

Aus der Klinik und der Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenkranke
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. med. Ernst Kastenbauer

Identifizierung Epstein-Barr-Virus regulierter Gene in primären humanen B-Lymphozyten

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Tanja Krug
aus Berlin
2003

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. B. Wollenberg

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. E. Meinel
Prof. Dr. K.-K. Conzelmann

Mitbetreuung durch die
promovierten Mitarbeiter: Dr. rer. nat. O. Gires
Dr. rer. nat. R. Zeidler

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. K. Peter

Tag der mündlichen Prüfung: 05.06.2003

Erklärung

Diese Dissertation wurde selbständig angefertigt. Ich habe mich keiner weiteren außer der angegebenen Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schriftum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht.

Die vorliegende Dissertation wurde nicht in gleicher oder ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht.

München, den 30. Januar 2003

(Tanja Krug)

Teile dieser Arbeit sollen wie folgt veröffentlicht werden:

Martin Schlee, Tanja Krug, Olivier Gires, Reinhard Zeidler, Wolfgang Hammerschmidt, Reinhard Mailhammer, Gerhard Laux, Josip Lovric and Georg Bornkamm. Early events after infection of primary B cells by EBV are reflected by activation of EBNA2 in conditionally immortalized B cells.

Manuscript in preparation.

Meinen Eltern und Katrin

1	EINLEITUNG	1
1.1	Adenoide/Rachenmandel	2
1.2	B-Lymphozyten	3
1.3	Das Epstein-Barr-Virus	4
1.3.1	Latenz	5
1.3.2	Immortalisierung	7
1.4	EBV-assoziierte Erkrankungen	8
1.4.1	Tumorerkrankungen	9
1.4.2	EBV-induzierte Gene	11
1.5	Aufgabenstellung	13
2	MATERIAL	14
2.1	Antikörper	14
2.2	Oligonucleotide	14
2.3	Zelllinien	14
2.4	Chemikalien, Enzyme, Geräte und Sonstiges	14
3	METHODEN	19
3.1	Zellkultur	19
3.1.1	Zellkulturbedingungen	19
3.1.2	Aufbewahrung von Zellen	19
3.1.3	Präparation primärer B-Lymphozyten	20
3.1.4	Infektion von primären B-Lymphozyten mit B95.8-Virusüberstand.....	20
3.2	FACS-Analysen	21
3.3	PCR-Analysen	21
3.3.1	Agarose-Gelelektrophorese	22
3.4	Immunfluoreszenz-Analyse	22
3.5	Immunoblot Analyse	22
3.6	Thymidin-Inkorporation	24
3.7	Zwei-dimensionale Polyacrylamidgelelektrophorese (2D-PAGE)	24
3.7.1	1. Dimension: Isoelektrische Fokussierung	24
3.7.2	2. Dimension: SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese.....	25
3.7.2.1	Schwefelmarkierung von Proteinen	27
3.7.3	Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation Time-of-Flight Analyse (MALDI-ToF).....	27
3.7.3.1	Trypsin-Verdau	27
3.7.3.2	Beschichten mit DHB-Matrix	28
3.7.3.3	MALDI-ToF Analyse	28
3.8	Lightcycler PCR	29

4	ERGEBNISSE	30
4.1	EBV-induzierte differentielle Genexpression in primären humanen B-Lymphozyten.....	30
4.1.1	Etablierung eines zellulären Systems zur Untersuchung von EBV-induzierten Veränderungen in B-Lymphozyten	30
4.1.2	Kinetiken der EBV-Infektion primärer B-Lymphozyten.....	33
4.1.2.1	Immunfärbung	33
4.1.2.2	Immunoblot Analyse	34
4.2	Verstärkte Proliferation EBV-infizierter B-Lymphozyten	36
4.3	Identifizierung EBV-regulierter Proteine in humanen B-Lymphozyten ..	37
4.3.1.1	EBV-regulierte Proteine in humanen primären B-Lymphozyten	41
4.3.1.2	Induktion von Nm23 und Nmi nach EBV-Infektion	43
4.4	Parallele Induktion von EBNA2 und EBV-induzierten Proteinen in humanen B-Lymphozyten	44
4.5	mRNA-Expression von EBNA2, c-myc und Nm23 in humanen B-Lymphozyten nach EBV-Infektion	46
5	DISKUSSION	48
5.1	EBNA2-Expression in humanen B-Lymphozyten nach dreitägiger EBV-Infektion	48
5.2	Identifizierung EBV-regulierter Gene in primären humanen B-Lymphozyten.....	49
5.3	EBNA2 regulierte Proteine	55
6	ZUSAMMENFASSUNG.....	58
7	ABKÜRZUNGEN.....	59
8	LITERATUR	62

1 Einleitung

Mit steigender Inzidenz erkranken jährlich weltweit immer mehr Menschen an Krebs. Etwa jeder Vierte bis Fünfte stirbt in den Industrieländern an einem malignen Tumor. Vor allem Krebserkrankungen der Lunge, der Brust und des Colon/Rektums werden immer häufiger diagnostiziert (Jemal et al., 2002).

Die Tumorätiologie ist uneinheitlich und von enormer Komplexität. Sowohl Umweltfaktoren (Strahlung, chemische Karzinogene), als auch eine erbliche Prädisposition und gestörte Immunfunktion kommen als Kofaktoren einer malignen Erkrankung in Betracht. Dass auch Viren ein onkogenes Potential besitzen, ist seit längerer Zeit bekannt: Bereits 1911 beschrieb Peyton Rous, dass Viren bei Geflügel Sarkome verursachen. Das kausale Virus wurde nach dem Entdecker Rous-Sarkom-Virus benannt (Rous, 1979). Neben dem Hepatitis B/C-Viren, die an der Entstehung des primären Leberkarzinoms beteiligt sind und den humanen Papillomaviren, die vorwiegend mit Karzinomen der Genitalschleimhaut in Verbindung gebracht werden, ist besonders das Epstein-Barr-Virus (EBV) hervorzuheben. So besteht eine starke Korrelation zwischen einer EBV-Infektion und mehreren verschiedenen Tumorerkrankungen. Insbesondere das Burkitt-Lymphom, das Hodgkin-Lymphom und das Nasopharynxkarzinom werden mit einer EBV-Infektion assoziiert (Liebowitz, 1998; Niedobitek, 1999). Um die pathogenetischen Mechanismen bei einer EBV induzierten Tumorentstehung besser verstehen und untersuchen zu können, wurde ein *in vitro* Modell entwickelt. Dazu wurden lymphoblastoide Zelllinien, sogenannte LCLs, generiert, die durch Immortalisierung primärer B-Lymphozyten mit EBV leicht *in vitro* etabliert werden können (Thorley-Lawson and Mann, 1985). Als Ausgangsmaterial zur Gewinnung primärer B-Lymphozyten dienten Adenoide, da diese sich viel schneller und effizienter mit EBV infizieren ließen, als B-Lymphozyten aus Tonsillen oder peripherem Blut (Zeidler et al., 1996).

1.1 Adenoide/Rachenmandel

Adenoide bezeichnen die krankhaft veränderliche Form der Rachenmandel. Diese sogenannte reaktive Hyperplasie der Rachenmandel (Tonsilla pharyngea), die v.a. im Kleinkindalter vorkommt, entsteht durch rezidivierende Infekte der oberen Luftwege. Ist die Hyperplasie so stark fortgeschritten, dass es letztendlich zur Verlegung der Choane (=hintere Öffnungen der Nasenhöhle in den Nasenrachenraum) kommt, ist eine Adenotomie indiziert, um mögliche Folgeerscheinungen, wie chronische Verläufe und Sprachentwicklungsstörungen zu minimieren (Winther and Innes, 1994).

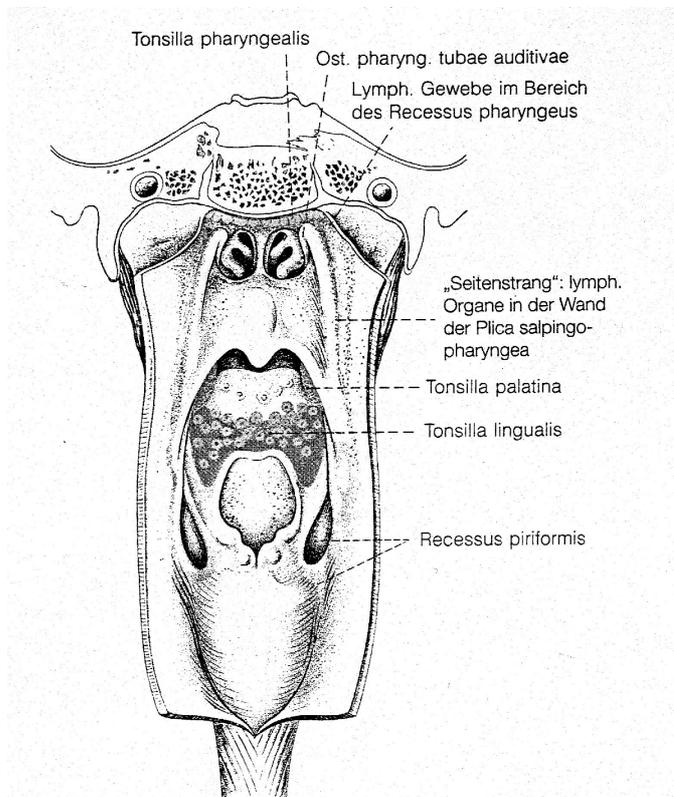


Abb. 1: Darstellung des lymphatischen Rachenrings. Der Pharynx ist von hinten her eröffnet. Die Tonsilla pharyngea befindet sich hinten oben im Fornix des Schlundes. (aus: D. Drenckhahn, W. Zenker; Benninghoff, Anatomie Band 1; 1994)

Die Rachenmandel (Tonsilla pharyngea) befindet sich in der Mitte der hinteren Nasopharynxwand. Gemeinsam mit den Gaumenmandeln (Tonsillae palatinae) und der Zungenmandel (Tonsilla lingualis) bildet sie die sekundären lymphatischen Organe der Schleimhäute (Waldeyerscher Rachenring). Dort haben sie die Aufgabe, das Eindringen von Mikroorganismen über die empfindlichen Schleimhäute zu verhindern bzw. eingedrungene Bakterien noch innerhalb der Schleimhäute abzufangen. Dementsprechend konzentrieren sich hier neben T-Lymphozyten und

Makrophagen vor allem B-Lymphozyten und Plasmazellen, die somit das immunologische „Frühwarnsystem“ darstellen.

1.2 B-Lymphozyten

Die Bursa Fabricii, ein lymphoretikuläres Organ bei Vögeln, gab den B-Lymphozyten ihren Namen. Sie ist die Bildungsstätte Immunglobulin-produzierender Bursalymphozyten nach Ansiedlung zirkulierender Stammzellen in einer empfänglichen Periode der frühen Embryonalentwicklung. Beim Menschen entstehen die B-Lymphozyten aus den hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark. Diese pluripotenten Stammzellen teilen sich und erzeugen so zwei spezialisierte Typen von Vorläufern: eine lymphatische Vorläuferzelle, aus der sich B- und T-Lymphozyten bilden, und eine myeloide Vorläuferzelle, aus der Leukozyten, Erythrozyten und Megakaryozyten hervorgehen. Nach ihrer Entstehung reifen B-Lymphozyten im Knochenmark. Um das Knochenmark verlassen zu können, wird die Selbst-Toleranz etabliert: die Bindung von Autoantigenen an Oberflächenimmunglobulinen in einer frühen Entwicklungsphase führt zur Inaktivierung (=Anergie) oder zum Verlust des betreffenden B-Lymphozyten und gewährleistet so eine Toleranz gegenüber ubiquitären Selbst- oder Autoantigenen. Nur ein kleiner Teil der im Knochenmark produzierten B-Lymphozyten überlebt. Sie werden Teil des Pools langlebiger, peripherer reifer B-Lymphozyten. Jeder dieser B-Lymphozyten trägt an seiner Oberfläche Rezeptoren einer einzigen Spezifität. Diese Rezeptoren entstehen durch die zufällige Kombination variabler Rezeptorsegmente und die paarweise Zusammenlagerung verschiedener variabler Ketten. Es entstehen B-Lymphozyten, die alle einen eigenen, spezifischen Rezeptor tragen, so dass das gesamte Repertoire von Rezeptoren praktisch jedes Antigen erkennen kann. Wird ein Antigen erkannt und von dem B-Zellrezeptor gebunden, wird der B-Lymphozyt aktiviert. Einmal aktiviert, teilt sich der B-Lymphozyt und reift zur antikörperproduzierenden Plasmazelle, die Basis der humoralen Immunabwehr. Mit der Aktivierung des Lymphozyten, geht auch dessen morphologische Veränderung einher. Die kleinen, naiven B-Lymphozyten beginnen sich zu vergrößern, Nucleoli erscheinen jetzt und das Volumen des Cytoplasmas nimmt zu, bis letztendlich die Differenzierung zur

Plasmazelle vollzogen ist. Die spezifische Bindung von Antigenen an B-Zellrezeptoren bis hin zur Entstehung von antikörperproduzierenden Plasmazellen wird als klonale Selektionstheorie bezeichnet.

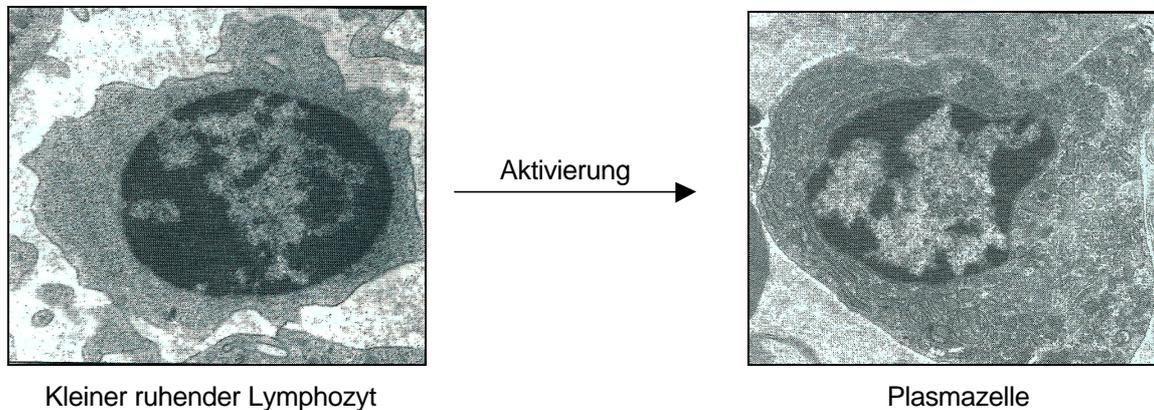


Abb. 2: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme von B-Lymphozyten in verschiedenen Aktivierungsstadien. Durch die Bindung des spezifischen Antigens gehen kleine, ruhende Lymphozyten in aktive, antikörperproduzierende Plasmazellen über. (aus: C. Janeway, P. Travers; Immunologie; 1997)

1.3 Das Epstein-Barr-Virus

Das Epstein-Barr-Virus (EBV) ist ein ubiquitäres humanes γ -Herpesvirus mit einem doppelsträngigen DNA-Genom. Das Genom hat eine Größe von 172 kb und kodiert für ca. 80-100 verschiedene Proteine (Baer et al., 1984).

Etwa 95% der erwachsenen Bevölkerung weltweit ist mit dem Epstein-Barr-Virus infiziert. Beim gesunden Infizierten persistiert das Virus in B-Lymphozyten des peripheren Blutes. Eine von 10^4 - 10^6 B-Lymphozyten ist in diesem Fall latent mit EBV infiziert. Lytisch repliziert das Virus in Epithelzellen der Rachenschleimhaut. Ob beim ersten Viruskontakt die Infektion des Schleimhautepithels der Besiedlung des B-Zellkompartiments vorausgeht oder umgekehrt, ist unklar. *In vitro* infiziert das Virus sehr effizient humane B-Lymphozyten. Die Infektion epithelialer Zellen ist möglich, jedoch mit einer geringeren Effizienz (Imai et al., 1998). Wichtig für die effiziente Infektion von B-Lymphozyten ist die Wechselwirkung des Komplementrezeptors 2 (CR2 oder CD21) auf der Zelloberfläche mit dem Glykoprotein gp350 auf der Virusoberfläche (Nemerow et al., 1985; Tanner et al., 1987). Wie aber aus der Infizierbarkeit CD21-negativer epithelialer Zellen (Yoshiyama et al., 1997) und der

Infektiosität gp350-negativer Virusmutanten (Janz et al., 2000) zu ersehen ist, sind auf Virus- wie auf Zellseite alternative, wenngleich ineffektivere Infektionsmechanismen möglich.

1.3.1 Latenz

Der Lebenszyklus von EBV weist wie der anderer Herpesviren eine lytische und eine latente Phase auf. Die Primärinfektion verläuft über Epithelzellen des Oropharynx und ist durch eine lytische DNA-Replikation, die Expression nahezu aller viraler Gene, Virusproduktion und Lyse der befallenen Zellen gekennzeichnet. Im weiteren Verlauf wechselt EBV von der lytischen zur latenten Phase seines Lebenszyklus, die nur zeitweilig von einer lytischen Phase mit einhergehender Virusproduktion unterbrochen wird (Liebowitz, 1998; Rickinson, 1996). Während der Latenz werden nur noch elf EBV-Gene exprimiert: sechs Epstein-Barr-Virus Nukleäre Antigene (EBNA) 1, 2, 3A-C und EBNA-LP (leader protein), die drei Latenten Membran Proteine (LMP) 1, 2A und 2B und nicht-polyadenylierte RNAs (EBER1 und EBER2), die von der Polymerase III transkribiert werden (Kieff, 1996). In diesem Zustand, der als Latenz III bezeichnet wird, verändern sich die infizierten B-Lymphozyten zu proliferierenden lymphoblastoiden Zellen und induzieren in der Folge eine humorale und zelluläre Immunantwort des Wirts. Proliferierende B-Lymphozyten werden auf diese Weise eliminiert und es entsteht ein EBV-spezifisches, immunologisches Gedächtnis. In einigen B-Lymphozyten, vermutlich Gedächtnis-B-Zellen, ändert EBV sein Muster der Genexpression zur Latenz I bzw. II. Als Latenz I bezeichnet man das Genexpressionsmuster, das in EBV-positiven Burkitt-Lymphomen vorliegt. Hier ist EBNA1 das einzig nachweisbare virale Protein. EBNA1 ist ein DNA-bindendes Kernprotein und wird in allen EBV Latenzformen detektiert. Es bindet an den latenten Replikationsursprung der viralen DNA, oriP, und vermittelt die Rekrutierung des zellulären „origin recognition complex“ (ORC) (Chaudhuri et al., 2001; Schepers et al., 2001). Zudem ist EBNA1 für die korrekte Segregation der EBV-Episomen bei der Zellteilung verantwortlich (Aiyar et al., 1998; Yates et al., 1985). Eine herausragende Eigenschaft von EBNA1 ist seine nahezu fehlende Immunogenität. Diese beruht auf einer repetitiven Sequenz, die ausschließlich aus Glycin und Alanin besteht und welche die proteolytische Degradation von EBNA1 durch den

Proteasomen-Komplex und somit die Präsentation von antigenen Peptiden auf der Zelloberfläche durch MHC I verhindert (Levitskaya et al., 1995; Levitskaya et al., 1997). Die Expression von EBNA1 und den latenten Membranproteinen LMP1, LMP2A und LMP2B entspricht der Latenz II. Diese Latenzform findet man bei verschiedenen EBV-assoziierten Tumoren, wie dem Nasopharynxkarzinom, dem Hodgkin- und dem T-Zell-Lymphom wieder (Young et al., 2000). B-Lymphozyten, die sich in der Latenzstadium I und II befinden, entgehen der Überwachung durch das Immunsystem und können somit im Wirt lebenslang persistieren (Miyashita et al., 1997; Miyashita et al., 1995). Eine erneute und unkontrollierte Proliferation solcher Lymphozyten kann bei immunsupprimierten Patienten, z.B. nach HIV-Infektion oder Transplantation, zur Ausbildung maligner Tumoren führen. Eine sporadische und kurze lytische Phase in diesen B-Lymphozyten ist für die Neuinfektion und damit für die lebenslange Persistenz von EBV verantwortlich (Kieff, 1996; Rickinson, 1996). Es gibt ebenfalls die Annahme, dass Gedächtnis-B-Zellen EBV tragen und somit eine lebenslange Infektion gewährleisten.

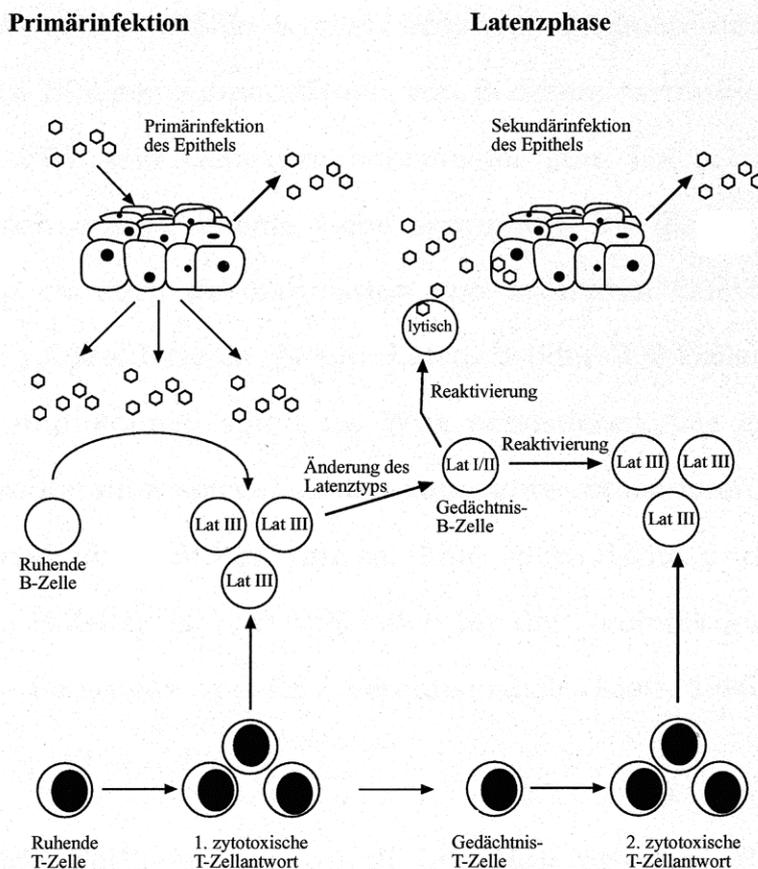


Abb. 3: Schematische Darstellung der Primärinfektion und der Latenzphasen des EBV (nach Rickinson und Kieff, 1996). Die Primärinfektion mit EBV erfolgt über die Epithelzellen des Oropharynx. Nach Virusproduktion und Zelllyse werden ruhende B-Lymphozyten infiziert, die in die Latenz III übergehen. Diese B-Lymphoblasten werden von zytotoxischen T-Lymphozyten eliminiert. Nach Abklingen der Primärinfektion persistiert EBV in Gedächtnis-B-Zellen, die nun in den Latenztyp I/II wechseln. Die Reaktivierung von Latenz I/II wird durch Gedächtnis-T-Zellen kontrolliert. Ebenso ist die Reaktivierung des lytischen Zyklus im Oropharynx möglich. Dies führt zu einer Sekundärinfektion des Epithels und Virusproduktion. Lat I, II und III: Latenz I, II und III

1.3.2 Immortalisierung

Während der latenten Infektion exprimiert das Epstein-Barr-Virus elf verschiedene Gene (Kieff, 1996). Dabei sind fünf dieser Gene - EBNA1, EBNA2, EBNA3A/3C und LMP1 – für die EBV-vermittelte B-Zell-Immortalisierung essentiell (Hammerschmidt and Sugden, 1989; Kaye et al., 1993; Kilger et al., 1998; Tomkinson et al., 1993). Durch die Expression dieser Proteine kommt es zur Initiation der B-Zell-Immortalisierung, d.h. B-Lymphozyten erhalten die Fähigkeit, sich unendlich zu teilen und *in vitro* zu lymphoblastoiden Zelllinien, sogenannten LCLs, auszuwachsen. Für EBNA2 und LMP1 konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass sie essentiell für die Aufrechterhaltung der Proliferation immortalisierter B-Lymphozyten sind (Kempkes et al., 1995; Kilger et al., 1998). EBERs und EBNA3B scheinen dagegen bei der Immortalisierung nicht essentiell zu sein (Swaminathan et al., 1991; Tomkinson and Kieff, 1992). EBNA-LP (EBNA-Leader-Protein) und LMP2A/B verbessern die Effizienz der Immortalisierung (Brielmeier et al., 1996; Young et al., 2000), sind aber ebenfalls abdinglich.

Dem im Kern exprimierten Protein EBNA2 kommt eine zentrale Rolle bei der Immortalisierung von B-Lymphozyten zu. Ein erster Hinweis darauf war die Beobachtung, dass der Virusstamm P3HR-1, dessen Genom in dem für EBNA2-kodierenden Bereich eine Deletion aufweist, B-Lymphozyten *in vitro* nicht immortalisierte. Die transformierende Eigenschaft von EBV konnte durch Komplementation der fehlenden Sequenzen wieder hergestellt werden (Hammerschmidt and Sugden, 1989).

EBNA2 wird durch das *BamH1 Y right open reading frame 1* (BYRF-1) im EBV-Genom kodiert (Mueller-Lantzsch et al., 1985). Dies entspricht beim EBV Typ1 (B95.8-Prototyp) einem 487 Aminosäuren (AS) langen Protein mit zwei Wiederholungsstrukturen, einem Polyprolin-Strang (AS 58-97) und einer Arginin-Glycin-Wiederholungsstruktur (AS 341-356). Detaillierte Mutationsanalysen zeigten, dass für die Immortalisierung folgende Domänen von entscheidender Bedeutung sind: einige Proline des Polyprolin-Bereiches und der benachbarten Region (AS 95-110), die Bindestelle für RBP-J κ und PU.1 (AS 281-336) und die saure Transaktivierungsdomäne (AS 426-462) (Kieff, 1996).

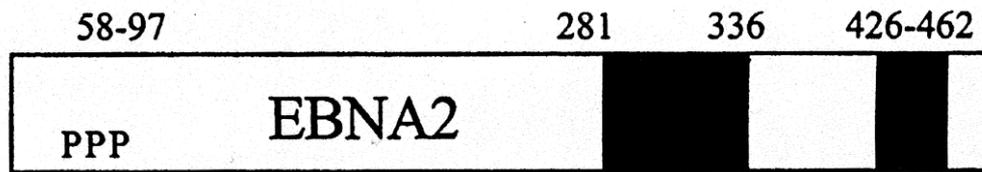


Abb. 4: Struktur des EBNA2-Protein (nach Kieff, 1996). Das EBNA2-Protein setzt sich aus 487 Aminosäuren (AS) zusammen. Für die Immortalisierung primärer B-Lymphozyten sind die AS 95-110, 281-336 und 426-462 entscheidend. PPP: Polyprolin-Strang

EBNA2 wirkt als Koaktivator bei der Transkription zellulärer und viraler Gene. Es induziert die Expression der B-Zell-Aktivierungsmarker CD23 und CD21 (Calender et al., 1987; Wang et al., 1990), der zellulären Tyrosinkinase *c-fgr* (Knutson, 1990), der viralen Gene LMP1, LMP2A, -2B und die Transkription vom EBV *BamH1*-Promotor (Cp) (Abbot et al., 1990; Jin and Speck, 1992; Sung et al., 1991; Zimmer-Strobl et al., 1991). Die Interaktion von EBNA2 mit der basalen Transkriptionsmaschinerie erfolgt über eine saure Transaktivierungsdomäne und führt letztendlich zur Transkription von Genen, deren Promotoren EBNA2 responsive Elemente enthalten (Kieff, 1996). Die Bindung von EBNA2 an DNA-Sequenzen wird dabei durch das zelluläre Adaptormolekül RBP-J κ (Rekombinationssignal-Bindeprotein-J κ) vermittelt (Grossman et al., 1994; Henkel et al., 1994; Waltzer et al., 1994). EBNA2 interagiert zudem mit dem Transkriptionsfaktor PU.1, der für die Transaktivierung von LMP1 durch EBNA2 benötigt wird (Johannsen et al., 1995; Laux et al., 1994). Ein Gen, welches durch EBNA2 direkt reguliert wird, ist das Onkogen *c-myc* (Jayachandra et al., 1999; Kaiser et al., 1999). *c-myc* besitzt eine zentrale Rolle in der Zellzyklus- und Wachstumsregulation (Amati et al., 1998; Dang, 1999) und wird in einer Vielzahl von Tumoren überexprimiert. Seine Überexpression inhibiert eine Zellzyklusarretierung in Folge von wachstumshemmenden Signalen, Differenzierungsstimuli sowie einer Reduzierung von Wachstumsfaktoren (Amati et al., 1998). Dies lässt vermuten, dass die Induktion von *c-myc* durch EBNA2 ein entscheidender Faktor bei Entstehung von lymphoproliferierenden Erkrankungen ist.

1.4 EBV-assoziierte Erkrankungen

Eine EBV-Infektion im Kindesalter verläuft meist asymptomatisch. Erfolgt sie dagegen bei Jugendlichen oder Erwachsenen, kann sich daraus eine infektiöse

Mononukleose entwickeln (Liebowitz, 1998). Diese selbstlimitierende, lymphoproliferative Erkrankung ist auch unter der Bezeichnung Pfeiffersches Drüsenfieber bekannt. Sie äußert sich mit Halsschmerzen, Fieber und geschwollenen Lymphknoten. Diese Symptome werden durch die erhöhte Produktion von CD8-positiven T-Lymphozyten hervorgerufen, wodurch eine verstärkte Immunantwort verursacht wird. Sie klingen üblicherweise nach einigen Wochen ab, das Virus verbleibt jedoch im Organismus und wird lebenslang über den Hals-, Nasen- und Rachenraum in den Speichel ausgeschieden (Gerber et al., 1972). Die Übertragung des Virus mit dem Speichel gab der mit der Infektion verbundenen Mononukleose die Bezeichnung „kissing disease“. In seltenen Fällen klingen die Symptome der infektiösen Mononukleose nicht vollständig ab, und die Patienten entwickeln eine chronisch Infektion, bei der sich das Virus zusätzlich zum Latenzstadium in erhöhtem Maß auch lytisch vermehrt. Die Symptome, die sich in Form von Müdigkeit, Abgeschlagenheit und Lymphknotenschwellung äußern, sind schwächer ausgeprägt als bei der infektiösen Mononukleose, können aber über Monate und Jahre hinweg andauern (= „chronic fatigue disease“). Tödliche Verläufe der infektiösen Mononukleose treten familiär gehäuft bei Männern auf und sind mit bestimmten Gendefekten auf dem X-Chromosom korreliert. Diese sogenannte XLP-Syndrom (X-linked lymphoproliferative syndrome) ist durch eine Hypogammaglobulinämie, eine aplastische Anämie und die verstärkte Infiltration der Lunge, Niere, Leber und des Knochenmarks mit CD8-positiven T-Lymphozyten und B-Lymphozyten gekennzeichnet. Als Folge versagen die Organe und der Patient verstirbt (Liebowitz, 1998).

1.4.1 Tumorerkrankungen

EBV ist ätiologisch eng mit einer Reihe von Krebserkrankungen assoziiert, wie z.B. dem Burkitt-Lymphom, dem Hodgkin-Lymphom, dem Nasopharynxkarzinom, bestimmten T-Zell-Lymphomen (VAHS-assoziiertes T-Zell-Lymphom, nasales T-Zell-Lymphom und das periphere T-Zell-Lymphom vom AILD/pleomorphen Typ) und dem immunoblastischen Lymphom (Kieff, 1996; Rickinson, 1996). Burkitt-Lymphome zeichnen sich durch spezifische chromosomale Translokationen des Protoonkogens *c-myc* vom langen Arm des Chromosoms 8 auf das Chromosom 14 aus, die zu einer

permanenten Aktivierung des *c-myc* Gens führen. Die in Afrika endemische Form des Burkitt-Lymphoms ist zu 100% mit EBV assoziiert, während sporadisch auftretende und AIDS-assoziierte Formen eine weniger regelmäßige Assoziation mit EBV aufweisen (Magrath, 1990). Das Hodgkin-Lymphom ist das in der westlichen Welt am häufigsten auftretende maligne Lymphom. Es zeichnet sich durch eine veränderte Struktur des betroffenen Lymphknotens und die Anwesenheit mononukleärer Hodgkin- und Reed-Sternberg Zellen aus (Herbst, 1996). Reed-Sternberg Zellen sind wenig differenzierte, transformierte B-Zellen, die die eigentliche maligne Population bei diesen Tumoren darstellt. Nasopharynxkarzinome sind epitheliale Tumore des Nasen-Rachenraums. Sie treten besonders gehäuft in China auf, was eine zusätzliche genetische bzw. umweltbedingte Komponente vermuten lässt (Nicholls et al., 1997; Zheng et al., 1994). Das Risiko immunoblastischer Lymphome besteht besonders bei immunsupprimierten Patienten, z.B. nach HIV-Infektion oder Transplantation. Diese Lymphome stehen in einem engen Zusammenhang mit einer fehlenden Immunabwehr gegen proliferierende, EBV-infizierte B-Lymphozyten (Rickinson, 1996). All diese Tumore entstehen oft erst viele Jahre nach einer primären EBV-Infektion, was auf einen mehrstufigen Entstehungsprozess hinweist. So sind virale Onkogene in der Lage, zelluläre Proteine außer Kraft zu setzen bzw. permanente konstitutive Signale zu induzieren, die zur Zellproliferation beitragen. Beispielsweise reagieren die adenoviralen Proteine E1A und E1B mit den Zellzyklusregulatoren p53 und Rb. Es kommt dadurch zum Verlust von p53 Funktionen und zum Sequestrieren von Rb. Die Folge sind ein unkontrolliertes Überlaufen von Kontrollpunkten im Zellzyklus und ein Verlust der Zellproliferationskontrolle (Jones, 1990; Moran, 1993). Ähnlich könnten auch EBV-kodierte Onkogene bei dem unkontrollierten Wachstum von B-Lymphozyten und der EBV-assoziierten Tumorentstehung eine entscheidende Rolle spielen. Interessanterweise weist keines der in der Latenz exprimierten Gene von EBV Ähnlichkeiten zu den Onkogenen auf, die bei den sogenannten kleinen DNA-Tumoviren zur Identifikation des onkogenen Prinzips mit Rb und p53 beigetragen haben.

1.4.2 EBV-induzierte Gene

Untersuchungen immortalisierter B-Lymphozyten, die als *in vitro* Modelle zur Untersuchung pathogenetischer Mechanismen der EBV-vermittelten Tumorentstehung dienen, machten deutlich, dass sich durch eine EBV-Infektion mehrere Veränderungen auf zellulärer Ebene vollziehen. Studien haben gezeigt, dass neben EBNA2 auch LMP1 zelluläre Gene zu induzieren vermag. Das latente Membranprotein 1 (LMP1) ist eines der Gene, dessen Expression für den Prozess der B-Zell-Immortalisierung als absolut essentiell gilt (Kaye et al., 1993; Kilger et al., 1998). LMP1 konnte auch *in vivo* als virales Onkogen identifiziert werden (Kulwichit et al., 1998; Wang et al., 1985; Wilson et al., 1990) und ist als einziges EBV-Protein in der Lage, auch in nicht lymphoiden Zelllinien wie z.B. Nager-Fibroblasten die charakteristischen Merkmale der Zelltransformation zu vermitteln (Baichwal and Sugden, 1988; Moorthy and Thorley-Lawson, 1993a; Wang et al., 1985). LMP1 induziert in B-Lymphozyten viele phänotypischen Veränderungen, die nach einer EBV-Infektion zu beobachten sind. Dazu gehört die Induktion der B-Zell-Aktivierungsmarker CD21, CD23, CD39, CD40, und CD58 (Wang et al., 1988; Wang et al., 1990), sowie die der Adhäsionsmoleküle ICAM-1, LFA-1 und LFA-3 (Rowe et al., 1995; Wang et al., 1990). Desweiteren induziert es die Expression der Zytokine IL-6, IL-8 und IL-10 (Eliopoulos et al., 1999; Eliopoulos et al., 1997; Nakagomi et al., 1994), die, insbesondere IL-10, während der frühen Infektionsphase von EBV-infizierten Zellen produziert werden. IL-10 hat eine immunsupprimierende Wirkung und kann dadurch die Lyse EBV-infizierter Zellen durch eine cytotoxischen T-Zellantwort verhindern. In diesem Zusammenhang wurde auch ein weiteres Gen, das TAP1-Gen (transporter associated with antigen processing-1) identifiziert. TAP1, und auch TAP2, sind Transportproteine, die bei der Prozessierung von Antigenen eine Rolle spielen. Sie binden ATP und wirken beim Transport kurzer Peptide aus dem Zytosol in das Lumen des endoplasmatischen Retikulums mit (Androlewicz et al., 1993). Hier lagern sich die Peptide an neusynthetisierte MHC-I-Klasse-Moleküle an. TAP1 und TAP2 sind daher für die korrekte Expression von MHC-I-Klasse-Moleküle notwendig. Unter dem Einfluss von IL-10 kommt es zu einer drastischen Repression des Gens (Zeidler et al., 1997). Als Folge kommt es zur Einschränkung der Funktion des gesamten TAP-Transporters. Die Inaktivierung von TAP führt zu einer

verminderten Antigenpräsentation auf B-Lymphozyten und somit zu einer schlechteren anti-viralen Immunantwort.

Es wurde gezeigt, dass LMP1 als konstitutiv aktiver Rezeptor agiert (Gires et al., 1997), der eine Reihe von Gemeinsamkeiten mit Mitgliedern der Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor (TNF-R)-Familie besitzt. Die Transmembrandomäne von LMP1 ist für die spontane Aggregation von LMP1-Molekülen in der Plasmamembran verantwortlich. Diese Oligomerisierung ist notwendige und hinreichende Voraussetzung, um Signaltransduktionsvorgänge am C-Terminus von LMP1 zu initiieren (Floettmann and Rowe, 1997; Gires et al., 1997; Kaykas et al., 2001). LMP1 induziert über seinen C-Terminus den Transkriptionsfaktor Nukleärer Faktor-kappa B (NF-κB) (Huen et al., 1995; Mitchell and Sugden, 1995), die p38 MAPK (mitogen activated protein kinase) - und JNK1/AP1 (c-Jun N-terminal kinase 1/ activator protein 1) – Signalkaskade (Kieser et al., 1999; Kieser et al., 1997). Verantwortlich für die Aktivierung dieser Signalwege sind zwei Subdomänen, die als CTAR1 und 2 (C-terminal activator regions) bezeichnet werden und die als essentiell bei der Transformation von B-Lymphozyten gelten (Huen et al., 1995; Izumi et al., 1997; Izumi and Kieff, 1997; Moorthy and Thorley-Lawson, 1993b). Eine dritte Domäne, CTAR3, interagiert mit der Janus-Kinase 3 (JAK3) und induziert dessen Autophosphorylierung sowie die nachfolgende Aktivierung von STATs (signal transducers and activators of transcription) (Gires et al., 1999). Der Aktivierung der NF-κB-Signalkaskade folgt die Induktion des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors EGFR (Miller et al., 1997). Als Wachstumsfaktor-Rezeptor ist EGFR in die Regulation von Wachstum, Differenzierung, Apoptose und Zytokinproduktion der Zellen involviert. Wachstumsfaktor-Rezeptoren verlieren in Tumorzellen häufig die Regulation ihrer stringenten und transienten Aktivierung (Di Fiore et al., 1987).

LMP1 induziert auch die Expression von anti-apoptotischen Genen wie Bcl-2, A20, Mcl-1 und Bfl-1 (D'Souza et al., 2000; Henderson et al., 1991; Laherty et al., 1992). Dies ermöglicht dem Virus, die Replikationszeit zur Bildung neuer Viren möglichst lang zu erhalten oder latent in der Wirtszelle zu überdauern, bevor die Wirtszellen lysieren.

Die Expression der Matrix-Metalloprotease MMP-9 wird ebenfalls durch LMP1 induziert. Sie wird in vielen malignen Tumoren, v.a. aber in Nasopharynxkarzinomen,

überexprimiert und scheint eine wichtige Rolle bei der Invasion und Metastasierung von Tumoren zu spielen (Takeshita et al., 1999; Yoshizaki et al., 1998).

1.5 Aufgabenstellung

Das Epstein-Barr-Virus wird mit der Entstehung verschiedener menschlicher Tumore in Zusammenhang gebracht. *In vitro* infiziert es humane primäre B-Lymphozyten und induziert so effizient die Proliferation dieser ruhenden Zellen. Diese Immortalisation reflektiert teilweise die pathogenen Mechanismen von EBV, die bei einer menschlichen Tumorerkrankung beobachtet wurden. Untersuchungen solcher immortalisierten B-Lymphozyten machten deutlich, dass mit einer EBV-Infektion mehrere zelluläre Veränderungen einhergehen. Eine Reihe von EBV-induzierten Genen wurde bereits identifiziert, die evtl. zur Tumorentstehung beitragen können. In diesen Fällen kann aber nur von „späten“ EBV-regulierten Genen gesprochen werden, da diese Gene erst im Verlauf der Immortalisierung eine Veränderung ihrer Regulation erfahren. Der Nachweis sehr früher zellulärer Gene, die unmittelbar nach einer EBV-Infektion in B-Lymphozyten reguliert werden, fehlte bislang. Ziel meiner Arbeit war es, zelluläre Gene, deren Regulation durch frühe virale Genfunktionen direkt beeinflusst wird, zu identifizieren. Zu diesem Zweck sollte ein adäquates Zell-Infektion-System etabliert werden, um anschließend die EBV-Effekte auf Proteomebene analysieren zu können.

2 Material

2.1 Antikörper

α -CD19	BD Bioscience, Heidelberg
α -CD3	BD Bioscience, Heidelberg
α -EBNA2	R3 und 1E6 Hybridomüberstand (1:1), (freundlicherweise von Dr. E. Kremmer zur Verfügung gestellt, GSF-München)
α -Nm23	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
α -Nmi	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
α -Aktin	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg

2.2 Oligonucleotide

Die Synthesen der verwendeten Oligonucleotide wurden bei der Firma ARK Scientific, Darmstadt und Metabion, München in Auftrag gegeben.

2.3 Zelllinien

B95.8 ist eine lymphoblastoide Krallenaffen-Zelllinie, die latent/lytisch mit EBV-infiziert ist (Miller et al., 1972). B95.8-Zellen sezernieren bei fortlaufender Kultivierung mit Standardmedium laufend infektiöses EBV in den Kulturüberstand.

2.4 Chemikalien, Enzyme, Geräte und Sonstiges

Alle hier nicht aufgeführten Chemikalien wurden von Amersham, Merck oder Sigma in reiner Form bezogen.

Amersham Bioscience, Freiburg

ECL™ - Western blotting analysis System, IPG Buffer, IPG-Strips (pH 3-10, pH 4-7), 2D-PAGE-Anlage bestehend aus IPGphor, Elektrophoresekammer SE600 und Hoefer „Gelstainer“, Gelelektrophorese-Kammern, Gelelektrophorese-Netzgeräte, Filmkassetten

Amersham Life Science, Buckinghamshire, UK

[³H]-Thymidin (25Ci/mmol)

Becton-Dickinson GmbH, Heidelberg

Plastik-Reaktionsgefäße 50 ml, Zellkultur-Multiloch-Platten, Zellsiebe 100µm, FACS Flow™, FACS Rinse™, FACS-Röhrchen, Durchflußzytometer „FACSCalibur“

Biochrom AG, Berlin

Fetal Bovine Serum (Seromed®), Zellkulturmedium RPMI 1640, Penicillin/Streptomycin 10000 U/10000 µg/ml, Bicol Separating Solution

Bio-Rad Lab., Richmond, Calif., USA

Tetramethyldiamin (TEMED), Gel-Trockenrahmen, Gelelektrophorese-Netzgeräte

Biometra, biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen

UNO-Thermoblock™, PCR-Gelkammer

Bruker Daltonik AG, Bremen

Anchorchip 400/384-Platte, Massenspektrometer (MALDI-ToF)

Corning GmbH, Wiesbaden

Costar® beschichtete Zentrifugengefäße, Costar® Einmalpipetten

Delux, Labortechnik, Gödenstorf

EL_x800 Universal Microplate Reader

Eastman Kodak Company, Rochester, N.Y., USA

Röntgenfilme

Eppendorf Gerätebau, Hamburg

Reaktionsgefäße verschiedener Größe (1,5ml/2ml), Thermomixer 5436,
Tischzentrifuge 5415 R

Gibco BRL, Life Technologies, Eggenstein

Cystein- und methioninfreies RPMI-Medium, PBS-Tabletten, 1 kb DNA-Leiter, Mo-
MLV Reverse Transkriptase

Heraeus Instruments GmbH, Hanau

Inkubator für Zellkultur, CO₂-begast, Sicherheitswerkbank Klasse II, Tischzentrifuge
„Biofuge 13“

ICN Biochemicals, Inc., Eschwege

Trans ³⁵Schwefel (1000Ci/mmol)

Invitrogen GmbH, Karlsruhe

Proteingrößenstandard „BenchMark™ Prestained“

Kontron, Analytik GmbH, München

Ultrazentrifuge TGA-65, Ultrazentrifugenröhrchen

MBI Fermentas, St. Leon-Rot

Restriktionsenzyme, 6x Loading Dye Solution, ϕX174 DNA/BsuRI (Hae III)-Marker

Merck-Eurolab GmbH

Aceton, Acetonitril, Ammoniumperoxodisulfat (APS), Chloroform, 1,4-Dithioerythritol
(DTE), Ethanol, Ethidiumbromid, Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA),
Formaldehyd, Glycerin, Harnstoff, Isopropanol, 2-Jodacetamid,
Kaliumhexacyanoferrat, Methanol, Natriumacetat (wasserfrei), Natriumcarbonat,

Natriumthiosulfat, Methanol, Silbernitrat, Trifluoressigsäure, Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS), anorganische Salze, Säuren und Basen

Millipore GmbH, Eschborn

Immobilon-P Transfermembran, Sterilfilter 0,2 und 0,45 µm Porengröße

Nunc GmbH, Wiesbaden

Cryotubes 2 ml, Plastikpetrischalen, Plastik-Reaktionsgefäße 15 ml, Zellkulturflaschen

OXOID GmbH, Wesel

Schafsblut mit Alsever-Zusatz

Packard Bioscience GmbH, Dreieich

96 Well-Unifilter Platten, 96 Well-Luma-Platten, Cell Harvester, TOP Counter

Pierce, Rockford

BCA Protein Assay

Promega GmbH, Mannheim

Rnasin, Trypsin

QIAGEN, Hilden

QIAshredder™ (250) Säulen

Roche Diagnostics, GmbH, Mannheim

Tripure, Oligo(dT)₁₅, Master SYBR Green I, LightCycler Kapillaren, LightCycler

Roth, Karlsruhe

Duran® Glasgeräte, Diagnostik Objektträger, Deckgläser

Serva, Heidelberg

Bromphenolblau

Sigma Chemie, München

Ammoniumbicarbonat, 2,5-Dihydroxybenzoesäure, Guanidinium, 2-Hydroxy-5-Methoxy-Benzoesäure, β -Mercaptoethanol, Peptidfragmentstandard für MALDI-ToF

Schubert & Weiss GmbH, München

Ultraschallbad, Schüttler

Whatman Limited, Springfield Mill, Maidstone, Kentucky, USA

3 MM-Papier

Zeiss, Oberkochen

Axiovert 10 Fluoreszenzmikroskop

3 Methoden

3.1 Zellkultur

3.1.1 Zellkulturbedingungen

Alle Zellen wurden in einem Inkubator bei 37°C unter einer Atmosphäre von 5% CO₂ und in wasserdampfgesättigter Atmosphäre kultiviert. Das Kulturmedium RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute) wurde mit 10% fötalem Kälberserum (FCS), 100 µg/ml Streptomycin und 100 U/ml Penicillin supplementiert. Glutamin war als N-Acetylalanylglutamin enthalten („stabiles Glutamin“). Medien und Zusätze wurden von Biochrom, Berlin, bezogen.

B95.8 Zelllinie

Die B-Zelllinie B95.8 wurde in RPMI-Medium vermehrt und alle 3-4 Tage 1:5 ausplattiert.

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte in einer Fast-Read 102 Zählkammer. Um tote von lebenden Zellen unterscheiden zu können, wurde die Zellsuspension mit einem Volumen einer 0,5%-igen Trypanblau-Lösung (in PBS) gemischt. Tote Zellen nehmen den Farbstoff auf und sind deshalb im Mikroskop an ihrer Blaufärbung von vitalen Zellen zu unterscheiden.

3.1.2 Aufbewahrung von Zellen

Zellen können in Gegenwart von DMSO in flüssigem Stickstoff eingefroren und über längere Zeit gelagert werden. Zum Einfrieren wurden 10⁷ Zellen abzentrifugiert (1200 rpm, 5 min, 20°C) und in 1 ml RPMI-Medium mit 50% FCS und 10% DMSO resuspendiert und in 2 ml-Gefäße (Nunc-Cryotype™) pipettiert. Um die Zellen schonend abzukühlen, wurde das Röhrchen in ein Styroporbehältnis gegeben und bei -80°C tiefgefroren. Zur längeren Lagerung wurden die Zellen anschließend in flüssigen Stickstoff überführt.

Zur Wiederverwendung wurden die Zellen mit warmen Kulturmedium (Zimmertemperatur) schnell aufgetaut. Anschließend wurden die Zellen vorsichtig in vorgewärmten Kulturmedium gewaschen und in ein Kulturgefäß überführt.

3.1.3 Präparation primärer B-Lymphozyten

Als Quelle für humane primäre B-Lymphozyten dienten frische Adenoide von ambulant operierten Patienten, meist Kindern, der HNO-Klinik Großhadern. Aus den Adenoiden wurde Lymphozytenkonzentrate hergestellt, indem das mit Skalpellen zerkleinerte Material unter Waschen mit PBS durch ein Zellsieb (100 μm) filtriert wurde. Diese Zellsuspension wurde mit RPMI-Medium auf ein Volumen von 10 ml aufgefüllt. Es wurde 2 ml Schafsblut zugegeben und kurz abzentrifugiert (1200 rpm, 5 min, 20°C), wodurch die T-Lymphozyten rosettiert wurden. Die Proben wurden anschließend über einen Ficoll-Gradienten (Ficoll-Dichte 1.077) aufgereinigt. Dafür wurden je 15 ml Ficoll mit 12 ml Zellsuspension überschichtet. Es folgte eine Zentrifugation bei 2000 rpm (770 g) für 25 min bei 10°C. Die Interphase des Gradienten, die fast ausschließlich B-Lymphozyten enthält, wurde abgenommen und restliche Schafserythrozyten mit einem Lysispuffer (10 mM KHCO_3 , 155 mM NH_4CL , 0,1 mM EDTA, pH 7.4) entfernt. Die gewonnene B-Lymphozytensuspension wurde dreimal (1200 rpm, 5 min, 20°C) mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die primären B-Lymphozyten in Kulturmedium suspendiert und direkt verwendet.

3.1.4 Infektion von primären B-Lymphozyten mit B95.8-Virusüberstand

Primäre humane B-Lymphozyten aus Adenoiden wurden mit aufkonzentriertem B95.8-Virusüberstand infiziert. Zum Erhalt der aufkonzentrierten Überstände wurden 1×10^7 B95.8-Zellen ausgesät und fünf Tage zur Virusproduktion im Inkubator kultiviert. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert (1200 rpm, 5 min, 20°C) und der Virusüberstand weiter aufkonzentriert. Dazu wurde der Überstand in Ultrazentrifugenröhrchen überführt und 2h bei 18750 rpm und 5°C abzentrifugiert. Die Viruspellets wurden in 1 ml Zellkulturmedium aufgenommen und über Nacht bei 4°C zur vollständigen Resuspendierung inkubiert. 2×10^7 frisch isolierte

B-Lymphozyten wurden in 5 ml RPMI-Medium resuspendiert. Zur Infektion wurde 1 ml des aufkonzentrierten Virusüberstandes zugegeben. Zur Kontrolle dienten 2×10^7 frisch isolierte B-Lymphozyten in 6 ml RPMI-Medium.

3.2 FACS-Analysen

Die Bestimmung der Oberflächenexpression von Proteinen auf Zellen erfolgte mit Hilfe spezifischer Antikörper und eines Durchflußzytometers (FACS™). Dazu wurden 5×10^6 Zellen dreimal in kaltem PBS/5%FCS gewaschen und mit spezifischen Antikörpern (CD19, CD3) 20 min auf Eis inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in PBS/5%FCS wurden die Zellen mit APC- bzw. PerCP-konjugiertem Sekundärantikörper für 20 min auf Eis im Dunkeln inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wurde die Oberflächenexpression in einem FACS™ Durchflußzytometer (Becton Dickinson) bestimmt. Zur Kontrolle wurden Zellen ausschließlich mit Sekundärantikörper inkubiert und gleichermaßen vermessen.

3.3 PCR-Analysen

„Taq“ DNA-Polymerase und der dazugehörige Puffer wurden von der Firma MBI Fermentas bezogen und die PCR-Analyse nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Das Temperaturprofil der PCR richtete sich nach den Schmelztemperaturen der Oligonucleotide und der Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragmentes.

Standardprotokoll für die Amplifikation von gp85-DNA Fragmenten

Reaktionsansatz:

2 µg Gesamt-DNA
5 µl 10x PCR-Puffer
5 µl $MgCl_2$ (25 mM)
1 µl dNTP (10 mM)
je 1 µl Primer (10 pm)
1 µl Taq Polymerase (1u/µl)
 H_2O ad 50 µl

PCR-Programm: 94°C 3 min, 60°C 1 min, 72°C 1 min, 30 Zyklen

3.3.1 Agarose-Gelelektrophorese

Die DNA-Fragmente wurden, je nach Größe, in Agarose-Gelen geeigneter Konzentration aufgetrennt. Die Migrationsgeschwindigkeit der Fragmente ist dabei dem Logarithmus ihrer Größe umgekehrt proportional. Die Agarosekonzentration eines Gels betrug zwischen 1% und 2%. Zur späteren Detektion der DNA wurde Ethidiumbromid (40 ng/ml) der Agaroselösung zugesetzt. Die anzulegende Spannung berechnet sich aus dem Abstand der beiden Elektroden und sollte etwa 3 V/cm betragen. Zur Detektion der Nucleinsäuren wurde das Gel nach dem Lauf unter UV Licht betrachtet.

Laufpuffer: 1xTBE (45 mM Tris-Borat, 1 mM EDTA) oder 1xTAE (40 mM Tris-Acetat, 1 mM EDTA)

3.4 Immunfluoreszenz-Analyse

Die Expression des latenten EBV-Proteins EBNA2 in frisch infizierten primären humanen B-Lymphozyten wurde durch Immunfärbungen nachgewiesen. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und für 20 min mit Aceton fixiert. Die fixierten Zellen wurden mit spezifischem Antikörper für 30 min bei 37°C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen der Zellen mit PBS wurden sie mit einem zweiten, Cy3-konjugierten Sekundärantikörper für weitere 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und in einer 10%-igen PBS/Glyzerin-Lösung eingebettet. Zur Analyse wurde der Farbstoff mit Licht der Wellenlänge 546 nm angeregt und mit einem invertierten Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Axiovert 10) mit dem geeigneten Filtereinsatz mikroskopiert.

3.5 Immunoblot Analyse

10^6 Zellen pro Ansatz wurden in 200 μ l 1% Triton X-100/TBS lysiert. Die unlösliche Fraktion wurde durch Zentrifugation (13000 rpm, 10 min, 20°C) abgetrennt. Zur Denaturierung der Proteine wurden die Lysate mit „Laemmli“-Puffer versetzt und 5 min bei 95°C erhitzt. Anschließend wurden die Proteine durch SDS-

Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Als Molekulargewichtsstandard wurde der „BenchMark™ Prestained Protein Ladder“ (GibcoBRL, Lifetechnologies) verwendet. Die SDS-PAGE erfolgte bei 180 V und 30 mA/Gel in 10-15%-igen SDS-Gelen. Unmittelbar nach der Elektrophorese wurden die aufgetrennten Proteine auf eine Immobilon-P Transfermembran (Millipore) übertragen. Der Transfer erfolgte bei 100 V, 500 mA und 40 min. Nach dem Transfer der Proteine auf die Membran wurde diese für ca. 15 min in Blocklösung geschwenkt, um unspezifische Proteinbindestellen abzusättigen. Anschließend wurde die Membran für 1h mit dem primären Antikörper bei Raumtemperatur inkubiert. Vor Zugabe des Sekundärantikörpers wurde die Membran dreimal 10 min lang in Waschpuffer geschwenkt. Die Inkubation mit dem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper (Verdünnung 1:5000) erfolgte ebenfalls bei Raumtemperatur für 30 min. Der Immunoblot wurde anschließend dreimal 10 min lang gewaschen und mit Hilfe von ECL als Substrat nach Angaben des Herstellers sichtbar gemacht.

Zur mehrmaligen Nutzung der Membran wurde diese in 40 ml Strip-Lösung für 20 min bei 52°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für je 20 min in Waschpuffer wurde die Membran erneut geblockt und mit Primärantikörper inkubiert.

Laemmli-Puffer: 140 mM Tris-HCl (pH 7,0), 30% Glycerin, 4% SDS, 16% β -Mercaptoethanol, 0,1% Bromphenolblau

10% SDS-Gel (80ml): 26,6 ml Acrylamid (30%)/Bisacrylamid (0,8%)-Lösung, 13,3 ml 2 M Tris-HCl (pH 8,8), 530 μ l 0,5 M EDTA, 40 ml H₂O

Sammelgel (100ml): 15 ml Acrylamid (30%)/Bisacrylamid (0,8%)-Lösung, 6,2 ml 2M Tris-HCl (pH 6,8), 800 μ l 0,5 M EDTA, 1ml 10% SDS, 76,5 ml H₂O

Transferpuffer (10x): 250 mM Tris-HCl, 1,26 M Glycin

Blocklösung: 20 mM Tris-HCl (pH 7,4); 150 mM NaCl, 5% Magermilchpulver

Waschlösung: 20 mM Tris-HCl (pH 7,4); 150 mM NaCl, 1% Tween-20

Strip-Lösung: 125 mM Tris-HCl (pH 6,8), 10% SDS, 10 mM DTT

3.6 Thymidin-Inkorporation

Jeweils 5×10^4 B-Lymphozyten wurden in 100 μ l Endvolumen in 96-Well-Platten ausplattiert. Davon wurden Triplikate mit B95.8-Überstand versetzt. Die restlichen Triplikate dienten als Negativkontrolle. Dieser Ansatz wurde fünf mal wiederholt, da sich die Kinetik über fünf Tage erstrecken sollte. Die B-Lymphozyten wurden anschließend für fünf Tage bei 37°C inkubiert. Jeden Tag wurde fortlaufend in sechs der insgesamt 30 Wells 0,5 μ Ci [3 H]-Thymidin pipettiert und die B-Lymphozyten für weitere 4h bei 37°C inkubiert. Nach Ende der Inkubationszeit wurden die [3 H]-Thymidin-markierten B-Lymphozyten in den 96-Well-Platten mit Hilfe eines FilterMate™ Cell Harvester auf speziell entwickelte UniFilter-Platten transferiert. Die Aufnahme des Thymidins wurde als emittierte β -Strahlung im Liquid-Scintillationsverfahren mit Hilfe eines Packard Topcounters quantifiziert. Als Maß für die Proliferation wurden Zerfälle pro Minute (counts per minute = cpm) angegeben, welche mit der Menge des eingebauten Thymidins korrelieren.

3.7 Zwei-dimensionale Polyacrylamidgelelektrophorese (2D-PAGE)

3.7.1 1. Dimension: Isoelektrische Fokussierung

Bei der isoelektrischen Fokussierung werden Proteine nach ihrer Zusammensetzung hinsichtlich der geladenen (sauren und basischen) Seitenketten aufgetrennt. Hierfür läßt man die Proteine in einem immobilisierten pH-Gradienten wandern. Nach Anlegen einer Spannung migrieren die Proteine entsprechend ihrer Netto-Ladung zum Plus- oder Minuspol entlang dem pH-Gradienten im Gel. Bei einem für jedes einzelne Protein spezifischen pH-Wert, dem sogenannten isoelektrischen Punkt (pI), wandert das Protein, dessen Nettoladung jetzt gleich Null ist, nicht mehr.

Durchführung

2×10^7 Zellen wurden sukzessive einmal in PBS und PBS/H₂O (1:1) gewaschen und anschließend in 350 μ l Lysis Puffer lysiert. Die DNA im Lysat wurde in QIAshredder-

Zentrifugationssäulen (13000 rpm, 2 min) zerkleinert und anschließend bei 42000 g bei RT 30 min pelletiert. Die Proteine im Überstand wurden mit 2 µl IPG Puffer und 1 µl Bromphenolblau Puffer versetzt und mit Hilfe von „immobiline dry strip“ Gradienten (pH 3-10 und pH 4-7; 18 cm) auf einer IPGphor-Fokussierungseinheit nach ihrem isoelektrischen Punkten aufgetrennt. Das dabei verwendete Fokussierungsprotokoll ist in der nachfolgenden Tabelle aufgeführt:

Stufen	Spannung (V)	Dauer (h)
Rehydrierung	0	0,1
1	30	8
2	50	4
3	200	2
4	500	2
5	2000	2
6	4000	2
Gradient	8000	1
8	8000	9

Die Fokussierung erfolgte über den Zeitraum von 30h bei 20°C. Die Stromstärke wurde auf 50 µA pro Streifen begrenzt. Die üblicherweise erhaltene Gesamtvoltstundenzahl betrug 92 kWh. Nach der Fokussierung wurden die IPG-strips entweder bei -80°C weggefroren oder sofort auf ein SDS-PAGE Gel geladen.

2D-Lysis Puffer: 9 M Harnstoff, 4% CHAPS, 1% DTT, 1 mM EDTA

Resolving Puffer (pH 8,8): 1,5 M Tris-HCl, 0,4% SDS, 1,5 mM Na₂S₂O₃ (zwei Wochen bei 4°C haltbar)

Bromphenolblau Puffer: 3 mM Bromphenolblau in Resolving Puffer

3.7.2 2. Dimension: SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Bei der Gelelektrophorese trennt man die zu untersuchenden Moleküle in einem Polymer-Gel, über dem ein elektrisches Potential angelegt ist, auf. Dazu werden die

IPG-strips in einer SDS-Lösung inkubiert. SDS bindet an die hydrophoben Regionen der Proteine, wodurch alle Proteine gleicher Größe die gleiche Anzahl an negativen Ladungen erhalten. Die Proteine wandern dann gemäß ihrer Ladung zum Pluspol des elektrischen Feldes. Die Geschwindigkeit hängt dabei von ihrer Größe ab, da lange Moleküle die engmaschig quervernetzte Gelmatrix nur langsamer durchqueren können als kurze. Durch die Kombination der 1. und 2. Dimension erhält man so ein Proteingel mit sehr hoher Auflösung, in dem die Proteine als einzelne Spots sichtbar sind.

Durchführung

Die IPG-strips wurden sukzessive mit bromphenolblau-haltigem Equilibrierungspuffer behandelt, der jeweils 65 mM DTE (reduzierend) oder 215 mM 2-Jodacetamid enthielt. Anschließend wurden die IPG-strips auf ein 13%-iges SDS-Polyacrylamidgel aufgelegt, mit 0,5% Agarose (in Equilibrierungspuffer) überschichtet, und die fokussierten Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt (SDS-Laufpuffer; 5 W, 15 min zum Einwandern der Proteine, danach 60 W).

Equilibrierungspuffer: 6 M Harnstoff, 3,3 M Glycerin, 70 mM SDS, 3,3% Resolving Puffer

SDS-Laufpuffer: 1,92 M Glycin, 0,25 M Tris, 1% SDS

Die Detektion der Proteine erfolgte anschließend mit einer Silberfärbung:

Schritt	Lösung	Dauer (min)
1	Fixierer	30
2	Fixierer	30
3	50% Ethanol	20
4	50% Ethanol	20
5	50% Ethanol	20
6	Sensitivierung	2
7	Wasser	1
8	Wasser	1
9	Silber	15
10	Wasser	1
11	Entwickler	1-20
12	Wasser	1
13	Fixierer	10
14	Aufbewahrung	>30

Fixierlösung: 50% Methanol, 12% Essigsäure

Sensitivierungslösung: 1,5 mM Natriumthiosulfat

Silberlösung: 12 mM Silbernitrat, 0,075% Formaldehyd (37%)

Entwicklerlösung: 0,57 M Natriumcarbonat, 2,5% Sensitivierungslösung, 0,05% Formaldehyd (37%)

Aufbewahrungslösung: 20% Ethanol, 2% Glycerin

Die gefärbten Gele wurden zwischen zwei Cellophanfolien gebettet und in Trockenrahmen aufgespannt und bei RT getrocknet.

3.7.2.1 Schwefelmarkierung von Proteinen

2×10^7 B-Lymphozyten wurden in 4 ml cystein- und methioninfreiem RPMI-Medium mit 10% FCS resuspendiert. Zwei Stunden vor der Zellernte wurden 0,125 mCi/ml Trans-³⁵Schwefel (>1000 Ci/mmol, ICN) hinzugefügt. Die Aufarbeitung der Zellen und die Durchführung der zweidimensionalen Polyacrylamidgelelektrophorese erfolgte anlog 3.6.1 und 3.6.2. Radioaktiv-markierte Gele wurden zur Sichtbarmachung 12-96h exponiert.

3.7.3 Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation Time-of-Flight Analyse (MALDI-ToF)

3.7.3.1 Trypsin-Verdau

Zu analysierende Proteine wurden aus einem fixierten silbergefärbten Gel ausgeschnitten, in silanisierte 500 µl Eppendorf Gefäße überführt und mit 100 µl Wasser (Millipore) einmal 30 min bei RT gewaschen. Nach kurzer Zentrifugation wurde das Wasser mit einer Pipette vorsichtig abgezogen. Die gewaschenen Gelstücke wurden mit 30 µl frisch hergestellter Bleichlösung (ein Teil 30 mM $K_3Fe(CN)_6$ + ein Teil 100 mM Natriumthiosulfat) versetzt, im Schüttler bis zur Entfärbung inkubiert (5 min) und danach dreimal mit je 100 µl Wasser gewaschen (einmal kurz, dann zweimal je 5 min). Anschließend wurden die Gelstücke zweimal im Wechsel 15 min mit 50% Acetonitril und 50 mM Ammoniumbicarbonat (frisch) gewaschen. Zum Verdau der Proteine wurden die Gelstücke in 20 µl

Ammoniumbicarbonat und 0,5 µl Trypsin (100 ng/µl) aufgenommen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf Gefäß überführt und die verbliebenen Gelstücke nochmal mit 30 µl 70% Acetonitril für 20 min bei RT nacheluiert. Der Überstand wurde abgenommen, mit dem ersten vereinigt, in flüssigen Stickstoff schockgefroren und im Vakuum (Speedvac) getrocknet. Das erhaltene Lyophilisat wurde in 50 µl Wasser gelöst und erneut getrocknet. Dieser Prozess wurde so lange wiederholt bis keine Salzurückstände mehr sichtbar waren. Anschließend wurde das Lyophilisat bei -20°C gelagert.

3.7.3.2 Beschichten mit DHB-Matrix

Das Anchor-Target (Bruker) wurde vor jeder Messung mit 50% Methanol gespült und an der Luft getrocknet. Das Lyophilisat wurde in 10 µl Resolving Puffer im Ultraschall-Bad gelöst und anschließend 1 µl dieser Lösung mit 1 µl des DHB-Mixes vermischt. Aus dieser Mischung wurden 0,5 µl auf das Anchor-Target aufgebracht und nach Kristallisation in der MALDI-ToF vermessen.

Resolving Puffer: 10% Acetonitril, 0,1% Trifluoressigsäure

DHB-Mix: bestehend aus 9 Teilen DHB (20% Acetonitril, 0,1% Trifluoressigsäure, 20 mg/ml 2,5-Dihydroxybenzoesäure) und 1 Teil HMB (20% Acetonitril, 0,1% Trifluoressigsäure, 20 mg/ml 2-Hydroxy-5-Methoxybenzoesäure)

3.7.3.3 MALDI-ToF Analyse

Die MALDI-ToF ist eine spezielle Variante der Massenspektroskopie. Bei der MALDI-ToF Analyse werden Peptide mittels Laser in positive oder negative Ionen überführt (=Ionisation). Diese sind meist instabil und zerfallen in geladene und ungeladene Bruchstücke (=Fragmentierung). Die geladenen Bruchstücke werden in einem elektrischen Feld nach ihrer Masse aufgetrennt (=Massen-Fokussierung). Ihre Massen und relativen Intensitäten werden in einem für jedes Peptid charakteristischen Diagramm, dem Massenspektrum, registriert. Die so erhaltenen Massenspektren wurden anschließend kalibriert und zur Identifizierung des jeweiligen Proteins mit „peptid mass fingerprint“ Proteindatenbanken verglichen (<http://www.matrixscience.com>).

3.8 Lightcycler PCR

Die sogenannte „real-time“ PCR ermöglicht es, jede einzelne PCR-Reaktion in ihrer exponentiellen Phase zu quantifizieren. Dazu wird nach jedem erfolgten Zyklus die Inkorporation eines Farbstoffes (SYBR Green I) in die sich vermehrende doppelsträngige DNA optisch gemessen. Die gemessene Fluoreszenz steht somit in berechenbarer Abhängigkeit der Zyklenzahl und der Ausgangsmenge der cDNA.

Durchführung

Aus humanen B-Lymphozyten wurde Gesamt-RNA durch Phenol-Chloroform-Extraktion (Tripure Isolation Reagent, Roche) gemäß des Protokolls des Herstellers isoliert. 1 µg RNA wurde mit 100 ng Oligo(dT)₁₅ (insgesamt 6,25 µl Gesamtvolumen) 5 min bei 65°C inkubiert. Anschließend wurden 3,75 µl RT-Mix hinzugefügt. Die reverse Transkription erfolgte 55 min bei 37°C und wurde durch dreiminütiges Erhitzen auf 95°C beendet. Der RT-Ansatz wurde dann 1:10 mit Wasser verdünnt und direkt für die Lightcycler-PCR eingesetzt („cDNA“). Die PCR-Reaktion erfolgte in einer Quarzkapillare im Lightcycler (Roche). Nach einem zehnmütigen Denaturierungsschritt bei 95°C zum Aufschmelzen der Wachskügelchen, in denen die Taq enthalten ist, erfolgten 45 Zyklen mit 1 Sekunde 95°C, 10 Sekunden Annealing, und ein Amplifikationsschritt bei 72°C. Die Annealingtemperatur und Amplifikationszeit variierten je nach Primerpaar (siehe Tabelle). Die PCR wurde z.T. auch in 10 µl Gesamtvolumen durchgeführt.

In Lightcycler PCR-Reaktionen wurde die Amplifikationszeit bei 72°C aus dem Produkt aus Amplifikatgröße in Basenpaaren x 0,04 sec berechnet.

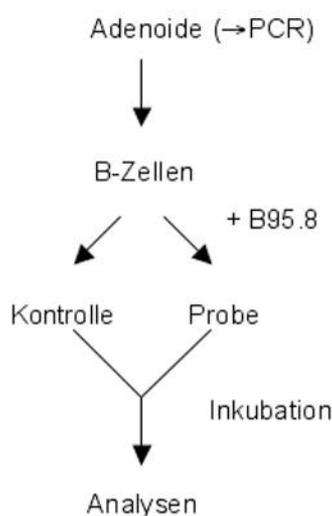
<u>Reaktionsansatz:</u>	Primerpaare		
	Name	Amplifikatgröße	T _m (°C)
2 µl cDNA	hCD19	497	65
1,6 µl MgCl ₂ (25 mM)	EBNA2	191	65
2 µl Roche Mix	c-myc	236	65
2 µl Primerpaar (10 µM)	Nm23	462	65
12,4 µl H ₂ O			

4 Ergebnisse

Das Epstein-Barr-Virus infiziert und immortalisiert *in vitro* mit hoher Effizienz primäre humane B-Lymphozyten. Dabei sind die fünf viralen Gene - EBNA1, EBNA2, EBNA3A/-3C und LMP1 - für die EBV-vermittelte B-Zell-Immortalisierung entscheidend (Hammerschmidt and Sugden, 1989; Kaye et al., 1993; Kilger et al., 1998; Tomkinson et al., 1993). Dass eine EBV-Infektion auch eine Reihe zellulärer Veränderungen mit sich bringt, wurde bereits in der Einleitung eingehend erläutert. Diese bisher gefundenen zellulären Gene stellen mit Sicherheit nur einen sehr kleinen Anteil derjenigen Gene dar, die durch EBV während des Immortalisierungsprozess eine Veränderung in ihrer Expression erfahren. Ziel meiner Arbeit ist daher die Identifizierung weiterer zellulärer Gene, die unmittelbar nach einer EBV-Infektion eine Veränderung in ihrer Regulation erfahren.

4.1 EBV-induzierte differentielle Genexpression in primären humanen B-Lymphozyten

4.1.1 Etablierung eines zellulären Systems zur Untersuchung von EBV-induzierten Veränderungen in B-Lymphozyten



Um die Veränderungen von B-Lymphozyten nach einer EBV-Infektion untersuchen zu können, wurde ein zelluläres *in vitro* System etabliert. Dieses *in vitro* System erlaubt es, virale und zelluläre Gene, die mit dem Immortalisierungsprozess in Zusammenhang stehen, zu studieren. In Abbildung 5 ist der Ablauf der Probenaufbereitung schematisch dargestellt.

Abb. 5: Schematische Darstellung der Probenaufbereitung und Infektion von B-Lymphozyten mit B95.8

Als Quelle für die Gewinnung von B-Lymphozyten dienten frische Adenoide. Adenoide fallen nach einer Adenotomie an, und wurden vom ambulanten OP der HNO-Klinik Großhadern bezogen. Bevor Adenoide für weitere Analysen aufbereitet wurden, wurde eine natürliche und bereits erfolgte EBV-Infektion der B-Lymphozyten mittels PCR ausgeschlossen. Dazu wurde die zelluläre Gesamt-DNA der aus den Adenoiden in das Aufbewahrungsmedium übergetretenen B-Lymphozyten auf das Vorhandensein viraler DNA mit Primern spezifisch für das Oberflächenglykoprotein gp85 untersucht. Die Gesamt-DNA der B-Lymphozyten wurde aufgereinigt und mittels gp85-spezifischen Primern amplifiziert. Anschließend wurden die Amplifikate in einem Agarosegel aufgetrennt und mittels Ethidiumbromid-Interkalierung detektiert. Abbildung 6 zeigt, dass alle Adenoide, die für weitere Analysen verwendet wurden, EBV negativ waren.

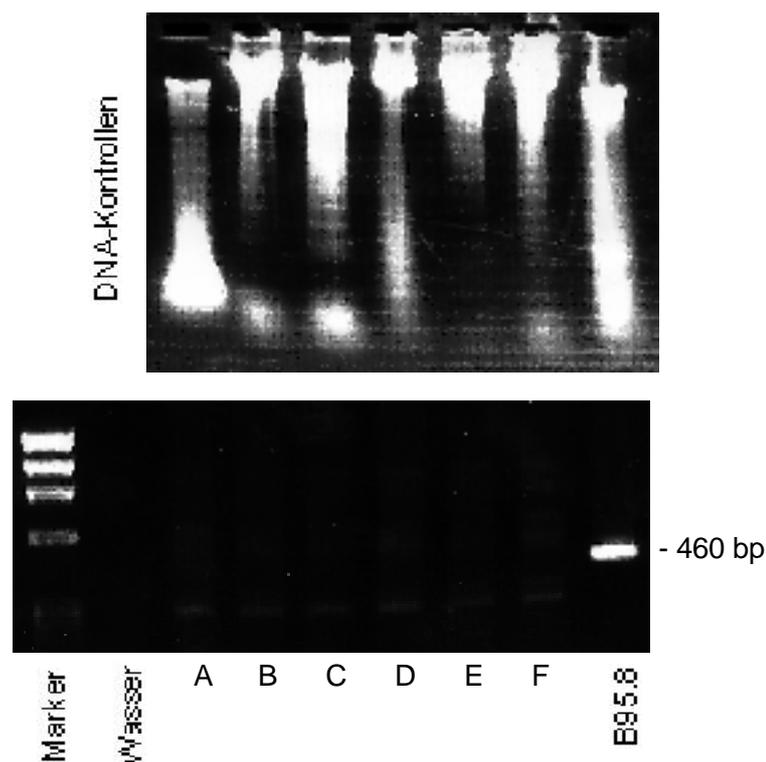


Abb. 6: gp85-spezifische PCR-Amplifikation viraler DNA in primären humanen B-Lymphozyten. Primäre B-Lymphozyten aus Adenoiden wurden mit einer 0,3 M Guanidinium-Lösung lysiert, die Gesamt-DNA isoliert und eine Amplifikation der DNA mit gp85-spezifischen Primern durchgeführt. Die DNA wurde auf ein 1%-iges Agarosegel aufgetragen und die 460 bp-Bande wurde über eine Ethidiumbromid-Interkalierung detektiert. Gezeigt wird die Abwesenheit von gp85 in sechs verschiedenen Adenoiden, die anschließend für weitere Versuche aufgearbeitet wurden. Als Marker wurde der ϕ X174 DNA/BsuRI (Hae III)-Marker verwendet. Die DNA-Kontrollen dienten als Beleg dafür, dass in jeder isolierten Probe DNA enthalten war.

Nachdem eine vorherige EBV-Infektion für alle verwendeten Adenoide ausgeschlossen wurde, wurden die Adenoide mechanisch zerkleinert. Anschließend wurden mit Hilfe einer Dichtezentrifugation über eine Stufengradienten aus Ficoll die peripheren mononukläeren Blutzellen (PBMZs, vor allem Lymphozyten und Monozyten) von Granulozyten und Erythrozyten abgetrennt. Da aber für weitere Analysen eine reine B-Lymphozytensuspension gewünscht wurde, mußten zusätzlich die T-Lymphozyten, die sich in ihrer Dichte nur wenig von B-Lymphozyten unterscheiden, abgetrennt werden. Dabei machte man sich zu Nutzen, das T-Lymphozyten von Schafserythrozyten rosettiert werden können, so an Dichte zunehmen und somit in der Dichtezentrifugation mit den Granulozyten und Erythrozyten sedimentiert werden. Zur Bestimmung des erhaltenen B-Lymphozytenanteils wurde die Oberflächenexpression des B-Lymphozyten-spezifischen Markers CD19 und des T-Lymphozyten-spezifischen Markers CD3, vor und nach der Depletierung der T-Lymphozyten mit Schafsblut, in der Durchflusszytometrie, gemessen.

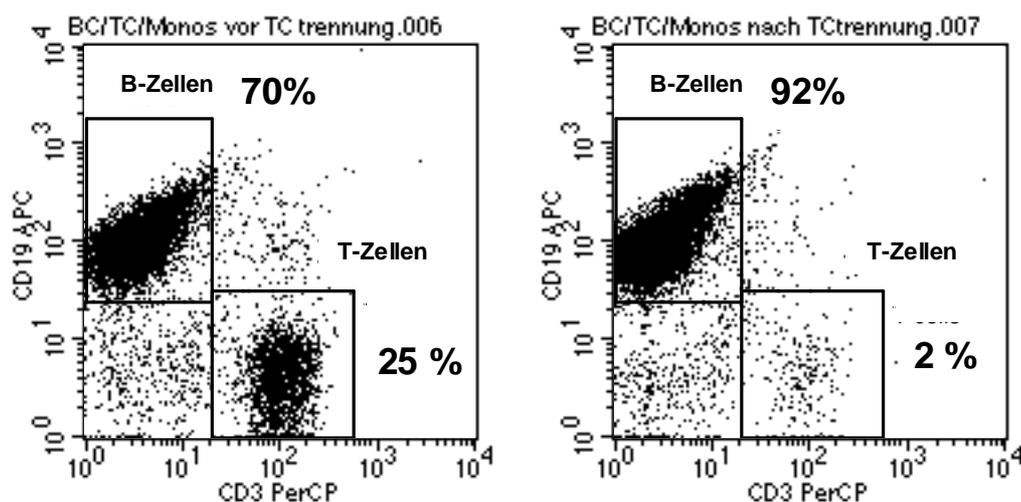


Abb. 7: Anteil der B- und T-Lymphozyten vor und nach Depletierung der T-Lymphozyten mit Schafsblut. Um den Anteil an B- und T-Lymphozyten einer Lymphozytensuspension zu bestimmen, wurde die Expression der B- und T-Lymphozyten-spezifischen Oberflächenmarker (CD19, CD3) mittels Durchflusszytometrie nachgewiesen.

Die Abbildung 7 zeigt, dass vor Depletierung der T-Lymphozyten mit Schafsblut die isolierten primären Zellen einen durchschnittlichen B-Lymphozytenanteil von 70% enthielten. Der Anteil an T-Lymphozyten betrug durchschnittlich 25%. Nach

Depletierung der T-Lymphozyten mit Schafsblut stieg der Anteil der B-Lymphozyten auf durchschnittlich 90%, der Anteil der T-Lymphozyten sank dagegen auf 2-3%. Damit war die Voraussetzung, eine möglichst reine B-Lymphozytensuspension für weitere Analysen zu erhalten, geschaffen.

Nach der Isolierung von B-Lymphozyten erfolgte die Infektion der Zellen mit EBV. Als Quelle für infektiöses Wildtyp-EBV diente die B95.8-Zelllinie. Um die Effizienz der Infektion zu steigern, wurden die infektiösen Viruspartikel aus dem Zellkultur-Überstand der B95.8-Zelllinie durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert. Um Veränderungen an primären humanen B-Lymphozyten nach einer EBV-Infektion feststellen zu können, wurden diese in Standard-Zellkulturmedium bzw. konditioniertem B95.8-Überstand inkubiert. Zur Steigerung der Effizienz erfolgte die Inkubation der B-Lymphozyten mit Virus in kleinen, 10 ml Zellkulturflaschen und minimalen Volumina. Die notwendige Inkubationsdauer zur effizienten Infektion von B-Lymphozyten wurde mittels Kinetiken bestimmt.

4.1.2 Kinetiken der EBV-Infektion primärer B-Lymphozyten

In ersten Experimenten wurde der Zeitpunkt der EBV-Infektion bestimmt, der erlaubt frühestmögliche EBV-Effekte zu messen. Dazu wurde eine Infektionskinetik über einen Zeitraum von fünf Tagen etabliert. EBNA2 wird zusammen mit EBNA-LP in den ersten 24-32 Stunden nach einer erfolgten EBV-Infektion exprimiert (Alfieri et al., 1991). Es ist somit eines der ersten viralen Proteine, die nach einer EBV-Infektion exprimiert werden, und somit geeignet für den frühen Infektionsnachweis.

Primäre humane B-Lymphozyten wurden fünf Tage mit konditioniertem B95.8-Überstand inkubiert. Kontrollzellen wurden nur mit Standard-Zellkulturmedium inkubiert. Das Infektionsstadium der B-Lymphozyten wurde nun anhand der EBNA2-Expression für den angegebenen Zeitraum sowohl in einer Immunfärbung als auch in einer Immunoblot Analyse nachgewiesen.

4.1.2.1 Immunfärbung

Nach fünftägiger Inkubation wurden Kontrollzellen, B95.8-Zellen (Positivkontrolle) und die B95.8-infizierten B-Lymphozyten mit EBNA2-spezifischen Antikörpern

markiert und angefärbt. Mit Hilfe eines Cy3-konjugierten Sekundärantikörpers konnten die Zellen in einem invertierten Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden (Abb.8). Kontrollzellen erscheinen im Fluoreszenzmikroskop ungefärbt, wodurch eine EBV-Infektion ausgeschlossen werden konnte; dies bestätigte auch die PCR-Analyse (Abb.6/A). Bei der Positivkontrolle B95.8 wurden 95% der Zellen angefärbt. Die Kinetik zeigte einen kontinuierlichen Anstieg der EBNA2-Konzentration in EBV-infizierten B-Lymphozyten. An Tag 1 exprimierten 20% der B-Lymphozyten EBNA2. An Tag 3 erhöhte sich die EBNA2-Expression auf 50% um schließlich an Tag 5 mit 80% EBNA2-positiven B-Lymphozyten ihr Maximum zu erreichen.

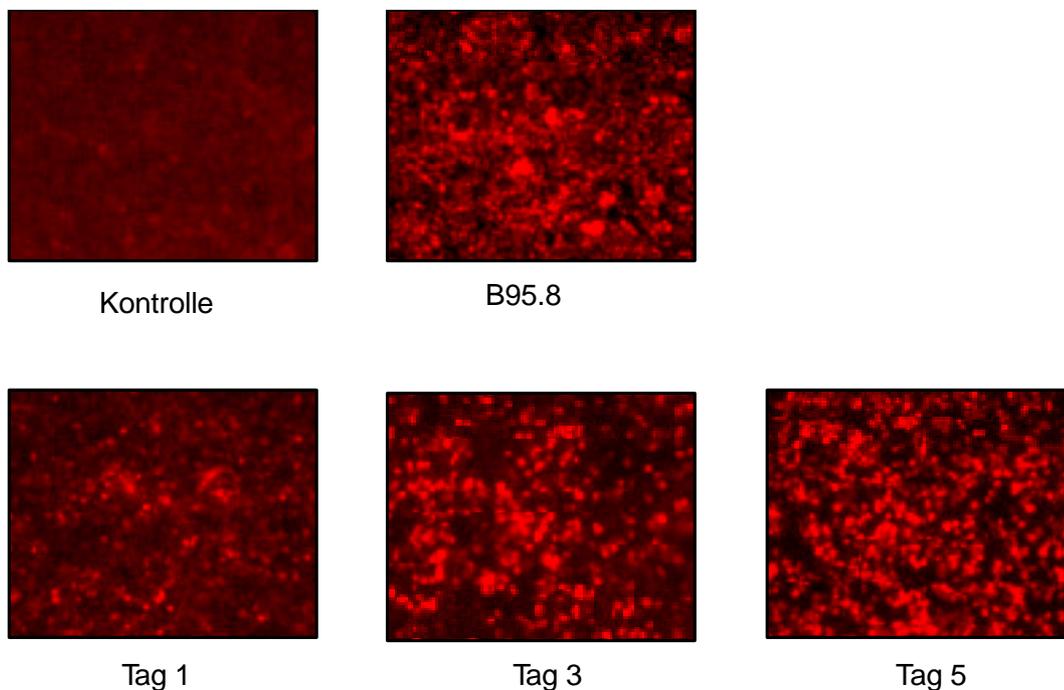


Abb. 8: Immunfärbung von B-Lymphozyten mit EBNA2-spezifischen Antikörpern. Die B-Lymphozyten wurden mit Aceton fixiert und als Nachweis des Infektionsstadiums wurde eine Immunfärbung mit dem Hybridomüberstand R3 und 1E6 (1:1) gegen EBNA2 durchgeführt. Die Detektion erfolgte mit einem Cy3-gekoppelten Sekundärantikörper in einem invertiertem Fluoreszenzmikroskop.

4.1.2.2 Immunoblot Analyse

Die Expression von EBNA2 wurde mit Hilfe einer Immunoblot Analyse bestimmt. B-Lymphozyten wurden mit konditioniertem B95.8-Überstand oder Standard-

Zellkulturmedium für fünf Tage inkubiert. Täglich wurden 5×10^6 B-Lymphozyten für die Immunoblot Analyse aufgearbeitet. Die Proteinlysate wurden über eine eindimensionale Gelelektrophorese (SDS-PAGE) in einem 10%-igen Polyacrylamidgel aufgetrennt, auf eine PVDP-Membran transferiert und die EBNA2-Expression mit einem spezifischen Antikörper und einem Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörper nachgewiesen. Abbildung 9 zeigt, dass ab Tag drei der Infektion eine EBNA2-Expression beobachtet werden kann, im Gegensatz zu Kontrollzellen (-B95.8, Tag 1/5) die kein EBNA2 exprimierten. Die Abwesenheit von EBV konnte auch hier in der vorangegangenen PCR-Analyse bestätigt werden (Abb.6/E). Als Kontrolle für die Auftragung gleicher Proteinmengen wurde, neben der Proteinquantifizierung über BCA, ein Immunoblot gegen Aktin durchgeführt.

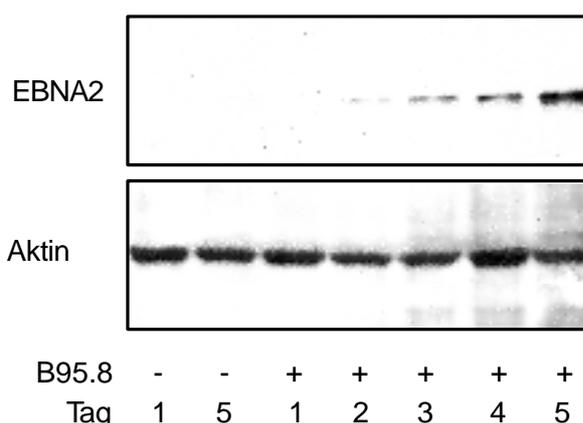


Abb. 9: Immunoblot Analyse zum Nachweis des Infektionsstadiums in B-Lymphozyten. B-Lymphozyten wurden fünf Tage mit B95.8-Überstand inkubiert und anschließend in 1% Triton lysiert. Die Proteine wurden in einem 10%-igen SDS PAGE getrennt und mit Hilfe von EBNA2-spezifischen Antikörpern detektiert (oben). Das gleichmäßige Beladen des Gels wurde mit Hilfe eines Aktin-spezifischen Immunoblots überprüft (unten).

Die beiden Messungen bestätigten, dass die etablierten Infektionsbedingungen eine ausreichende Infektionseffizienz gewährleisten, da die Expression des viralen EBNA2 in EBV-infizierten B-Lymphozyten innerhalb von drei Tagen stattfand. Deshalb wurde die Infektionsdauer humaner B-Lymphozyten mit EBV auf drei Tage festgelegt.

4.2 Verstärkte Proliferation EBV-infizierter B-Lymphozyten

Im Folgenden wurden die Effekte der EBV-Infektion auf die Proliferation und Morphologie von primären B-Lymphozyten untersucht. Ein verändertes Verhalten humaner B-Lymphozyten als Folge einer EBV-Infektion wurde dadurch deutlich, dass B-Lymphozyten kurz nach der Infektion Zellaggregate bildeten (Daten nicht gezeigt). Die Proliferation der B-Lymphozyten nach einer EBV-Infektion wurde in einem [³H]-Thymidin-Assay gemessen. Mit Hilfe der Thymidin-Inkorporation kann die Menge an neusynthetisierter DNA und damit indirekt die Proliferationsrate bestimmt werden. Das veränderte Proliferationsverhalten der B-Lymphozyten nach einer EBV-Infektion wurde über einen Zeitraum von fünf Tagen verfolgt. Dazu wurden 5×10^4 B-Lymphozyten pro 100 μl Zellkulturmedium mit B95.8 infiziert. Um die Proliferationsrate zu bestimmen, wurden jeder B-Lymphozytenkultur für 4h [³H]-Thymidin zugesetzt und die [³H]-Thymidin-Inkorporation in die zelluläre DNA gemessen. Nicht-infizierte Kontrollzellen wurden gleichermaßen mit [³H]-Thymidin versetzt und vermessen. Die Abbildung 10 zeigt den zeitlichen Verlauf der [³H]-Thymidin-Inkorporation in humane B-Lymphozyten über einen Zeitraum von fünf Tagen. Bis Tag 2 unterscheidet sich die DNA-Syntheserate der infizierten B-Lymphozyten (durchgezogene Linie) von der DNA-Syntheserate der Kontrollzellen (gestrichelte Linie) nicht. Die [³H]-Thymidin-Inkorporation in die B-Lymphozyten nimmt hierbei sogar zunächst ab. Dies kann darauf zurückgeführt werden, dass die mechanische Aufarbeitung der Adenoide einige B-Lymphozyten so beschädigt hat, dass diese kurze Zeit später in der Kultur abstarben. Ein deutlicher Unterschied in der [³H]-Thymidin-Inkorporation wurde zwei Tage nach der Infektion messbar. Die DNA-Syntheserate infizierter B-Lymphozyten stieg steil an, nicht-infizierte B-Lymphozyten zeigten dagegen bis Tag fünf keinen Zuwachs der DNA-Syntheserate. Die höhere Ausgangskonzentration an cpm's für das zweite Adenoid (Ad2) erklärt sich durch die erhöhte B-Lymphozytenausbeute aus dem zweiten Adenoid, wodurch mehr B-Lymphozyten für den Versuch zur Verfügung standen. Dass bei diesem Versuch eine bereits zuvor bestehende EBV-Infektion der beiden verwendeten

Adenoide ausgeschlossen werden kann, zeigt die PCR-Analyse in 4.1.1 (Abb.6 B und C), mittels der keine virale DNA nachgewiesen werden konnte.

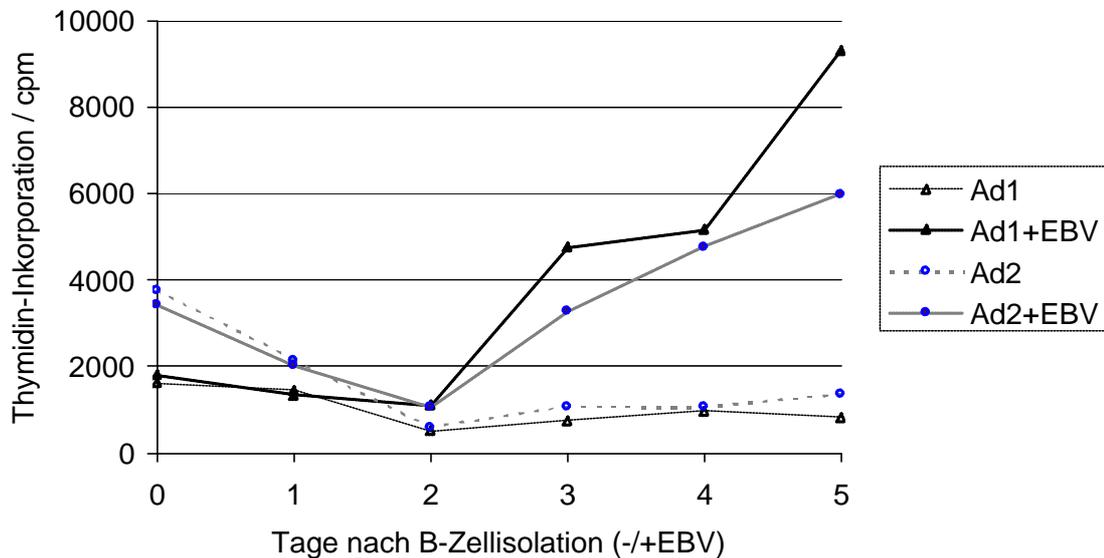


Abb. 10: Proliferationsverhalten humaner B-Lymphozyten nach einer EBV-Infektion. Die DNA-Synthesen der B-Lymphozyten wurde mittels einer ^3H -Thymidin-Inkorporation bestimmt. Die B-Lymphozyten wurden aus zwei verschiedenen Adenoiden isoliert und mit Zellkulturmedium oder B95.8-Überstand versetzt. Vor jeder Messung wurden die Zellen 4h mit 0,5 μCi versetzt. Die ^3H -Thymidin-Inkorporation wurde mittels Liquid-Scintillationsverfahren bestimmt.

4.3 Identifizierung EBV-regulierter Proteine in humanen B-Lymphozyten

Um Veränderungen in primären B-Lymphozyten nach einer EBV-Infektion feststellen zu können, wurden primäre humane B-Lymphozyten drei Tage in Standard-Zellkulturmedium bzw. konditioniertem B95.8-Überstand inkubiert (siehe 4.1.2). Abbildung 6/D zeigt, dass bei den verwendeten B-Lymphozyten eine natürliche EBV-Infektion ausgeschlossen werden konnte. Zur radioaktiven Markierung neu synthetisierter Proteine wurden B-Lymphozyten zwei Stunden vor der weiteren Aufarbeitung mit 0,125 mCi/ml Trans ^{35}S Schwefel inkubiert. Die Markierung der Proteine mit radioaktiven Schwefel lässt im Gegensatz zur Silber- und Commassiefärbung eine bessere qualitative und quantitative Aussage zu und ermöglicht den Nachweis neuer Proteine, die innerhalb dieser 2h gebildet wurden. Anschließend wurden die B-Lymphozyten für eine Auftrennung mittels 2D-

Gelelektrophorese aufbereitet. Mit Hilfe dieser Technik wurde das Proteom infizierter und nicht-infizierter B-Lymphozyten verglichen.

Bei der 2D-Gelelektrophorese werden Proteine in der ersten Dimension nach ihrem isoelektrischen Punkt (pI) aufgetrennt, um sie dann in einer anschließenden zweiten Dimension, in einem SDS-Polyacrylamidgel, bezüglich ihres Molekulargewichts aufzutrennen. Gekoppelt mit einer darauffolgenden Proteinfärbung (Silberfärbung) bzw. durch die Markierung der Proteine mit radioaktiven Schwefel kann das Proteom der B-Lymphozyten visualisiert werden. Abbildung 11 und 12 zeigen exemplarisch die Visualisierung des Proteinexpressionsmusters mittels Proteinmarkierung und Proteinfärbung.

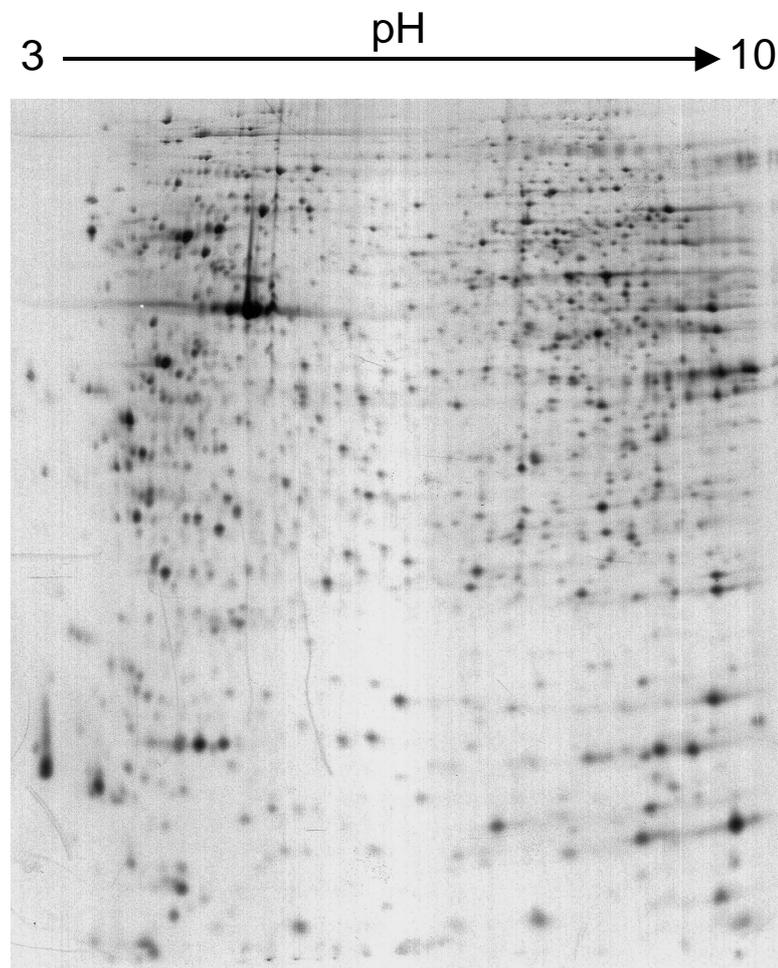


Abb. 11: Schwefelmarkiertes Proteinexpressionsmuster von EBV-infizierten humanen B-Lymphozyten im pH-Bereich 3-10. Humane B-Lymphozyten (2×10^7) wurden mit $0,125 \text{ mCi/ml}$ Trans ^{35}S Schwefel für 2h inkubiert und anschließend in 2D-Lysispuffer aufgenommen. Die isoelektrische Fokussierung erfolgte auf einer IPGphor Fokussierungseinheit mit einem pH Gradienten von pH 3-10. Anschließend wurden die fokussierten Proteine in einem 13%-igem SDS-PAGE Gel aufgetrennt. Zur Sichtbarmachung der Proteine wurde auf die getrockneten Gele ein Röntgenfilm aufgelegt und ca. 12-96h lang exponiert.

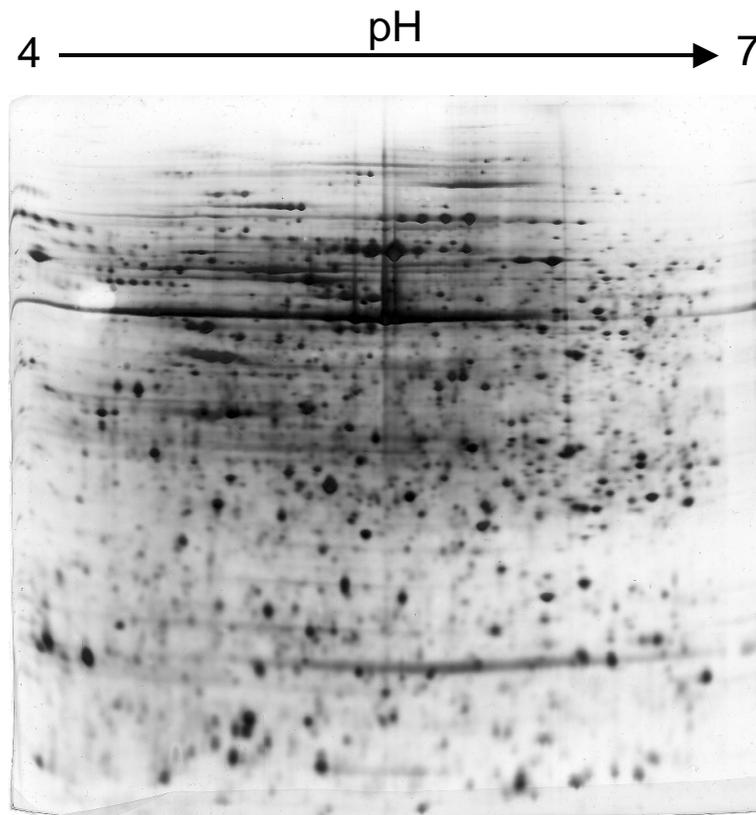
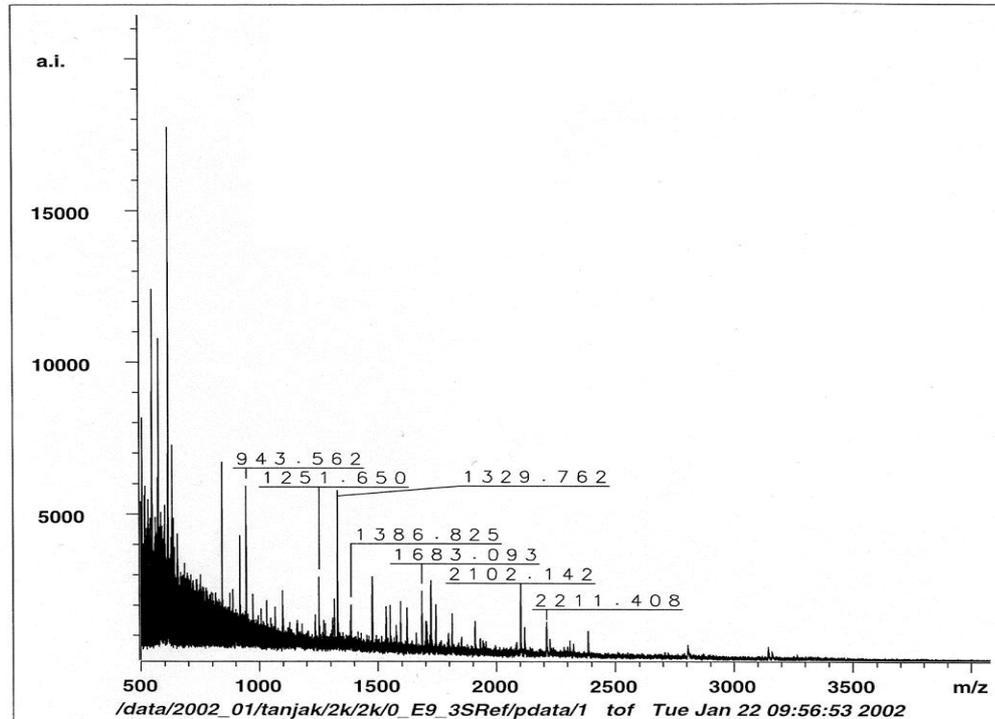


Abb. 12: Darstellung des Proteinexpressionsmusters von EBV-infizierten humanen B-Lymphozyten mittels eines silbergefärbten 2D-Gels im pH-Bereich 4-7. Humane B-Lymphozyten (2×10^7) wurden in 2D-Lysispuffer aufgenommen und auf einer IPGphor Fokussierungseinheit mit einem pH Gradienten von pH 4-7 fokussiert. Anschließend wurden die fokussierten Proteine in einem 13%-igem SDS-PAGE Gel aufgetrennt und mit Silbernitrat gefärbt.

Die erhaltenen Gele, die jeweils das Proteom infizierter und nicht-infizierter humaner primärer B-Lymphozyten aufschlüsselten, wurden auf Unterschiede in ihrem Proteinexpressionsmusters untersucht. Aus den silbergefärbten 2D-Gelen wurden dann Proteine von Interesse ausgeschnitten, tryptisch verdaut, mit organischen Matrixsubstanzen auf einer Metallplatte kristallisiert und anschließend in einem MALDI-ToF Massenspektrometer analysiert. Mit dem erhaltenen Massenspektrum, dem „Peptid mass fingerprint“ (PMF) des analysierten Proteins, wurde eine Datenbanksuche durchgeführt. Dazu wurden die erhaltenen PMFs mittels eines externen Peptid-Standard-Mix kalibriert und zur Identifizierung des jeweiligen Proteins mit Proteindatenbanken verglichen (<http://www.matrixscience.com>). Aus dem Vergleich des gemessenen mit dem theoretisch berechneten PMF läßt sich das Protein identifizieren. Abbildung 13 zeigt einen solches Massenspektrum und das

Ergebnis der Datenbanksuche, repräsentativ für alle in dieser Arbeit mittels MALDI-ToF Analyse identifizierten Proteine.



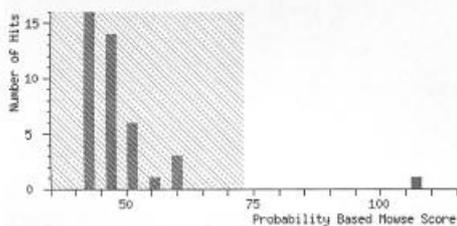
MASCOT
(MATRIX) SCIENCE

Mascot Search Results

User : Tanja
Email : tanja.krog@gmx.net
Search title : 2k
Database : NCBI nr 20021121 (1242147 sequences; 395475034 residues)
Timestamp : 27 Nov 2002 at 07:52:02 GMT
Top Score : 107 for gi|12654849, N-myc (and STAT) interactor [Homo sapiens]

Probability Based Mowse Score

Score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event. Protein scores greater than 73 are significant ($p < 0.05$).



Concise Protein Summary Report

[Switch to full Protein Summary Report](#)

To create a bookmark for this report, right click this link: [Concise Summary](#)

1. gi 12654849	Mass: 35206	Total score: 107	Peptides matched: 10
N-myc (and STAT) interactor [Homo sapiens]			
gi 12314112	Mass: 35234	Total score: 107	Peptides matched: 10
Unknown (protein for MGC:23722) [Homo sapiens]			
gi 4758814	Mass: 35266	Total score: 107	Peptides matched: 10
N-myc and STAT interactor; N-myc interactor [Homo sapiens]			
<hr/>			
2. gi 14590194	Mass: 13164	Total score: 60	Peptides matched: 6
chemotaxis protein (cheY) [Pyrococcus horikoshii]			
<hr/>			
3. gi 2285288	Mass: 69159	Total score: 58	Peptides matched: 10
Hypothetical protein ZC518.3c [Caenorhabditis elegans]			
gi 12654883	Mass: 69187	Total score: 48	Peptides matched: 9
CCR4 [Caenorhabditis elegans]			
<hr/>			
4. gi 22853087	Mass: 78210	Total score: 58	Peptides matched: 10
Hypothetical protein ZC518.3b [Caenorhabditis elegans]			
gi 17544524	Mass: 90763	Total score: 50	Peptides matched: 10
ZC518.3b.p [Caenorhabditis elegans]			

Abb. 13: „Peptide mass fingerprint“ eines in der MALDI-ToF analysierten Proteins mit dem dazugehörigem Datenbanksuchergebnis. Das analysierte Protein wurde aus einem silbergefärbten Gel ausgeschnitten, tryptisch verdaut und in einer DHB-Matrix (2,5-Dihydroxybenzoesäure) mittels Massenspektrometer analysiert.

4.3.1.1 EBV-regulierte Proteine in humanen primären B-Lymphozyten

Der Vergleich von EBV-infizierten und nicht-infizierten B-Lymphozyten mittels 2D-Gelelektrophorese ließ deutliche Unterschiede im Proteinexpressionsmusters der B-Lymphozyten erkennen. Diese Unterschiede ließen sich sowohl durch den Vergleich der silbergefärbten Gele als auch durch den Vergleich der schwefelmarkierten Proteine feststellen. Es konnten zehn regulierte Proteine identifiziert werden. Davon wurden fünf zelluläre Proteine in EBV-infizierten B-Lymphozyten reprimiert und fünf induziert. Die folgenden beiden Abbildungen zeigen Ausschnitte aus silbergefärbten Gelen und 2D-Gelen, welche schwefelmarkierte Proteine aufzeigen, die sowohl die Repression als auch die Induktion dieser Proteine belegen.

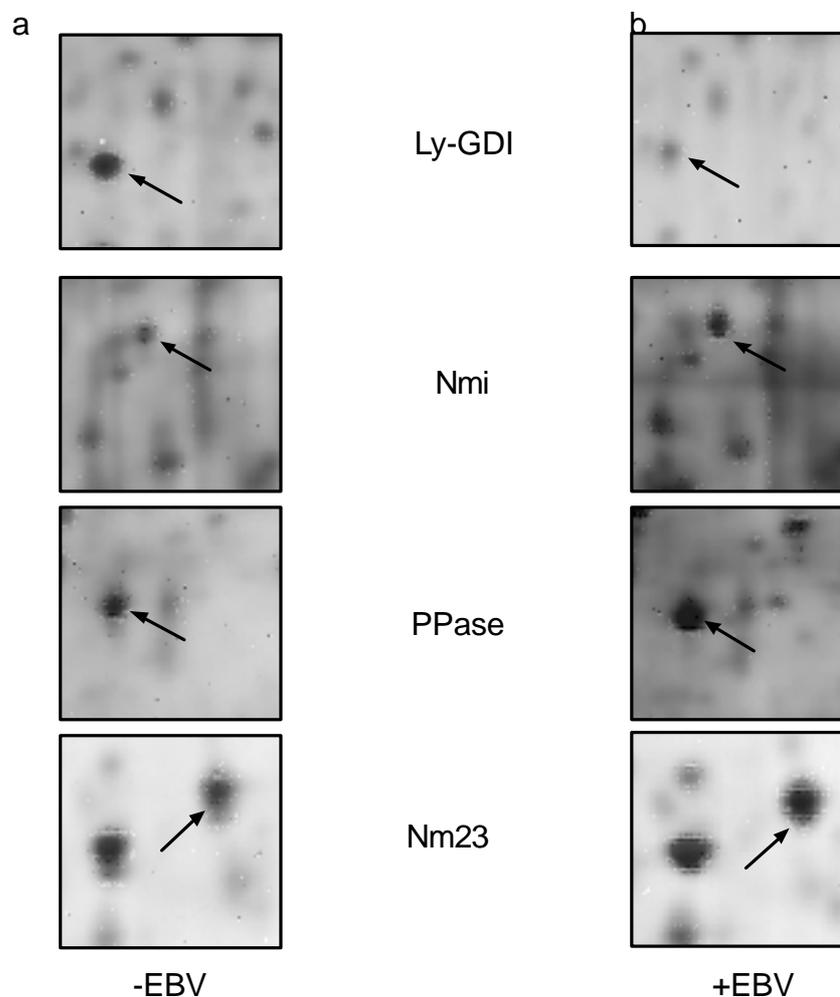


Abb. 14: Ausschnitte aus silbergefärbten 2D-Gelen, die mit a) Zellkulturmedium und b) mit B95.8-Überstand inkubiert wurden. Die Pfeile deuten jeweils auf das EBV-regulierte Protein, welches in einer anschließenden MALDI-ToF Massenspektrometeranalyse identifiziert wurde. Gezeigt sind beispielhaft Ausschnitte aus einem Gel aus acht unabhängigen Experimenten.

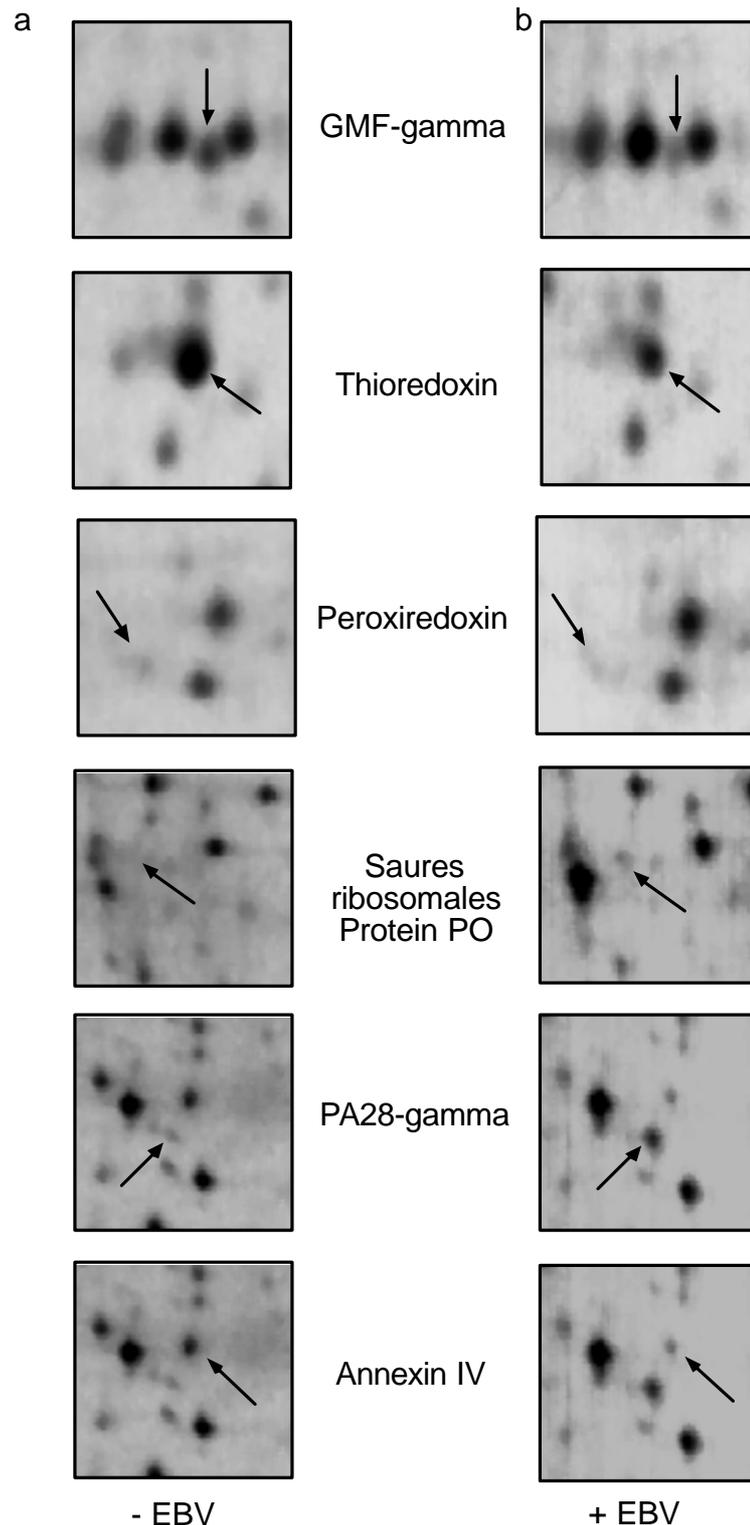


Abb. 15: Ausschnitte aus einem 2D-Gel, welches schwefelmarkierte Proteine darstellt. Die B-Lymphozyten wurden mit a) Zellkulturmedium und b) mit B95.8-Überstand für drei Tage inkubiert. Zwei Stunden vor der weiteren Aufarbeitung wurden die B-Lymphozyten mit 0,125 mCi/ml Trans ³⁵Schwefel versetzt. Die Pfeile deuten jeweils auf das EBV-regulierte Protein, welches in einer anschließenden MALDI-ToF Massenspektrometeranalyse identifiziert wurde. Gezeigt sind beispielhaft Ausschnitte aus einem Gel aus fünf unabhängigen Experimenten.

Die durch EBV induzierten Proteine PPase, Nm23, Nmi, das saure ribosomale Protein PO und das PA28- γ sind an der Nukleotidsynthese, der Signaltransduktion, der Translation und der Proteindegradation beteiligt. Thioredoxin und Peroxiredoxin 3, welche zu den EBV reprimierten Proteine zählen, spielen eine wichtige Rolle beim oxidativen Stress der Zelle. Die reprimierten Proteine Ly-GDI, Annexin 4 und GMF- γ sind beteiligt an der Organisation des Zytoskeletts und der Signaltransduktion. Zur besseren Übersicht wurden die identifizierten Proteine in einer Tabelle (Tab.1) aufgelistet. Die Tabelle gibt Auskunft über die Regulation und Funktion der identifizierten Proteine, sowie über deren Molekulargewicht (MW) und isoelektrischen Punkt (pI).

Protein	Regulation	Funktion	MW (Da)	pI
Saures ribosomales Protein PO	↑	Protein-Anabolismus	34423	5,71
Annexin IV	↓	Signaltransduktion	35957	5,85
GMF- γ	↓	Signaltransduktion?	16961	5,18
Ly-GDI	↓	Cytoskelett, Signaltransduktion	23031	5,1
Nm23	↑	DNA-Metabolismus?	17309	5,83
Nmi	↑	Signaltransduktion?	35117	5,24
PA28- γ	↑	Protein-Katabolismus	29602	5,69
Peroxiredoxin3	↓	Redox-Status	28044	7,11
PPase	↑	Nucleotid-Metabolismus	33095	5,54
Thioredoxin	↓	Redox-Status	11884	4,82

Tab.1: Auflistung der durch EBV-regulierten Proteine, die mittels 2D-Gelelektrophorese und anschließender Massenspektrometrie identifiziert wurden. Die Pfeile zeigen die Regulation dieser Proteine durch eine EBV-Infektion (↓ = Repression, ↑ = Induktion).

4.3.1.2 Induktion von Nm23 und Nmi nach EBV-Infektion

Da Nm23 in Verbindung mit einer EBV-Infektion eine wichtige Funktion bei der Tumormetastasierung zukommt (Subramanian et al., 2001) und Nmi in seiner Funktion als potenter Signaltransduktor (Bao and Zervos, 1996; Zhu et al., 1999) auffiel, wurden diese beiden Proteine repräsentativ für alle weiteren acht identifizierten Proteine, herausgegriffen, um deren Induktion nach einer erfolgten EBV-Infektion mittels Immunoblot Analyse zu bestätigen. Dazu wurden Proteinlysate

von B-Lymphozyten hergestellt, die zuvor drei Tage in Zellkulturmedium bzw. konditioniertem B95.8-Überstand inkubiert wurden. Auch hier konnte mittels PCR-Analyse (Abb.6/E) eine bereits zuvor bestehende EBV-Infektion ausgeschlossen werden. Die Proteine wurden über eine eindimensionale Gelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran transferiert und Nm23 und Nmi mit spezifischen Antikörpern und einem Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörper detektiert. Abbildung 16 zeigt eine deutliche Induktion von Nm23 und Nmi nach dreitägiger Inkubation der B-Lymphozyten mit B95.8-Überstand. Somit konnte das Ergebnis aus der 2D-Gelelektrophorese bestätigt werden. Eine spezifische Immunfärbung von Aktin auf derselben Membran bestätigt das gleichmäßige Beladen des Gels.

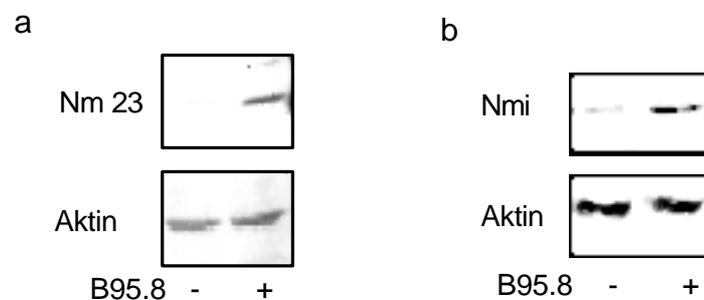


Abb. 16: Induktion EBV-regulierter Proteine in humanen B-Lymphozyten. Gezeigt ist a) ein Nm23 und b) ein Nmi Immunoblot mit Gesamtzelllysaten aus nicht-infizierten und EBV-infizierten (B95.8) B-Lymphozyten. Die Färbung erfolgte mit Nm23 und Nmi spezifischen Antikörpern. Eine spezifische Immunfärbung von Aktin auf derselben Membran bestätigt das gleichmäßige Beladen des Gels.

4.4 Parallele Induktion von EBNA2 und EBV-induzierten Proteinen in humanen B-Lymphozyten

Wie in 4.1.3.2 gezeigt wurde, kam es nach drei Tagen zu einer Erhöhung der Nm23- und Nmi-Expression in humanen EBV-infizierten B-Lymphozyten. Die Expression von Nm23, Nmi und EBNA2 wurde anschließend über einen Zeitraum von sechs Tagen in einer Immunoblot Analyse untersucht. Dies sollte eine mögliche Abhängigkeit EBV-regulierter Proteine von der viralen EBNA2-Expression in humanen B-Lymphozyten aufzeigen. Abbildung 17 zeigt den zeitlichen Verlauf der Nm23, Nmi und EBNA2 Expression nach Infektion von B-Lymphozyten mit B95.8-Überstand. Eine Induktion von Nm23 und Nmi erfolgt zeitgleich mit der EBNA2 Induktion: Die

Nm23-Kinetik zeigt, dass sich ab Tag 3 virales EBNA2-Protein detektieren lässt. Die EBNA2-Expression steigt dabei bis Tag 6 kontinuierlich an. Zeitgleich wird Nm23 exprimiert, welches parallel mit der EBNA2-Expression ansteigt. Nmi wird ebenfalls parallel zu EBNA2 induziert. Die Induktion findet jedoch einen Tag früher, an Tag 2, statt. Im Gegensatz zu Nm23 wird Nmi in allen Zellen schwach exprimiert. In den Kontrollzellen (-B95.8, Tag 1/6) war erwartungsgemäß keine Expression von EBNA2 zu sehen. Zur Überprüfung gleichmäßiger Proteinbeladung wurde parallel eine Immunfärbung gegen Aktin durchgeführt.

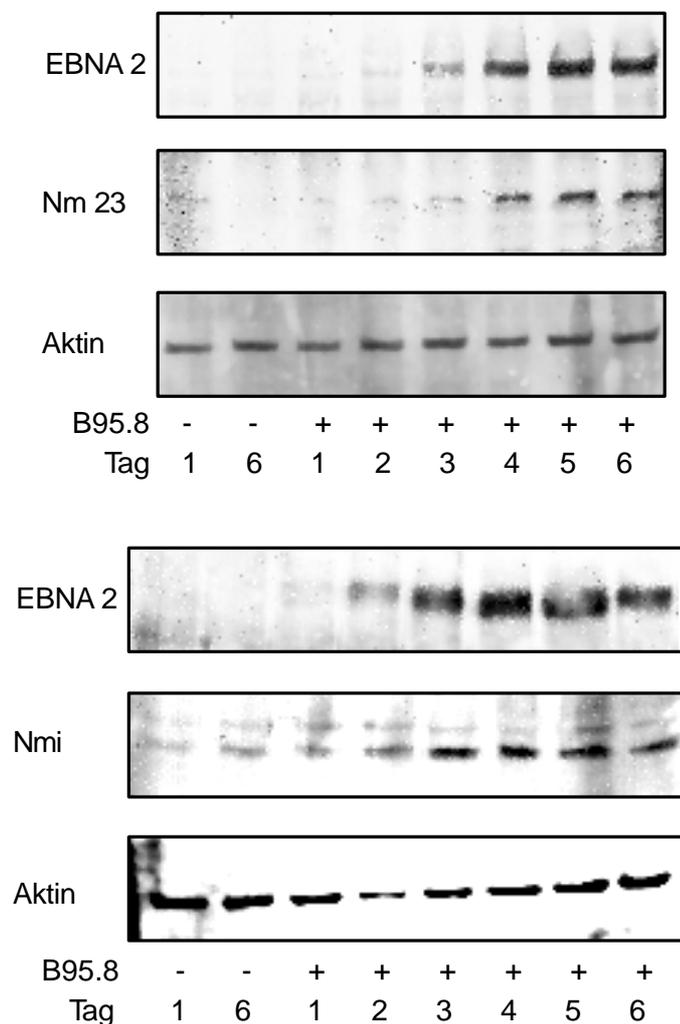


Abb. 17: Schnelle Induktion von Nm23 und Nmi durch EBNA2. B-Lymphozyten wurden für den angegebenen Zeitraum (1-6 Tage) mit Zellkulturmedium bzw. B95.8-Überstand inkubiert. Anschließend wurden die B-Lymphozyten lysiert, Proteine über eine SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF Membran übertragen. EBNA2, Nm23 und Nmi wurden mit spezifischen Antikörpern und einem HRP-gekoppelten Sekundärantikörper im Immunoblot nachgewiesen. Zur Überprüfung der gleichmäßigen Proteinbeladung wurde die Menge an Aktin bestimmt.

4.5 mRNA-Expression von EBNA2, *c-myc* und Nm23 in humanen B-Lymphozyten nach EBV-Infektion

Wie in 4.3 bereits gezeigt wurde, wurden Nm23 und Nmi durch EBNA2 schnell induziert. Da bereits bekannt ist, dass *c-myc* ein direktes Zielgen von EBNA2 (Kaiser et al., 1999) und Nm23 wiederum ein direktes Zielgen von *c-myc* ist (Schuhmacher et al., 2001), wurde die mRNA-Expression dieser Gene in EBV-infizierten humanen B-Lymphozyten untersucht. Dazu sollte die mRNA-Expression von EBNA2, *c-myc* und Nm23 kurz nach der EBV-Infektion von humanen B-Lymphozyten mittels „real-time“ PCR, die eine quantitative Messung erlaubt, bestimmt werden. B-Lymphozyten wurden über einen Zeitraum von fünf Tagen mit B95.8-Überstand infiziert bzw. als Kontrolle in Zellkulturmedium inkubiert. Aus der PCR-Analyse (Abb.6/F) geht hervor, dass die für die EBV-Infektion verwendeten B-Lymphozyten vor der Infektion EBV-negativ waren. RNA von Kontroll- und infizierten Zellen wurden täglich isoliert. Es erfolgte eine reverse Transkription der mRNA und eine „real-time“ PCR Messung mit Hilfe von EBNA2-, *c-myc*- und Nm23-spezifischen Primern. Die erhaltene Kinetik über einen Zeitraum von fünf Tagen ist in Abbildung 18 dargestellt. Bis Tag 3 nach Infektion stimmt die EBNA2-Expression mit der Expression von *c-myc* und Nm23 überein: Die Expression dieser drei Gene steigt kontinuierlich an. Die *c-myc*-Expression ist dabei schon vor der Infektion humaner B-Lymphozyten mit EBV erhöht. Im Gegensatz zu Nm23 folgt *c-myc* der EBNA2-Expression nach drei Tagen Infektion nicht mehr: Die Expression von *c-myc* erreicht an Tag vier ihr Minimum, während EBNA2 und Nm23 an Tag 4 ihr Maximum aufweisen. An Tag 5 steigt die *c-myc* Expression wieder an. Die EBNA2 und Nm23 Expression dagegen nimmt ab Tag 4 stark ab, bleibt aber im Vergleich zu ihrer Ausgangskonzentration erhöht.

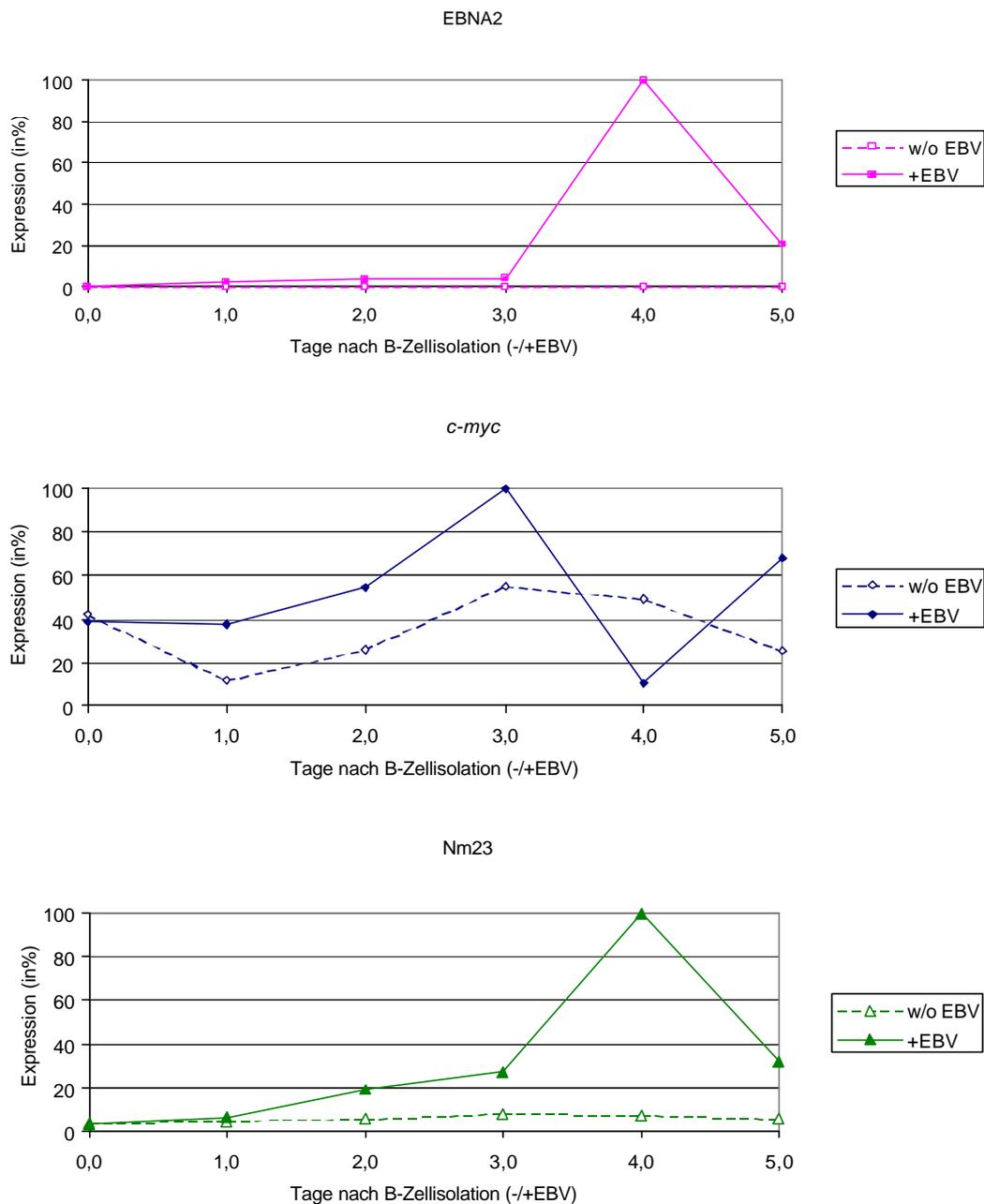


Abb. 18: mRNA-Expression von EBNA2, *c-myc* und Nm23 in humanen B-Lymphozyten. B-Lymphozyten wurden über einen Zeitraum von fünf Tagen mit B95.8-Überstand infiziert oder als Kontrolle in Zellkulturmedium inkubiert. Jeden Tag wurde von den infizierten und nicht-infizierten B-Lymphozyten mRNA isoliert und diese revers transkribiert. Anschließend wurde eine „real-time“ PCR durchgeführt. Die Expression (in %) entspricht dabei der berechneten Menge jedes einzelnen Gens. Die x-Achse beschreibt den zeitlichen Verlauf nach der B-Zellisolation sowohl für infizierte als auch für nicht-infizierte B-Lymphozyten. Die gestrichelte Linie zeigt den Kurvenverlauf für nicht-infizierte B-Lymphozyten auf, die durchgezogene Linie spiegelt den Verlauf der infizierten Zellen wieder.

5 Diskussion

Das Epstein-Barr-Virus ist ätiologisch mit einer Reihe von Krebserkrankungen assoziiert, wie dem Burkitt-Lymphom, dem Hodgkin-Lymphom, dem Nasopharynxkarzinom, bestimmten T- Zell-Lymphomen und dem immunoblastischen Lymphom (Rickinson, 1996). Die Immortalisierung primärer humaner B-Lymphozyten dient *in vitro* als Modell für die Untersuchung einer EBV assoziierten Tumorentstehung. Das Verständnis der molekularen Mechanismen, die bei der Immortalisierung von B-Lymphozyten durch EBV greifen, ist von großer Bedeutung im Hinblick auf die Tumorentstehung. Neben den EBV-kodierten Proteinen, die bei dem unkontrollierten Wachstum von B-Lymphozyten und der EBV-assoziierten Tumorentstehung eine entscheidende Rolle spielen (Kempkes et al., 1995; Kilger et al., 1998), wurden eine Reihe zellulärer Proteine identifiziert (1.4.2), die durch EBV in ihrer Expression reguliert werden. Der Nachweis sehr früher zellulärer Gene, die unmittelbar nach einer EBV-Infektion in B-Lymphozyten reguliert werden, fehlt bislang. Ziel meiner Arbeit war es, solche zellulären Proteine zu identifizieren und zu charakterisieren. Dazu wurde zum einen ein zelluläres System etabliert, anhand dessen eine effiziente und ausreichende EBV-Infektion primärer humaner B-Lymphozyten innerhalb von drei Tagen gewährleistet werden konnte. Anschließend wurden mittels 2D-Gelelektrophorese und nachfolgender Massenspektrometrie diejenigen Proteine identifiziert, die nach dreitägiger EBV-Infektion reguliert wurden. Zum anderen wurde die Expression von EBNA2 in Bezug auf die Expression des Protoonkogens *c-myc* untersucht, sowie dessen Einfluss auf zelluläre Proteine. Dies sollte einen Einblick in die Vernetzung zellulärer Abläufe in humanen B-Lymphozyten nach einer EBV-Infektion geben.

5.1 EBNA2-Expression in humanen B-Lymphozyten nach dreitägiger EBV-Infektion

Zunächst sollten die Infektionsbedingungen und –dauer, die eine frühestmögliche Infektion der B-Lymphozyten mit EBV gewährleistet, ermittelt werden. Dazu wurde ein System etabliert, das es erlaubte eine möglichst hohe Infektionseffizienz zu

erreichen. B-Lymphozyten wurden in geringen Volumina Zellkulturmedium aufgenommen und mit hohen Virustitern infiziert. Dabei mußte beachtet werden, dass die Infektionsbedingungen genau eingehalten werden, um eine Standardisierung des Protokolls zu gewährleisten. Lediglich die Adenoide, aus denen die B-Lymphozyten isoliert wurden, stammten von verschiedenen Spendern. Anschließend wurde die EBV-Präsenz in humanen B-Lymphozyten anhand des viralen nukleären Proteins EBNA2 nachgewiesen. EBNA2 ist neben EBNA-LP eines der ersten viralen Proteine, das nach einer EBV-Infektion in humanen B-Lymphozyten exprimiert wird (Alfieri et al., 1991) und war somit geeignet für den frühen Infektionsnachweis. Bereits ein Tag nach EBV-Infektion war das virale Protein nachweisbar (siehe 4.1.2.1). Da für eine spätere 2D-Analyse ausreichende Proteinmengen vorhanden sein müssen, um eine genaue Aussage über die Regulation der Proteine geben zu können, müssen mindestens 50% der B-Lymphozyten mit EBV infiziert sein. Eine Mindestinfektionsrate von 50% konnte in der Immunfärbung (siehe 4.1.2.1) nach drei Tagen Infektionsdauer ermittelt werden. Da nach der ermittelten Infektionsdauer von drei Tagen EBNA2 sowohl in der Immunfärbung (siehe 4.1.2.1) als auch in der Immunoblot Analyse (siehe 4.1.2.2) nachweisbar war, wurde gewährleistet, dass das Virus in der Zelle aktiv ist und somit auch zelluläre Veränderungen erwartet werden konnten. Damit war ein System etabliert, mit Hilfe dessen sowohl eine hohe Infektionseffizienz erreicht werden konnte und zudem gewährleistet war, dass es sich nach dreitägiger EBV-Infektion um den frühestmöglichen Zeitpunkt handelt, an dem zelluläre Veränderungen durch den viralen Einfluss zu erwarten sind.

5.2 Identifizierung EBV-regulierter Gene in primären humanen B-Lymphozyten

Die Identifizierung EBV-regulierter Proteine mittels 2D-Proteomanalyse (4.1.3) sollte Einblick in die zellulären Geschehnisse in primären humanen B-Lymphozyten unmittelbar nach einer EBV-Infektion liefern. Mit Hilfe des in 4.1 beschriebenen etablierten Systems konnten zehn Proteine identifiziert werden, die unmittelbar nach einer EBV-Infektion in humanen B-Lymphozyten reguliert wurden: Das *saure ribosomale Protein PO* ist Teil der 60S Untereinheit in eukaryotischen Ribosomen.

Uchiumi et al. konnten zeigen, dass dieses multifunktionelle Protein in der Rattenleber mit dem Elongationsfaktor EF-2 während der Proteinbiosynthese interagiert (Uchiumi et al., 1986; Uchiumi et al., 1985) und somit eine wichtige Rolle bei der Translation spielt. Interessanterweise wurde dieses Protein in der Burkitt-Lymphomzelllinie BL60 als Apoptose-assoziiertes Protein identifiziert. Es wurde gezeigt, dass das saure ribosomale Protein in apoptotischen Burkitt-Lymphomzellen eine Modifikation erfährt. Diese Modifikation zeigte sich in 2D-Proteomanalysen in Form einer pH-Veränderung vom sauren in den neutralen pH-Bereich nach der anti-IgM Antikörper-induzierten Apoptose in Burkitt-Lymphomzellen (Brockstedt et al., 1998). Welche Rolle es jedoch bei der Apoptose spielt, ist nicht bekannt. Ein weiteres Protein, das durch EBV induziert wird, ist die *PPase* (anorganische Pyrophosphatase). Sie wird ubiquitär in allen menschlichen Geweben exprimiert und katalysiert die Hydrolyse von Pyrophosphat (PP_i) zu Orthophosphat (Fairchild and Patejunas, 1999). PP_i fällt als Nebenprodukt bei der NTP-abhängigen RNA- und DNA-Synthese an. Der Entzug des Pyrophosphates durch die anorganische Pyrophosphatase begünstigt thermodynamisch diese Reaktion, sodass die RNA- und DNA-Synthese bevorzugt katalysiert wird. Die Tatsache, dass die *PPase* sowohl die RNA- als auch die DNA-Synthese fördert, lässt die Vermutung zu, dass ihre Induktion durch EBV die Zellproliferation erhöht. Dies würde auch im Einklang mit den Ergebnis aus 4.2 stehen, das eine verstärkte Proliferation EBV-infizierter B-Lymphozyten belegt. Die Überexpression der *PPase* in Adenokarzinomen der Lunge (Chen et al., 2002) ist ein weiterer Beleg dafür, dass ihre Überexpression durchaus zur Tumorentstehung beitragen kann. Im Gegensatz zur *PPase* wird *Nm23-H1* in metastasierenden Tumorzellen, wie dem Melanom und Mammakarzinom (de la Rosa et al., 1995; Martin and Pilkington, 1998), reprimiert. *Nm23-H1* ist eine Nukleosiddiphosphat-Kinase (NDP-Kinase) und katalysiert die Umwandlung des Nukleosiddiphosphates in das Nukleosidtriphosphat (Postel, 1998). Da die Repression von *Nm23-H1* das Metastasierungspotential von Tumorzellen erhöht, spricht die Expression von *Nm23-H1* in Tumorgewebe für einen günstigen Verlauf der Karzinogenese. So wurde es ursprünglich als Repressor der Tumormetastasierung beschrieben (Leone et al., 1991). Im Zusammenhang mit einer EBV-Infektion wird die Funktion des *Nm23-H1* jedoch revertiert. Dies ist auf die Interaktion des viralen EBNA3C-Protein mit *Nm23-H1* zurückzuführen. Subramanian

et al. zeigten, dass die Interkalation von Nm23-H1 und EBNA3C die Migrationsfähigkeit von Burkitt-Lymphomzellen und Brustkrebszellen erhöht (Subramanian et al., 2001). Außerdem führte die Expression von EBNA3C zu einer Translokation von Nm23-H1 aus dem Zytosol in den Zellkern. Interessanterweise bindet Nm23-H2, welches zu 88% homolog zu Nm23-H1 ist, an das nuklease-sensitive Element des *c-myc*-Promotors und ermöglicht so *in vitro* eine effiziente Transkriptionsinitiation (Postel et al., 1993; Postel et al., 2000). Verglichen mit Nm23-H2 bindet Nm23-H1 an das nuklease-sensitive Element des *c-myc*-Promotors jedoch deutlich schwächer (Hildebrandt et al., 1995; Postel et al., 1996). Außerdem konnte durch eine Behandlung der Zellen mit Antisense-Oligonukleotide oder Antisense-mRNA gezeigt werden, dass Nm23-H1 nicht nur an der Zellproliferation, sondern auch am Zellwachstum beteiligt ist. (Kimura et al., 2000). Mit *PA28-g* konnte ein Protein identifiziert werden, welches am Zellwachstum der B-Lymphozyten beteiligt ist. Der Proteasomaktivator PA28- γ , der auch als Ki-autoantigen bezeichnet wird, ist ein essentieller Koregulator des 20S Proteasoms. Es wurde gezeigt, dass der Proteasomaktivator PA28, welcher sich aus je einer PA28- α und PA28- β Untereinheit zusammensetzt, das 20S Proteasom in seiner Funktion als Immunoproteasom induziert (Sijts et al., 2002). Diese Aktivierung ist IFN- γ abhängig und führt zur vermehrten Präsentation von MHC-I-Molekülen. Im Gegensatz dazu, unterstützt der Proteasomaktivator PA28- γ die trypsinähnliche, nicht IFN- γ induzierbare Proteasomaktivität (Khan et al., 2001; Wilk et al., 2000). Der Phänotyp von PA28- γ negativen Mäusen (Murata et al., 1999) deutet darauf hin, dass die Expression von PA28- γ mit der Transformation und mit der Kontrolle des Zellwachstums zusammenhängt.

Durch eine EBV-Infektion werden in B-Lymphozyten nicht nur stoffwechselaktive und wachstumsfördernde Proteine induziert. So zeigte sich, dass auch Proteine, die an der Signaltransduktion der Zelle beteiligt sind, deutlich reguliert wurden. *Nmi* wird in humanen B-Lymphozyten nach EBV-Infektion stark induziert. *Nmi* steht für N-myc and STAT interactor und interagiert sowohl mit *n/c-myc* als auch mit STAT (Signal transducer and activator of transkription). *Nmi* bindet an alle STAT-Moleküle, mit Ausnahme von STAT2. Interessanterweise fehlt *Nmi* eine intrinsische Aktivierungsdomäne, d.h. *Nmi* alleine kann keine Transkription einleiten. Stattdessen verstärkt *Nmi* die Assoziation des Koaktivators CBP/p300 mit STAT1 und STAT5.

Dieser Komplex erhöht, IL2- und IFN- γ -abhängig, die Transkription (Zhu et al., 1999). Desweiteren bindet Nmi über seinen C-Terminus, welcher große Homologien zum Leucin-Zipperprotein IP35 aufweist (Bange et al., 1994), an das bHLH-Zipmotiv von *c-myc*. Das bHLH-Zipmotiv besteht aus drei strukturellen Einheiten: einer basischen (b), einer Helix-Loop-Helix (HLH) und einer Leucin-Zipper Einheit. Durch die Bindung von Nmi an das bHLH-Zipmotiv wird die Dimerisierung von *c-myc* mit anderen Proteinen, die ebenfalls ein bHLA-Zipmotiv besitzen, stabilisiert und gefördert (Bao and Zervos, 1996). Da eine fehlregulierte Expression von *c-myc* bei der Entstehung und Progression von Tumoren eine wichtige Rolle spielt (Eick and Hermeking, 1996; Garte, 1993; Luscher, 2001) und Nmi wiederum an der Regulation von *c-myc* beteiligt ist, könnte Nmi ebenfalls zu einer möglichen Tumorentstehung beitragen. Gestützt wird diese These durch die erhöhte Expression von Nmi in einigen Tumorzelllinien. Bao et al. konnten nachweisen, dass in den Tumorzelllinien HL-60, K-562, MOLT-4 und Raji Nmi überexprimiert wird. Dies stimmte mit der Überexpression von *c-myc* in diesen Zelllinien überein (Bao and Zervos, 1996). Zusätzlich wurden drei weitere reprimierte Proteine identifiziert, die an der Signaltransduktion beteiligt sind. Die cDNA von *GMF-g* (Glia maturation factor γ) wurde sowohl als Homolog zu GMF- β (Asai et al., 1998) als auch aus einer cDNA-Bank hämatopoetischer Vorläuferzellen (Mao et al., 1998) isoliert. Die Funktion von GMF- γ ist bislang unbekannt, einzig die Funktion des Homologes GMF- β wurde studiert. Es spielt in der MAP/ERK- und NF- κ B-Signaltransduktion eine wichtige Rolle. So konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung von GMF- β durch die Proteinkinase A (PKA) die ERK1/ERK2 (p44/p42) MAP-Kinase Aktivität inhibiert (Zaheer and Lim, 1996). Interessanterweise wird die p38-Kinase Aktivität parallel dazu verstärkt (Lim and Zaheer, 1996). Da GMF- β die anti-apoptotische Eigenschaft der MAP/ERK-Kinase hemmt, dagegen aber die pro-apoptotische Eigenschaft von p38 aktiviert, kommt es verstärkt zur Apoptose in GMF- β überexperimierenden Zellen. Desweiteren zeigten Transfektionsexperimente an C6 Rattengliomazellen, dass eine Transfektion der Gliomazellen mit GMF- β zu einer Aktivierung des nukleären Transkriptionsfaktors NF- κ B führt (Lim et al., 2000). NF- κ B unterdrückt die Apoptose und fördert somit das Überleben der Zellen. Ob nun die anti-apoptotische, oder pro-apoptotische Eigenschaft des GMF- β in Vordergrund tritt, ist unklar. Neuste

Untersuchungen ergaben, dass die Überexpression von GMF- β in Astrozyten zur Sezernierung von GM-CSF führt und in Mikrogliazellen die MHC-II und IL-1 β Expression induziert wird (Zaheer et al., 2002). Da Mikroglia und Astrozyten das „Immunsystem“ des Gehirns darstellen, übernimmt auch GMF- β eine immunregulatorische Funktion. Erwähnenswert ist auch, dass GMF- γ bisher in der Literatur noch nie in Zusammenhang mit dem hämatopoetischen Immunsystem, der Immortalisierung und der Tumorentstehung gebracht worden ist.

Ly-GDI ist der Lymphozyten-spezifische Rho GDP-dissociation inhibitor (GDI) (Scherle et al., 1993). Ly-GDI hemmt die Ras-ähnliche GTPase der Rho-Familie und inaktiviert diese dadurch (Takai et al., 1995). Die kleinen G-Proteine der Rho-Familie Rho, Rac und Cdc42 sind sowohl am Zellwachstum als auch an der Organisation des Zytoskeletts beteiligt (Hall, 1990). Die Rolle von Rho, Rac und Cdc42 speziell in B-Lymphozyten ist unbekannt. Man weiß, dass eine Stimulation der B-Lymphozyten eine Neuordnung des Aktinzytoskeletts bewirkt. Monomeres Aktin wird in polymeres Aktin umgewandelt, woraus eine Umverteilung der Mikrofilamente resultiert (Melamed et al., 1991; Ridley et al., 1992). Dieses Proteinkinase C-abhängige Ereignis scheint nicht nur für strukturelle Veränderungen in der Zelle zu sorgen, es scheint auch Signale für eine anschließende Proliferation zu liefern (DeBell et al., 1992; Melamed et al., 1991). Die Hemmung von Rho, Rac und Cdc42 durch Ly-GDI würde somit einen entscheidenden Einfluß auf diese Prozesse haben. Da durch eine EBV-Infektion Ly-GDI in B-Lymphozyten reprimiert wird (siehe Tab.1), minimiert sich die Hemmung von Rho, Rac und Cdc42 durch Ly-GDI wiederum. Die Repression von Ly-GDI würde somit eine Zunahme der Proliferation EBV-infizierter B-Lymphozyten bewirken und somit im Einklang mit der [³H]-Thymidin-Inkorporation Analyse in 4.2 stehen. *Annexin IV* wird in EBV-infizierten B-Lymphozyten ebenfalls reprimiert. Die Funktion von Annexin IV ist bisher unklar. Annexine umfassen eine Familie Calcium- und Phospholipid-bindender Proteine, die in der Mehrzahl aller eukaryotischer Organismen gefunden wurden (Gerke and Moss, 2002). In menschlichen Geweben sind bisher mehr als zehn homologe Annexine beschrieben worden. Annexin VI wurde bereits in humanen B-Lymphozyten nachgewiesen (Barel et al., 1991), wo es intrazellulär an den EBV-Rezeptor CD21 bindet. Welche Auswirkungen diese Bindung auf die Aktivierung von B-Lymphozyten hat bleibt jedoch noch unverstanden (Barel et al., 1991). Interessanterweise konnte Annexin VI in EBV-transformierten B-

Lymphozyten nicht nachgewiesen werden. Vielmehr wurde hier das Tumorsuppressorprotein p53 als direkter intrazellulärer Bindepartner von CD21 identifiziert (Barel et al., 1991). Da Annexin IV ein Homolog zu Annexin VI ist und in EBV-infizierten B-Lymphozyten ebenfalls reprimiert ist, kann von einer ähnlichen Funktion des Annexin IV ausgegangen werden.

Desweiteren werden Proteine stark reguliert, die den intrazellulären Redox-Status der Zelle mit beeinflussen: *Thioredoxin* und *Peroxiredoxin 3* werden durch EBV reprimiert. Dies deutet auf eine Umstellung des Redoxhaushalts der Zelle hin, was sich auf die Aktivität des Proteasoms und die Aktivität von Transkriptionsfaktoren auswirken kann (Arrigo, 1999). Das zwischen Zytosol und Zellkern wandernde Thioredoxin (Karimpour et al., 2002) aktiviert beispielsweise Transkriptionsfaktoren wie AP1, NF- κ B, Ref-1 und p53 über deren redox-sensitives Cysteinmotiv und spielt dadurch eine entscheidende Rolle bei der Apoptose (Arrigo, 1999). Das mitochondriale Peroxiredoxin 3 konnte in Rattenfibroblasten als *c-myc*-induziertes Zielgen nachgewiesen werden (Wonsey et al., 2002). Da *c-myc* aber wiederum als ein direktes Zielgen von EBNA2 beschrieben wurde (Kaiser et al., 1999), steht die Repression des mitochondrialen Peroxiredoxin 3 nach einer EBV-Infektion im Gegensatz zur Identifikation von Peroxiredoxin 3 als *c-myc*-induziertes Zielgen in Rattenfibroblasten.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das Epstein-Barr-Virus bereits nach drei Tagen einen deutlichen und messbaren Einfluss auf das Zellproteom hat. Dies konnte anhand der zehn identifizierten EBV-regulierten Proteine belegt werden. Die in der Literatur beschriebene Funktion dieser Proteine lässt erkennen, dass die EBV-regulierten Proteine den Erhalt des Virus in B-Lymphozyten und dessen Verteilung im Lymphsystem stützen. So bewirkt die Veränderung dieser Proteine v.a. einen Zuwachs der Proliferationsrate der B-Lymphozyten. Sowohl die Induktion der PPase, die die DNA-Synthese in der Zelle verstärkt, als auch die Repression des Ly-GDI, wodurch die Hemmung der kleinen G-Proteine vermindert wird, treiben die Proliferation voran. Auch die Induktion von Nm23-H1 und PA28- γ und deren Kontrolle über das Zellwachstum gewährleistet dem Virus ein sicheres Fortbestehen in den B-Lymphozyten. Bedingt durch die verstärkte Proliferation der B-Lymphozyten, erhöht sich auch die Replikationsfrequenz des Virusgenoms, um dessen Weiterverteilung auf die Tochterzellen zu gewährleisten. Durch die vermehrte Proliferation der B-

Lymphozyten wird so die Verteilung des Virusgenoms in humanen B-Lymphozyten vorangetrieben, wodurch der Pool EBV-infizierter B-Lymphozyten vergrößert wird. Unabhängig von diesen identifizierten Proteinen konnte in 4.2 gezeigt werden, dass EBV-infizierte B-Lymphozyten nach zwei Tagen EBV-Infektion verstärkt zu proliferieren beginnen. Dies steht im direkten Einklang mit der Funktion der identifizierten Proteine und unterstreicht somit die Relevanz der identifizierten Proteine am Proliferationsgeschehen.

Eine unkontrollierte Proliferation von B-Lymphozyten kann unter besonderen Umständen aber auch zur Entstehung einer infektiösen Mononukleose oder zur Ausbildung maligner Tumoren führen. Die Assoziation des Epstein-Barr-Virus mit mehreren Tumoren bestätigt dies (Liebowitz, 1998; Niedobitek, 1999; Rickinson, 1996). Liegen solche besondere Umstände vor, wie z.B. die EBV-Infektion immunsupprimierter Patienten im Rahmen einer Organtransplantation oder bei einer Virus-bedingten Immunschwäche, wie im Falle von AIDS, erhöht sich das Risiko dieser Patienten immunoblastische Lymphome zu entwickeln. Diese Lymphome stehen im engen Zusammenhang mit einer fehlenden Immunabwehr gegen proliferierende, EBV-infizierte B-Lymphozyten (Rickinson, 1996).

5.3 EBNA2 regulierte Proteine

Das Protoonkogen *c-myc* spielt eine entscheidende Rolle bei der Regulation der Zellproliferation, der Differenzierung von Zellen und deren Apoptose (Henriksson and Luscher, 1996). Eine deregulierte, konstitutive oder erhöhte Expression von *c-myc* trägt außerdem zur Progression von Neoplasien bei Mensch und Tier bei (Eick and Hermeking, 1996; Garte, 1993; Luscher, 2001). In Burkitt-Lymphomen beispielsweise kommt es zu einer chromosomalen Translokation des Protoonkogens *c-myc* in den Locus der Immunoglobulin Enhancer kodierenden Region des Genoms (Leder et al., 1983). Meist wird der lange Arm des Chromosoms 8 auf das Chromosom 14 übertragen, seltener gelangen Teile der Chromosomen 2 oder 22 auf den langen Arm von Chromosom 8. Als Folge davon kommt es zu einer verstärkten Expression von *c-myc* unter der Kontrolle der Immunoglobulin Enhancer und zu einer unkontrollierten B-Lymphozyten Proliferation. Da eine Fehlregulation von *c-myc* eine Tumorentstehung begünstigen kann, wurde eine mögliche Veränderung der *c-myc*-

Expression in EBV-infizierten humanen B-Lymphozyten untersucht. Dies sollte Rückschlüsse auf eine mögliche Beteiligung von *c-myc* an der Entartung humaner B-Lymphozyten zulassen.

Es war bereits bekannt, dass *c-myc* ein direktes Zielgen von EBNA2 ist (Kaiser et al., 1999). Kaiser et al. zeigten in ER/EB2-5 östrogen-abhängigen Zelllinien die direkte Induktion von *c-myc* nach einer EBNA2-Expression innerhalb von 24h. Untersuchungen zu einem späteren Zeitpunkt wurden nicht durchgeführt. Schuhmacher et al. konnten wiederum belegen, dass Nm23 ein direktes Zielgen von *c-myc* darstellt (Schuhmacher et al., 2001). Um weitere direkte Zielgene von *c-myc* entschlüsseln zu können, etablierten Schuhmacher et al. die Zelllinie P493-6. Diese Zelllinie wurde durch die stabile Transfektion von ER/EB2-5-Zellen mit einem *pmyc*-tet-Konstrukt etabliert und ermöglichte so, durch Zugabe oder Entzug von Tetracyclin, die konditionale Regulation von *c-myc*. Nach spätestens 24h wurden die *c-myc*-induzierten Gene mittels Microarrays, Run-on Experimenten und Northernblot Analysen identifiziert. Daten über einen längeren Zeitraum wurden nicht erhoben. Durch diese vorangegangenen Beobachtungen konnte bereits ein direkter Zusammenhang der Expression dieser drei Gene erstellt werden. Da es sich bei den zuvor beschriebenen Versuchen jeweils um etablierte Zelllinien handelte, in denen sowohl EBNA2 als auch *c-myc* kontrolliert an- und abgeschaltet werden konnte, stellte das in 4.1.1 etablierte System ein Modell dar, in dem eine „natürliche“ EBV-Infektion humaner B-Lymphozyten ermöglicht werden konnte. Das Expressionsverhalten dieser drei Gene nach einer EBV-Infektion in humanen B-Lymphozyten, speziell im Zusammenhang mit einer möglichen Veränderung der *c-myc*-Expression, wurde über einen Zeitraum von fünf Tagen mittels einer „real-time“ PCR verfolgt. Der Verlauf der EBV-Infektion wurde anhand der EBNA2-Expression in humanen primären B-Lymphozyten verfolgt. Die Korrelation der EBNA2- und *c-myc*-Expression sowie die Korrelation der *c-myc*- und Nm23-Expression untermauern den bereits publizierten Zusammenhang dieser drei Gene: EBNA2 induziert direkt *c-myc* und Nm23 wird wiederum direkt von *c-myc* induziert. Ab Tag 3 zeigt *c-myc* zu EBNA2 und Nm23 ein gegenläufiges Verhalten. Ein direkter Zusammenhang zwischen dem starken Abfall der *c-myc*-Expression nach einer EBV-Infektion konnte bisher nur in Burkitt-Lymphomzellen gezeigt werden. Die Reduktion der *c-myc*-Expression konnte hier in direkter Verbindung mit der Chromosomen-Translokation t(8,14) gebracht

werden. Jochner et al. zeigten, dass EBNA2 die Transkription des Ig- μ Locus reprimiert. Da die *c-myc*-Expression unter der Kontrolle des Immunglobulin Enhancers steht, kommt es, bedingt durch die chromosomale Translokation, zur Repression der *c-myc*-Expression (Jochner et al., 1996).

Allgemein lässt sich der starke Abfall der *c-myc*-Expression durch die negative Autoregulation von *c-myc* erklären. Diese negative Autoregulation der *c-myc*-Expression konnte in *c-myc*-induzierten Tumoren *in vivo* (Morse et al., 1986; Potter et al., 1987), einer Vielzahl von Zellen *in vitro* (Blasi et al., 1985; Clynes et al., 1988; Lombardi et al., 1987) und transgenen Mäusen (Adams et al., 1985), beobachtet werden. Grignani et al. konnten die negative Autoregulation von *c-myc* speziell in EBV-immortalisierten B-lymphoblastoiden Zellen nachweisen (Grignani et al., 1990). Dazu transfizierten sie einen *c-myc*-induzierbaren Vektor in LCLs. Die Induktion dieses Vektors resultierte in einer Zunahme des exogenen *c-mycs*, wodurch es zu einer Abnahme des endogenen *c-mycs* kam.

Die Gegenregulation der *c-myc*-Expression durch zelluläre aber auch virale Proteine, wäre eine weitere, mögliche Erklärung für die plötzliche Repression von *c-myc*. MAD1, ein zelluläres Protein, welches die Funktion von *c-myc* antagonisiert, und das zelluläre p27^{KIP1} konnten als potente Inhibitoren sowohl der *c-myc*-Expression als auch der Cyclin E-CDK2-Aktivität nachgewiesen werden (McArthur et al., 2002). Gemeinsam inhibieren sie das Protein *c-myc* und die Cyclin E-CDK2-Aktivität in humanen Granulozyten und bewirken damit den Übergang aus der Wachstumsphase in die Differenzierungsphase der Granulozyten. Ähnliche Untersuchungen wurden an B-Lymphozyten nicht durchgeführt. Wodurch die Repression von *c-myc* an Tag 4 letztendlich verursacht wird, müssen weitere Untersuchungen klären.

6 Zusammenfassung

Das Epstein-Barr-Virus infiziert und immortalisiert *in vitro* effizient primäre humane B-Lymphozyten. In meiner Arbeit habe ich zelluläre Gene, deren Regulation durch frühe virale Genfunktionen direkt beeinflusst werden, studiert. Zu diesem Zweck wurde ein adequates Zell-Infektion-System etabliert, um anschließend die EBV-Effekte auf Proteomebene analysieren zu können. Dies sollte einen Einblick in die zellulären Geschehnisse in primären humanen B-Lymphozyten unmittelbar nach einer EBV-Infektion liefern.

Mit Hilfe des etablierten zellulären Systems konnte gezeigt werden, dass EBV-infizierte B-Lymphozyten nach zwei Tagen EBV-Infektion verstärkt zu proliferieren beginnen. Dies steht im direkten Einklang mit der Funktion der durch Proteomanalyse identifizierten Proteine. Sowohl die Induktion der PPase, welche die DNA-Synthese in der Zelle verstärkt, als auch die Repression des Ly-GDI, wodurch die Hemmung der kleinen G-Proteine vermindert wird, treiben die Proliferation voran. Desweiteren verursacht die Induktion von Nm23-H1 sowohl ein gesteigertes Wachstum als auch eine verstärkte Proliferation der B-Lymphozyten. Thioredoxin und Peroxiredoxin 3, welche den Redoxhaushalt der Zelle regulieren und das stoffwechselaktive saure ribosomale Protein PO unterstützen dabei die Proliferation. Durch die vermehrte Proliferation der B-Lymphozyten wird die Verteilung des Virusgenoms in humanen B-Lymphozyten vorangetrieben, wodurch der Pool EBV-infizierter B-Lymphozyten im Wirtsorganismus vergrößert wird.

Eine unkontrollierte Proliferation dieser B-Lymphozyten kann unter besonderen Umständen zur Entstehung einer infektiösen Mononukleose oder zur Ausbildung maligner Tumoren führen. Die Assoziation des Epstein-Barr-Virus mit mehreren Tumoren bestätigt dies. Liegen solche besondere Umstände vor, wie z.B. die EBV-Infektion immunsupprimierter Patienten, erhöht sich das Risiko dieser Patienten, immunoblastische Lymphome zu entwickeln. Diese Lymphome stehen im engen Zusammenhang mit einer fehlenden Immunabwehr gegen proliferierende, EBV-infizierte B-Lymphozyten.

7 Abkürzungen

α	anti
AIDS	erworbenes Immundefizienz Syndrom („acquired immune deficiency syndrom“)
AP-1	Aktivierungsprotein-1
APS	Amminoperoxodisulfat
AS	Amminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchonic Acid
CBP	CREB-binde Protein
CD	Zell-Differenzierungsmarker (“Cluster of differentiation”)
cDNA	komplementäre DNA
Ci	Curie
cpm	Zerfälle pro Minute (“counts per minute”)
CR2	Komplementrezeptor 2
CTAR	carboxyterminale Aktivierungsregion
Da	Dalton
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DTE	Dithioerythritol
EBER	EBV-encoded RNA
EBNA	Epstein-Barr nuclear antigen
EBNA-LP	Epstein-Barr nuclear antigen-Leader protein
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EF	Elongationsfaktor
EGFR	epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor
FCS	fötales Kälberserum („fetal calf serum“)
GDP	Guanosindiphosphat
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-koloniestimulierender Faktor
GMF- γ	„Glia maturation factor- γ “

gp	Glykoprotein
h	Stunde
HIV	humanes Immundefizienz Virus („human immunodeficiency virus“)
HRP	Horse-radish Peroxidase
ICAM	intrazelluläres Adhäsionsmolekül („intracellular adhesion molecule“)
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
JAK3	Janus-Kinase 3
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
kb	Kilobasenpaare
LCL	lymphoblastoide Zelllinie
LFA	„lymphocyte function-associated antigen“
LMP	latentes Membranprotein
Ly-GDI	Lymphozyten-spezifischer Rho GDP-Dissoziation Inhibitor
mA	Milliampere
MAPK	mitogen-aktivierte Proteinkinase
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex („major histocompatibility complex“)
min	Minute
MMP	Matrix-Metalloprotease
mRNA	Boten-RNA („messenger-RNA“)
NDP-Kinase	Nukleotiddiphosphat-Kinase
NF- κ B	nukleärer Faktor κ B
Nmi	„N-myc and STAT interactor“
NTP	Nukleotidtriphosphat
ORC	„origin recognition complex“
PA28- γ	Proteasomaktivator 28- γ
PBMZ	mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion

pI	isoelektrischer Punkt
PKA	Proteinkinase A
PP _i	Pyrophosphat
RBP-Jκ	Rekombinationssignal-Bindeprotein-Jκ
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute („rounds per minute“)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	reverse Transkriptase-PCR
SDS	Natriumdodecylsulfat
STAT	Signaltransduktions-aktivierter Transkriptionsfaktor
TAP	„transporter associated with antigen processing“
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
TNF-R	Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor
TPS	Tetraborat-gepufferte Salzlösung
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan
UV	Ultraviolett
W	Watt

8 Literatur

- Abbot, S.D., Rowe, M., Cadwallader, K., Ricksten, A., Gordon, J., Wang, F., Rymo, L. and Rickinson, A.B. (1990) Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 induces expression of the virus-encoded latent membrane protein. *J Virol*, **64**, 2126-2134.
- Adams, J.M., Harris, A.W., Pinkert, C.A., Corcoran, L.M., Alexander, W.S., Cory, S., Palmiter, R.D. and Brinster, R.L. (1985) The c-myc oncogene driven by immunoglobulin enhancers induces lymphoid malignancy in transgenic mice. *Nature*, **318**, 533-538.
- Aiyar, A., Tyree, C. and Sugden, B. (1998) The plasmid replicon of EBV consists of multiple cis-acting elements that facilitate DNA synthesis by the cell and a viral maintenance element. *Embo J*, **17**, 6394-6403.
- Alfieri, C., Birkenbach, M. and Kieff, E. (1991) Early events in Epstein-Barr virus infection of human B lymphocytes. *Virology*, **181**, 595-608.
- Amati, B., Alevizopoulos, K. and Vlach, J. (1998) Myc and the cell cycle. *Front Biosci*, **3**, D250-268.
- Androlewicz, M.J., Anderson, K.S. and Cresswell, P. (1993) Evidence that transporters associated with antigen processing translocate a major histocompatibility complex class I-binding peptide into the endoplasmic reticulum in an ATP-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 9130-9134.
- Arrigo, A.P. (1999) Gene expression and the thiol redox state. *Free Radic Biol Med*, **27**, 936-944.
- Asai, K., Fujita, K., Yamamoto, M., Hotta, T., Morikawa, M., Kokubo, M., Moriyama, A. and Kato, T. (1998) Isolation of novel human cDNA (hGMF-gamma) homologous to Glia Maturation Factor-beta gene. *Biochim Biophys Acta*, **1396**, 242-244.
- Baer, R., Bankier, A.T., Biggin, M.D., Deininger, P.L., Farrell, P.J., Gibson, T.J., Hatfull, G., Hudson, G.S., Satchwell, S.C., Seguin, C. and et al. (1984) DNA sequence and expression of the B95-8 Epstein-Barr virus genome. *Nature*, **310**, 207-211.
- Baichwal, V.R. and Sugden, B. (1988) Transformation of Balb 3T3 cells by the BNLF-1 gene of Epstein-Barr virus. *Oncogene*, **2**, 461-467.
- Bange, F.C., Vogel, U., Flohr, T., Kiekenbeck, M., Denecke, B. and Bottger, E.C. (1994) IFP 35 is an interferon-induced leucine zipper protein that undergoes interferon-regulated cellular redistribution. *J Biol Chem*, **269**, 1091-1098.
- Bao, J. and Zervos, A.S. (1996) Isolation and characterization of Nmi, a novel partner of Myc proteins. *Oncogene*, **12**, 2171-2176.
- Barel, M., Gauffre, A., Lyamani, F., Fiandino, A., Hermann, J. and Frade, R. (1991) Intracellular interaction of EBV/C3d receptor (CR2) with p68, a calcium-binding protein present in normal but not in transformed B lymphocytes. *J Immunol*, **147**, 1286-1291.

- Blasi, E., Mathieson, B.J., Varesio, L., Cleveland, J.L., Borchert, P.A. and Rapp, U.R.** (1985) Selective immortalization of murine macrophages from fresh bone marrow by a raf/myc recombinant murine retrovirus. *Nature*, **318**, 667-670.
- Brielmeier, M., Mautner, J., Laux, G. and Hammerschmidt, W.** (1996) The latent membrane protein 2 gene of Epstein-Barr virus is important for efficient B cell immortalization. *J Gen Virol*, **77 (Pt 11)**, 2807-2818.
- Brockstedt, E., Rickers, A., Kostka, S., Laubersheimer, A., Dorken, B., Wittmann-Liebold, B., Bommert, K. and Otto, A.** (1998) Identification of apoptosis-associated proteins in a human Burkitt lymphoma cell line. Cleavage of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 by caspase 3. *J Biol Chem*, **273**, 28057-28064.
- Calender, A., Billaud, M., Aubry, J.P., Banchereau, J., Vuillaume, M. and Lenoir, G.M.** (1987) Epstein-Barr virus (EBV) induces expression of B-cell activation markers on in vitro infection of EBV-negative B-lymphoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **84**, 8060-8064.
- Chaudhuri, B., Xu, H., Todorov, I., Dutta, A. and Yates, J.L.** (2001) Human DNA replication initiation factors, ORC and MCM, associate with oriP of Epstein-Barr virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 10085-10089.
- Chen, G., Gharib, T.G., Huang, C.C., Thomas, D.G., Shedden, K.A., Taylor, J.M., Kardia, S.L., Misek, D.E., Giordano, T.J., Iannettoni, M.D., Orringer, M.B., Hanash, S.M. and Beer, D.G.** (2002) Proteomic analysis of lung adenocarcinoma: identification of a highly expressed set of proteins in tumors. *Clin Cancer Res*, **8**, 2298-2305.
- Clynes, R., Wax, J., Stanton, L.W., Smith-Gill, S., Potter, M. and Marcu, K.B.** (1988) Rapid induction of IgM-secreting murine plasmacytomas by pristane and an immunoglobulin heavy-chain promoter/enhancer-driven c-myc/v-Ha-ras retrovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**, 6067-6071.
- D'Souza, B., Rowe, M. and Walls, D.** (2000) The bfl-1 gene is transcriptionally upregulated by the Epstein-Barr virus LMP1, and its expression promotes the survival of a Burkitt's lymphoma cell line. *J Virol*, **74**, 6652-6658.
- Dang, C.V.** (1999) c-Myc target genes involved in cell growth, apoptosis, and metabolism. *Mol Cell Biol*, **19**, 1-11.
- de la Rosa, A., Williams, R.L. and Steeg, P.S.** (1995) Nm23/nucleoside diphosphate kinase: toward a structural and biochemical understanding of its biological functions. *Bioessays*, **17**, 53-62.
- DeBell, K.E., Conti, A., Alava, M.A., Hoffman, T. and Bonvini, E.** (1992) Microfilament assembly modulates phospholipase C-mediated signal transduction by the TCR/CD3 in murine T helper lymphocytes. *J Immunol*, **149**, 2271-2280.
- Di Fiore, P.P., Pierce, J.H., Fleming, T.P., Hazan, R., Ullrich, A., King, C.R., Schlessinger, J. and Aaronson, S.A.** (1987) Overexpression of the human EGF receptor confers an EGF-dependent transformed phenotype to NIH 3T3 cells. *Cell*, **51**, 1063-1070.
- Eick, D. and Hermeking, H.** (1996) Viruses as pacemakers in the evolution of defence mechanisms against cancer. *Trends Genet*, **12**, 4-6.

- Eliopoulos, A.G., Gallagher, N.J., Blake, S.M., Dawson, C.W. and Young, L.S.** (1999) Activation of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway by Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1 coregulates interleukin-6 and interleukin-8 production. *J Biol Chem*, **274**, 16085-16096.
- Eliopoulos, A.G., Stack, M., Dawson, C.W., Kaye, K.M., Hodgkin, L., Sihota, S., Rowe, M. and Young, L.S.** (1997) Epstein-Barr virus-encoded LMP1 and CD40 mediate IL-6 production in epithelial cells via an NF-kappaB pathway involving TNF receptor-associated factors. *Oncogene*, **14**, 2899-2916.
- Fairchild, T.A. and Patejunas, G.** (1999) Cloning and expression profile of human inorganic pyrophosphatase. *Biochim Biophys Acta*, **1447**, 133-136.
- Floettmann, J.E. and Rowe, M.** (1997) Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 (LMP1) C-terminus activation region 2 (CTAR2) maps to the far C-terminus and requires oligomerisation for NF-kappaB activation. *Oncogene*, **15**, 1851-1858.
- Garte, S.J.** (1993) The c-myc oncogene in tumor progression. *Crit Rev Oncog*, **4**, 435-449.
- Gerber, P., Lucas, S., Nonoyama, M., Perlin, E. and Goldstein, L.I.** (1972) Oral excretion of Epstein-Barr virus by healthy subjects and patients with infectious mononucleosis. *Lancet*, **2**, 988-989.
- Gerke, V. and Moss, S.E.** (2002) Annexins: from structure to function. *Physiol Rev*, **82**, 331-371.
- Gires, O., Kohlhuber, F., Kilger, E., Baumann, M., Kieser, A., Kaiser, C., Zeidler, R., Scheffer, B., Ueffing, M. and Hammerschmidt, W.** (1999) Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus interacts with JAK3 and activates STAT proteins. *Embo J*, **18**, 3064-3073.
- Gires, O., Zimmer-Strobl, U., Gonnella, R., Ueffing, M., Marschall, G., Zeidler, R., Pich, D. and Hammerschmidt, W.** (1997) Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus mimics a constitutively active receptor molecule. *Embo J*, **16**, 6131-6140.
- Grignani, F., Lombardi, L., Inghirami, G., Sternas, L., Cechova, K. and Dalla-Favera, R.** (1990) Negative autoregulation of c-myc gene expression is inactivated in transformed cells. *Embo J*, **9**, 3913-3922.
- Grossman, S.R., Johannsen, E., Tong, X., Yalamanchili, R. and Kieff, E.** (1994) The Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 transactivator is directed to response elements by the J kappa recombination signal binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 7568-7572.
- Hall, A.** (1990) The cellular functions of small GTP-binding proteins. *Science*, **249**, 635-640.
- Hammerschmidt, W. and Sugden, B.** (1989) Genetic analysis of immortalizing functions of Epstein-Barr virus in human B lymphocytes. *Nature*, **340**, 393-397.
- Henderson, S., Rowe, M., Gregory, C., Croom-Carter, D., Wang, F., Longnecker, R., Kieff, E. and Rickinson, A.** (1991) Induction of bcl-2 expression by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 protects infected B cells from programmed cell death. *Cell*, **65**, 1107-1115.

- Henkel, T., Ling, P.D., Hayward, S.D. and Peterson, M.G.** (1994) Mediation of Epstein-Barr virus EBNA2 transactivation by recombination signal-binding protein J kappa. *Science*, **265**, 92-95.
- Henriksson, M. and Luscher, B.** (1996) Proteins of the Myc network: essential regulators of cell growth and differentiation. *Adv Cancer Res*, **68**, 109-182.
- Herbst, H.** (1996) Epstein-Barr virus in Hodgkin's disease. *Semin Cancer Biol*, **7**, 183-189.
- Hildebrandt, M., Lacombe, M.L., Mesnildrey, S. and Veron, M.** (1995) A human NDP-kinase B specifically binds single-stranded poly-pyrimidine sequences. *Nucleic Acids Res*, **23**, 3858-3864.
- Huen, D.S., Henderson, S.A., Croom-Carter, D. and Rowe, M.** (1995) The Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 (LMP1) mediates activation of NF-kappa B and cell surface phenotype via two effector regions in its carboxy-terminal cytoplasmic domain. *Oncogene*, **10**, 549-560.
- Imai, S., Nishikawa, J. and Takada, K.** (1998) Cell-to-cell contact as an efficient mode of Epstein-Barr virus infection of diverse human epithelial cells. *J Virol*, **72**, 4371-4378.
- Izumi, K.M., Kaye, K.M. and Kieff, E.D.** (1997) The Epstein-Barr virus LMP1 amino acid sequence that engages tumor necrosis factor receptor associated factors is critical for primary B lymphocyte growth transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 1447-1452.
- Izumi, K.M. and Kieff, E.D.** (1997) The Epstein-Barr virus oncogene product latent membrane protein 1 engages the tumor necrosis factor receptor-associated death domain protein to mediate B lymphocyte growth transformation and activate NF-kappaB. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 12592-12597.
- Janz, A., Oezel, M., Kurzeder, C., Mautner, J., Pich, D., Kost, M., Hammerschmidt, W. and Delecluse, H.J.** (2000) Infectious Epstein-Barr virus lacking major glycoprotein BLLF1 (gp350/220) demonstrates the existence of additional viral ligands. *J Virol*, **74**, 10142-10152.
- Jayachandra, S., Low, K.G., Thlick, A.E., Yu, J., Ling, P.D., Chang, Y. and Moore, P.S.** (1999) Three unrelated viral transforming proteins (vIRF, EBNA2, and E1A) induce the MYC oncogene through the interferon-responsive PRF element by using different transcription coadaptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 11566-11571.
- Jemal, A., Thomas, A., Murray, T. and Thun, M.** (2002) Cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin*, **52**, 23-47.
- Jin, X.W. and Speck, S.H.** (1992) Identification of critical cis elements involved in mediating Epstein-Barr virus nuclear antigen 2-dependent activity of an enhancer located upstream of the viral BamHI C promoter. *J Virol*, **66**, 2846-2852.
- Jochner, N., Eick, D., Zimmer-Strobl, U., Pawlita, M., Bornkamm, G.W. and 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.

- Johannsen, E., Koh, E., Mosialos, G., Tong, X., Kieff, E. and Grossman, S.R.** (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.
- Jones, N.C.** (1990) Transformation by the human adenoviruses. *Semin Cancer Biol*, **1**, 425-435.
- Kaiser, C., Laux, G., Eick, D., Jochner, N., Bornkamm, G.W. and Kempkes, B.** (1999) The proto-oncogene c-myc is a direct target gene of Epstein-Barr virus nuclear antigen 2. *J Virol*, **73**, 4481-4484.
- Karimpour, S., Lou, J., Lin, L.L., Rene, L.M., Lagunas, L., Ma, X., Karra, S., Bradbury, C.M., Markovina, S., Goswami, P.C., Spitz, D.R., Hirota, K., Kalvakolanu, D.V., Yodoi, J. and Gius, D.** (2002) Thioredoxin reductase regulates AP-1 activity as well as thioredoxin nuclear localization via active cysteines in response to ionizing radiation. *Oncogene*, **21**, 6317-6327.
- Kaye, K.M., Izumi, K.M. and Kieff, E.** (1993) Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 is essential for B-lymphocyte growth transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 9150-9154.
- Kaykas, A., Worringer, K. and Sugden, B.** (2001) CD40 and LMP-1 both signal from lipid rafts but LMP-1 assembles a distinct, more efficient signaling complex. *Embo J*, **20**, 2641-2654.
- Kempkes, B., Spitzkovsky, D., Jansen-Durr, P., Ellwart, J.W., Kremmer, E., Delecluse, H.J., Rottenberger, C., Bornkamm, G.W. and Hammerschmidt, W.** (1995) B-cell proliferation and induction of early G1-regulating proteins by Epstein-Barr virus mutants conditional for EBNA2. *Embo J*, **14**, 88-96.
- Khan, S., van den Broek, M., Schwarz, K., de Giuli, R., Diener, P.A. and Groettrup, M.** (2001) Immunoproteasomes largely replace constitutive proteasomes during an antiviral and antibacterial immune response in the liver. *J Immunol*, **167**, 6859-6868.
- Kieff, E.** (1996) Epstein-Barr virus and its replication. In Fields, B.N., Knipe, D.M., Howley, P.M. (ed.), *Fields Virology*. Lippincott-Raven Publisher, Philadelphia.
- Kieser, A., Kaiser, C. and Hammerschmidt, W.** (1999) LMP1 signal transduction differs substantially from TNF receptor 1 signaling in the molecular functions of TRADD and TRAF2. *Embo J*, **18**, 2511-2521.
- Kieser, A., Kilger, E., Gires, O., Ueffing, M., Kolch, W. and Hammerschmidt, W.** (1997) Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 triggers AP-1 activity via the c-Jun N-terminal kinase cascade. *Embo J*, **16**, 6478-6485.
- Kilger, E., Kieser, A., Baumann, M. and Hammerschmidt, W.** (1998) Epstein-Barr virus-mediated B-cell proliferation is dependent upon latent membrane protein 1, which simulates an activated CD40 receptor. *Embo J*, **17**, 1700-1709.
- Kimura, N., Shimada, N., Fukuda, M., Ishijima, Y., Miyazaki, H., Ishii, A., Takagi, Y. and Ishikawa, N.** (2000) Regulation of cellular functions by nucleoside diphosphate kinases in mammals. *J Bioenerg Biomembr*, **32**, 309-315.
- Knutson, J.C.** (1990) The level of c-fgr RNA is increased by EBNA-2, an Epstein-Barr virus gene required for B-cell immortalization. *J Virol*, **64**, 2530-2536.
- Kulwichit, W., Edwards, R.H., Davenport, E.M., Baskar, J.F., Godfrey, V. and Raab-Traub, N.** (1998) Expression of the Epstein-Barr virus latent membrane

- protein 1 induces B cell lymphoma in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 11963-11968.
- Laherty, C.D., Hu, H.M., Opipari, A.W., Wang, F. and Dixit, V.M.** (1992) The Epstein-Barr virus LMP1 gene product induces A20 zinc finger protein expression by activating nuclear factor kappa B. *J Biol Chem*, **267**, 24157-24160.
- Laux, G., Dugrillon, F., Eckert, C., Adam, B., Zimmer-Strobl, U. and Bornkamm, G.W.** (1994) Identification and characterization of an Epstein-Barr virus nuclear antigen 2-responsive cis element in the bidirectional promoter region of latent membrane protein and terminal protein 2 genes. *J Virol*, **68**, 6947-6958.
- Leder, P., Battey, J., Lenoir, G., Moulding, C., Murphy, W., Potter, H., Stewart, T. and Taub, R.** (1983) Translocations among antibody genes in human cancer. *Science*, **222**, 765-771.
- Leone, A., Flatow, U., King, C.R., Sandeen, M.A., Margulies, I.M., Liotta, L.A. and Steeg, P.S.** (1991) Reduced tumor incidence, metastatic potential, and cytokine responsiveness of nm23-transfected melanoma cells. *Cell*, **65**, 25-35.
- Levitskaya, J., Coram, M., Levitsky, V., Imreh, S., Steigerwald-Mullen, P.M., Klein, G., Kurilla, M.G. and Masucci, M.G.** (1995) Inhibition of antigen processing by the internal repeat region of the Epstein-Barr virus nuclear antigen-1. *Nature*, **375**, 685-688.
- Levitskaya, J., Sharipo, A., Leonchiks, A., Ciechanover, A. and Masucci, M.G.** (1997) Inhibition of ubiquitin/proteasome-dependent protein degradation by the Gly-Ala repeat domain of the Epstein-Barr virus nuclear antigen 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 12616-12621.
- Liebowitz, D.** (1998) Pathogenesis of Epstein-Barr virus. In McCance, D. (ed.), *Human Tumor Virus*. American Society for Microbiology.
- Lim, R. and Zaheer, A.** (1996) In vitro enhancement of p38 mitogen-activated protein kinase activity by phosphorylated glia maturation factor. *J Biol Chem*, **271**, 22953-22956.
- Lim, R., Zaheer, A., Yorek, M.A., Darby, C.J. and Oberley, L.W.** (2000) Activation of nuclear factor-kappaB in C6 rat glioma cells after transfection with glia maturation factor. *J Neurochem*, **74**, 596-602.
- Lombardi, L., Newcomb, E.W. and Dalla-Favera, R.** (1987) Pathogenesis of Burkitt lymphoma: expression of an activated c-myc oncogene causes the tumorigenic conversion of EBV-infected human B lymphoblasts. *Cell*, **49**, 161-170.
- Luscher, B.** (2001) Function and regulation of the transcription factors of the Myc/Max/Mad network. *Gene*, **277**, 1-14.
- Magrath, I.** (1990) The pathogenesis of Burkitt's lymphoma. *Adv Cancer Res*, **55**, 133-270.
- Mao, M., Fu, G., Wu, J.S., Zhang, Q.H., Zhou, J., Kan, L.X., Huang, Q.H., He, K.L., Gu, B.W., Han, Z.G., Shen, Y., Gu, J., Yu, Y.P., Xu, S.H., Wang, Y.X., Chen, S.J. and Chen, Z.** (1998) Identification of genes expressed in human CD34(+) hematopoietic stem/progenitor cells by expressed sequence tags and efficient full-length cDNA cloning. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 8175-8180.
- Martin, K.K. and Pilkington, G.J.** (1998) Nm23: an invasion suppressor gene in CNS tumours? *Anticancer Res*, **18**, 919-926.

- McArthur, G.A., Foley, K.P., Fero, M.L., Walkley, C.R., Deans, A.J., Roberts, J.M. and Eisenman, R.N.** (2002) MAD1 and p27(KIP1) cooperate to promote terminal differentiation of granulocytes and to inhibit Myc expression and cyclin E-CDK2 activity. *Mol Cell Biol*, **22**, 3014-3023.
- Melamed, I., Downey, G.P., Aktories, K. and Roifman, C.M.** (1991) Microfilament assembly is required for antigen-receptor-mediated activation of human B lymphocytes. *J Immunol*, **147**, 1139-1146.
- Miller, G., Shope, T., Lisco, H., Stitt, D. and Lipman, M.** (1972) Epstein-Barr virus: transformation, cytopathic changes, and viral antigens in squirrel monkey and marmoset leukocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **69**, 383-387.
- Miller, W.E., Mosialos, G., Kieff, E. and Raab-Traub, N.** (1997) Epstein-Barr virus LMP1 induction of the epidermal growth factor receptor is mediated through a TRAF signaling pathway distinct from NF-kappaB activation. *J Virol*, **71**, 586-594.
- Mitchell, T. and Sugden, B.** (1995) Stimulation of NF-kappa B-mediated transcription by mutant derivatives of the latent membrane protein of Epstein-Barr virus. *J Virol*, **69**, 2968-2976.
- Miyashita, E.M., Yang, B., Babcock, G.J. and Thorley-Lawson, D.A.** (1997) Identification of the site of Epstein-Barr virus persistence in vivo as a resting B cell. *J Virol*, **71**, 4882-4891.
- Miyashita, E.M., Yang, B., Lam, K.M., Crawford, D.H. and Thorley-Lawson, D.A.** (1995) A novel form of Epstein-Barr virus latency in normal B cells in vivo. *Cell*, **80**, 593-601.
- Moorthy, R.K. and Thorley-Lawson, D.A.** (1993a) All three domains of the Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein LMP-1 are required for transformation of rat-1 fibroblasts. *J Virol*, **67**, 1638-1646.
- Moorthy, R.K. and Thorley-Lawson, D.A.** (1993b) Biochemical, genetic, and functional analyses of the phosphorylation sites on the Epstein-Barr virus-encoded oncogenic latent membrane protein LMP-1. *J Virol*, **67**, 2637-2645.
- Moran, E.** (1993) Interaction of adenoviral proteins with pRB and p53. *Faseb J*, **7**, 880-885.
- Morse, H.C., 3rd, Hartley, J.W., Fredrickson, T.N., Yetter, R.A., Majumdar, C., Cleveland, J.L. and Rapp, U.R.** (1986) Recombinant murine retroviruses containing avian v-myc induce a wide spectrum of neoplasms in newborn mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **83**, 6868-6872.
- Mueller-Lantzsch, N., Lenoir, G.M., Sauter, M., Takaki, K., Bechet, J.M., Kuklik-Roos, C., Wunderlich, D. and Bornkamm, G.W.** (1985) Identification of the coding region for a second Epstein-Barr virus nuclear antigen (EBNA 2) by transfection of cloned DNA fragments. *Embo J*, **4**, 1805-1811.
- Murata, S., Kawahara, H., Tohma, S., Yamamoto, K., Kasahara, M., Nabeshima, Y., Tanaka, K. and Chiba, T.** (1999) Growth retardation in mice lacking the proteasome activator PA28gamma. *J Biol Chem*, **274**, 38211-38215.
- Nakagomi, H., Dolcetti, R., Bejarano, M.T., Pisa, P., Kiessling, R. and Masucci, M.G.** (1994) The Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 (LMP1) induces interleukin-10 production in Burkitt lymphoma lines. *Int J Cancer*, **57**, 240-244.

- Nemerow, G.R., Wolfert, R., McNaughton, M.E. and Cooper, N.R.** (1985) Identification and characterization of the Epstein-Barr virus receptor on human B lymphocytes and its relationship to the C3d complement receptor (CR2). *J Virol*, **55**, 347-351.
- Nicholls, J.M., Agathangelou, A., Fung, K., Zeng, X. and Niedobitek, G.** (1997) The association of squamous cell carcinomas of the nasopharynx with Epstein-Barr virus shows geographical variation reminiscent of Burkitt's lymphoma. *J Pathol*, **183**, 164-168.
- Niedobitek, G.** (1999) The Epstein-Barr virus: a group 1 carcinogen? *Virchows Arch*, **435**, 79-86.
- Postel, E.H.** (1998) NM23-NDP kinase. *Int J Biochem Cell Biol*, **30**, 1291-1295.
- Postel, E.H., Berberich, S.J., Flint, S.J. and Ferrone, C.A.** (1993) Human c-myc transcription factor PuF identified as nm23-H2 nucleoside diphosphate kinase, a candidate suppressor of tumor metastasis. *Science*, **261**, 478-480.
- Postel, E.H., Berberich, S.J., Rooney, J.W. and Kaetzel, D.M.** (2000) Human NM23/nucleoside diphosphate kinase regulates gene expression through DNA binding to nuclease-hypersensitive transcriptional elements. *J Bioenerg Biomembr*, **32**, 277-284.
- Postel, E.H., Weiss, V.H., Beneken, J. and Kirtane, A.** (1996) Mutational analysis of NM23-H2/NDP kinase identifies the structural domains critical to recognition of a c-myc regulatory element. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 6892-6897.
- Potter, M., Mushinski, J.F., Mushinski, E.B., Brust, S., Wax, J.S., Wiener, F., Babonits, M., Rapp, U.R. and Morse, H.C., 3rd.** (1987) Avian v-myc replaces chromosomal translocation in murine plasmacytomagenesis. *Science*, **235**, 787-789.
- Rickinson, A.a.K., Elliott.** (1996) Epstein-Barr virus. In Fields, B.N., Knipe, D.M., Howley, P.M. (ed.), *Fields Virology*. Lippincott-Raven Publisher, Philadelphia.
- Ridley, A.J., Paterson, H.F., Johnston, C.L., Diekmann, D. and Hall, A.** (1992) The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell*, **70**, 401-410.
- Rous, P.** (1979) A transmissible avian neoplasm. (Sarcoma of the common fowl) by Peyton Rous, M.D., *Experimental Medicine* for Sept. 1, 1910, vol. 12, pp.696-705. *J Exp Med*, **150**, 738-753.
- Rowe, M., Khanna, R., Jacob, C.A., Arguet, V., Kelly, A., Powis, S., Belich, M., Croom-Carter, D., Lee, S., Burrows, S.R. and et al.** (1995) Restoration of endogenous antigen processing in Burkitt's lymphoma cells by Epstein-Barr virus latent membrane protein-1: coordinate up-regulation of peptide transporters and HLA-class I antigen expression. *Eur J Immunol*, **25**, 1374-1384.
- Schepers, A., Ritzi, M., Bousset, K., Kremmer, E., Yates, J.L., Harwood, J., Diffley, J.F. and Hammerschmidt, W.** (2001) Human origin recognition complex binds to the region of the latent origin of DNA replication of Epstein-Barr virus. *Embo J*, **20**, 4588-4602.
- Scherle, P., Behrens, T. and Staudt, L.M.** (1993) Ly-GDI, a GDP-dissociation inhibitor of the RhoA GTP-binding protein, is expressed preferentially in lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 7568-7572.

- Schuhmacher, M., Kohlhuber, F., Holzel, M., Kaiser, C., Burtscher, H., Jarsch, M., Bornkamm, G.W., Laux, G., Polack, A., Weidle, U.H. and Eick, D.** (2001) The transcriptional program of a human B cell line in response to Myc. *Nucleic Acids Res*, **29**, 397-406.
- Sijts, A., Sun, Y., Janek, K., Kral, S., Paschen, A., Schadendorf, D. and Kloetzel, P.M.** (2002) The role of the proteasome activator PA28 in MHC class I antigen processing. *Mol Immunol*, **39**, 165-169.
- Subramanian, C., Cotter, M.A., 2nd and Robertson, E.S.** (2001) Epstein-Barr virus nuclear protein EBNA-3C interacts with the human metastatic suppressor Nm23-H1: a molecular link to cancer metastasis. *Nat Med*, **7**, 350-355.
- Sung, N.S., Kenney, S., Gutsch, D. and Pagano, J.S.** (1991) EBNA-2 transactivates a lymphoid-specific enhancer in the BamHI C promoter of Epstein-Barr virus. *J Virol*, **65**, 2164-2169.
- Swaminathan, S., Tomkinson, B. and Kieff, E.** (1991) Recombinant Epstein-Barr virus with small RNA (EBER) genes deleted transforms lymphocytes and replicates in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 1546-1550.
- Takai, Y., Sasaki, T., Tanaka, K. and Nakanishi, H.** (1995) Rho as a regulator of the cytoskeleton. *Trends Biochem Sci*, **20**, 227-231.
- Takeshita, H., Yoshizaki, T., Miller, W.E., Sato, H., Furukawa, M., Pagano, J.S. and Raab-Traub, N.** (1999) Matrix metalloproteinase 9 expression is induced by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 C-terminal activation regions 1 and 2. *J Virol*, **73**, 5548-5555.
- Tanner, J., Weis, J., Fearon, D., Whang, Y. and Kieff, E.** (1987) Epstein-Barr virus gp350/220 binding to the B lymphocyte C3d receptor mediates adsorption, capping, and endocytosis. *Cell*, **50**, 203-213.
- Thorley-Lawson, D.A. and Mann, K.P.** (1985) Early events in Epstein-Barr virus infection provide a model for B cell activation. *J Exp Med*, **162**, 45-59.
- Tomkinson, B. and Kieff, E.** (1992) Use of second-site homologous recombination to demonstrate that Epstein-Barr virus nuclear protein 3B is not important for lymphocyte infection or growth transformation in vitro. *J Virol*, **66**, 2893-2903.
- Tomkinson, B., Robertson, E. and Kieff, E.** (1993) Epstein-Barr virus nuclear proteins EBNA-3A and EBNA-3C are essential for B-lymphocyte growth transformation. *J Virol*, **67**, 2014-2025.
- Uchiumi, T., Kikuchi, M., Terao, K., Iwasaki, K. and Ogata, K.** (1986) Cross-linking of elongation factor 2 to rat-liver ribosomal proteins by 2-iminothiolane. *Eur J Biochem*, **156**, 37-48.
- Uchiumi, T., Kikuchi, M., Terao, K. and Ogata, K.** (1985) Cross-linking study on protein topography of rat liver 60 S ribosomal subunits with 2-iminothiolane. *J Biol Chem*, **260**, 5675-5682.
- Waltzer, L., Logeat, F., Brou, C., Israel, A., Sergeant, A. and 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.

- Wang, D., Liebowitz, D. and Kieff, E.** (1985) An EBV membrane protein expressed in immortalized lymphocytes transforms established rodent cells. *Cell*, **43**, 831-840.
- Wang, D., Liebowitz, D., Wang, F., Gregory, C., Rickinson, A., Larson, R., Springer, T. and Kieff, E.** (1988) Epstein-Barr virus latent infection membrane protein alters the human B-lymphocyte phenotype: deletion of the amino terminus abolishes activity. *J Virol*, **62**, 4173-4184.
- Wang, F., Gregory, C., Sample, C., Rowe, M., Liebowitz, D., Murray, R., Rickinson, A. and Kieff, E.** (1990) Epstein-Barr virus latent membrane protein (LMP1) and nuclear proteins 2 and 3C are effectors of phenotypic changes in B lymphocytes: EBNA-2 and LMP1 cooperatively induce CD23. *J Virol*, **64**, 2309-2318.
- Wilk, S., Chen, W.E. and Magnusson, R.P.** (2000) Properties of the nuclear proteasome activator PA28gamma (REGgamma). *Arch Biochem Biophys*, **383**, 265-271.
- Wilson, J.B., Weinberg, W., Johnson, R., Yuspa, S. and Levine, A.J.** (1990) Expression of the BNLF-1 oncogene of Epstein-Barr virus in the skin of transgenic mice induces hyperplasia and aberrant expression of keratin 6. *Cell*, **61**, 1315-1327.
- Winther, B. and Innes, D.J.** (1994) The human adenoid. A morphologic study. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, **120**, 144-149.
- Wonsey, D.R., Zeller, K.I. and Dang, C.V.** (2002) The c-Myc target gene PRDX3 is required for mitochondrial homeostasis and neoplastic transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 6649-6654.
- Yates, J.L., Warren, N. and Sugden, B.** (1985) Stable replication of plasmids derived from Epstein-Barr virus in various mammalian cells. *Nature*, **313**, 812-815.
- Yoshiyama, H., Imai, S., Shimizu, N. and Takada, K.** (1997) Epstein-Barr virus infection of human gastric carcinoma cells: implication of the existence of a new virus receptor different from CD21. *J Virol*, **71**, 5688-5691.
- Yoshizaki, T., Sato, H., Furukawa, M. and Pagano, J.S.** (1998) The expression of matrix metalloproteinase 9 is enhanced by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 3621-3626.
- Young, L.S., Dawson, C.W. and Eliopoulos, A.G.** (2000) The expression and function of Epstein-Barr virus encoded latent genes. *Mol Pathol*, **53**, 238-247.
- Zaheer, A. and Lim, R.** (1996) In vitro inhibition of MAP kinase (ERK1/ERK2) activity by phosphorylated glia maturation factor (GMF). *Biochemistry*, **35**, 6283-6288.
- Zaheer, A., Mathur, S.N. and Lim, R.** (2002) Overexpression of glia maturation factor in astrocytes leads to immune activation of microglia through secretion of granulocyte-macrophage-colony stimulating factor. *Biochem Biophys Res Commun*, **294**, 238-244.
- Zeidler, R., Eissner, G., Meissner, P., Uebel, S., Tampe, R., Lazis, S. and Hammerschmidt, W.** (1997) Downregulation of TAP1 in B lymphocytes by cellular and Epstein-Barr virus-encoded interleukin-10. *Blood*, **90**, 2390-2397.

- Zeidler, R., Meissner, P., Eissner, G., Lazis, S. and Hammerschmidt, W.** (1996) Rapid proliferation of B cells from adenoids in response to Epstein-Barr virus infection. *Cancer Res*, **56**, 5610-5614.
- Zheng, X., Yan, L., Nilsson, B., Eklund, G. and Drettner, B.** (1994) Epstein-Barr virus infection, salted fish and nasopharyngeal carcinoma. A case-control study in southern China. *Acta Oncol*, **33**, 867-872.
- Zhu, M., John, S., Berg, M. and Leonard, W.J.** (1999) Functional association of Nmi with Stat5 and Stat1 in IL-2- and IFN γ -mediated signaling. *Cell*, **96**, 121-130.
- Zimber-Strobl, U., Suentzenich, K.O., Laux, G., Eick, D., Cordier, M., Calender, A., Billaud, M., Lenoir, G.M. and Bornkamm, G.W.** (1991) Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 activates transcription of the terminal protein gene. *J Virol*, **65**, 415-423.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Herrn Dr. Reinhard Zeidler für die Vergabe des Themas, Hilfe und Unterstützung bei allen Problemen und seine ständige Diskussionsbereitschaft,

Herrn Dr. Olivier Gires für die hervorragende Betreuung, den wissenschaftlichen Rat und nicht zuletzt für die superschnelle Korrektur,

Frau PD Dr. Barbara Wollenberg, die sich sofort dazu bereit erklärte diese Arbeit als „Doktormutter“ zu betreuen, egal ob bei Gummibärchen in ihrem Zimmer oder bei einem Glas Rotwein vorm offenen Kamin,

Herrn Prof. Dr. Ernst Kastenbauer für die guten Arbeitsbedingungen in seiner Abteilung und seinen „Klinikern“ für die Beschaffung von Primärmaterial,

Herrn Prof. Dr. Wolfgang Hammerschmidt und seiner „Truppe“ für die rege wissenschaftliche Kooperation und Unterstützung, insbesondere Markus, Madeleine und Annette die in Sachen EBV immer einen guten Rat für mich parat hatten,

Herrn Prof. Dr. Dirk Eick und seinem Trupp, die mich ganz herzlich in ihrem Labor aufnahmen und mich immer reichlich mit „Schoki“ versorgten,

besondern Dank an Martin, von dem ich noch eine Menge lernen konnte,

Jens und Jürgen für die vielen Stunden die sie mit mir vor dem Computer verbrachten,

und dem gesamten Laborteam der HNO-Forschung für eine schöne und mehr als kollegiale Atmosphäre....

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name: Tanja Krug
Geburtsdatum: 19.10.1974
Geburtsort: Berlin
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch
Wohnort: Stiftsbogen 53
81375 München

Ausbildung

1981-1985 Grundschole Breitengüßbach
1985-1994 Gymnasium der Englischen Fräulein, Bamberg
Juni 1994 Abitur

1994-1995 Studium der Mineralogie an der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen
1995-1999 Studium der Pharmazie an der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen
1999-2000 Praktisches Jahr in der Schloss-Apotheke in Erlangen
Juli 2000 3. Staatsexamen

2000-2003 Promotion im Bereich der Onkologie an der Ludwig-Maximilians-Universität, München