS (58-100), die das Molekül sehr steif macht, und eine Arginin-Glycin-Wiederholung von 16 AS (337-358). Das P3HR1-Virusisolat, das eine EBNA2-Deletion aufweist, ist zur Transformation befallener Zellen nicht mehr im Stande (MILLER, 1974; BORNKAMM, 1982; JEANG, 1983). In Deletionsversuchen konnten drei für die Transformationskapazität unbedingt notwendige Abschnitte des Proteins gezeigt werden. Diese umfassen einige der Prolinreste der Polyprolinregion, die die RBP- κ -Bindungsdomäne umgebende Region (AS 281-336) sowie die Transaktivierungsdomäne (AS 426-462) (COHEN, 1991; TONG, 1994; YALAMANCHILI, 1996; HARADA, 1998).

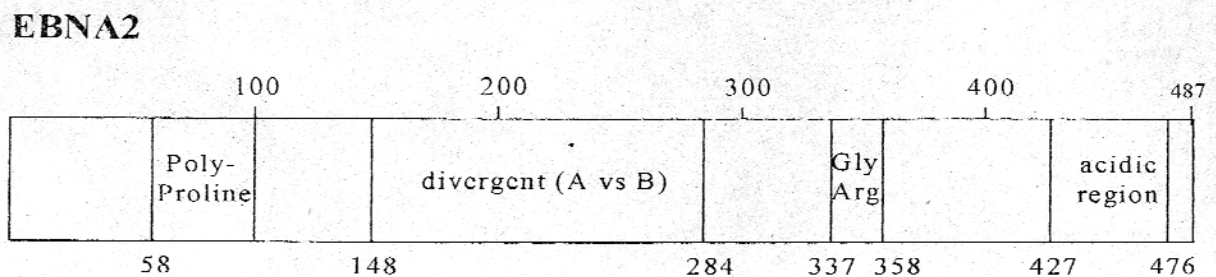


Abbildung 2.4. Schematischer Aufbau des EBNA2 (modifiziert nach MIDDLETON, 1991). Das Protein ist 487 AS lang, hat 2 Wiederholungseinheiten (hier nicht abgebildet), einen poly-Prolin-Bereich von 42 AS Länge und eine Arginin-Glycin-Wiederholung von 21 AS Länge. Es existieren zwei Varianten des EBNA2, deren Unterschiede auf unterschiedlichen DNS-Sequenzen im BYRF1-Leserahmen beruhen. Im EBNA2-Protein finden sich die Unterschiede im relativ hydrophoben Zentrum.

EBNA2 ist zur Initiation (COHEN, 1989; HAMMERSCHMIDT, SUGDEN, 1989; KAYE, 1993; TOMKINSON, 1993) und zur Aufrechterhaltung (KEMPKES, 1995; KILGER, 1998) des latenten Stadiums essentiell. EBNA2 ist Transaktivator und Repressor verschiedener zellulärer und viraler Gene. Durch die Genaktivierung löst EBNA2 eine Kaskade an Sekundärereignissen aus, die zur Aktivierung der B-Zellen führt. EBNA2 verstärkt die Synthese von Zytokinen und Wachstumsfaktoren wie TNF α (Tumor-Nekrose-Faktor- α), Lymphotoxin, G-CSF (Granulozyten-Kolonie-Stimulierender-Faktor), außerdem von

EINLEITUNG

zellulärem CD21, CD23, CyclinD2 sowie den Protoonkogenen c-myc und c-fgr. Die Transkription von Immunglobulin-M wird durch EBNA2 unterbunden (JOCHNER, 1996). EBNA2 aktiviert verschiedene Promotoren wie den C-Promotor sowie den Promotor der latenten Membranproteine (LMP) 1 und 2.

Aufgrund seiner Unfähigkeit direkt an DNS binden zu können, kooperiert EBNA2 mit zellulären Faktoren wie PU.1 (LAUX, 1994; JOHANNSEN, 1995) oder dem ubiquitär exprimierten DNS-Bindungsprotein RBP-Jκ (RNA-binding-protein-J-κ, auch CBF1, C-promotor-binding-protein-1, auch *Suppressor of Hairless*) (GROSSMANN, 1994; HENKEL, 1994; WALTZER, 1994; ZIMBER-STROBL, 1994; JOHANNSEN, 1996). RBP-Jκ vermittelt dann die Bindung an responsive Elemente (LAI, 2002; HAYWARD, 2004). Alle Promotoren, die durch EBNA2 aktiviert werden, tragen die RBP-Jκ-Bindungsdomäne. Die RBP-Jκ-Bindungsdomäne der AS 316-326 (LING, 1993a; YALAMANCHILI, 1994) ist in EBV1, EBV2 und Herpesvirus *papio* (LING, 1993b) konserviert. RBP-Jκ ist Teil des Signalübertragungsweges des Zelloberflächenrezeptors *Notch* (ARTAVANIS-TSAKONAS, 1999). (Das Gen für den *Notch*-Rezeptor wurde 1917 von Thomas Hunt Morgan entdeckt, der eine Mutation bei der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* beschrieb, die Kerben [eng. *notches*] auf ihren Flügeln hatten [MORGAN, 1911]). Der aktivierte *Notch*-Rezeptor ist das zelluläre Äquivalent von EBNA2 (HSIEH, 1996; SAKAI, 1998). Nach der Bindung des *Notch*-Liganden wird der intrazelluläre Teil von *Notch* proteolytisch gespalten (KIDD, 1998; SCHROETER, 1998), intrazelluläres-*Notch* (*Notch IC*) diffundiert in den Kern und bindet an Zielstrukturen im RBP-Jκ, wodurch es diesen Repressor zum Transaktivator wandelt (JARRIAULT, 1995, MUMM, 2000). *Notch IC* und EBNA2 binden an ähnliche Strukturen und erfüllen ähnliche Aufgaben, so dass man EBNA2 als ein konstitutiv aktives Homolog von *Notch* bezeichnet hat. Trotz vieler Gemeinsamkeiten ist *Notch* allerdings im Umkehrschluss nicht fähig EBNA2 bei Induktion und Unterhalt der B-Zell-Proliferation zu ersetzen (HÖFELMAYR, 2001).

Mittels Hefe-Zwei-Hybrid-Verfahren konnte gezeigt werden, dass die Transaktivierungs-Domäne des EBNA2 mit Komponenten des Transkriptionsapparates (TONG, 1995a,b,c) interagiert und somit eine Rolle in der Prozessierung und dem Metabolismus von RNS zu spielen scheint. Voss und Mitarbeiter unserer Arbeitsgruppe konnten die funktionelle Interaktion von EBNA2 mit dem SMN-Protein (*survival of motor neurons*) in der Transaktivierung des Epstein-Barr Virus LMP1-Promotors zeigen (VOSS, 2001). Die

EINLEITUNG

methylierte Arginin-Glycin-Wiederholung von EBNA2 dient der Bindung an SMN (BARTH, 2003), welches u.a. an der Reifung von Spleißosomen und somit indirekt am Metabolismus von RNS beteiligt ist (PELLIZZONI, 1998; MEISTER, 2000; PELLIZZONI, 2001). Assoziationen von EBNA2 mit Histonacetyltransferasen (WANG, 2000) und Chromatinmodellierenden Proteinen (WU, 1996) geben weitere Hinweise auf die Funktion als ein Genexpression regulierender und Transkription steuernder Faktor. Grundhoff et al. aus unserer Arbeitsgruppe belegten, dass EBNA2 mit dem „DEAD-Box“-Protein DP103 interagiert (GRUNDHOFF, 1999). DP 103 (auch DDX20 oder Gemin3) interagiert wiederum als Teil eines gemeinsamen großen Multiproteinkomplexes mit SMN (CHARROUX, 1999; CAMPBELL, 2000). Obwohl noch nicht für alle DEAD-Box-Proteine belegt, wird angenommen, dass viele dieser Proteine ATP-abhängige RNS-Helikase-Funktionen tragen und somit die Sekundärstruktur der RNS beeinflussen (YAN, 2003). Da sie an fast allen RNS-metabolisierenden Schritten, wie Initiation der Translation, pre-mRNS-Spleißen, Ribosom-*Assembly*, mRNS-Transport und -Stabilisierung beteiligt sind, spielen sie eine zentrale Rolle in der Zellentwicklung, -differenzierung und proliferation (MOUILLET, 2008).

Weitere Hinweise auf die Beteiligung von EBNA2 an RNS-metabolisierenden Prozessen konnten durch den Nachweis der Interaktion von EBNA2 mit humanen nukleären Ribonukleoproteinen (hnRNP) erbracht werden. Die hnRNP spielen eine wesentliche Rolle in der mRNS-Biosynthese. Grässer et al. zeigten die Bindung von EBNA2 an RBM4 (*RNA-binding-motif-protein 4*), das zur großen Gruppe der RNS-Bindungs-Motiv enthaltenden Proteine gehört (PFUHL, unveröffentlicht) und dessen Homolog *Lark* in *Drosophila* die zyklischen Mechanismen der Entpuppung steuert (McNEIL, 1998). *Lark* interagiert mit RNS, die nachgeschaltete Elemente des *clock output pathways* kodiert (NEWBY, 1996). Das hnRNP/AUF1-like Protein JKTBP (TSUCHIYA, 1998; KAMEI, 1999; AGAKI, 2000) bindet möglicherweise als 3-Hybrid in Hefe über SMN an EBNA2 (Grässer, unveröffentlicht). HnRNP-R und hnRNP-Q binden wiederum an SMN (ROSSOLL, 2002). Die Bindung erfolgt über eine C-terminale Arginin-Glycin-reiche Region, die dem RGG-Motiv (Arginin-Glycin-Glycin) anderer SMN-bindender Proteine wie dem von EBNA2 ähnelt (FRIESEN, 2000).

Erste Hinweise auf die Bindung von EBNA2 an ein hnRNP der M-Gruppe konnten mittels Hefe-Zwei-Hybrid-System durch unsere Arbeitsgruppe erbracht werden.

2.7. Die humanen nukleären Ribonukleoproteine (hnRNP)

Im Laufe der mRNA-Biogenese unterläuft die Mehrzahl der Polymerase-II-Transkripte eine Vielzahl von Differenzierungsschritten, die zur eigentlichen, ins Zytoplasma exportierten, mRNA führen. Diese zum Teil sequentiell ablaufenden Mechanismen führen dementsprechend im Nukleoplasma zur Anwesenheit einer Reihe Vorläuferprodukte der RNA wie prä-mRNA, mRNA und intermediären Reaktionsprodukten, die alle gemeinsam heterogene nukleäre RNA (hnRNA) genannt werden (DREYFUSS, 1993). Vom Verlassen des Transkriptionsapparates, über die gesamte Reifungszeit, bis zur Translation im Zytoplasma, assoziiert hnRNA mit RNA-bindenden Proteinen. Die Gesamtheit dieser Proteine wiederum wird als heterogene nukleäre Ribonukleoproteine (hnRNP) bezeichnet. Es sind mehr als 20 hnRNP bekannt, sie variieren in Größe von 34-120 kDa und werden mit den Buchstaben A-U bezeichnet. Die funktionelle Besonderheit der sich zu Multiproteinkomplexen versammelnden hnRNP besteht einerseits in ihrer Fähigkeit an RNA zu binden (z.T. spezifisch, z.T. unspezifisch), andererseits darin, mit anderen Proteinen zu interagieren (KRECIC, 1999; LAGUINGE, 2005). Die RNA-bindenden Proteine liefern zusätzlich zur eigentlichen Sequenz der RNA weitere Informationen, die die hnRNA-Verarbeitung (Spleißen, Methylierung, Polyadenylierung, *Capping*) (HASE, 2006; HOVANNISYAN, 2007), den RNA-Transport (KIESLER, 2005), deren Lokalisation (JAIN, 2008) und Translation spezifizieren und die Stabilität der RNA gewährleisten. Sie bereichern die RNA um wichtige Informationen bezüglich ihrer Herkunft und verhindern Nonsense-Mutationen (DREYFUSS, 2002).

2.7.1 Humane nukleäre Ribonukleoproteine der M-Gruppe (hnRNP M)

Die Gruppe der hnRNP-M Proteine gehört zu den am häufigsten vorkommenden Mitgliedern der RNP-Konsensussequenz-Familie RNA-bindender Proteine. Durch *in situ* Hybridisierung konnte ihr Gen beim Menschen auf Chromosom 19 gefunden werden. Sie finden sich vornehmlich im Kern der Zelle, wo sie z.T. in größeren Komplexen, sog. L-hnRNP (*large*

EINLEITUNG

heterogenous nuclear RNP), vorkommen (KAFSALA, 2000). In zweidimensionaler Elektrophorese erscheinen sie als Muster von vier Protein-Isoformen. Die multiplen Isoformen entstehen wahrscheinlich durch alternatives Spleißen mit Addition kleiner Peptid-Insertionen und durch post-translationale Modifikationen. Alle Mitglieder der hnRNP-M-Familie sind also hochgradig miteinander verwandt. Sie binden hnRNS *in vivo* über ihre drei RNS-Bindungsdomänen vom RRM-Typ (*RNA recognition motif*, auch RBD, *RNA binding domain*). *In vitro* hat sich bei vielen hnRNP eine mRNS-Prferenz gezeigt, die sich auf Substrukturen der RNS bezieht. Die Bindung an die RNS scheint sehr stabil zu sein, da Immun-Purifikationsverfahren viele andere der großmolekularen hnRNP aus ihrer Bindung an die RNS verdrängen. Die hnRNP-M binden *in vitro* spezifisch an RNS poly(G) und poly(U) Homopolymere (DATAR, 1992). Diese Bindung ist salzresistent. Sie besitzen eine Hexapeptid-Wiederholungsregion reich an Methionin und Argininresten (*MR repeat motif*), die einer Untereinheit des *Cleavage Stimulation Factors* (CSF) gleicht, der an der 3' Reifung und Polyadenylierung von Säugetier-pre-mRNS beteiligt ist. Methioninreiche Regionen spielen immer wieder eine Rolle in hnRNP. Inwieweit sie an der Bindung an andere Proteine bzw. an RNS beteiligt sind und was sie genau zur Zusammensetzung und zum Zerfall von hnRNP-Komplexen beitragen, ist noch Gegenstand der Forschung.

Neben der CS-RBD (*consensus sequence RNA-binding domain*) und der RGG-Box-RNS-Bindungs-Domäne, finden sich eine Reihe von Hilfsdomänen, die Protein-Protein Interaktionen erleichtern und möglicherweise die hnRNP-Komplexbildung spezifisch auf individuelle hnRNS abstimmen.

Ihre Rolle haben die hnRNP-M Proteine in der Vermittlung von Spleiß-Reaktionen (XIN, 2000; KAFSALA, 2002). Freund et al. fanden in hnRNP-M-depletierten Kernextrakten *in vitro* keine Spleißaktivität. Durch Verwendung monoklonaler Antikörper gegen synthetische hnRNP-Peptide *in vitro* ließ sich eine Spleißinhibition beobachten (FREUND, 2004). Durch den Nachweis der Bindung von hnRNP-M an ISE/ISS-3 (*intronic splicing enhancer/ exonic splicing enhancer 3*) beim alternativen Spleißen von Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptor-2-Transkripten konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass hnRNP-M sowohl Exon-Inklusion wie auch Exon-Exklusion beim alternativen Spleißen im Säugetier induzieren kann (HOVHANNISYAN, 2007).

Die hnRNP-M Proteine vermitteln bei regulativen Funktionen der Gen-Expression und dienen als Rezeptor (BAJENOVA, 2003). Auch in der Stress-Antwort der Zelle, z.B. bei Hitze-

EINLEITUNG

Schock-Behandlung, spielen die M-Proteine eine Rolle. Die Zelle stellt hier, um Fehler zu vermeiden, u.a. ihre pre-mRNS-Prozessierung, wie das Spleißen, ein. Die M-Proteine wandern aus dem hnRNP-Komplex, binden an die nukleäre Matrix und haben somit möglicherweise eine Art Schalterfunktion, indem sie Spleißvorgänge zeitweilig unterbinden. Diese Annahme ließ sich auch unter der Verwendung monoklonaler Antikörper gegen die M-Proteine reproduzieren, wobei es zu einem Spleiß-Arrest in der Phase des Spleißosom-*Assembly* kam (GATTONI, 1996). Immunologisch mit den M-Proteinen verwandte Moleküle finden sich in allen Eukaryoten, vom Menschen bis zur Hefe.

2.8. Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation (BiFC)

Bei der Bimolekularen Fluoreszenzkomplementation wurden selbst nicht fluoreszierende Fragmente des GFP (TSIEN, 1998) entwickelt, die ihre Fähigkeit zur Fluoreszenz wiedererlangen können, wenn sie in räumliche Nähe zueinander gelangen und dabei das Fluorophor rekonstituiert werden kann (HU, 2002) (s. Abb. 2.5, 2.6). Etabliert wurde die BiFC mit Transkriptionsfaktoren der bZIP-Familie (*basic region leucine zipper domain*), die über ein Leucin-Zipper-Motiv miteinander wechselwirken. Eine bZIP Domäne besteht aus einer Alpha-Helix, bei der jede siebte AS hydrophob ist (häufig ein Leucin). Kommen zwei dieser Domänen aus zwei Proteinen in Kontakt, können sich sowohl Homo- als auch Heterodimere bilden. Die Leucine lagern sich wegen der hydrophilen Umgebung aufgrund hydrophober Wechselwirkungen zusammen. Da die jeweils nachfolgenden Leucine nicht zu 100 Prozent in einer geraden Linie stehen, winden sich die beiden alpha-Helices zu einer linksgängigen Super-Helix (*coiled coil*). Werden die beiden Transkriptionsfaktoren bFos und bJun mit jeweils einem der nicht fluoreszierenden YFP-Fragmente gekoppelt und in Zellen kotransfiziert, so kann eine YFP-Fluoreszenz im Zellkern detektiert werden. Das Auftreten der Fluoreszenz liefert den direkten Hinweis auf die Interaktion der Transkriptionsfaktoren und deren Lokalisation im Zellkern. Vorteilhaft ist, dass das Messsignal erst dann auftritt wenn eine Interaktion erfolgt, und dass die Interaktion der Proteine direkt in ihrem natürlichen Milieu sichtbar gemacht werden kann.

EINLEITUNG

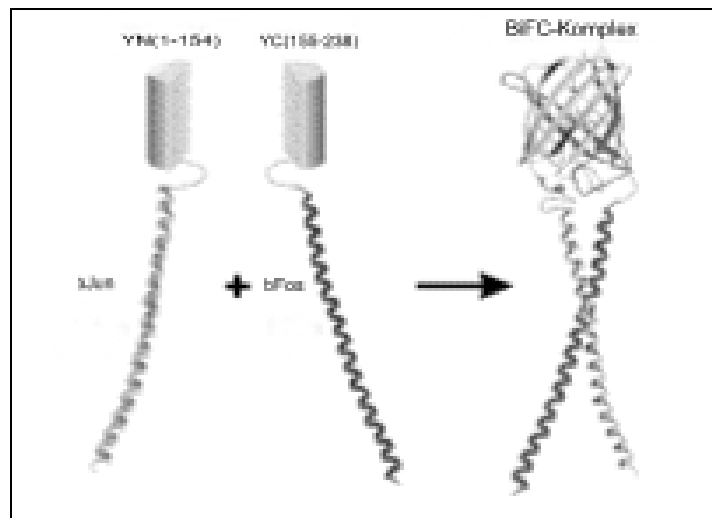


Abbildung 2.5. BiFC Komplexbildung (modifiziert nach HU, 2002). Hypothetisches Modell des bFosYC/ bJunYN-Heterodimers basierend auf der Röntgen-Struktur-Analyse von bFos-BJun (GLOVER, 1995) und GFP (ORMÖ, 1996). Die genaue Struktur der die beiden Proteine verbindenden Elemente ist noch unbekannt.

Die Interpretation der Befunde benötigt keinerlei Datenverarbeitung, um mögliche Quellen anderer Fluoreszenz zu korrigieren. Die intrinsische Fähigkeit des Komplexes zur Fluoreszenz erlaubt die Detektion von Protein-Protein Interaktionen ohne das normale Milieu der Zelle zu stören. Das Verfahren ist außerdem sensibel genug Interaktionen zwischen Proteinen, die in (nahezu) natürlichen Mengen exprimiert werden, zu detektieren. Und dank der niedrigen intrinsischen Fluoreszenz in fast allen Zellen, ist das Verfahren auch in einer Vielzahl Gewebe- und Zelltypen anwendbar.

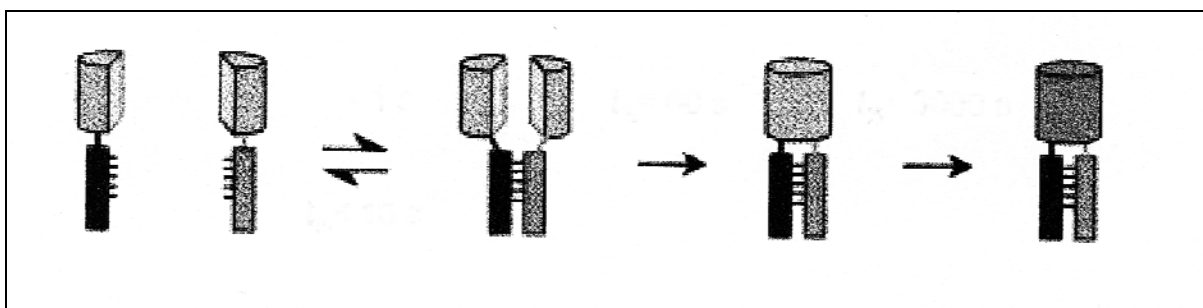


Abbildung 2.6. BiFC Komplex. Nach Bindung der Fusionsproteine (im Bild der untere Abschnitt des Komplexes) ist die erforderliche räumliche Nähe der nicht fluoreszierenden YFP-Fragmente (im Bild oben) erreicht, um die Rekonstitution des intakten Fluorophors zu ermöglichen. (modifiziert nach HU, 2002).

2.9. Ziele der Arbeit

Um die Rolle des EBNA2-Proteins in EBV-immortalisierten Zellen genauer zu beleuchten und seine vielfachen Interaktionswege besser zu verstehen, wurden in Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe mögliche Bindungspartner des EBNA2 gesucht. In der Y2H-Sichtung einer cDNA-Bank mit EBNA2 als *Prey* wurden mehrere RNS-bindende Proteine als mögliche Bindungspartner des EBNA2 identifiziert. Die Ergebnisse legten im Einzelnen die Bindung von EBNA2 an hnRNP-K, hnRNP-M2, h-*Lark*/RBM4 und (möglicherweise indirekt) hnRNP D/AUF1-like (JKTBP) nahe. Die Bindung von RBM4 an EBNA2 konnte durch unsere Arbeitsgruppe bestätigt werden (GRÄSSER, nicht veröffentlicht). Versuche die Bindung von EBNA2 an hnRNP-M2 mittels Co-Immun-Präzipitation zu bestätigen, scheiterten an den molekularen Eigenschaften des hnRNP-M2, das durch seine ausgeprägte *Klebrigkeit* Kontrollergebnisse verfälschte und damit keine eindeutige Aussage über seine spezifischen Bindungseigenschaften zuließ. Ziel dieser Arbeit war der erneute Versuch der Bestätigung der im Hefe-Zwei-Hybrid System gezeigten Interaktion von EBNA2 mit dem humanen nukleären Ribonukleoprotein M2 (hnRNP-M2). Mit dem von Kerppola und Mitarbeitern neu entwickelten Verfahren der bimolekularen Fluoreszenzkomplementation (BiFC) (HU, 2002) ergab sich die Möglichkeit, die vermutete Interaktion des hnRNP-M2 und EBNA2 *in vivo* zu zeigen und damit die Schwierigkeiten, die sich in den *in vitro*-Versuchen ergeben hatten, zu umgehen.

3. Material

3.1. Zelllinien

3.1.1. Epitheliale Zelllinien

- HEK-293 Zellen (*human embryonic kidney*): Zelllinie, die als Transformationsprodukt einer menschlichen embryonalen Nierenzelle mit DNS-Anteilen des humanen Adenovirus 5 erstellt wurde. 293-Zellen sind hypotriploide Epithelzellen, die adhärent wachsen (GRAHAM, 1977).

3.1.2. Bakterienstämme

Zur Klonierung rekombinanter DNS und Amplifikation von Plasmiden wurden die E.coli Stämme

- MOS Blue (kultiviert aus dem pMOSBlue-T Vector™-Kit[Amersham]) und
- HB101 (ROULLAND-DUSSOIX, 1969)

eingesetzt.

3.2. Kulturmedien

3.2.1. Kulturmedien für Bakterien

Zum selektiven Wachstum von Bakterienkulturen in Suspension (Plasmidisolierung), bzw. auf Agarplatten (zur Selektion von Transformanten), wurde LB-Medium (2,5% [w/v] *Luria broth base* [Gibco]), bzw. LB-Agar (3,75% [w/v] *Luria's Agar* [Gibco]) verwendet. Abhängig

MATERIAL

von den jeweiligen Resistenzgenen der eingesetzten Plasmide, wurde Ampicillin oder Kanamycin in Konzentrationen von 100µg/ml, bzw. 30 µg/ml zugesetzt.

3.2.2. Kulturmedium für Säugerzellen

- RPMI 1640: Zur Kultivierung eukaryoter Suspensionszellen wurde RPMI 1640 (Sarstedt), suplementiert mit 10% (v/v) FKS (Biochrom), 1 mM Natriumpyruvat (Sarstedt), 40 U/ml Penicillin G40, 10 U/ml Moronal, 10 µg/ml Neomycinsulfat und 50 µg/ml Streptomycinsulfat verwendet.
- DMEM: Zur Kultivierung von adhärenren Monolayer-Zellkulturen wurde *Dulbecco`s Modified Eagle Medium* (Bio-Whitacker), suplementiert mit 10% (v/v) FKS (Biochrom), 40 U/ml Penicillin G40, 10 U/ml Moronal, 10 µg/ml Neomycinsulfat und 50 µg/ml Streptomycinsulfat verwendet.

3.3. Größen- und Molekulargewichtsmarker

3.3.1. DNS-Größenmarker

Zur Größenbestimmung linearer ds-DNS-Fragmente zur Klonierung wurde die *1kbp-DNA-Ladder* (Gibco) verwendet. Sie enthält Fragmente folgender Größe (bp):

- 12.216 / 11.198 / 10.180 / 9.162 / 8.144 / 7.126 / 6.108 / 5.090 / 4.072 / 3.054 / 2.036 / 1.636 / 1.018 / 517 / 506 / 396 / 344 / 298 / 220 / 201 / 154 / 134 / 75

MATERIAL

Außerdem verwendet wurde die 1kbp plus DNS-Leiter (Gibco) mit folgenden Fragmentgrößen (bp):

- 12.000 / 11.000 / 10.000 / 9.000 / 8.000 / 7.000 / 6.000 / 5.000 / 4.000 / 3.000 / 2.000 / 1.650 / 1.000 / 850 / 650 / 500 / 400 / 300 / 200 / 100

3.3.2. Protein-Molekulargewichtsmarker

Zur Bestimmung des Molekulargewichts von Proteinen in der SDS-Page wurden der LMW (*Low Molecular Weight*, Pharmacia)-Marker verwendet. Dieser enthält Proteine folgender Molekulargewichte:

- | | | |
|-----------------------------------|------|-----|
| • Phosphorylase b | 94 | kDa |
| • Kälberserumalbumin | 67 | kDa |
| • Ovalbumin | 43 | kDa |
| • Carboanhydrase | 30 | kDa |
| • Trypsininhibitor aus Sojabohnen | 20,1 | kDa |
| • Lactalbumin | 14,4 | kDa |

3.4. Allgemeine Puffer

3.4.1. SDS-Probenpuffer (2x Sample Buffer)

- | | | |
|------------------------------------|-------|-------|
| • Tris/HCl (pH 6,8) | 130 | mM |
| • SDS | 6% | (w/v) |
| • β -Mercapto-1,2-propandiol | 10% | (v/v) |
| • Bromphenolblau | 0,05% | (w/v) |
| • Glycerin | 10% | (w/v) |

MATERIAL

3.4.2. PBS (für Proteine, mit Mg² und Ca²)

• NaCl	140	mM
• KCl	25	mM
• Na/K-Phosphat (pH7,5)	10	mM
• MgCl ²	0,5	mM
• CaCl ²	1	mM

3.4.3. PBS (für Zellen, ohne Mg² und Ca²)

• NaCl	140	mM
• KCl	25	mM
• Na/K-Phosphat (pH 7,5)	10	mM

3.4.4. TE-Puffer

• Tris/HCL (pH 8,0)	10	mM
• EDTA (pH 8,0)	1	mM

3.5. Enzyme

• Alkalische Phosphatase (CIP)	Boehringer
• T4-DNA-Ligase	New England Biolabs
• Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs
• <i>Taq</i> -Polymerase	Pharmacia
• Lysozym	Boehringer

MATERIAL

3.6. Antikörper

3.6.1. Primärantikörper

Antikörper		Epitop	Eingesetzte Verdünnung
R3 (GSF, München)	α -EBNA2A monoklonaler Antikörper, Ratte IgG2a (KREMMER, 1995)	C-terminaler Bereich von EBNA2A	1 : 10
3F10 (Roche)	α -HA-Epitop monoklonaler Antikörper, Ratte IgG2a	HA-Epitop Sequenz YPYDVPDYA	1 : 100

Tabelle 3.1. Eingesetzte Primärantikörper, das Epitop, das sie erkennen, und die verwendete Verdünnung.

3.6.2. Sekundärantikörper

Antikörper	Eingesetzte Verdünnung
Peroxidase-konjugierte α -Maus IgG Antikörper (Ziege)	1 : 2000
Peroxidase-konjugierte α -Ratte IgG Antikörper (Kaninchen)	1 : 2000
Peroxidase-konjugierte α -Ziege IgG Antikörper (Kaninchen)	1 : 2000

Tabelle 3.2. Sekundärantikörper der Klasse IgG, gewonnen aus Ziege und Kaninchen, in deren verwendeter Verdünnung

3.7. Oligonukleotide

Zur Amplifikation der DNA-Inserts mittels Polymerase-Kettenreaktion wurden verschiedene Oligonukleotide als Primer benutzt.

Für die Amplifikation EBNA2wt und EBNA2 Δ RG:

- EcoXho-5-E2 und
- EBNA2-3'Eco

Für die Amplifikation von hnRNP-M2:

- M5'Bgl-II und
- 3-YnMBgl

3.8. Bezugsquellen anderer Materialien

- **Chemikalien (in Reinstform):** Sigma (Deisenhofen), Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Serva (Heidelberg), Seakem (Rockland, USA)
- **Membranen und Filter:** Immobilon (Millipore), Nitrocellulose (Schleicher und Schuell, Dassel), Hybond N⁺ (Amersham), Whatman limited (Springfield Mill, USA)
- **Fotochemikalien:** Polaroid Film Pack Land Type 655, Kodak X-omat Röntgenfilm (Bremaphot, Saarbrücken), ECL-HyperfilmTM (Amersham)
- **Enzyme:** New England Biolabs (Schwalbach)
Roche (Mannheim)

4. Methoden

4.1. DNS-Techniken

4.1.1. Plasmid-DNS-Analyse aus Bakterien (Minipräparation) (BIRNBOIM, 1979)

Zur schnellen analytischen Isolierung kleiner Mengen Plasmid-DNS wurden 1,5 ml einer LB-Übernachtskultur mit entsprechendem Selektionsantibiotikum (Ampicillin oder Kanamycin) zentrifugiert (10min, 5000rpm, 4°C) und das Pellet in 200 µl STET-Puffer (8% [w/v] Sacharose, 50mM Tris-HCl [pH 8,0], 50mM EDTA, 0,1% [v/v] Triton X-100 und 0,5mg/ml Lysozym) resuspendiert und 5 min auf Eis inkubiert. Nach 30 sec Denaturierung im kochenden Wasserbad und Zentrifugation (15 min, 13000 rpm, 4°C) wurde das Pellet aus denaturiertem Protein und genomischer DNS entfernt. Durch Zugabe von 200µl Isopropanolol zum Überstand, Durchmischung und Zentrifugation (20 min, 13000 rpm, RT) wurde die Plasmid DNS gefällt und anschließend mit 2µl Vol. 70% Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand dekantiert und das DNS-Pellet einige min über Kopf getrocknet, in 20µl TE / RNase (100µg/ml, pH8,0) -Puffer aufgenommen und 10 min bei 37°C zum RNS-Verdau inkubiert.

4.1.2. Präparative Plasmid-DNS-Isolierung aus Bakterien

Die präparative DNS-Analyse erfolgte mit Hilfe des *Qiagen-Kits* (Qiagen™, Düsseldorf) über alkalische Lyse und Ionenaustauschchromatographie gemäß den Angaben des Herstellers. Über Qiagen-100 Säulen können 30-150 ml Bakterienkultur aufgearbeitet werden, mit Qiagen™-500 Säulen 150-500 ml Bakterienkultur.

Eine Einzelzell-Kolonie wurde als Übernachtskultur (37°C, 100 ml Ampicillinhaltiges LB-Medium) aerob geschüttelt. Die dicht gewachsene Kultur wurde in zwei 50 ml Falcons gefüllt

METHODEN

und abzentrifugiert (10 min., 5800rpm, Heraeus Megafuge 1.0 RF), der Überstand verworfen und das Bakterienpllet in 4 ml Puffer 1 resuspendiert. Nach Zugabe von 4 ml Puffer 2 wurde der Ansatz vorsichtig gemischt und für 2,5 min bei RT inkubiert. Zur Lyse der Zellen und Freisetzung der DNA und anderer Zellbestandteile führte das im Puffer enthaltene SDS, indem es die Zellmembran auflöste. NaOH denaturierte sowohl die chromosomale als auch die Plasmid-DNS. Anschließend wurde durch Zugabe von 4 ml Puffer 3 das Lysat neutralisiert. Die kleinere, kovalent geschlossene Plasmid-DNS renaturierte wieder und blieb in Lösung, wohingegen die chromosomale Wirts-DNS präzipitierte. Der Ansatz wurde abzentrifugiert (6000 rpm, 30 min, 4°C, Heraeus Megafuge 1.0 RF) und der DNS-enhaltende Überstand auf die Qiagen™-Säule gegeben, die zuvor mit 4 ml QBT-Puffer äquilibriert wurde. Die Salz- und pH-Einstellungen bewirken, dass im Lysat nur Plasmid DNS an die Säule bindet und dadurch zurückgehalten wird. Nach Waschen der Säule zur Entfernung von Proteinen mit 2x5ml QC-Puffer wurde die Plasmid-DNS mit 5 ml QF-Puffer eluiert und mit 3,5 ml Isopropanol (100%) gefällt. Das durch Zentrifugation (6000 rpm, 30 min, 4°C) erhaltene Pellet wurde mit eiskaltem Ethanol (70%) gewaschen und 10 min bei RT getrocknet. Nach Resuspension des DNS-Pellets in 100 µl TE Puffer wurde die DNS-Konzentration photometrisch bestimmt und ein Kontroll-Restriktionsverdau durchgeführt.

- Puffer 1:

Tris/HCl (pH 8,0)	50	mM
EDTA	10	mM
RNase A	100	µg/ml

- Puffer2:

NaOH	200	mM
SDS	1%	(w/v)

- Puffer3:

Kaliumacetat	3	M
(ad pH 5,5 mit Eisessig eingestellt)		

- Puffer QBT:

NaCl	750	mM
MOPS (pH7,0)	50	mM
Ethanol	15%	(v/v)
Triton X-100	0,15%	(v/v)

METHODEN

- Puffer QC:

NaCl	1	M
MOPS (pH 7,0)	50	mM
Ethanol	15%	(v/v)

- Puffer QF:

NaCl	1,25	M
Tris/HCl (pH 8,5)	50	mM
Ethanol	15%	(v/v)

4.1.3. Reinigung von Nukleinsäuren durch Phenolisieren (KIRBY, 1957)

Die Phenol-Extraktion stellt eine Routine-Methode zur Denaturierung und Entfernung von Proteinen aus Nukleinsäurelösungen dar. Die Nukleinsäurelösungen wurden mit Phenollösung versetzt, die sich ausbildenden Phasen mittels Vortexen gemischt und durch kurze Zentrifugation bei 13.000 rpm erneut getrennt. Die die DNS enthaltende wässrige Oberphase wurde vorsichtig abpipetiert und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Eventuell in der Lösung verbliebene Phenolreste wurden nun durch die analog ablaufende Chloroform-Isoamylalkohol (CIA)-Extraktion entfernt.

- Phenollösung:

distilliertes Phenol	50%	(v/v)
CIA	50%	(v/v)
8-OH-Phenol	0,1%	(v/v)

(Oxidationsschutz)
mit TE-Puffer (pH 8,0) abgesättigt und bei 4°C gelagert

- CIA-Lösung:

Chloroform/Isoamylalkohol	24/1	(v/v)
---------------------------	------	-------

METHODEN

4.1.4. Ethanolpräzipitation von Nukleinsäuren (SAMBROOK, 1989)

Um Nukleinsäurelösungen weiter zu konzentrieren nutzt man die Tatsache, dass DNS in Ethanol bei gleichzeitiger Anwesenheit relativ hoher Konzentrationen monovalenter Kationen unlöslich ist.

Die Nukleinsäurelösung wurde mit 1/10 des Volumens 3M Na-Acetatlösung versetzt und mit dem 2,5fachen Volumen gekühlten, absoluten Ethanols gemischt. Nach einer einstündigen Inkubation bei -70°C wurden die Nukleinsäuren in einer 30minütigen Zentrifugation bei 13.000 rpm und 4°C gefällt. Anschließend wurde das DNS-Pellet in 70%igem gekühlten Ethanol gewaschen, 10 min unter Vakuum getrocknet (Speed-Vac Concentrator, Savant) und in 20 μl TE-Puffer aufgenommen.

4.1.5. Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren (SAMBROOK, 1989)

Zur Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren und Proteinen bedient man sich der Absorptionsspektrometrie. Aufgrund der Spektralcharakteristika der Basen absorbieren Nukleinsäuren Licht zwischen 250 und 270 nm mit einem Absorptionsmaximum bei 260 nm Wellenlänge. Bei 260 nm entspricht eine Absorptionseinheit bei 1 cm Schichtdicke der Küvette circa einer Konzentration von 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ bei doppelsträngiger DNS, 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ bei RNA oder einzelsträngiger DNS oder 33 $\mu\text{g}/\text{ml}$ bei kurzkettigen Oligonukleotiden.

Um eine Aussage über die Reinheit einer Nukleinsäurelösung zu erhalten wird der Quotient der bei 260 und 280 nm gemessenen Absorptionskoeffizienten gebildet ($\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$). Bei einer reinen DNS-Lösung läge der Quotient zwischen 1,65 und 1,85. Niedrigere Werte sprechen für eine Verunreinigung der Lösung durch Phenolreste oder Proteine, höhere Werte dagegen lassen auf eine Verunreinigung durch RNS schließen.

Die Ausgangslösung wird in einem Verhältnis von 1:100 verdünnt und gegen eine Referenzlösung aus H_2O bidest. mit dem Ultaspec 3000 Spektrometer (Pharmacia Biotech) gemessen.

4.1.6. Enzymatische Modifikation von DNS-Fragmenten

4.1.6.1. Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion stellt ein *in vitro*-Verfahren zur selektiven Anreicherung von Nukleinsäurebereichen definierter Länge und Sequenz aus einem Gemisch von Nukleinsäuremolekülen dar (MULLIS, 1987). Die Technik beruht auf der Fähigkeit von DNS-Polymerasen, einen Einzelstrang zu einem Doppelstrang aufpolymerisieren zu können, sofern ihnen ein kurzer doppelsträngiger Bereich als Primer zur Verfügung steht. Im ersten Reaktionszyklus wird eine doppelsträngige DNS-Matrize (*Template*) bei 95°C denaturiert, worauf sich beim sogenannten *Annealing* unter Abkühlung die synthetischen, zu bestimmten Bereichen der Matrize komplementären Oligonukleotide (*Primer*) an die Einzelstränge anlagern können. In einer durch die DNS-Polymerase in Gegenwart von Desoxyribonukleotiden (dNTPs) katalysierten Reaktion werden die Einzelstränge bei 72°C zu Doppelsträngen aufgefüllt, wobei die freien 3'-Hydroxylenden der *Primer* als Synthesestartpunkt dienen (Extension). Durch periodische Wiederholung (30-40 Zyklen) der einzelnen Reaktionsschritte (Denaturierung, Primeranlagerung und Synthese) kommt es zu einer exponentiellen Vervielfältigung und Anreicherung der Zielsequenz. Die für die PCR eingesetzte Taq-Polymerase, ein aus dem thermophilen, gramnegativen Bakterium *Thermus aquaticus* (BROCK, 1969) isoliertes Enzym, hat ein Temperaturoptimum von 72°C und bleibt selbst bei dem zur Denaturierung benötigten Temperaturanstieg auf über 90°C für einige Zeit stabil.

Die Reaktionsschritte wurden vollautomatisch mit Hilfe des PCR-Gerätes Progene (Techne, Cambridge) durchgeführt. Die exakten Parameter konnten manuell programmiert werden.

4.1.6.2. Spaltung von DNS durch Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen (RE) wurden gemäß den Angaben des Herstellers in 20µl-Standard-Ansätzen (0,1 Vol 10x RE-Puffer, 0,7 – 1,5µg Substrat-DNS), ca. 10 U der entsprechenden RE (und 1x BSA, falls für RE benötigt) und steriles H₂O dest. ad 20 µl zur gezielten Spaltung von DNS eingesetzt.

METHODEN

4.1.6.3. Dephosphorylierung von Vektor-DNS (CHACONAS, 1980)

Um ein Rezirkularisieren oder die Bildung von Oligonukleotiden von restriktionsverdauter DNS zu verhindern, wurde die linearisierte Vektor-DNS vor der Ligation mit alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm (*calf intestinal phosphatase*, CIP) behandelt. Hierdurch werden Phosphatgruppen an den 5'-Enden des linearisierten Vektors enzymatisch entfernt, wodurch die Ligation erst nach dem Einbau eines phosphorylierten DNS-Fragmentes möglich wird. Die linearisierte DNS wurde mit Alkalischer Phosphatase für eine Stunde bei 37°C inkubiert.

4.1.6.4. Ligation von DNS-Fragmenten (SGRAMELLA, 1970 ; DUGAICYK, 1975)

Zur Ligation von Vektor- und Insertfragmenten im Laufe einer Klonierung wurden mittels Gelelektrophorese bestimmte äquimolare Mengen beider Fragmente (~ 1µg) in Standard-Ansätzen mit Hilfe der T4 DNS-Ligase (New England Biolabs) 2h bis über Nacht bei 16°C ligiert und anschließend zur Transformation von Bakterien eingesetzt. Um die Rezirkularisierung linearisierter Vektorfragmente im Ligationsansatz zu vermeiden, wurden vor der Ligation die Vektorenden durch CIP dephosphoryliert.

- Ligase-Puffer: ATP 10 mmol/l
 MgCl₂ 100 mmol/l
 DTT 100 mmol/l
 Tris/HCl 500 mmol/l
 BSA 500 µg/ml
 pH 7,0 bei 25°C

4.1.6.5. Ligationskontrolle mittels Blau-/Weiß-Selektion

Die eine Hälfte eines Ligationsansatzes wurde zur späteren Verwendung gelagert, die andere in E.coli-Bakterien des Stammes *pmos* transfiziert und mit 35µl X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid, BCIG) und 20µl IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid) auf LB-Amp-Platten (*Luria Broth* mit Ampicillin) ausplattiert und über Nacht bei 37°C

METHODEN

inkubiert. Die Selektion, welche Kolonie das klonierte Fragment exprimiert hat, erfolgt anhand der Farbe der Kolonie. pGEM trägt das Gen für β -Galaktosidase (β -Gal). Wird β -Gal exprimiert, spaltet es X-Gal, es entsteht eine blaue Verfärbung. Die in den Vektor klonierten Fragmente zerstören nun das β -Gal-Gen, X-Gal kann nicht mehr gespalten werden. Die Kolonien sind weiß. Anschließend können anhand der weißen Verfärbung der positiv transformierten Bakterien, Kolonien selektiert und zur weiteren Verarbeitung im Mini-präp-Verfahren Medium angeimpft werden.

4.1.7. Herstellung von Agarosegelen

Abhängig von der Größe der aufzutrennenden Nukleinsäuremoleküle wurden Agarosegele entsprechender Porengröße gewählt. Gele, die 0,6% (w/v) Agarose enthalten, haben relativ große Poren, die DNS-Fragmente von 1-20 kbp auftrennen. 2%ige Gele mit ihrer geringeren Porengröße eignen sich zur Auftrennung von DNS-Fragmenten von 0,1-2 kbp Länge.

Je nach gewünschter Konzentration des Gels wurde eine abgewogene Menge Agarose im entsprechenden Volumen TAE-Puffer aufgenommen und im Mikrowellenherd bei 760 Watt ca. 5 min. gelöst. Die auf ungefähr 60°C abgekühlte Agaroselösung wurde dann mit Ethidiumbromid (Endkonzentration 0,56 $\mu\text{g/ml}$) versetzt. Ethidiumbromid interkaliert als fluoreszierender Farbstoff mit doppelsträngiger DNS. Diese Ethidiumbromid-DNS-Komplexe fluoreszieren in 254 nm UV-Licht blau-violett.

Die noch heiße Lösung wurde auf zuvor präparierte Platten gegossen, Kämme mit gewünschter Taschenzahl und Tiefe eingelassen und das Gel aushärten lassen. Nach der Polymerisation wurden Kunststoffrahmen und -kämme entfernt und die Gele in Haushaltsfolie gewickelt bei 4°C gelagert.

- TAE-Puffer :

Tris	2	M
Na-Acetat	0,25	M
EDTA	0,5	M
- Ethidiumbromidlösung: 10 mg/10ml H₂O

METHODEN

4.1.7.1. Optimale Auftrennungsbereiche von Agarosegelen (SAMBROOK, 1989)

Agarose-Gehalt in %	0,9	2,0
Auftrennungsbereich	0,5 – 7 kbp	0,1 – 2 kbp

Tabelle 4.1. Optimale Auftrennungsbereiche von Agarosegelen. Agarosegele mit 0,9% Agarosegehalt zeigen eine optimale Auftrennung zwischen 0,5 - 7 kbp. Gele mit einem Agarosegehalt von 2% trennen im Bereich von 0,1 - 2 kbp am genauesten.

4.1.8. Agarosegelelektrophorese doppelsträngiger DNS (SAMBROOK, 1989)

Die Analyse von dsDNS-Fragmenten erfolgte durch Agarosegelelektrophorese nach Sambrook. Aufzutrennenden Proben wurden mit 0,2 Vol. Ladepuffer (50% [v/v] Glycerin, 50mM EDTA, 0,25% [w/v] Bromphenolblau) versetzt und in 1x TAE (40 mM Tris, 5mM Na-Acetat, 10mM EDTA, pH 7,8 [mit Eisessig eingestellt]) in 0,5µg/ml Ethidiumbromid enthaltenden 0,6 – 3% Agarose/ TAE-Gelen bei 100 – 140 V aufgetrennt. Zur präparativen Isolierung von Fragmenten erfolgte die Analyse der Gele in langwelligem UV-Licht (366 nm), zur photographischen Dokumentation mit Hilfe des Geldokumentationssystems Biotech Gel Print 2000i™ (MWG) in kurzwelligem UV-Licht (254 nm).

4.1.9. Isolierung von DNS-Fragmenten aus Agarosegelen

Die präparative DNS-Isolierung mit Hilfe des *Gene-Clean-Kits* eignet sich nach Angaben des Herstellers zur Aufreinigung von DNS-Fragmenten aus Agarosegelen, die größer als 300bp sind. Kleinere Moleküle werden irreversibel an die im Verfahren eingesetzte Glasmilch gebunden.

Die aus dem Agarosegel ausgeschnittene DNS-Bande wurde gewogen und im 3fachen Volumen 6 M NaI-Lösung bei 55°C ca. 10 min vollständig gelöst. Abhängig vom DNS-Gehalt der Probe, wurden 6-10 µl Glasmilch zupipettiert. Beim Abkühlen des Gemisches (für 15 min. auf Eis stellen und von Zeit zu Zeit vortexen oder für eine Stunde auf dem Drehrad

METHODEN

befestigen) wurde die sich in Lösung befindliche DNS an die Glasmilch gebunden. Anschließend wurde die Probe kurz bei 13.000 rpm in der Tischzentrifuge zentrifugiert, der Überstand abpipettiert und verworfen und das entstehende Glasmilch-Pellet dreimal in je 500µl *New-Wash*-Lösung gewaschen, wieder zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das so von NaI gereinigte Glasmilch-Pellet wurde in TE-Puffer (pH 7,4) resuspendiert und ca. 30 min. bei 55°C inkubiert, um die DNS von der Glasmilch zu lösen. Nach erneuter Zentrifugation (13.000 rpm) wurde der nun die DNS enthaltene Überstand in ein frisches Eppendorf-Gefäß überführt.

Gene-Clean-Kit (Dianova):

- NaI 6 M
- Glasmilch Silika Matrix
- New-Wash-Puffer NaCl, Tris, EDTA, Ethanol, Aqua dest. (pH 7,0-8,5)

4.2. Methoden bakterieller Zellkultur

4.2.1. Herstellung transformationskompetenter Bakterien

Zur Herstellung transformationskompetenter Bakterien wurden 30 ml SOB-Medium (2% [w/v] Trypton, 0,5% [w/v] Hefe Extrakt, 10mM NaCl, 6,75 mM KCl und 20 mM MgCl₂ [frisch zugesetzt]) mit einer Einzelkolonie inokuliert und über Nacht bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert. 8 ml dieser Vorkultur dienen zur Inokulation einer frischen 200 ml SOB-Kultur, welche bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,3 bei 37°C kultiviert wurde. Nach 15 min Inkubation auf Eis und Zentrifugation (5 min, 2000 rpm, 4°C) wurde das Pellet in 64 ml Transformationspuffer 1 (100mM RbCl, 50mM MnCl₂ 4 H₂O, 100 mM CaCl₂ 2H₂O, 30 mM CH₃COOH [pH 7], 15 % [v/v] Glycerin, pH 5,8 [0,2 M CH₃COOH]) resuspendiert und 15

METHODEN

min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation (5 min, 2000rpm, 4°C) wurde das Pellet in 16 ml Transformationspuffer 2 (0,5 M MOPS [pH 6,8], 100 mM RbCl, 75 mM CaCl₂ H₂O, 15% Glycerol) resuspendiert, aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert.

4.2.2. Transformation kompetenter Bakterien

Zur Transformation kompetenter Bakterien (LEDERBERG, 1974) wurden 60µl Bakterien auf Eis aufgetaut, mit 20 ng (Plasmid) bis 250 ng (Ligationsansatz) DNS gemischt, 20 min auf Eis inkubiert und für 90 sec einem 42°C Hitzeschock ausgesetzt. Nach 2 minütiger Inkubation auf Eis und Zugabe von 60 µl LB (ohne Antibiotikum) wurde der Ansatz 20 min bei 37°C vorinkubiert und anschließend auf antibiotikahaltigen LB-Platten ausplattiert bzw. zur Inokulation einer antibiotikahaltigen Suspensionskultur verwendet und über Nacht bei 37°C inkubiert.

4.2.3. Kultivierung von E.Coli

Zur Anzucht von Flüssigkulturen wurden entsprechende Mengen LB-Medium (supplementiert mit den entsprechenden Selektionsantibiotika) mit einer durch Verdünnungsausstrich auf einer Agarplatte erhaltenen Einzelkolonie inokuliert. Suspensionskulturen wurden bei 37°C unter aeroben Bedingungen auf einem Schüttler gezogen.

4.3. Methoden eukaryoter Zellkultur

4.3.1. Kultivierung von Säuger- und Insektenzellen

B- und T- lymphoide Zellen, bzw. epitheliale *Monolayer* wurden in supplementiertem RPMI 1640, bzw. DMEM auf 37°C und 5% CO₂ kultiviert und zweimal wöchentlich (bei einer Zelldichte von ca. 5×10^6 Zellen/ml) durch Verdünnung in frischem Medium, bzw. durch Trypsinisierung und nachfolgender Verdünnung, subkultiviert.

4.3.2. Qualitative Zellzahlbestimmung mit Hilfe des CASY™-Counters

Zur exakten quantitativen Bestimmung der Zelldichte und gleichzeitiger qualitativer Analyse der Größenverteilung einer Zellpopulation (z.B. vor Elektrophoration) wurde ein definiertes Volumen (5µl) der Population im 10³-fachen Volumen (5ml) einer Elektrolytlösung (CASYTon™) resuspendiert und in einem CASY™-Counter (Schade Systems) analysiert. Zellgröße und Integrität der Zellmembran beeinflussen den gemessenen elektrischen Widerstand der Elektrolytlösung beim Durchtritt der Zellen durch eine im Gerät befindliche Kapillare und können anhand des ausgegebenen Histogramms dokumentiert werden.

4.4. Rekombinante Genexpression in eukaryoten Zellen

4.4.1. Kalziumphosphat-Transfektion adhärenter Zellkulturen

Am Vortag in entsprechender Dichte ausgesäte, 40 – 60% konfluente, adhärenente *Monolayer*-Zellkulturen wurden durch Zugabe von DNS-Kalziumphosphat-Präzipitaten (GRAHAM, 1973) transfiziert. Die im jeweiligen Experiment angegebenen Mengen Plasmid-DNS wurden

METHODEN

in 230 µl sterilem H₂O aufgenommen und unter ständigem Schütteln steril mit 30 µl 2 M CaCl₂-Lösung und anschließend 240 µl 2x HBS-Puffer-Gemisch (280 mM NaCl, 50 mM HEPES, 1,5 mM NaHPO₄ [pH 7,05 und pH 6,5, jeweils eingestellt mit 0,1M NaOH und in den weiter unten angegebenen Verhältnissen gemischt]) tropfenweise versetzt und der Ansatz 20 min bei 37°C inkubiert. Das gebildete Präzipitat wurde auf die Zellen getropft und diese 6h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach einmaligem Waschen der Zellen in PBS bei RT und Zugabe von 2,5ml frischen Mediums wurden die Zellen zur Expression der jeweiligen Proteine 24h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert und zur Herstellung von Proteinextrakten verwendet.

4.4.2. Transfektion eukaryotischer Zellen mit dem FuGene®-Kit

FuGene™ ist ein Transfektionsreagenz, das von Roche Biochemicals angeboten wird. Es zeichnet sich durch eine hohe Transfektionseffizienz aus. Außerdem wird im Vergleich zur Calciumphosphatmethode weniger DNS benötigt. Einen Tag vor der Transfektion wurden die entsprechenden Zellen ausgesät, sodass sie einen ca. 50% konfluenten Zellrasen bildeten. Die Transfektion wurde nach Firmenvorschrift durchgeführt. Für 10cm Zellkultur-Schalen wurden 100 µl serumfreies Zellkulturmedium (DMEM) mit 5µl FuGene™ gemischt und für 5 min bei Raumtemperatur stehengelassen. Anschließend wurde dieses Gemisch tropfenweise zu 1-2 µg der entsprechenden Plasmid-DNS gegeben. Diese Suspension wurde 15 min bei 37°C inkubiert, damit sich die Micellen bilden können. Schließlich wurde die Suspension auf die ausgesäten Zellen getropft.

4.5. Protein-Techniken

4.5.1. Herstellung von Proteinextrakten

Unter reduzierenden, denaturierenden Bedingungen hergestellte SDS-Probenpuffer-Extrakte wurden z.B. zur Auftrennung in der SDS-PAGE eingesetzt. Sie wurden durch Resuspension

METHODEN

von ca. 10^6 Zellen in 100 μ l SDS-Probenpuffer, 5 mal 5 sec Ultraschallbehandlung (Branson Sonifier 250) zur Fragmentierung chromosomaler DNS und 5 min Denaturierung im kochenden Wasserbad, anschließender Zentrifugation (5 min, 13000 rpm, RT) und Verwerfung des Pellets hergestellt und bei -20°C gelagert.

4.5.2. Herstellung nativer Zellextrakte

Native eukaryote Proteinextrakte wurden durch zweimaliges Waschen von ca. 5×10^6 Zellen in PBS, Resuspension in 2 Vol nativem Lysispuffer (PufferK: 100mM Tris-HCl [pH 8,0], 100 mM NaCl, 5 mM KCl, 0,5 mM MgCl_2 , 1 mM CaCl_2 , 0,5% [v/v] NP40, 5 μ g/ml Aprotinin, 0,5 mM PMSF, 10 μ g/ml Pepstatin A, 5 μ g/ml Leupeptin), 30 min Inkubation auf Eis und anschließender Pelletierung des Zell-Debris (20 min, 13000 rpm, 4°C) hergestellt und bei -70°C gelagert.

4.5.3. Herstellung von Sample-Buffer-Extrakten

Eine Methode geeignet zur Gewinnung von Gesamtproteinextrakten aus nahezu allen Zellen. Der Proteinaufschluss erfolgt mit Hilfe von Ultraschall, der zelluläre Membranen und chromosomale DNS zerstört.

Zur Herstellung von Sample-Buffer-Extrakten wurden die Zellen in sterilem PBS gewaschen und dann in 2xProbenpuffer aufgenommen. Nach ca. 20-sekündiger Behandlung mit Ultraschall (Branson Sonifier 250) wurde der Ansatz 5 min gekocht, 15 min bei 13.000 rpm abzentrifugiert und bis zur Auftrennung in der SDS-Page bei -20°C aufbewahrt.

- 2x Sample-Buffer:

Tris-Hcl	150 mM	(pH 6,8)
SDS	6%	(w/v)
3-Mercapto-1,2-Propandiol	10%	(v/v)
Bromphenolblau	0,05%	(v/v)
Glycerin	10%	(v/v)

METHODEN

4.5.4. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) (SAMBROOK, 1989)

4.5.4.1. Herstellung von SDS-Polyacrylamidgelen

Zwei mit Ethanol gereinigte Glasplatten, zwischen denen drei Kunststoff-Abstandshalter liegen, werden mit Klammern aneinander befestigt. Der äußere Rand dieses Rahmens wird mit 1%iger Agarose abgedichtet. Nachdem die Platten aufgestellt und waagrecht ausgerichtet wurden, füllt man das Trenngel ein und überschichtet es mit Wasser. Ist das Trenngel polymerisiert, entfernt man das Wasser und füllt das Sammelgel auf. Zur Taschenbildung werden Kunststoffkämme benutzt.

In Abhängigkeit der aufzutrennenden Proteine wurden 10-12%ige Polyacrylamid-Trenngel verwendet. Zur Bestimmung des relativen Molekulargewichts der aufgetrennten Proteine wurden Markerproteine bekannter Molekulargewichte parallel zu den zu untersuchenden Proteinen aufgetrennt. Die Elektrophorese erfolgte bei konstanter Stromstärke von 25-30 A.

10%iges Polyacrylamidgel:

Komponente	Sammelgel	Trenngel (10%)
Sammelgelstock	1,25 ml	/
Trenngelstock	/	4,00 ml
Acrylamid	0,75 ml	5,30 ml
Bisacrylamid	0,30 ml	2,12 ml
H ₂ O	2,70 ml	4,58 ml
APS	50µl	140µl
TEMED	10µl	14µl

Tabelle 4.2. Zusammenstellung eines 10% Polyacrylamidgels mit den zwei Komponenten Sammelgel und Trenngel.

METHODEN

- Trenngelstock (bottom gel stock):

Tris/HCl (pH8,8)	1,5	M
SDS	0,4%	(w/v)

- Sammelgelstock (upper gel stock):

Tris/HCl (pH 6,8)	0,5	M
SDS	0,4%	(w/v)

- Laufpuffer:

Tris/HCl	0,25	M
SDS	0,1%	(w/v)
Glycin	0,2	M

4.5.4.2. SDS-PAGE Verfahren

In einer SDS Page werden Proteine in Gegenwart eines Überschusses an SDS elektrophoretisch aufgetrennt. Hierbei lagert sich das negativ geladene SDS durch Bindung an die hydrophoben Regionen in konstantem Gewichtsverhältnis an die Proteine an. Dadurch kompensiert es die positiven Ladungen, so dass alle Proteine zur Anode wandern. Gleichzeitig denaturiert das SDS die Proteine vollständig, so dass sie in einem Gel geeigneter Porosität entsprechend ihrer molaren Masse wandern. Hierbei entspricht die elektrophoretische Beweglichkeit der Proteine einer Funktion des Logarithmus ihres Molekulargewichts. Die Gelmatrix besteht aus Ketten polymerisierten Acrylamids, die durch N, N- Methylenbisacrylamid quervernetzt werden. Die Polymerisierungsreaktion wird durch Amoniumpersulfat (APS) gestartet und durch N,N,N,N-Tetramethyldiamin (TEMED) katalysiert. Die Auftrennungseigenschaften sowie die Porengröße des jeweiligen Gels hängen von der eingesetzten Acrylamid- bzw. Bisacrylamidkonzentration ab. Eine hohe Auflösung bei der Trennung wurde durch eine diskontinuierliche Gelelektrophorese erreicht, bei der das zu analysierende Proteingemisch in einem Gel aufgetrennt wird, das aus zwei Gelsystemen unterschiedlicher Porengröße und unterschiedlichem pH-Wert des Puffers besteht. Die Proteine wandern von einem grobporigen Sammelgel, in dem sie konzentriert werden, in ein feinporiges Trenngel, in dem die Auftrennung erfolgt. Mit Hilfe von Markerproteinen

METHODEN

bekannter Molekulargewichte, die parallel zu den aufzutrennenden Proteinen laufen, kann das relative Molekulargewicht letzterer ermittelt werden.

4.5.4.3. Coomassieblau-Färbung

Die Coomassieblau-Färbung eines SDS-Polyarylamidgels wurde zur Detektion aller im Gel vorhandenen Proteine eingesetzt. Das Gel wurde für 1 h bei 55°C in Coomassieblau-Färbelösung auf dem Schüttler inkubiert und durch mehrmaliges Aufkochen in Wasser in der Mikrowelle so lange entfärbt, bis einzelne Banden zu sehen waren. Anschließend wurde es über 1 h bei 80°C unter Vakuum getrocknet (DryGel jr., Hoefer).

- Färbelösung: Eisessig 25% (v/v)
 Isopropanol 10% (v/v)
 Coomassieblau 0,02% (v/v)
 (Coomassie Brilliant Blue R 250)

4.5.5. Immunblot (Western Blot) (TOWBIN, 1979; BURNETTE, 1981)

Zuvor in einer SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennte Proteine können im Immunblot auf eine Membran übertragen werden. Dabei bleibt das nach der Auftrennung entstandene Proteinmuster immobilisiert auf der Membran erhalten. Die Proteine binden bei niedriger Ionenstärke über hydrophobe Wechselwirkungen an die Membran. Da sowohl die Immunreaktivität als auch die funktionelle Aktivität der Proteine weitgehend erhalten bleibt, können diese durch Einsatz spezifischer Antikörper immunologisch identifiziert werden.

METHODEN

4.5.5.1. Proteintransfer (Westernblot)

Die für den Proteintransfer eingesetzte Nitrozellulose-Membran wurde vor dem Aufbau des Blots in PBS äquilibriert. Anschließend wurden in einer mit Transferpuffer gefüllten Wanne auf ein PVC-Gitter zwei Schwammtücher, zwei Whatman-Papiere, das Polyacrylamidgel, die Nitrozellulose-Membran, zwei weitere Whatman-Papiere und zwei Schwammtücher aufgelegt, und nach oben durch ein weiteres Gitter abgeschlossen. Der Blot wurde in richtiger Orientierung zur Anode hin in eine mit Transferpuffer gefüllte Kammer (LBK 2005 Transphor Electro Blotting Unit) gestellt. Der Transfer wurde 1,5 h bei 330 mA durchgeführt. Nach dem Transfer wurde die Nitrozellulose-Membran zur unspezifischen Färbung aller Proteine kurz in Poinceau STM gelegt. Die Markerspuren wurden abgetrennt, 15 min in Amidoschwarz-Lösung angefärbt und anschließend entfärbt. Die restliche Membran wurde für 30 min bei Raumtemperatur in PBS-Milch inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen der Membran abzusättigen.

- Transferpuffer:

Tris/HCl	25 mM
Glycin	192 mM
Methanol	20% (v/v)
SDS	0,05% (w/v)

- Blockingpuffer:

Magermilchpulver in PBS-Puffer	5% (w/v)
-----------------------------------	----------

- Amidoschwarz-Färbelösung:

Isopropanol	25% (v/v)
Essigsäure	10% (v/v)
Amidoschwarz	0,1% (w/v)

- Amidoschwarz-Entfärbelösung:

Isopropanol	10% (v/v)
Essigsäure	10% (v/v)

4.5.5.2. Immunologischer Nachweis membrangebundener Proteine

Die Nitrozellulosemembran wurde anschließend mit dem entsprechenden Antikörper in 2-4 ml PBS-Milch (5%) luftblasenfrei in Klarsichthüllen eingeschweißt und auf einem Schüttler über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde die Membran 1 x 15 min und 2 x 10 min in PBS-Puffer gewaschen, um unspezifisch gebundene Antikörper zu entfernen. Danach wurde die Membran mit einem entsprechenden Sekundärantikörper in 2-4 ml PBS-Milch (5%) luftblasenfrei in Klarsichthüllen eingeschweißt und auf dem Schüttler 1 h bei 4°C inkubiert. Nach einem Waschschrift von 1 x 15 min und 2 x 10 min in PBS-Puffer erfolgte die Detektion gebundener Sekundärantikörper mit Hilfe des ECL™-Kits (Enhanced Chemoluminescence, Amersham). Dabei erfolgte eine durch Peroxidase katalysierte Reduktion von H₂O₂ und Oxidation von Luminol und eine Licht-Emission von λ428 nm, die durch einen blaulichtempfindlichen ECL™-Film (Hyperfilm ECL™, Amersham) dokumentiert wurde. Dazu wurde die Membran in einer Kunststoffschale mit dem kurz vorher 1:1 gemischten ECL™-Lösungen 1 und 2 (je 3 ml) für eine min inkubiert, getrocknet und für 30 sec bis 10 min auf den ECL-Film gelegt, der anschließend entwickelt und fixiert wurde.

5. Ergebnisse

5.1. Einleitung

EBNA2 interagiert mit verschiedenen RNS-bindenden Proteinen, wie den humanen nukleären Ribonukleoproteinen (hnRNP). Diese assoziieren z.T. bereits während der Transkription mit RNS-Vorläufern und bestimmen dadurch das weitere Schicksal der Moleküle. Sie markieren Exon-Exon-Übergänge, sind an Spleiß-Reaktionen beteiligt und regeln nukleozytoplasmatischen In- und Export. Ein Großteil der Genregulation findet demnach posttranskriptionell statt und wirft damit die Frage auf, ob viele Gendefekte und daraus resultierende klinisch bedeutsame Krankheiten im Grunde auf einem fehlerhaften RNS-Metabolismus beruhen.

Die Bindung von EBNA2 an andere RNS-bindende Proteine, wie DP103 (DEAD-Box Protein 103, auch Gemin3, auch DDX20) und SMN, konnte durch unsere Arbeitsgruppe nachgewiesen werden (GRUNDHOFF 1999, BARTH 2003). Hinweise auf weitere Bindungspartner des EBNA2 fanden wir mittels Hefe-Zwei-Hybrid-System (*Yeast Two-Hybrid-Screen*, Y2H). Demnach sind direkte Bindungen von EBNA2 an hnRNP K und h-Lark/RBM4 zu vermuten. Mittels Y2H-Screening einer cDNA-Bank mit EBNA2 als *Prey* konnte auch hn-RNP-M2 als möglicher Bindungspartner identifiziert werden. Versuche die Interaktion von EBNA2 und hnRNP-M2 mittels Co-IP und Kolokalisation zu bestätigen, schlugen allerdings fehl, da hnRNP-M2 aufgrund seiner ausgeprägten *Klebrigkeit* Kontrollergebnisse verfälschte und damit keine sicheren Aussagen über sein spezifisches Bindungsverhalten erlaubte.

Mit dem zu diesem Zeitpunkt relativ neuen Verfahren der bimolekularen Fluoreszenz-Komplementation (BiFC), sollte der Nachweis der Bindung von EBNA2 an hn-RNP-M2 erbracht werden. Hierzu werden PCR-Amplifikate der vermuteten Interaktionspartner in die beiden Expressionsvektoren des Systems kloniert. Die Vektoren enthalten jeweils die Sequenz des C- (AS 155–238) bzw. N-Terminus (AS 1–154) des YFP. Das fertige Expressionsprodukt besteht dann aus einem der zu untersuchenden Bindungspartner, z.B. dem EBNA2-Protein, an das sich jeweils der C- bzw. N-Terminus des YFP-Proteins anschließt. Analog dazu besteht

ERGEBNISSE

das komplementäre Expressionsprodukt aus dem zweiten vermuteten Bindungspartner und dem gegenseitigen Terminus des YFP-Proteins. Die C- bzw. N-terminalen Fragmente des YFP allein besitzen keine Fähigkeit zur Fluoreszenz. Kommt es allerdings zur räumlichen Annäherung bzw. Interaktion der zu untersuchenden Proteine, in diesem Fall EBNA2 und hnRNP-M2, können auch der C- und N-Terminus des YFP interagieren und das Fluorophor kann rekonstituiert werden (s. 2.8.). Da man die vermuteten Bindungspartner in der BiFC in nahezu natürlicher Menge in ihre normale Umgebung bringt, eignet sich das Verfahren zum Nachweis von Interaktionen zwischen Proteinen, ohne dass die strukturelle Grundlage, der genaue Mechanismus oder genaue Ort dieser Interaktion innerhalb der Zelle bekannt sein muss.

5.2. Herstellung der Inserts

Als Template für die EBNA2-Inserts dienten uns die freundlicherweise von E. Kieff überlassenen pSG5-EBNA2 und pSG5-EBNA2 Δ RG (s. Methoden). Unter Verwendung der Primer *Eco-Xho-5-E2* bzw. *EBNA2-3'-Eco* wurden die Inserts mittels PCR amplifiziert (s. Abb. 5.1.). EBNA2-Wildtyp bindet über seine Arginin-Glycin-Region (RG) an SMN (s. Einleitung). Um herauszufinden, ob diese Region auch für die vermutete Bindung an hnRNP-M2 essentiell ist, wurde eine Deletionsvariante, EBNA Δ RG, erstellt. Im Hinblick auf die Schwierigkeiten, die sich mit der Expression und bimolekularen Fluoreszenzkomplementation der Konstrukte ergaben, haben wir später eine weitere EBNA2-Variante kloniert. Davon ausgehend, dass der Polyprolinabschnitt (AS 57-100) des EBNA2 dessen molekulare Eigenschaften für unsere Zwecke möglicherweise negativ beeinflusst, erstellten wir einen Primer der eben diese ersten 100 AS des EBNA2-Proteins wegfallen lässt.

Von dem Template pSG5-M2 wurden, mit *M5'-BglII* und *3-YNMBgl* als Primer, PCR-Amplifikate hergestellt und in der Agarosegelelektrophorese aufgetrennt (s. Abb.5.2.).

Die gereinigten PCR-Produkte wurden entweder direkt einem Restriktionsverdau unterzogen oder zur weiteren Vermehrung dieser Ausgangsprodukte in den pGEM-Vektor kloniert. Im Falle der EBNA2-Inserts wurde mit der Restriktionsendonuklease EcoRI (s. Abb. 5.3., 5.4.), im Falle von hnRNP-M2 mit BglII geschnitten. Von je einem verdaubaren pGEM-EBNA2wt,

ERGEBNISSE

EBNA2 Δ RG- bzw. hnRNP-M2-Klon wurden Aufreinigungen mittels Qiagen® Verfahren angefertigt.

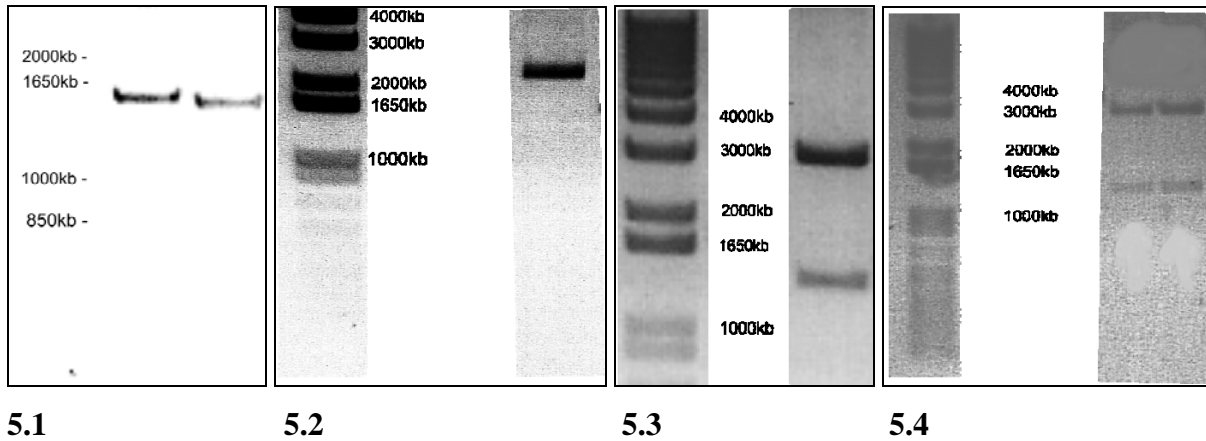


Abbildung 5.1. PCR-Amplifikation von EBNA2 Wildtyp (~1500kb) und EBNA2 Δ RG (~1400kb). Die Abbildung zeigt die mit Ethidiumbromid gefärbten, im 1%igen Agarosegel aufgereinigten PCR-Amplifikate. Wie erwartet läuft das etwas kürzere EBNA2 Δ RG in der rechten Bande geringfügig schneller. **5.2.** PCR-Amplifikation von hnRNP-M2 (~2100kb). Die mit Ethidiumbromid gefärbten PCR-Amplifikate werden in 1%igen Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt. Das hnRNP-M2-Amplifikat läuft, wie erwartet, knapp über der 2000 kb-Bande. **5.3.** Kontrollverdau des Klonierungsvektors pGEM mit dem Insert EBNA2 Wildtyp (wt) und Auftrennung im 0,1%igen Agarosegel. Die Vektorbande läuft bei circa 3000 kb, das EBNA2-Insert bei circa 1500kb, was jeweils den erwarteten Größen entspricht. **5.4.** Kontrollverdau des pGEM-Vektors mit dem Insert EBNA2 Δ RG und Auftrennung im 0,1%igen Agarosegel. Der Verdau wurde auf 2 Taschen verteilt. Den erwarteten Größen entsprechend, läuft der Vektor pGEM bei ca. 3000kb, EBNA2 Δ RG bei ca. 1400kb.

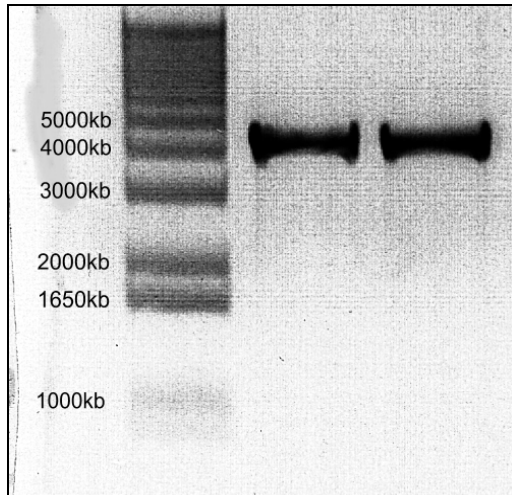
5.3. Verdau der BiFC-Vektoren, Ligation und Kontrollverdau

Der den C-Terminus des GFP enthaltende Vektor YC-GFP wurde zur Vorbereitung auf die Ligation an die EBNA2-PCR-Amplifikate mit EcoRI verdaut und anschließend die Linearisierung des Vektors im Agarosegel kontrolliert (s. Abb. 5.5.). Um ein Rezirkularisieren des Vektors zu verhindern, wurde über Nacht mit CIP-Enzym (*caly intestinal phosphatase*) behandelt. Der Verdau von YN-GFP, der den Aminoterminus des GFP enthält, verlief entsprechend, mit der Ausnahme, dass hier in Vorbereitung auf die Ligation von hnRNP-M2 das Restriktionsenzym BamHI verwendet wurde (s. Abb. 5.6.).

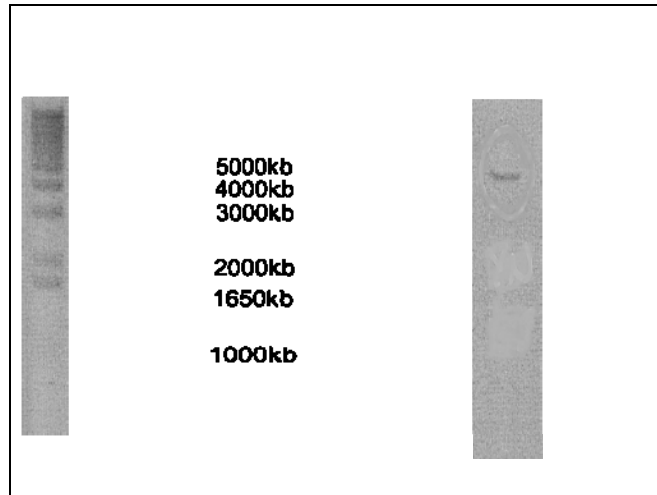
Die Ligationsansätze wurden über Nacht inkubiert und anschließend in *E.coli* transformiert. In einem Umkehrschritt erfolgt die Kontrolle der Ligation. Mittels der entsprechenden Restriktionsendonukleasen wird das jeweilige Insert erneut aus dem Vektor geschnitten (s. Abb. 5.7., 5.8.). Entsprechend erfolgte der Kontrollverdau des komplementären Teils des

ERGEBNISSE

BiFC Systems. Den Herstellerangaben folgend, wurde das Insert hn-RN-M2 mit der Restriktionsendonuklease BglIII aus dem Vektor geschnitten (s. Abb. 5.9.).



5.5.

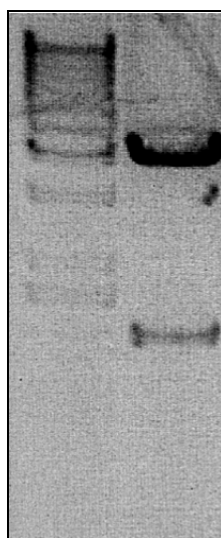


5.6.

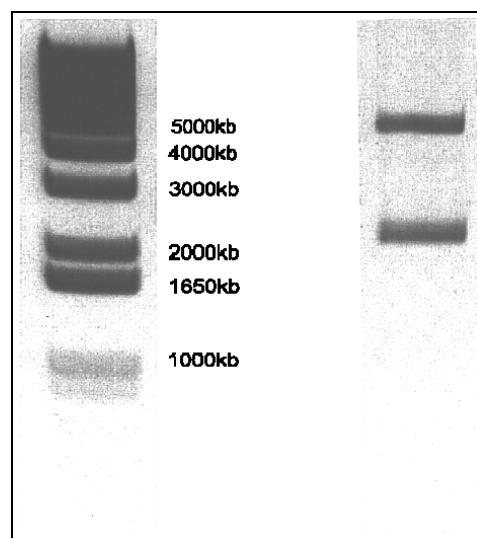
Abbildung 5.5. Restriktionsverdau von YC, dem C-terminalen Teil des BiFC-Systems, mit dem Restriktionsenzym EcoRI und Auftrennung im 0,1%igen Agarosegel. Das Amplifikat wurde auf 2 Taschen aufgeteilt. Der Vektor läuft auf der zu erwartenden Höhe von 4000kb. **5.6.** Restriktionsverdau von YN, dem N-terminalen Teil des BiFC-Systems, mit der Restriktionsendonuklease BamHI, und Auftrennung im 0,1%igen Agarosegel. Die singuläre Bande YN läuft auf einer Höhe von ca. 5000kb.



5.7.



5.8.



5.9.

Abbildung 5.7. Kontrollverdau von YC-EBNA2wt und anschließender Auftrennung im 0,1%igen Agarosegel. Die obere Bande stellt den bei 4000kb laufenden Vektor YC, die untere das Insert EBNA2 Wildtyp, dar. **5.8.** Kontrollverdau von YC-EBNA2ΔRG und anschließender Auftrennung im 0,1% Agarosegel. YC läuft bei 4000 kb, EBNA2ΔRG bei 1400kb, was den jeweiligen zu erwartenden Größen entspricht. **5.9.** Kontrollverdau von YN-hnRNP-M2 und Auftrennung im 0,1 %igen Agarosegel. Die obere Bande entspricht dem 5000kb großen Vektor YN, die untere dem 2100kb großen hnRNP-M2.

5.4. Orientierungsverdau

Da die PCR-Amplifikate jeweils am 5'- als auch am 3'-Ende mit EcoRI geschnitten sind, ergibt sich die theoretische Möglichkeit, dass das Insert in falscher Orientierung in den Vektor ligiert wurde. Um dies auszuschließen wurden die YC-EBNA2-Konstrukte einem Verdau mit der Restriktionsendonuklease NcoI ausgesetzt und im Agarosegel kontrolliert. Die Bandenkombination: 1 x ~540 bp, 1 x ~985 bp und 1 x ~4000 bp bestätigt die korrekte Orientierung, wohingegen drei Banden der Größen 1 x ~540 bp, 1 x ~511 bp und 1 x ~4500bp Klone mit falsch orientiertem Insert anzeigen.

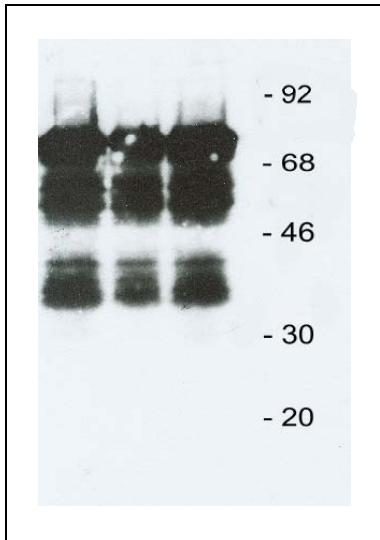
Da auch das hnRNP-M2 PCR-Amplifikat jeweils am 3' als auch am 5'-Ende mit dem gleichen Restriktionsenzym geschnitten wurde (BglII), musste auch hier kontrolliert werden, ob das Insert in der richtigen Orientierung in den YN-Vektor ligiert worden war. Das Konstrukt wurde zu diesem Zweck einem EcoRI-Verdau unterzogen und anschließend in der Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Die Bandenkombination 1 x ~600 bp und 1 x ~6700 bp bedeutete die korrekte, die Kombination 1 x ~1500 bp und 1 x ~5750 bp die falsche Orientierung des Inserts im Vektor. Von jeweils 2-3 somit geprüften Konstrukten wurden 100 ml LB-Amp zur weiteren Verarbeitung im Qiagen®-Verfahren angeimpft.

5.5. Transfektion der Konstrukte, SDS-PAGE und Western Blot

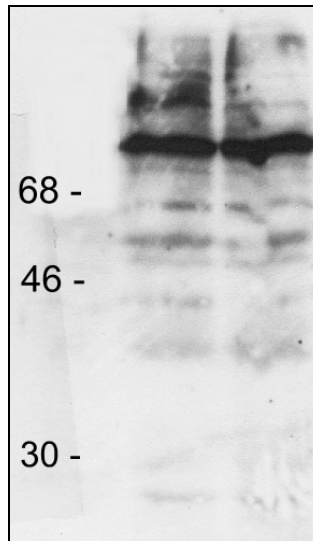
Die auf ihre richtige Orientierung geprüften und aufgereinigten Klone konnten anschließend transfiziert werden. Die DNS wurde mittels Calciumphosphat-Methode (SAMBROOK, 1989) oder mit Hilfe des FuGene®-Transfektionskits in adhärente Zellen der Linie 293, humane, mit Adenovirus 5 transformierte Nierenepithelzellen (GRAHAM, 1977), transfiziert.

Circa 24 h nach Transfektion der Vektor-Insert-Konstrukte in GP293-Zellen, wurden mittels Ultraschall und Zugabe von Bromphenolblau so genannte Sample-Buffer-Extrakte angefertigt. Zur Expressionskontrolle wurden die Extrakte zur weiteren Auftrennung der Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) zugeführt. Alle EBNA2-Klone wurden mit dem monoklonalen EBNA2-färbenden Antikörper R3 (KREMMER, 1995) nachgewiesen, der spezifisch im C-Terminus von EBNA2 bindet (s. Abb. 5.10., 5.11., 5.12.).

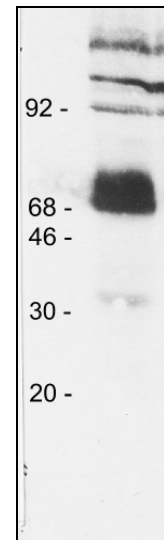
ERGEBNISSE



5.10.



5.11.



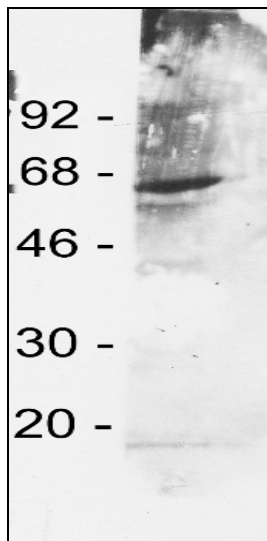
5.12.

Abbildung 5.10. Expression von YC-EBNA2wt in GP293 Zellen. Auftrennung im 10%igen Acrylamidgel. Als Primärantikörper diente α EBNA R3, als Sekundärantikörper α Ratte pox. Bei circa 75 kDa finden sich in allen 3 Bahnen die Banden der spezifisch angefärbten Konstrukte. **Abbildung 5.11.** Expressionskontrolle EBNA2 Δ RG in GP 293 Zellen. Auftrennung im 10%igen Acrylamidgel. Als Primärantikörper diente α EBNA R3, als Sekundärantikörper α Ratte pox. In 2 Taschen aufgeteilt, finden sich bei circa 75 kDa deutliche Banden der spezifisch angefärbten Konstrukte. **Abbildung 5.12.** Expressionskontrolle EBNA2 Δ Prolin in GP293 Zellen. Auftrennung im 10%igen Acrylamidgel. Als Primärantikörper kam α EBNA R3 zum Einsatz, als Sekundärantikörper diente α Ratte pox. Die Bande des etwas kleineren Δ Prolin-Expressionsproduktes läuft wie erwartet etwas überhalb 68 kDa.

In der SDS-PAGE der YC-EBNA2 Konstrukte fanden sich bei allen Subtypen - Wildtyp, Δ RG und Δ Prolin – mit dem monoklonalen Antikörper R3 spezifisch gefärbte Banden der zu erwartenden Größen. Die Konstrukte bilden jeweils einen Teil des BiFC-Systems. Sie bestehen aus dem EBNA2-Protein, bzw. dem jeweils deletierten EBNA2-Fragment, und dem C-Terminus des GFP, der eine Hälfte des Fluorophors trägt.

Um die ebenfalls mittels SDS-PAGE aufgetrennten YN-hnRNP-M2-Konstrukte nachzuweisen, benutzten wir den monoklonalen Antikörper α GFP. Dieser bindet spezifisch im GFP (s. Abb.5.13.).

ERGEBNISSE



5.13.

Abbildung 5.13. Expression von YN-hnRNP-M2 in GP293 Zellen. Auftrennung im 10%igen Acrylamidgel. Als Primärantikörper diente α GFP, als Sekundärantikörper α Maus pox. Exemplarischer Blot. Die deutlich zu erkennende Bande knapp unterhalb 68 kDa entsprach nicht der erwarteten Bandengröße von circa 90 kDa.

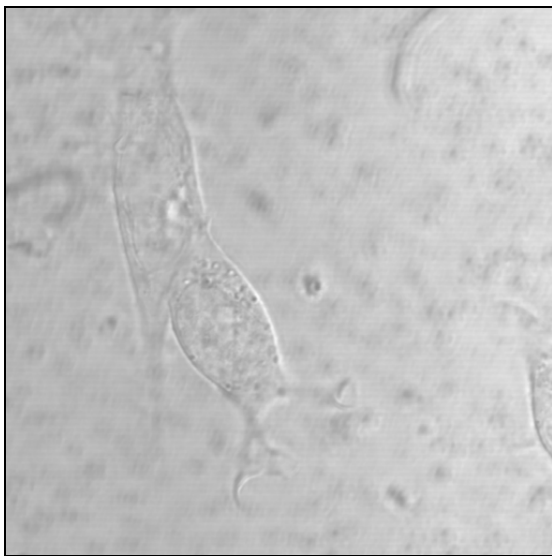
In Abb. 5.13. zu erkennen, fand sich in der mit α GFP gefärbten SDS-PAGE eine Bande von knapp unterhalb 68 kDa. Dies entsprach nicht den erwarteten circa 90 kDa des YN-hnRNP-M2-Konstruktes. Das in dieser Arbeit verwendete DNS Template hnRNP-M wurde bereits in verschiedenen Testreihen unserer Arbeitsgruppe benutzt und seine korrekte Primärsequenz mehrfach bestätigt. Wie bereits im Ergebnisteil weiter oben berichtet, ergaben Amplifikation, Klonierung und Orientierungsverdau des Konstruktes die korrekten Ergebnisse. Auch in der daraufhin durchgeführten Kontrollreihe fand sich im Western-Blot die singuläre Bande von ca. 68 kDa. Wir gehen davon aus, dass eine nicht vorhergesehene Veränderung der Tertiärstruktur, wie sie bei vielen größeren Proteinen auftritt, für die veränderten Laufeigenschaften des hnRNP verantwortlich ist (s. Diskussion).

5.6. Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation (BiFC)

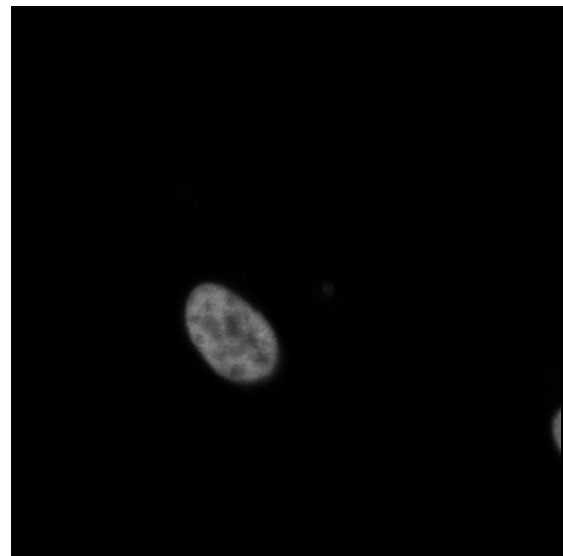
Die Versuche zur Bimolekularen Fluoreszenzkomplementation (BiFC) (s. 2.8.), die wir in Kooperation mit PD A. Schmid aus dem II. Physiologischen Institut der Universitätskliniken

ERGEBNISSE

des Saarlandes durchgeführt haben, zeigten selbst bei den in diesem Assay benutzten Positivkontrollen, den *in vivo* dimerisierenden Zellfaktoren *c-fos* und *c-jun*, ausschließlich schwache Fluoreszenz (s. Abb. 5.14., 5.15.). *C-fos* und *c-jun* komplexieren über ein in beiden Bindungspartnern enthaltenes Zinkfingermotiv, was ihre gegenseitige Affinität und die Stabilität ihrer gegenseitigen Bindung erklärt. Eine starke Färbung wie sie in der Originalpublikation von Hu und Mitarbeitern beschrieben wurde (HU, 2002), konnte zu diesem Zeitpunkt nicht reproduziert werden.



5.14.



5.15.

Abbildung 5.14. Exemplarische Darstellung von *jun/fos* im BiFC-System. Negativkontrolle (zur Verfügung gestellt von, und © A. Schmid, Institut für Physiologie, Universität des Saarlandes, Homburg). **Abbildung 5.15.** Exemplarische Darstellung von *jun/fos* im BiFC-System (zur Verfügung gestellt von, und © A. Schmid, Physiologisches Institut, Universität des Saarlandes). Man erkennt deutlich die im Zellkern erscheinende Fluoreszenz. *Jun* und *fos* sind in räumlich enge Beziehung zueinander getreten. Der amino- bzw. carboxyterminale Teil des geteilten GFP interagiert, die Fähigkeit zur Fluoreszenz wird wiederhergestellt.

Nach Kotransfektion der von uns erstellten EBNA2-Konstrukte mit dem vermuteten Interaktionspartner hnRNP-M2, konnte keine Fluoreszenz detektiert werden. Die Abb. 5.14. und 5.15. zeigen beispielhaft die Transmissionsmuster der im Original-Essay benutzten bZIP-Proteine *jun* und *fos*.

6. Diskussion

6.1. Diskussion

Die Fähigkeit des Epstein-Barr Virus B-Lymphozyten zu infizieren und deren unbegrenzte Proliferation zu induzieren wurde 1967 von Henle et al. erkannt (HENLE, 1967; POPE, 1968). In EBV-immortalisierten Zelllinien, sogenannten *lymphoblastoid cell lines* (LCL), werden nur wenige virale Gene exprimiert (RICKINSON, KIEFF, 1996). EBNA2 ist nach Infektion eines der ersten nachweisbaren viralen Genprodukte; es dient der Etablierung (COHEN, 1989; HAMMERSCHMIDT, SUGDEN, 1989; KAYE, 1993; TOMKINSON, 1993) und Aufrechterhaltung (KEMPKES, 1995; KILGER, 1998) des immortalisierten Zustands. Durch die Aktivierung einer Reihe viraler und zellulärer Gene, löst EBNA2 eine Kaskade an Sekundärereignissen aus, die zur Aktivierung der B-Zellen führt, ihren Eintritt in den Zellzyklus auslöst und somit die Aufrechterhaltung des Wachstums der LCLs bedingt (SINCLAIR, 1994).

Neben den vielen bereits bekannten Funktionen des EBNA2, im Besonderen seine essentielle Stellung in den Prozessen der Initiation und Aufrechterhaltung des latenten Zustands des Epstein-Barr Virus, zeigten Ergebnisse unserer und anderer Arbeitsgruppen die vielfache Teilhabe von EBNA2 an Prozessen des RNS-Metabolismus. EBNA2 interagiert mit einer Reihe zellulärer Proteine, unter anderem mit dem „survival of motor neurons (SMN)“-Protein (BARTH, 2003), einem essentiellen Spleißfaktor, sowie der „DEAD-Box“-Helikase DDX20 (DP103/ Gemin3) (GRUNDHOFF, 1999). SMN liegt im Nukleus in so genannten *gems* (*gemini of coiled bodies*) vor und nimmt als Teil dieses Komplexes mittels vielfacher Interaktionen direkten und indirekten Einfluss auf die Biogenese und den Metabolismus von RNS (PELLIZZONI, 1998; LORSON, 1999; CAMPBELL, 2000; MOURELATOS, 2001; ROSSOLL, 2002). Die humanen DEAD-Box Proteine sind wegen ihrer Rolle als wichtige Mediatoren RNS-metabolisierender Prozesse (MOUILLET, 2008) und ihrer Funktion als RNS-Helikasen (YAN, 2003) interessante Ziele viraler Proteine, die Einfluss auf die Genexpression haben (HESTER, 2007).

DISKUSSION

Ziel dieser Arbeit war die Bestätigung der im Hefe-Zwei-Hybrid System (FIELDS, SONG, 1989) gezeigten Interaktion von EBNA2 mit dem humanen nukleären Ribonukleoprotein M2 (hnRNP-M2), da dieses Protein ebenfalls am RNS-Metabolismus beteiligt ist (KAFASLA, 2002; KIESLER, 2005; HASE, 2006; HOVANNISYAN, 2007; JAIN, 2008). Mittels Hefe-Zwei-Hybrid-*Screening*verfahren können mit einer cDNS-Bank mögliche Interaktionspartner identifiziert werden (CHIEN, 1991). Versuche, die vermutete Bindung von EBNA2 an hnRNP-M2 in Präzipitationsverfahren zu bestätigen, schlugen aufgrund der ausgeprägten *Klebrigkeit* des hnRNP-M2 fehl und machten somit die Bestätigung der Hefe-Experimente auf diesem Wege unmöglich. (HILLE, GRÄSSER, unveröffentlicht).

Im Rahmen dieser Arbeit sollten EBNA2 sowie Deletionsmutanten des EBNA2 in den BiFC Expressionsvektor kloniert und ein Nachweis der Interaktion des EBNA2 mit dem hnRNP-M2 erbracht werden. Das zu dieser Zeit noch relativ neue Verfahren der bimolekularen Fluoreszenz-Komplementation (BiFC) (HU, 2002; KERPPOLA, 2006) schien im Hinblick auf die mit dem hnRNP-M2 aufgetretenen Schwierigkeiten der ideale Ansatz, die vermutete Bindung des EBNA2 mit dem hnRNP-M2 zu bestätigen. Hatten die molekularen Eigenschaften des hnRNP-M2, dessen ausgeprägte *Klebrigkeit*, die jeweiligen *in vitro*-Bindungsstudien so sehr gestört, dass keinerlei reproduzierbare Aussage getroffen werden konnte, bot das neue Verfahren die Möglichkeit die Interaktion *in vivo* zu zeigen. Die Fluoreszenz kann im Fluoreszenzmikroskop ohne die Zellen zerstören zu müssen detektiert werden.

Kerppola et al. benutzten in ihrem Originalassay als Positivkontrolle die zwei Transkriptionsfaktoren *c-fos* und *c-jun*. Diese beiden Proteine tragen als molekulare Besonderheit jeweils eine so genannte bZIP- Domäne, auch Leucin-Zipper genannt (LANDSCHUTZ, 1988). Sie wird in vielen eukaryotischen DNS-Bindungsproteinen gefunden und dient der Dimerisierung von Proteinen (s. 2.8.). Die Interaktion von *c-jun* und *c-fos* ist daher durch eine hohe Affinität und Stabilität gekennzeichnet. Die Autoren gingen nach einer Reihe Versuchen in ihrer Originalpublikation davon aus, dass allein eine Annäherung der beiden zu untersuchenden Interaktionspartner auf eine Distanz von circa 10 nm ausreicht, um eine Rekonstitution des Fluorophors zu gewährleisten. Eindeutiger Vorteil des Verfahrens war somit, dass weder die genaue Art noch der genaue subzelluläre Ort der vermuteten Interaktion bekannt sein muss. Des Weiteren bietet das Verfahren die Möglichkeit

DISKUSSION

die Interaktion zweier Proteine an ihrem natürlichen Ort und in nahezu natürlichen Mengen nachzuweisen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden mehrere Deletionsvarianten des EBNA2 hergestellt um mögliche negative Einflüsse der Proteingröße einerseits und die Tertiärstruktur beeinflussender Bereiche andererseits auf die spätere Bindung auszuschließen. Diese wurden jeweils in den C-terminalen Teil des BiFC-Vektors kloniert. Dieser enthält die Basensequenz einer Hälfte des Fluorophors des Grün Fluoreszierenden Proteins. Die Konstrukte wurden in humanen embryonalen Nierenzellen der Zelllinie 293, die durch humanes Adenovirus 5 transformiert wurden (GRAHAM, 1977), exprimiert. Die Expressionsprodukte wurden in der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page) (SAMBROOK, 1989) aufgetrennt. Nach Anfärbung mit dem im Carboxylterminus des EBNA2 spezifisch bindenden monoklonalen Antikörpers R3, zeigten sich jeweils Banden der zu erwartenden Größe. Analog wurde bei der Erstellung des komplementären BiFC-Vektors vorgegangen. Nach der Amplifikation durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR), wurden sowohl der N-terminale Teil des BiFC-Vektors, als auch das PCR-Amplifikat des hnRNP-M2, korrelierenden Restriktionsenzymverdau unterzogen und ligiert. Der Expressionsvektor wurde ebenfalls in 293-Zellen transfiziert. Das Expressionsprodukt wurde über SDS-PAGE aufgetrennt. Die Färbung erfolgte mit dem spezifisch im GFP bindenden monoklonalen Antikörper α GFP. Anstatt der zu erwartenden Bande von circa 90 kDa, zeigte sich hier überraschenderweise eine singuläre Bande bei circa 68 kDa. Die komplette Versuchsreihe wurde mehrfach durchgeführt wobei alle Arbeitsschritte auf mögliche Fehlerquellen untersucht wurden. Das *DNS-Template* des hnRNP-M war bereits in anderen Testreihen unserer Arbeitsgruppe ohne Probleme benutzt worden. Die korrekte Primärstruktur des *Templates* war bereits im Vorfeld bestätigt worden. Alle Kontrollen bestätigten sowohl den korrekten Restriktionsverdau als auch die korrekte Orientierung des Moleküls im Vektor. Auch in den wiederholten Versuchsreihen lief das Konstrukt im Western-Blot auf einer Höhe von 68 kDa. Abb. 5.13. zeigt einen exemplarischen Blot. Der Grund für die abweichende Bandengröße konnte nicht abschließend geklärt werden. Wir vermuten, dass es posttranskriptionell zu einer nicht vorhergesehenen Veränderung der Tertiärstruktur des gesamten Proteins kommt. Solche Faltungen sind bei größeren Proteinen nicht unüblich. Auch das in dieser Arbeit verwendete EBNA2 zeigt im Western Blot eine von der rechnerischen Größe abweichende Laufgeschwindigkeit (berechnetes Molekulargewicht: 52 kDa, Laufverhalten im SDS-Gel: 85 kDa). EBNA2 besitzt mit ca. 25% einen hohen Gehalt

DISKUSSION

der Aminosäure Prolin. Bedingt durch ihre molekulare Struktur, hat die Aminosäure Prolin besonderen Einfluss auf die Tertiärstruktur des Proteins. Lange Ketten dieser Aminosäure versteifen ein Protein, es wird unflexibel (s. Abb. 6.1.).

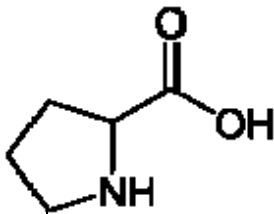


Abbildung 6.1 Aminosäure Prolin. Sie hat besonderen Einfluss auf die Tertiärstruktur von Proteinen, da sie Helices wie auch Faltblattstrukturen unterbrechen kann. Sie findet sich gehäuft am Übergang zwischen alpha-Helices und geraden Abschnitten.

Gerade diese gewisse Flexibilität wird aber in der BiFC benötigt damit die beiden Termini des YFP interagieren können und der Fluorophor rekonstituiert werden kann. Kerppola et al. gehen davon aus, dass wenigstens 10 nm zwischen den C- und N-Fragment bestehen sollten, um diese Flexibilität zu gewährleisten (HU, 2002).

Herr PD Dr. Schmid aus dem Physiologischen Institut der Universität Des Saarlandes in Homburg führte für uns die eigentliche Bimolekulare Fluoreszenz-Komplementation durch. Die aufgereinigten Konstrukte wurden nun wiederum in GP293 Zellen transfiziert. Bei Rekonstitution des Fluorophors durch die Interaktion der Konstrukte, erwarteten wir einen Fluoreszenznachweis im nukleären Kompartiment der Zellen. Fluoreszenzmikroskopisch konnte allerdings zu keinem Zeitpunkt eine, die Interaktion der beiden Teile des Fluorophors bestätigende Fluoreszenz, detektiert werden.

Geht man von einer posttranskriptionellen Veränderung der Tertiärstruktur des Konstruktes aus, kann nicht nur von veränderten Laufeigenschaften im elektrischen Feld des Western Blots, sondern auch von stark abweichenden Bindungseigenschaften des Proteins ausgegangen werden. Faltungen oder andere Veränderungen in der Struktur von größeren Proteinen, können deren Bindungseigenschaften gänzlich verändern. Eine vormals erreichbare Bindungsstelle kann nun verdeckt sein, neue Bindungsstellen können freigelegt werden. Daher ist es durchaus möglich, dass es zu einer Beeinflussung der Bindungsstelle von hnRNP-M und EBNA2 gekommen ist, welche deren Interaktion nun verhindert. Eine Bestätigung der Y2H Ergebnisse wäre wegen der veränderten Versuchsbedingungen nicht mehr möglich.

DISKUSSION

Des Weiteren bleibt hinzuzufügen, dass zu diesem Zeitpunkt die eindeutigen Ergebnisse mit dem BiFC-System von Kerppola et al. auch bei anderen putativen oder schon bestätigten Interaktionspartnern zu keinem Zeitpunkt reproduziert werden konnten. Schienen das Verfahren und die von Kerppola et al. veröffentlichten Ergebnisse auch eindeutig zu sein, blieben selbst die als positiv gewerteten Ergebnisse von der Stärke der Fluoreszenz und damit der Eindeutigkeit der Ergebnisse hinter den Erwartungen zurück. Ungeklärt bleibt außerdem die relevante Frage der Dauer und Reversibilität der Komplexbildung im BiFC-System. Unter *in vitro* Bedingungen scheint die Komplexbildung prinzipiell irreversibel zu sein (HU, 2002; KERPPOLA, 2006). Es gibt heute allerdings vermehrt Hinweise, dass die Bindung *in vivo* reversibel sein kann (SCHMIDT, 2003; GUO, 2005). Schmid et al. beobachteten im Verlauf ihrer Versuche eine rapide Abnahme der BiFC-Fluoreszenz, was auf die Auflösung des BiFC-Komplexes zurückgeführt werden konnte (ANDERIE, 2007). Was heute als Vorteil genutzt werden kann um reversible Prozesse mittels Videoanalyse zu studieren, war zum Zeitpunkt dieser Arbeit nicht bekannt und somit eine mögliche Fehlerquelle, da die Stärke des gemessenen Fluoreszenzsignals negativ zum zeitlichen Abstand zur Transfektion korrelierte, diese Korrelation als solche aber keinen Eingang in die Analyse der Messdaten fand.

6.2. Ausblick

Im Rahmen der Weiterentwicklung und des Zugewinns an Erfahrung mit dem BiFC-System wird sich zeigen, inwiefern dieses in der Theorie so anschauliche Assay zum Nachweis von *in vivo* Interaktionen genutzt werden kann. Auf die besonders günstigen Bedingungen im Rahmen der Originalarbeit ist bereits mehrfach eingegangen worden. Fraglich war stets, ob die eindeutigen Ergebnisse von Kerppola et al. ohne weiteres auf andere, nur vermutete Interaktionspartner übertragen werden können. Die im Originalassay benutzten Bindungspartner *c-fos* und *c-jun* sind zelluläre Transkriptionsfaktoren, die in ihrem normalen Milieu über eine so genannte Leucin-Zipper-Domäne dimerisieren. Daneben bieten sie beiden Termini des BiFC Systems eine gewisse Flexibilität, die benötigt wird, damit beide Teile des Fluorophors interagieren können. Wie sich das System bei Interaktionen schwacher Affinität und möglicherweise deutlich größerer räumlicher Distanz verhält, war schwer vorzusagen.

DISKUSSION

Basierend auf der Vermutung, dass möglicherweise die räumliche Anordnung der Bindungspartner bei der Interaktion weniger Toleranz erlaubt als zunächst vermutet, wäre zu überlegen, ob neue Bindungsstudien mit verkürzten Mutanten, die mehr Flexibilität für die die zwei Hälften des Fluorophors tragenden N- und C-Termini erlauben, den Bindungsnachweis erleichterte. Erste verkürzte Varianten des EBNA2 wurden im Rahmen dieser Arbeit erstellt. Auch die Einbeziehung der natürlichen Spleißvarianten des hnRNP-M2, hnRNP-M1-4, in die Bindungsstudien, erbrächte möglicherweise ergänzende Informationen zur Natur der Interaktion der hier vermuteten Bindungspartner. Gleichzeitig wären durch dieses Vorgehen die an der Bindung teilnehmenden Domänen der Proteine genauer zu ermitteln. Da weitere Hinweise aus dem Hefe-Zwei-Hybrid System auf die Interaktion von EBNA2 mit weiteren RNS-bindenden Proteinen vorliegen, sollten die in dieser Arbeit vorgelegten Expressionsvektoren auch bei der Sichtung weiterer möglicher Interaktionspartner des EBNA2 eingesetzt werden.

Abschließend, und besonders im Lichte der Tatsache, dass die Interaktion der EBNA2-Konstrukte mit dem hnRNP-M2 sich bereits mehreren Nachweisstudien entzogen hat, muss natürlich erneut darauf hingewiesen werden, dass der ursprüngliche Hinweis auf die Interaktion dem Hefe-Zwei-Hybrid-System entstammt, einem durchaus falsch positive Ergebnisse produzierenden und daher vorwiegend dem *Screening* dienenden Verfahren.

7. Literaturverzeichnis

1. **Akagi T, Kamei D, Tsuchiya N, Nishina Y, Horiguchi H, Matsui M, Kamma H, Yamada M (2000)** Molecular characterization of a mouse human nuclear ribonucleoprotein D-like protein JKTBP and its tissue-specific expression. *Gene* 245: 267-273.
2. **Anderie I, Schmid A (2007)** In vivo visualization of actin dynamics and actin interactions by BiFC. *Cell Biol Int* 31: 1131-1135.
3. **Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ (1999)** Notch signalling: cell fate control and signal interaction in development. *Science* 284: 770-776.
4. **Bajenova O, Stolper E, Gapon S, Sundina N, Zimmer R, Thomas P (2003)** Surface expression of heterogeneous nuclear RNA binding protein M4 on Kupfer cell relates to its function as a carcinoembryonic antigen receptor. *Exp Cell Res* 291: 228-241.
5. **Barth S, Liss M, Voss MD, Dobner T, Fischer U, Meister G, Graesser FA (2003)** Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 binds via its methylated arginine-glycine repeat to the survival motor neuron protein. *J Virol* 77: 5008-5013.
6. **Birnboim HC, Doley J (1979)** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 3: 1513-1523.
7. **Bornkamm GW, Hudewentz J, Freese UK, Zimmer U (1982)** Deletion of the non-transforming Epstein-Barr virus strain P3HR-1 causes fusion of the large internal repeat to the DSL region. *J Virol* 43: 952-968.
8. **Brock TD, Freeze H (1969)** *Thermus aquaticus* gen. n. and sp. n., a nonsporulating extreme thermophile. *J Bacteriol* 98: 289-97
9. **Burkitt D (1958)** A sarcoma involving the jaws in African children. *Br J Surg* 46: 218-223.
10. **Burnette WN (1981)** "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem* 112: 195-203.

LITERATURVERZEICHNIS

11. **Campbell L, Hunter KM, Mohaghegh P, Tinsley JM, Brasch MA, Davies KE (2000)** Direct interaction of Smn with dp103, a putative RNA helicase: a role for Smn in transcription regulation?. *Hum Mol Genet* 9: 1093-1100.
12. **Chaconas G, van den Sande JH (1980)** 5`-32P-labelling of RNA and DNA restriction fragments. *Methods Enzymol* 65: 75-85.
13. **Chang Y, Cesarman E, Pessin MS, Lee F, Culpepper J, Knowles DM, Moore PS (1994)** Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Science* 266: 1865-1869.
14. **Charroux B, Pellizzoni L, Perkinsao RA, Shevchenko A, Mann M, Dreyfuss G (1999)** Gemin3: A novel DEAD box protein that interacts with SMN, the spinal muscular atrophy gene product, and is a component of gems. *J Cell Biol* 147: 1181-1194.
15. **Chau CM, Deng Z, Kang H, Lieberman PM (2008)** Cell cycle association of the retinoblastoma protein Rb and the histone demethylase LSD1 with the Epstein-Barr virus latency promoter Cp. *J Virol* 82: 3428-3437.
16. **Chien CT, Bartel PL, Sternglanz R, Fields S (1991)** The two-hybrid system: a method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 9578-9582.
17. **Christensen T (2006)** The role of EBV in MS pathogenesis. *Int MS J* 13: 52-57.
18. **Cohen JI, Wang F, Kieff E (1991)** Epstein- Barr virus nuclear protein 2 mutations define essential domains for transformation and transactivation. *J Virol* 65: 2545-2554.
19. **Cohen JI, Wang F, Mannick J, Kieff E (1989)** Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 is a key determinant of lymphocyte transformation. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 9558-9562.
20. **Datar KV, Dreyfuss G, Swanson MS (1992)** The human hnRNP-M proteins: identification of a methionine/arginine-rich repeat motif in ribonucleoproteins. *Nucl Acids Res* 21: 439-446.
21. **Dreyfuss G, Kim VN, Kataoka N (2002)** Messenger-RNA binding proteins and the messages they carry. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3: 195-205.
22. **Dreyfuss G, Matunis MJ, Pinol-Roma S, Burd CG (1993)** hnRNP proteins and the biogenesis of mRNA. *Annu Rev Biochem* 62: 289-321.

LITERATURVERZEICHNIS

23. **Dugaicyk A, Boyer HW, Goodman HM (1975)** Ligation of EcoR1 endonuclease generated DNA fragments into linear and circular structures. *J Mol Biol* 96: 171-184.
24. **Epstein MA, Barr YM, Achong BG (1964)** A second virus-carrying tissue culture strain (EB2) of lymphoblasts from burkitt's lymphoma. *Pathol Biol* 12: 1233-1234.
25. **Fields S, Song O (1989)** A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 340: 245-246.
26. **Freund, M, Asang C, Kammler S, Konermann C, Krummheuer J, Hipp M, Meyer I, Gierling W, Theiss S, Preuss T, Schindler D, Kjems J, Schaal H (2004)** A novel approach to describe a U1 snRNA binding site. *Nucleic Acids Res* 31: 6963 – 6975.
27. **Friesen WJ, Dreyfuss G (2000)** Specific sequences of the Sm and Sm-like (Lsm) proteins mediate their interaction with the spinal muscular atrophy disease gene product (SMN). *J Biol Chem* 275: 26370-26375.
28. **Gale CR, Martyn CN (1995)** Migrant studies in multiple sclerosis. *Prog Neurobiol* 47: 425-448.
29. **Gattoni R, Mahe D, Mahl P, Fischer N, Mattei MG, Stevenin J, Fuchs JP (1996)** The human hnRNP proteins: structure and relation with early heat shock-induced splicing arrest and chromosome mapping. *Nucleic Acids Res* 24: 2535-2542.
30. **Glover JN, Harrison SC (1995)** Crystal structure of the heterodimeric bZIP transcription factor c-Fos-cJun bound to DNA. *Nature* 373: 257-261.
31. **Graham FL, Smiley J, Russel WC, Nairn R (1977)** Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 36: 59-74.
32. **Graham FL, van der Eb AJ (1973)** Transformation of rat cells by DNA of human adenovirus 5. *Virology* 54: 536-39.
33. **Grossmann SR, Johannsen E, Tong X, Yalamanchili R, Kieff E (1994)** The Epstein-Barr virus nuclear protein 2 transactivator is directed to response elements by the J kappa recombination signal binding protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 1332-1336.
34. **Grundhoff AT, Kremmer E, Tureci O, Glieden A, Gindorf C, Atz, J, Mueller-Lantzsch N, Schubach WH, Graesser F (1999)** Characterization of DP103, a

LITERATURVERZEICHNIS

- novel DEAD box protein that binds to the Epstein-Barr virus nuclear proteins EBNA2 and EBNA3C. *J Biol Chem* 274: 19136-19144.
35. **Guo Y, Rebecchi M, Scarlata S (2005)** Phospholipase Cbeta2 binds to and inhibits phospholipase Cdelta1. *J Biol Chem* 280: 1438-1447.
 36. **Hammerschmidt W, Sugden B (1989)** Genetic analysis of immortalizing functions of Epstein-Barr virus in human B-lymphocytes. *Nature* 340: 393-397.
 37. **Harada S, Yalamanchili R, Kieff E (1998)** Residues 231-280 of Epstein-Barr virus nuclear protein 2 are not essential for primary B-lymphocyte growth transformation. *J Virol* 72: 9948-9954.
 38. **Hase ME, Yalamanchili P, Visa N (2006)** The Drosophila heterogeneous nuclear ribonucleoprotein, HRP59, regulates alternative splicing and controls the production of its own mRNA. *J Biol Chem* 281: 39135-39141.
 39. **Hayward SD (2004)** Viral interactions with the Notch pathway. *Semin Cancer Biol* 14: 387-396.
 40. **Henkel T, Hinkel PD, Hayward SD, Peterson MG (1994)** Mediation of Epstein-Barr virus EBNA2 transactivation by recombination signal binding protein J kappa. *Science* 265: 92-95.
 41. **Henle G, Henle W, Clifford P, Diehl V, Kafuko GW, Kirya BG, Klein G, Morrow RH, Munube GM, Pike P, Tukei PM, Ziegler JL (1972)** Antibodies to Epstein-Barr virus in Burkitt's lymphoma and control groups. *J Natl Cancer Inst* 43: 1147-1157.
 42. **Henle G, Henle W, Diehl V (1968)** Relation of Burkitt's tumor-associated herpes-type virus to infectious mononucleosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 59: 94-101.
 43. **Henle W, Diehl V, Kohn G, Zur Hausen H, Henle G (1967)** Herpes virus and chromosome marker in normal leukocytes after growth with irradiated Burkitt cells. *Science* 157: 1064-1065.
 44. **Hester KD, Verhelle D, Escoubet-Lozach L, Luna R, Rose DW, Glass CK (2007)** Differential repression of c-myc and cdc2 gene expression by ERF and PE-1/METS. *Cell Cycle* 6: 1594-1604.
 45. **Hodgkin T (1973)** Classics in Oncology. Excerpts from: On some morbid appearances of the adsorbent glands and spleen (1832). *CA Cancer J Clin* 23: 54-60.

LITERATURVERZEICHNIS

46. **Höfelmayr H, Strobl LJ, Marschall G, Bornkamm GW, Zimmer-Strobl U (2001)** Activated Notch1 can transiently substitute for EBNA2 in the maintenance of proliferation of LMP1-expressing immortalized B-cells. *J Virol* 75: 2033-2040.
47. **Hovhannisyan RH, Carstens RP (2007)** Heterogenous Ribonucleoprotein M Is a Splicing Regulatory Protein That Can Enhance or Silence Splicing of Alternatively Spliced Exons. *J Biol Chem* 50: 36265-36274.
48. **Hsieh JJ, Henkel T, Salmon P, Robey E, Peterson MG, Hayward SD (1996)** Truncated mammalian Notch1 activates CBF1/RBP-J kappa-repressed genes by a mechanism resembling that of Epstein-Barr virus EBNA2. *Mol Cell Biol* 16: 952-959.
49. **Hu CD, Chinenov Y, Kerppola TK (2002)** Visualization of interactions among bZIP and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation. *Molecular Cell* 9: 789-798.
50. **Jain RA, Gavis ER (2008)** The Drosophila hnRNP M homolog Rumpelstiltskin regulates naos mRNA localization. *Development* 135: 973-982.
51. **Jarriault S, Brou C, Logeat F, Schroeter EH, Kopan R, Israel A (1995)** Signalling downstream of activated mammalian Notch. *Nature* 377: 355-358.
52. **Jeang HT, Hayward SD (1983)** Organization of the Epstein-Barr virus DNA molecule III. Location of the P3HR-1 deletion junction and characterization of the Not1 repeat units that form part of the template for an abundant 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced mRNA transcript. *J Virol* 48: 135-148.
53. **Jochner N, Eick D, Zimmer-Strobl M, Pawlita G, Bornkamm W, Kempkes B (1996)** Epstein-Barr-Virus nuclear antigen 2 is a transcriptional suppressor of the immunoglobulin mu gene: implications for the expression of the translocated c-myc gene in Burkitt's lymphoma cells. *EMBO J* 15: 375-382.
54. **Johanssen E, Koh E, Mosialos G, Tong X, Kieff E, Grossmann SR (1995)** Epstein-Barr virus nuclear protein 2 transactivation of the latent membrane protein 1 promoter is mediated by J kappa and PU.1. *J Virol* 69: 253-262.
55. **Johanssen E, Miller CL, Grossman SR, Kieff E (1996)** EBNA2 and EBNA3C extensively and mutually exclusively associate with RBPJk in Epstein-Barr virus transformed B-lymphocytes. *J Virol* 70: 4179-4183.

LITERATURVERZEICHNIS

56. **Kafsala P, Patrino-Georgoula M, Guialis A (2000)** The 72/74-kDa polypeptides of the 70-110 S large heterogeneous ribonucleoprotein complex (LH-RNP) represent a discrete subset of the hnRNP M protein family. *Biochem J* 350: 495-503.
57. **Kafsala P, Patrino-Gergoula M, Lewis JD, Guialis A (2002)** Association of the 72/74-kDa proteins, members of the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M group, with the re m-RNA at early stages of spliceosome assembly. *Biochem J* 63: 793-799.
58. **Kamei D, Tsuchiya N, Yamazaki M, Meguro H, Yamada M (1999)** Two forms of expression and genomic structure of the human heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D-like JKTBP gene (HNRPDL). *Gene* 228: 13-22.
59. **Kaye KM, Izumi KM, Kieff E (1993)** Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 is essential for B-lymphocyte growth transformation. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 9150-9154.
60. **Keegan TH, Glaser SL, Clarke CA, Gulley ML, Craig FE, Diguseppe JA, Dorfmann RF, Mann RB, Ambinder RF (2005)** Epstein-Barr virus as a marker of survival after Hodgkin`s lymphoma: a population based study. *J Clin Oncol* 23: 7604-7613.
61. **Kempkes B, Spitkovsky D, Jansen-Durr P, Ellwart JW, Kremmer E, Delecluse HJ, Rottenberger C, Bornkamm DW, 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.
62. **Kerppola TK (2006)** Design and implementation of bimolecular fluorescence complementation (BiFC) assays for the visualization of protein interactions in living cells. *Nat Protoc* 1: 1278-1286.
63. **Kidd S, Lieber T, Young MW (1998)** Ligand-induced cleavage and regulation of nuclear entry of Notch in *Drosophila melanogaster* embryos. *Genes Dev* 12: 3728-3740.
64. **Kiesler E, Hase ME, Brodin D, Visa N (2005)** Hrp59, an hnRNP M protein in *Chironomus* and *Drosophila*, binds to exonic splicing enhancers and is required for a subset of mRNAs. *J Cell Biol* 168: 1013-1025.

LITERATURVERZEICHNIS

65. **Kilger E, Kieser A, Gires O, Ueffing M, Kolch W, Hammerschmidt W (1998)** Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 triggers AP-1 activity via the c-Jun N-terminal kinase cascade. *EMBO J* 16: 6478-6485.
66. **Kirby KS (1957)** A new method for the isolation of deoxyribonucleic acids: evidence of the nature of bonds between deoxynucleotide and protein. *Biochem J* 66: 495-504.
67. **Konforte D, Simard N, Paige CJ (2008)** Interleukin-21 regulates expression of key Epstein-Barr virus oncoproteins, EBNA2 and LMP1, in infected human B cells. *Virology* 374: 100-113.
68. **Krecic AM, Swanson MS (1999)** HnRNP complexes: composition, structure and function. *Curr Opin Cell Biol* 11: 363-371.
69. **Kremmer E, Kranz B, Hille A, Klein K, Eulitz M, Hoffmann-Fezer G, Feiden W, Herrmann K, Delecluse HJ, Delsol G, Bornkamm GW, Mueller-Lantzsch N, Graesser FA (1995)** Rat monoclonal antibodies differentiating between the Epstein-Barr virus nuclear antigens 2A (EBNA2A) and 2B (EBNA2B). *Virology* 208: 336-342.
70. **Kubota N, Wada K, Ito Y, Shimoyama Y, Nakamura S, Nishiyama Y, Kimura H (2008)** One-step multiplex real-time PCR assay to analyse the latency patterns of Epstein-Barr virus infection. *J Virol Methods* 147: 26-36.
71. **Laguinge L, Bajenova O, Bowden E, Sayyah J, Thomas P, Juhl H (2005)** Surface expression of hnRNP M4 protein in HT29 colon cancer cells. *Anticancer Res* 25: 23-31.
72. **Lai EC (2002)** Keeping a good pathway down: transcriptional repression of Notch pathway target genes by CSL proteins. *EMBO Rep* 3: 840-845.
73. **Landschutz WH, Johnson PF, McKnight SL (1988)** The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science* 240: 1759-1764.
74. **Laux G, Dugrillon F, Eckert C, Adam B, Zimmer-Strobl U, Bornkamm GW (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* 69: 6947-6958.

LITERATURVERZEICHNIS

75. **Lederberg SM, Cohen SN (1974)** Transformation of Salmonella Typhimurium by plasmid deoxyribonucleic acid. *J. Bacteriol* 119: 1072-74.
76. **Ling PD, Rawlins DR, Hayar SD (1993a)** The Epstein-Barr virus immortalizing protein EBNA2 is targeted to DNA by a cellular enhancer-binding protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 9237-9241.
77. **Ling PD, Ryon JJ, Hayward SD (1993b)** EBNA2 of herpesvirus papio diverges significantly from the type A and type B EBNA2-proteins of Epstein-Barr virus but retains an efficient transactivation domain with a conserved hydrophobic motif. *J Virol* 67: 2990-3003.
78. **Lorson CL, Hahnen E, Androphy EJ, Wirth B (1999)** A single nucleotide in the SMN gene regulates the splicing and is responsible for spinal muscular atrophy. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 6307-6311.
79. **Lucchesi W, Brady G, Dittrich-Breiholz O, Kracht M, Russ, R, Farrell PJ (2008)** Differential gene regulation by Epstein-Barr virus type 1 and 2 EBNA2. *J Virol* 82: 7456-7466.
80. **McNeil GP, Zhang X, Genova G, Jackson FR (1998)** A molecular rhythm mediating circadian clock output in *Drosophila*. *Neuron* 20: 297-303.
81. **Meister G, Bulhler D, Laggerbauer B, Zobawa M, Lottspeich F, Fischer U (2000)** Characterization of a nuclear 20S complex containing the survival of motor neurons (SMN) protein and a specific subset of spliceosomal Sm proteins. *Hum Mol Genet* 9: 1093-1100.
82. **Middleton T, Gahn, TA, Martin JM, Sugden B (1991)** Immortalizing genes of Epstein-Barr virus. *Adv Virus Res* 40: 19-55.
83. **Miller G, Robinson J, Heston L, Lipman M (1974)** Differences between laboratory strains of Epstein-Barr virus based on immortalization, abortive infection and interference. *Proc Natl Acad Sci USA* 71: 4006-4010.
84. **Modrow S, Falke D, Truyen U (2003)** *Molekulare Virologie*. 2. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg Berlin.
85. **Morgan TH (1911)** The origin of nine wing mutations in *drosophila*. *Science* 33: 496-499.
86. **Mouillet J-F, Yan X, Ou Q, Jin L, Muglia LJ, Crawford P, Sadovsky Y (2008)** DEAD-Box Protein-103 (DP103, Ddx20) Is Essential for Early Embryonic

LITERATURVERZEICHNIS

87. **Mourelatos Z, Abel L, Yong J, Kataoka N, Dreyfuss G (2001)** SMN interacts with a novel family of hnRNP and spliceosomal proteins. *EMBO J* 20: 5443-5452.
88. **Mullis KB, Faloona FA (1987)** Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155: 335-350.
89. **Mumm JS, Kopan R (2000)** Notch signalling: from the outside in. *Dev Biol* 228: 151-165.
90. **Newby LM, Jackson FR (1996)** Regulation of a specific circadian clock output pathway by lark, a putative RNA-binding protein with repressor activity. *J Neurobiol* 31: 117-128.
91. **Niedermann JC, McCollum RW, Henle G, Henle W (1968)** Infectious mononucleosis. Clinical manifestations in relation to EB virus antibodies. *JAMA* 203: 205-209.
92. **Nonoyama M, Huang CH, Pagano JS, Klein G, Singh S (1973)** DNA of Epstein-Barr virus detected in tissue of Burkitt's lymphoma and nasopharyngeal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 70: 3265-3268.
93. **Ormö M, Cubitt AB, Kallio K, Gross LA, Tsien RY, Remington SJ (1996)** Crystal structure of the Aequorea Victoria green fluorescent protein. *Science* 273: 1392-1395.
94. **Pellizzoni L, Charroux B, Rappsilber J, Mann M, Dreyfuss G (2001)** A functional interaction between the survival motor neuron complex and RNA polymerase II. *J Cell Biol* 152: 75-85.
95. **Pellizzoni L, Kataoka N, Charroux B, Dreyfuss G (1998)** A novel function for SMN, the spinal muscular atrophy gene product, in pre-mRNA splicing. *Cell* 95: 615-624.
96. **Pope JH, Horne MK, 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.
97. **Rickinson AB, Kieff E (1996)** Epstein-Barr Virus. In: Fields B, Knipe DM, Howley PM (eds) *Virology*, Lippincot-Raven, Philadelphia.

LITERATURVERZEICHNIS

98. **Rossoll W, Kroening, A-K, Ohndorf U-M, Steegborn C, Jablonka S, Sendtner M (2002)** Specific interaction of Smn, the spinal muscular atrophy determining gene product, with hnRNP-R and gry-rbp/hnRNP-Q: a role for Smn in RNA processing in motor axons? *Hum Mol Genet* 11: 93-105.
99. **Roulland-Dussoix D, Boyer HW (1969)** The Escherichia coli B restriction endonuclease. *Biochem Biophys Acta* 195: 219-29.
100. **Sakai T, Taniguchi Y, Tamura K, Minoguchi S, Fukuhara T, Strobl LJ, Zimmer-Strobl U, Bornkamm GW, Honjo T (1998)** Functional replacement of the intracellular region of the Notch1 receptor by Epstein-Barr virus nuclear antigen 2. *J Virol* 72: 6034-6039.
101. **Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989)** *Molecular cloning: A laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
102. **Schaffner A, Ruef C (1999)** Virale Infektionen. In: Alexander K, Daniel W, Diner H-C, Freund M, Köhler H, Matern S, Maurer H, Michel B, Nowak D, Risler T, Schaffner A, Scherbaum W, Sybrecht GW, Wolfram G, Zeitz M (eds) *Thiemes Innere Medizin: TIM*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart New York
103. **Schmidt C, Peng B, Li Z, Sclabas GM, Fujioka S, Niu J (2003)** Mechanisms of proinflammatory cytokine induced biphasic NF-kappaB activation. *Mol Cell* 12: 1287-1300.
104. **Schroeter EH, Kisslinger JA, Kopan R (1998)** Notch-1 signalling requires ligand induced proteolytic release of intracellular domain. *Nature* 393: 382-386.
105. **Sgramella V, van den Sande JH, Khorana HG (1970)** Studies on polynucleotides: a novel joining reaction catalysed by T4 polynucleotide ligase. *Proc Natl Acad Sci USA* 67: 1468-1475.
106. **Sinclair AJ, Palmero I, Peters G, Farrell PJ (1994)** EBNA2 and EBNA-LP cooperate to cause G0 to G1 transition during immortalization of resting human B lymphocytes by Epstein-Barr virus. *EMBO J* 13: 3321-3328.
107. **Tiwawech D, Srivatanakul P, Karalak A, Ishida T (2008)** Association between EBNA2 and LMP1 subtypes of Epstein-Barr virus and nasopharyngeal carcinoma in Thais. *J Clin Virol* 42: 1-6.

LITERATURVERZEICHNIS

108. **Tomkinson B, Kieff E (1992)** Second-site homologous recombination in Epstein-Barr virus: insertion of type 1 EBNA3 genes in place of type 2 has no effect on in vitro infection. *J Virol* 66: 780-789.
109. **Tomkinson B, Robertson E, Kieff E (1993)** Epstein-Barr virus nuclear protein EBNA3-A and EBNA3-C are essential for B-Lymphocyte growth transformation. *J Virol* 67: 2014-2025.
110. **Tong X, Drapkin R, Reinberg D, Kieff E (1995a)** The 62- and 80 kDa subunits of transcription factor IIIH mediate the interaction with Epstein-Barr virus nuclear protein 2. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 3259-3263.
111. **Tong X, Drapkin R, Yalamanchili R, Mosialos G, Kieff E (1995b)** The Epstein-Barr virus nuclear protein 2 acidic domain forms a complex with a novel cellular coactivator that can interact with TFIID. *Mol Cell Biol* 15: 4735-4744.
112. **Tong X, Wang F, Thut C J, Kieff E (1995c)** The Epstein-Barr virus nuclear protein 2 acidic domain can interact with TFIIB, TAF 40 and RPA 70 but not with TATA-binding protein. *J Virol* 69: 585-588.
113. **Tong X, Yalamanchili R, Harada S, Kieff E (1994)** The EBNA2 arginyl-glycine domain is critical but not essential for B-lymphocyte growth transformation; the rest of region 3 lacks essential interactive domains. *J Virol* 68: 6188-6197.
114. **Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979)** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 4350-4354.
115. **Tsien RY (1998)** The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem* 67: 509-544.
116. **Tsuchiya N, Kamei D, Takano A, Matsui T, Yamada M (1998)** Cloning and characterization of a cDNA encoding a novel heterogeneous nuclear ribonucleoprotein-like protein and its expression in myeloid leukaemia cells. *J Biochem (Tokyo)* 123: 499-507.
117. **Voss MD, Hille A, Barth S, Spurk A, Hennrich F, Holzer D, Mueller-Lantzsch N, Kremmer E, Grässer FA (2001)** Functional cooperation of Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 and the Survival Motor Neuron protein in transactivation of the viral LMP1 promoter. *J Virol* 75: 11781-11790.

LITERATURVERZEICHNIS

118. **Waltzer L, Logeat F, Brou C, Israel A, Sergeant A, Manet E (1994)** The human J kappa recombination signal sequence binding protein (RBP-J kappa) targets the Epstein-Barr virus EBNA2 protein to its DNA responsive elements. *EMBO J* 13: 5633-5638.
119. **Wang L, Grossmann SR, Kieff E (2000)** Epstein-Barr virus nuclear protein 2 interacts with p300, CBP and PCAF histone acetyltransferases in activation of the LMP1 promoter. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 430-435.
120. **Wu DY, Kalpana GV, Goff SP, Schubach WH (1996)** Epstein-Barr nuclear protein 2 binds to a component of the human SNF-SWI complex, hSNF5/In1. *J Virol* 70: 6020-6028.
121. **Xin Huang, Zhongliang Zhao, Zhenglong Yuan, Minghui Zhang, Xuejun Zhu, Guoyou Chen, Xuetao Cao (2000)** Cloning and characterization of a novel deletion mutant of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M4 from human dendritic cells. *Science in China* 43: 648-654.
122. **Yalamanchili R, Harada S, Kieff E (1996)** The N-terminal half of EBNA2, except for seven prolines, is not essential for B-Lymphocyte growth transformation. *J Virol* 70: 2468-2473.
123. **Yalamanchili R, Tong X, Grossman S, Johannsen E, Mosialos G, Kieff E (1994)** Genetic and biochemical evidence that EBNA2 interaction with a 63-kDa cellular GTG-binding protein is essential for B lymphocyte growth transformation by EBV. *Virology* 204: 634-641.
124. **Yan X, Mouillet JF, Ou Q, Sadovsky Y (2003)** A novel domain within the DEAD-box protein DP103 is essential for transcriptional repression and helicase activity. *Mol Cell Biol* 23: 414-423.
125. **Zimber-Strobl U, Strobl LJ, Meitinger C, Hinrichs R, Sakai T, Honjo T, Bornkamm GW (1994)** Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 exerts its transactivation function through interaction with recombination signal binding protein RBP-J kappa, the homologue of *Drosophila* Suppressor of Hairless. *EMBO J* 13: 4973-4982.
126. **Zur Hausen H, Schulte-Holthausen H, Klein G, Henle W, Henle G, Clifford P, Santesson L (1970)** EBV DNA in biopsies of Burkitt tumors and anaplastic carcinomas of the nasopharynx. *Nature* 228: 1056-1058.

DANK

8. Dank

Herrn Professor Dr. Friedrich A. Grässer möchte ich für die freundliche Überlassung des interessanten Themas, sein Vertrauen, die hervorragende Betreuung und seine geduldige Hilfs- und Diskussionsbereitschaft danken.

Für die freundliche Aufnahme in seinem Institut danke ich Herrn Professor Dr. Nikolaus Müller-Lantzsch.

Herrn PD Dr. A. Schmid danke ich für die Durchführung der Bimolekularen-Fluoreszenz-Komplementation.

Herrn Professor Dr. Montenarh danke ich für die Begutachtung dieser Arbeit.

Mein herzlicher Dank gilt auch und besonders Frau Dr. Stefanie Barth und Frau Ruth Nord für die geduldige Hilfe beim Anlernen der Methoden und für die vielen nützlichen Hinweise.

Bei Björn Schwalbert möchte ich mich für die kollegiale und freundschaftliche Zusammenarbeit bedanken.

Außerdem gilt mein Dank allen Mitarbeitern des Virologischen Instituts für das angenehme Arbeitsklima.

LEBENS LAUF

9. Lebenslauf

Persönliche Daten

Geburtsdatum / -ort 08.09.1976 in Leer, Niedersachsen

Schule und Zivildienst

1983 – 1996 Schule, Abitur 1996
1996 – 1997 Zivildienst

Studium

1998 – 2005 Universität des Saarlandes, Homburg (D)
Universität de Valencia, Valencia (E)
Tulane University, New Orleans (USA)

Ärztliche Tätigkeit

2006 – 2007 Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie
und Radioonkologie
Universitätsklinikum Eppendorf
Hamburg
2007 – Klinik für Strahlentherapie
(Radioonkologie)
Universitätsklinikum Schleswig-Holstein
Kiel