

**Regulation von B-Zell-Signalprozessen
durch das Latente Membranprotein 2A
des Epstein-Barr-Virus**

Dissertation
zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades

der Fakultät für Chemie
der Universität Bielefeld

vorgelegt von
Gökhan Yigit

Februar 2008

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Juni 2004 bis September 2004 in der Abteilung Biochemie und Molekulare Immunologie der Fakultät für Chemie an der Universität Bielefeld und von Oktober 2004 bis November 2007 in der Abteilung Zelluläre und Molekulare Immunologie der Georg-August-Universität Göttingen unter der wissenschaftlichen Leitung von Herrn Prof. Dr. Jürgen Wienands angefertigt. Diese Arbeit wurde durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (FOR 521) unterstützt.

Danksagung

Meinem Doktorvater Prof. Dr. Jürgen Wienands möchte ich für die Betreuung und Unterstützung in den vergangenen Jahren danken. Insbesondere seine ständige Diskussionsbereitschaft und sein fachlicher Rat haben entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Herrn Prof. Dr. Jürgen Frey danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Ich danke Prof. Dr. Detlev Schild und Dr. Dirk Czesnik für die gute Zusammenarbeit und die vielen Ideen bei den Ca^{2+} -Messungen auf Einzelzellebene.

Ich bedanke mich bei Dr. Niklas Engels für die gemeinsame Arbeit am LMP2A-Projekt.

Allen Kolleginnen und Kollegen in Göttingen sowie in Bielefeld danke ich für die gute Zusammenarbeit. Insbesondere das tolle Arbeitsklima und die vielen lustigen Momente in all den Jahren werden mir in Erinnerung bleiben.

Ein ganz besonderer Dank gilt Verena, die meine Arbeit entscheiden unterstützt hat. Ohne ihre Hilfe wäre diese Arbeit nicht in dieser Form zustande gekommen.

Ich möchte mich besonders bei Ingo und Michael bedanken, deren wissenschaftliche und vor allen Dingen moralische Unterstützung entscheidenden Anteil am Gelingen dieser Arbeit haben. Vielen Dank, dass Ihr mir innerhalb und außerhalb des Labors immer mit Rat und Tat zur Seite gestanden habt.

Der größte Dank gebührt meiner Familie. Ihr habt mich in jeder Hinsicht unterstützt. Euch möchte ich diese Arbeit widmen.

Teile dieser Dissertation sind zur Veröffentlichung eingereicht:

Engels N.*, Yigit G.*, Emmerich C., Czesnik D., Schild D., Wienands J.[#] (2008).
Analysis of Epstein-Barr virus LMP2A signaling *in statu nascendi* reveals a
PLC- γ 2-dependent feed forward activation signal. *Oncogene*

(* these authors contributed equally to this work, [#] corresponding author)

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	1
2. Einleitung	2
2.1 Das Epstein-Barr-Virus.....	3
2.2 Latenter Infektionszyklus und lytische Reaktivierung von EBV.....	6
2.3 Das Latente Membranprotein 2A des Epstein-Barr-Virus.....	7
2.4 Grundlagen der BCR-Signalleitung.....	10
2.5 Modellsysteme zur Analyse der LMP2A-Funktion in B-Zellen.....	13
3. Ziele der Arbeit	17
4. Material	18
4.1 Chemikalien und Reagenzien.....	18
4.2 Geräte.....	18
4.3 Lösungen, Puffer und Medien.....	19
4.4 Enzyme.....	19
4.5 Antikörper.....	20
4.6 Vektoren.....	21
4.7 cDNA-Konstrukte.....	22
4.8 Oligonucleotide.....	23
4.9 Bakterienstämme.....	24
4.10 Zelllinien.....	24
4.11 Sonstige Materialien.....	25
4.12 Software.....	25
5. Methoden	26
5.1 Molekularbiologische Methoden.....	26
5.1.1 Restriktionsspaltung von DNA.....	26
5.1.2 Agarose-Gelelektrophorese.....	26
5.1.3 Isolierung von DNA aus Agarosegelen.....	27

5. Methoden

5.1.4 Phenol-Chloroform-Extraktion von Proteinen.....	27
5.1.5 Ethanolpräzipitation von DNA.....	27
5.1.6 Photometrische DNA-Konzentrationsbestimmung.....	27
5.1.7 5'-Dephosphorylierung von Vektor-DNA.....	28
5.1.8 Ligation von DNA-Fragmenten.....	28
5.1.9 Herstellung transformationskompetenter <i>E. coli</i> -Bakterien.....	28
5.1.10 Transformation kompetenter <i>E. coli</i> -Bakterien.....	29
5.1.11 Analytische und präparative Isolierung von Plasmid-DNA.....	30
5.1.12 Langzeitaufbewahrung von Bakterienstämmen.....	30
5.1.13 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	31
5.1.14 Zielgerichtete Mutagenese.....	32
5.1.15 Sicherung von PCR-Fragmenten mit Hilfe der T/A-Klonierung.....	32
5.1.16 DNA-Sequenzierung.....	32
5.2 Zellbiologische Methoden.....	33
5.2.1 Allgemeine Aspekte.....	33
5.2.2 Kulturbedingungen.....	33
5.2.3 Einfrieren und Auftauen eukaryotischer Zellen.....	33
5.2.4 Zellzählung.....	34
5.2.5 Transfektion von DT40-Zellen durch Elektroporation.....	34
5.2.6 Transfektion von DT40-Zellen durch rekombinante Retroviren.....	34
5.2.6.1 Transfektion von Plat-E-Zellen mit FuGENE®.....	35
5.2.6.2 Retrovirale Infektion von DT40-Zellen.....	36
5.2.7 Durchflusscytometrische Analyse der Expression von Oberflächenproteinen (FACS-Analyse).....	36
5.2.8 Durchflusscytometrische Ca ²⁺ -Fluxanalyse.....	36
5.2.9 Ca ²⁺ -Fluxanalyse auf Einzelzellebene.....	38
5.2.10 Induktion der Cre/loxP-basierten Expression von Proteinen.....	38
5.2.11 Induktion der BZLF1-Expression.....	39
5.3 Proteinbiochemische Methoden.....	40
5.3.1 Stimulation und Lyse von DT40-Zellen.....	40
5.3.2 Immunpräzipitation (IP).....	40
5.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	41

5. Methoden	
5.3.4 Westernblot-Analyse.....	41
5.3.5 Reportergenassay zur Analyse der Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NFAT/AP-1 und NF-κB.....	42
6. Ergebnisse	45
6.1 Cre/loxP-basiertes Expressionssystem zur Analyse der LMP2A-Signalleitung in B-Lymphocyten.....	45
6.2 LMP2A induziert Oszillationen der cytosolischen Ca ²⁺ -Konzentration.....	46
6.2.1 BCR-induzierte Ca ²⁺ -Oszillationen.....	48
6.3 Die Membrantopologie des LMP2A-N-Terminus gewährleistet die konstitutive Signalleitung.....	52
6.3.1 CD72/LMP2A-induzierte Ca ²⁺ -Oszillationen sind abhängig von einem funktionellen LMP2A-ITAM.....	55
6.4 Funktioneller Vergleich der ITAMs von Igα, Igβ und LMP2A.....	57
6.5 LMP2A induziert die Expression des EBV-Transaktivators BZLF1.....	62
6.5.1 BCR-abhängige Aktivierung des viralen pZ-Promotors.....	62
6.5.2 LMP2A aktiviert den EBV-Promotor pZ.....	64
6.5.3 Die Aktivierung des viralen pZ-Promotors ist abhängig von der Orientierung des LMP2A-N-Terminus.....	65
6.6 LMP2A aktiviert die Transkriptionsfaktoren NFAT und NF-κB.....	66
7. Diskussion	71
7.1 LMP2A induziert die Aktivierung BCR-proximaler Signalkaskaden.....	73
7.2 Induktion des lytischen Replikationszyklus durch LMP2A.....	77
7.3 Die Membrantopologie des N-Terminus ist verantwortlich für die konstitutive Signalleitung durch LMP2A.....	79
8. Literatur	82

9. Anhang	94
9.1 Abbildungsverzeichnis.....	94
9.2 Tabellenverzeichnis.....	95
9.3 Aminosäuresequenzen von LMP2A und Fusionsproteinen.....	96

I Abkürzungen

4-HT	4-Hydroxytamoxifen
AIDS	<i>acquired immunodeficiency syndrome</i>
ALV	<i>avian leucosis virus</i>
AM	Acetoxymethylester
AP-1	<i>activating protein-1</i>
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BASH	<i>B cell adaptor containing an SH2 domain</i>
BCR	<i>B cell antigen receptor</i>
Blk	<i>B cell lymphoma kinase</i>
BLNK	<i>B cell linker protein</i>
BSA	<i>bovine serum albumine</i>
Btk	<i>Bruton's tyrosine kinase</i>
C2	<i>conserved 2 domain</i>
$[Ca^{2+}]_i$	intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration
CCL	<i>cleared cellular lysate</i>
CD	<i>clusters of differentiation</i>
cDNA	<i>complementary DNA/copy DNA</i>
CDR	<i>complementarity determing region</i>
CIP	<i>calf intestine phosphatase</i>
CMV	Cytomegalievirus
Cre	<i>causes recombination</i>
CS	<i>chicken serum</i>
Csk	<i>C-terminal Src kinase</i>
DAG	Diacylglycerin
ddH ₂ O	doppelt deionisiertes Wasser
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	2'-Desoxynucleosid-5'-trisphosphat

Dok	<i>downstream of tyrosine kinase</i>
DTT	1,4-Dithiothreitol
EBER	<i>EBV-encoded RNA</i>
EBNA	<i>Epstein-Barr-Virus nuclear antigen</i>
EBV	Epstein-Barr-Virus
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	<i>enhanced chemical luminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
<i>env</i>	<i>envelope</i> ; Gen codierend für Glycoprotein 160
ER	endoplasmatisches Reticulum
Erk	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorter</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FITC	Fluorescein-5-isothiocyanat
Fyn	<i>fgr/yes-related novel PTK</i>
<i>gag</i>	<i>core protein</i> , Gen codierend für p55
GEF	<i>guanine nucleotide exchange factor</i>
gp	Glycoprotein
Grb2	<i>growth factor receptor-bound protein 2</i>
GRP	<i>guanine nucleotide releasing protein</i>
HEK	<i>human embryonic kidney</i>
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure
HIV	<i>human immunodeficiency virus</i>
HRPO	<i>horseradish peroxidase</i>
Hsp90	<i>heat shock protein 90</i>
IB	Immunoblot
Ig	Immunglobulin
IP	Immunpräzipitation
IP3	Inositol-1,4,5-trisphosphat
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
IRES	<i>internal ribosome entry site</i>

ITAM	<i>immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i>
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinase</i>
LCLs	Lymphoblastoide Zelllinien
LMP	Latentes Membranprotein
loxP	<i>locus of crossover x in P1</i>
LTR	<i>long terminal repeat</i>
Lyn	<i>lck/yes-related novel kinase</i>
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MCM	MerCreMer
Mer	<i>mutated estrogen receptor</i>
MHCII	<i>major histocompatibility complex II</i>
mlg	membranständiges Immunglobulin
MMLV	<i>moloney murine leukemia virus</i>
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
Nck	<i>non-catalytic region of tyrosine kinase</i>
Nedd4	<i>neuronally expressed developmentally downregulated 4</i>
NFAT	<i>nuclear factor of activated T cells</i>
NF- κ B	<i>nuclear factor for κ gene in B lymphocytes</i>
NP-40	Nonidet P40
NTAL	<i>non-T cell activation linker</i>
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PIP2	<i>phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate</i>
PKC	<i>protein kinase C</i>
PLC- γ 2	<i>phospholipase C-γ2</i>
PMA	<i>phorbol-12-myristate-13-acetate</i>
<i>pol</i>	Gen codierend für retrovirale Protease, Reverse Transkriptase und Integrase
PTK	<i>protein tyrosine kinase</i>

PTP	<i>protein tyrosine phosphatase</i>
pTyr	Phosphotyrosin
pY	Phosphotyrosin
RNA	Ribonucleinsäure
RNase	Ribonuclease
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	Reverse Transkription/Raumtemperatur
SDS	<i>sodium dodecylsulfate</i>
SH	<i>Src homology domain</i>
SLP-65	<i>SH2 domain-containing leukocyte adaptor protein of 65 kDa</i>
<i>src</i>	<i>rous sarcoma oncogene</i>
Syk	<i>spleen tyrosine kinase</i>
TCR	<i>T cell antigen receptor</i>
Tec	<i>Tyrosine kinase expressed in hepatocellular carcinoma</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
T _M	<i>melting temperature</i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	ultraviolett
Vav	<i>vav oncogene/Adapterprotein mit GEF-Aktivität</i>
VCA	<i>virus capsid antigen</i>
VSV-G	<i>vesicular stomatitis virus glycoprotein</i>
v/v	<i>volume per volume</i>
w/v	<i>weight per volume</i>
wt	Wildtyp
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid

II Aminosäuren

Aminosäure	Abkürzung	Ein-Buchstaben-Code
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

III Nucleotide

Nucleotid	Abkürzung
Desoxyadenylat	A
Desoxycytidylat	C
Desoxyguanylat	G
Desoxythymidylat	T

IV Einheiten und Präfixe

k	kilo	min	Minute	V	Volt
c	centi	s	Sekunde	A	Ampere
m	milli	m	Meter	F	Farad
μ	micro	L	Liter	rpm	<i>rounds per minute</i>
n	nano	M	molar	g	Erdbeschleunigung
p	pico	g	Gramm	U	<i>Unit/Enzymeinheit</i>
t	Zeit	b	Base	Da	Dalton
h	Stunde	bp	Basenpaar	°C	Grad Celsius

1. Zusammenfassung

Das onkogene Epstein-Barr-Virus (EBV), der Erreger der infektiösen Mononukleose, gehört zur Gruppe der humanpathogenen γ -Herpesviren. Durch Etablierung eines latenten Zustands, in dem keine infektiösen Viruspartikel gebildet werden, kann das Virus seiner vollständigen Eliminierung durch das Immunsystem entgehen und im Organismus persistieren. EBV etabliert die Latenz in einer Population ruhender B-Gedächtniszellen, aus denen es reaktiviert werden kann und den lytischen Zyklus initiieren kann. Das Latente Membranprotein (LMP) 2A von EBV ist der Lage Signalleitungsprozesse in B-Zellen zu beeinflussen. Bisherige Untersuchungen der LMP2A-vermittelten Signalleitung stützen sich überwiegend auf *in vitro* mit EBV infizierte, sogenannte Lymphoblastoide Zelllinien (LCLs). In LCLs induziert die Expression von LMP2A die konstitutive Phosphorylierung BCR-proximaler Signalproteine und inhibiert gleichzeitig die BCR-abhängige Ca^{2+} -Mobilisierung. Allerdings exprimieren LCLs weitere EBV-codierte Proteine, so dass sich die isolierte Funktion von LMP2A in diesem Zellsystem nicht eindeutig bestimmen lässt.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die LMP2A-vermittelte Signalleitung in B-Lymphocyten *in statu nascendi* und unabhängig von weiteren viralen Proteinen untersucht werden. Dazu wurde ein Cre/loxP-basiertes Expressionssystem zur Analyse der LMP2A-Signalleitung in DT40 B-Lymphocyten verwendet, das es erlaubt, die Expression von LMP2A gezielt zu regulieren. Mit Hilfe dieses Systems konnte nachgewiesen werden, dass LMP2A ligandenunabhängig BCR-proximale Signalwege aktivieren kann. Die Aktivierung beschränkt sich dabei nicht wie in LCLs auf membrannahe Signalprozesse wie die Phosphorylierung der Signalproteine Lyn, Syk und SLP-65, sondern umfasst auch die Aktivierung von PLC- γ 2, einem Schlüsselenzym der cytosolische Ca^{2+} -Mobilisierung. Die Expression von LMP2A induziert Oszillationen der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration, die zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NFAT und NF- κ B führen. Diese konstitutive Signalleitung durch LMP2A ist abhängig von der Membrantopologie des cytosolischen N-Terminus. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass diese durch LMP2A-vermittelten Signale die Aktivierung des EBV-Promotors pZ induzieren und so zur Initiation des lytischen Replikationszyklus von EBV beitragen können.

2. Einleitung

Viren sind intrazelluläre Parasiten. Sie besitzen keinen eigenen Stoffwechsel und sind daher für ihre Vermehrung auf Wirtszellen angewiesen, deren zelluläre Prozesse sie umsteuern und für ihre Replikation modifizieren können. Die Infektion mit Viren kann für die Wirtszellen unterschiedliche Folgen haben, führt aber in den meisten Fällen über die Produktion neuer Viruspartikel zu ihrer Zerstörung. Viren haben sich im Verlauf der Evolution an bestimmte Zellen und Organismen angepasst. So befallen Viren nahezu sämtliche Zelltypen eines Organismus. Da die Infektion mit Viren für den Organismus schwerwiegende Folgen haben kann, haben Wirtsorganismen Abwehrmechanismen entwickelt, mit denen Virusinfektionen effizient bekämpft werden können.

Das Immunsystem der Vertebraten bietet einen solchen Schutz vor potentiellen Virusinfektionen. Es ermöglicht die Erkennung körperfremder, pathogener Strukturen und leitet Prozesse zu deren Eliminierung ein. Eine erste schützende Barriere gegen die meisten Mikroorganismen wird durch die angeborene Immunität vermittelt. Die Zellen des angeborenen Immunsystems verfügen auf ihrer Oberfläche über unveränderliche Rezeptoren, die allgemein vorkommende Merkmale von Pathogen erkennen und dadurch Krankheitserreger direkt bekämpfen können.

Die Infektion mit Viren stellt das Immunsystem vor große Herausforderungen. Viren sind in der Lage der Erkennung durch das Immunsystem zu entgehen, indem sie unter anderem stetig ihre Oberflächenstruktur verändern. Diese permanenten Veränderungen in der Struktur viraler Erreger haben zur Folge, dass sich das Immunsystem kontinuierlich anpassen muss, um einen wirksamen Schutz vor Infektionen zu ermöglichen. Dies wird durch die adaptive oder erworbene Immunität gewährleistet. B- und T-Lymphocyten bilden die Grundlage des adaptiven Immunsystems. Im Gegensatz zum angeborenen Immunsystem werden durch die stark diversifizierten und antigenspezifischen Rezeptoren auf der Lymphocytenoberfläche Pathogene spezifisch erkannt und eliminiert. Die Antigenrezeptoren, der *B cell antigen receptor* (BCR) auf B-Lymphocyten und der *T cell antigen receptor* (TCR) auf T-Lymphocyten, bilden ein nahezu unbegrenztes Rezeptorrepertoire, das durch zufällige, sogenannte somatische Rekombination

verschiedener Rezeptorgensegmente während der Lymphocytenentwicklung entsteht (WEIGERT et al., 1980; TONEGAWA, 1983; SCHATZ et al., 1992; ROWEN et al., 1996). Jeder Lymphocyt trägt ausschließlich Antigenrezeptoren einer einzigen Spezifität auf seiner Oberfläche (NUSSENZWEIG et al., 1987; MALISSEN et al., 1992; CORCORAN, 2005).

Einige Viren sind in der Lage, Zellen des adaptiven Immunsystems direkt zu infizieren und in ihnen ihre Vermehrung einzuleiten. So befällt das *human immunodeficiency virus* (HIV) eine Subpopulation der T-Lymphocyten und führt durch die Zerstörung dieser Zellen im Zuge seiner Vermehrung zu gravierenden Immundefekten (*acquired immunodeficiency syndrome*, AIDS). Das Epstein-Barr-Virus (EBV) ist in der Lage, B-Lymphocyten zu infizieren und in diesen seine Vermehrung einzuleiten. Zusätzlich kann EBV durch Etablierung eines latenten Infektionszustands, in dem keine infektiösen Viruspartikel gebildet werden, in B-Zellen persistieren und so seiner vollständigen Eliminierung durch das Immunsystem entgehen.

2.1 Das Epstein-Barr-Virus

Das Epstein-Barr-Virus, der Erreger der infektiösen Mononukleose, gehört zur Gruppe der humanpathogenen γ -Herpesviren. Die Virionen des Virus bestehen aus einer äußeren Membranhülle, die ein ikosaedrisches Capsid umgibt, in dem das doppelsträngige, lineare DNA-Genom eingeschlossen ist. Etwa 100 Genprodukte werden von diesem codiert (ROWE, 1999). Während eine Primärinfektion mit EBV im Kindesalter größtenteils asymptomatisch verläuft, ruft die Infektion von Jugendlichen und Erwachsenen in 30 bis 50 % der Fälle Anzeichen einer infektiösen Mononukleose hervor, die auch unter der Bezeichnung Pfeiffersches Drüsenfieber bekannt ist (JENSON, 1996). Ursache dieser selbstlimitierenden, lymphoproliferativen Erkrankung ist die massive Proliferation und polyklonale Aktivierung EBV-infizierter B-Zellen, die zur Aktivierung EBV-spezifischer, cytotoxischer T-Zellen führt. Als Folge der T-Zell-Antwort, in deren Verlauf der größte Teil der EBV-infizierten B-Zellen eliminiert wird, treten die bei der infektiösen Mononukleose beobachteten Schwellungen und Inflammationen der lymphatischen Gewebe auf. Weltweit sind etwa 95% aller

Erwachsenen seropositiv für EBV (HENLE et al., 1979; KIEFF, 1996; RICKINSON and KIEFF, 1996; LONGNECKER, 1998).

Darüber hinaus ist das Epstein-Barr-Virus mit dem Auftreten einer Vielzahl von Tumoren assoziiert. So treten insbesondere bei Patienten, die an der erworbenen Immunschwächekrankheit AIDS leiden, oder Empfängern von Organtransplantaten, deren Immunsystem supprimiert ist, EBV-assoziierte, polyklonale B-Zell-Lymphome auf. Die Entstehung von Burkitt-Lymphomen, aus denen 1964 erstmalig das Epstein-Barr-Virus isoliert werden konnte, ist ebenfalls eng mit der Infektion von B-Lymphocyten durch EBV verknüpft. Weitere menschliche Tumorerkrankungen, die mit einer EBV-Infektion in Verbindung gebracht werden, sind Hodgkin-Lymphome sowie Nasopharynxkarzinome. Letztere zählen zu den häufigsten Tumorerkrankungen in China und dem südostasiatischen Raum (BAUMFORTH et al., 1999; LONGNECKER, 1998; RICKINSON and KIEFF, 2001).

Wie alle γ -Herpesviren besitzt auch das Epstein-Barr-Virus ein enges Wirtsspektrum. Die Infektion von Zellen ist an die Expression des Komplementrezeptors CD21 gekoppelt. Der EBV-„Rezeptor“ CD21 wird überwiegend auf der Oberfläche von B-Lymphocyten und in geringerem Ausmaß auf Epithelzellen des Nasopharynx exprimiert. Bei der Infektion von B-Lymphocyten wird durch die Adsorption der viralen Glycoproteine (gp) 220/350 an den Komplementrezeptor CD21 die Internalisierung des Virus über rezeptorvermittelte Endocytose ausgelöst und so die Infektion der Zelle initiiert. Die Fusion der Vesikelmembran mit der EBV-Hülle, die durch gp85 in der Membranhülle des Virus vermittelt wird, führt schließlich zur Freisetzung des Nucleocapsids in das Cytosol der Zelle und kann so den lytischen Infektionszyklus einleiten, der in der Freisetzung neuer Viruspartikel und dem Tod der Wirtszelle resultiert (NEMEROW and COOPER, 1984; TANNER et al., 1987; NEMEROW et al., 1989; KIEFF, 1996).

Ein gemeinsames Merkmal aller Herpesviren ist ihre Fähigkeit, bei einer Primärinfektion durch die Etablierung eines latenten Zustands im Organismus zu persistieren. Während dieser Latenz werden keine infektiösen Partikel gebildet, wodurch das Virus seiner vollständigen Eliminierung durch das Immunsystem entgeht. Das Epstein-Barr-Virus etabliert diesen latenten Infektionszustand in

einer Population ruhender B-Gedächtniszellen (MIYASHITA et al., 1997). Im Blut EBV-infizierter Patienten ist etwa eine aus 10^5 bis 10^6 peripheren B-Lymphocyten latent mit dem Virus infiziert (KHAN et al., 1996). Aus diesen langlebigen Zellen kann EBV wiederholt reaktiviert werden und den lytischen Replikationszyklus einleiten. Zurzeit unterscheidet man vier verschiedene Stadien der Latenz, die durch die Expression unterschiedlicher EBV-Gene gekennzeichnet sind (siehe Tabelle 2.1) (KUPPERS, 2003).

Latenztyp	exprimierte EBV-Gene	Vorkommen
0	EBERs (LMP2A*)	B-Gedächtniszellen
I	EBERs EBNA1	Burkitt-Lymphome
II	EBERs EBNA1; LMP1, 2A	Hodgkin-Lymphome
III	EBERs EBNA1, 2, 3s, -LP LMP1, 2A	LCLs

Tabelle 2.1: Latenztypen von EBV (KUPPERS, 2003)

*Nachweis von LMP2A nur auf mRNA-Ebene; EBER, *EBV-encoded RNA*; EBNA, *Epstein-Barr virus nuclear antigen*; LMP, Latentes Membranprotein; LCLs, Lymphoblastoide Zelllinien.

In vitro mit EBV infizierte B-Lymphocyten immortalisieren und werden zu sogenannten Lymphoblastoiden Zelllinien (LCLs) transformiert (SUGDEN and MARK, 1977). In diesen stark proliferierenden Zellen, in denen das EBV-Genom in zirkulärer Form als Episom vorliegt, werden neben den 6 verschiedenen *EBV nuclear antigens* (EBNAs) 1, 2, 3A, 3B, 3C und LP die Latenten Membranproteine (LMP) 1, 2A und 2B exprimiert (KIEFF, 1996; RICKINSON and KIEFF, 1996; BORNKAMM and HAMMERSCHMIDT, 2001). Während EBNA1 eine entscheidende Rolle bei der Erhaltung und Replikation des Virus-Episoms spielt, sind die viralen Proteine LMP1, EBNA2, EBNA3A und EBNA3C *in vitro* essentiell für die Transformation und Immortalisierung von B-Lymphocyten. Aufgrund der starken

Proliferation von LCLs und dem Expressionsmuster der EBV-Proteine wurde ihr Zustand dem Latenzprogramm III zugeordnet, dem sogenannten *growth program* von EBV (siehe Tabelle 2.1) (BABCOCK et al., 2000). Während dieses Zustands werden zwar keine infektiösen Viruspartikel gebildet, trotzdem aber eine Vielzahl EBV-codierter Gene exprimiert. *In vivo* wird dieser Zustand nur in stark proliferierenden B-Zellen während der akuten Phase der infektiösen Mononukleose beobachtet und entspricht somit nicht dem Latenzprogramm 0, das in latent EBV-infizierten, ruhenden B-Zellen vorherrscht.

2.2 Latenter Infektionszyklus und lytische Reaktivierung von EBV

Wie alle Herpesviren kann auch das Epstein-Barr-Virus nach erfolgreicher Primärinfektion in den Wirtszellen in einen latenten Infektionszyklus eintreten. Während dieser Latenz bleibt die Produktion von infektiösen Partikeln unterbunden. Die Virus-DNA liegt in diesen Zellen in zirkulärer Form als extrachromosomales Episom vor (KASCHKA-DIERICH et al., 1976; LINDAHL et al., 1976). Diese latent infizierten B-Lymphocyten bilden einen beständigen Grundstock, aus dem das EBV reaktiviert werden kann und die lytische Replikation einleiten kann. Welche Signale bei der Reaktivierung des Virus eine Rolle spielen, ist weitgehend unbekannt, es konnte aber gezeigt werden, dass das virale BZLF1-Protein von entscheidender Bedeutung für die Einleitung des lytischen Infektionszyklus ist (SPECK et al., 1997).

Bei dem Produkt des *bzlf1*-Gens, BZLF1, ZEBRA oder auch Zta genannt, handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor mit einem Molekulargewicht von etwa 38 kDa. Dieser wirkt sich transaktivierend auf eine Vielzahl viraler Promotoren im EBV-Genom aus, inklusive des Promotors pZ, der seine eigene Expression steuert. Auf diese Weise kann BZLF1 den produktiven Vermehrungszyklus über die Expression viraler *delayed early*- und Strukturproteine einleiten. BZLF1 besitzt hohe Homologie zur Familie der zellulären AP-1-Transkriptionsfaktoren (*activating protein-1*) (FARRELL et al., 1989). Ähnlich wie bei seinen zellulären Homologen vermittelt die C-terminale Region des Proteins dessen Dimerisierung, während basische Aminosäuren im zentralen Bereich von BZLF1 die Bindung an die DNA

ermöglichen. Die transaktivierende Funktion von BZLF1 wird durch seine N-terminale Region gewährleistet, die mit zellulären Polymerase-Komplexen interagieren kann (PACKHAM et al., 1990; SINCLAIR, 2003). Zusätzlich bindet BZLF1 an die Sequenzen des Ori_{lyt}, dem Ausgangspunkt für die lytische Genomreplikation, und initiiert so die Vermehrung des EBV-Genoms (SCHEPERS et al., 1993).

Die Expression von BZLF1 ist an die Aktivierung der viralen Promotoren pZ und pR geknüpft (MANET et al., 1989). Welche Faktoren *in vivo* die Aktivierung der pZ- und pR-Promotoren induzieren, ist weitgehend unverstanden. *In vitro* konnte gezeigt werden, dass chemische Reagenzien wie Phorbol ester oder Ca²⁺-Ionophore sowie die BCR-Stimulation von B-Lymphocyten die Aktivierung des pZ-Promotors und damit die Expression des Transaktivators BZLF1 auslösen können (TOVEY et al., 1978; TAKADA, 1984; TAKADA and ONO, 1989). Zusätzlich belegen Untersuchungen an konditional EBV-infizierten B-Zellen der EREB2.5-Zelllinie, dass das Latente Membranprotein 2A (LMP2A) in diesen Zellen die Aktivierung des pZ-Promotors und dadurch die Expression von BZLF1 induzieren kann (SCHAADT et al., 2005).

2.3 Das Latente Membranprotein 2A des Epstein-Barr-Virus

Das Latente Membranprotein 2A ist eines von zwei Genprodukten, die durch das *Imp2*-Gen des Epstein-Barr-Virus codiert werden. Ausgehend von einem Primärtranskript entstehen durch alternative Spleißvorgänge die beiden integralen Membranproteine LMP2A und LMP2B (LAUX et al., 1988; LONGNECKER and KIEFF, 1990). Durch ihre terminale Lage im EBV-Genom kann ihre Transkription nur initiiert werden, wenn das EBV-Genom in episomale Form vorliegt, da erst die Zirkularisierung des Genoms das *Imp2*-Gen in die räumliche Nähe zu seinen Promotorelementen bringt (LAUX et al., 1988). Welches Genprodukt dabei entsteht, hängt von dem Promotor ab, der die Transkription des *Imp2*-Gens initiiert (SAMPLE et al., 1989). LMP2A und LMP2B unterscheiden sich nur in ihrer N-terminalen, cytosolischen Region. LMP2A besitzt N-terminal eine 119 Aminosäuren umfassende, hydrophile Region, die bei LMP2B fehlt. Beide Proteine besitzen 12 Transmembrandomänen und eine kurze, cytosolische C-terminale Region, die 27 Aminosäuren umfasst. Für die Transformation und

Immortalisierung primärer B-Lymphocyten *in vitro* werden LMP2A und LMP2B nicht benötigt (LONGNECKER et al., 1992).

Die N-terminale Region von LMP2A enthält acht Tyrosinreste, von denen sechs in homologen Proteinen nicht-humanpathogener Herpesviren konserviert sind (RIVAILLER et al., 1999). Vier dieser Tyrosine dienen als Substrat für zelluläre Protein-Tyrosin-Kinasen (PTK) und ermöglichen nach ihrer Phosphorylierung die Interaktion mit zellulären Signalmolekülen, wie den PTKs *lck/yes-related novel kinase* (Lyn) und *spleen tyrosine kinase* (Syk). Während die Src-Kinase Lyn an das phosphorylierte Tyrosin 112 binden kann, liegen die Tyrosine 74 und 85 im Kontext eines *immunoreceptor tyrosine-based activation motif* (ITAM) vor und vermitteln die Assoziation mit den tandemartig angeordneten *Src-homology 2*-Domänen (SH2) von Syk (ALBER et al., 1993; BEAUFILS et al., 1993; MILLER et al., 1995; FRUEHLING and LONGNECKER, 1997; FRUEHLING et al., 1998).

ITAMs sind zelluläre Signalmotive, die bei der Initiation intrazellulärer Signalkaskaden durch Immunrezeptoren von entscheidender Bedeutung sind. So bilden ITAMs die Grundlage für die intrazelluläre Signalgebung durch den BCR auf der Oberfläche von B-Lymphocyten. ITAM-Sequenzen sind evolutionär hochkonserviert. Ihre Aminosäureabfolge entspricht der Konsensussequenz D/Ex₇D/ExxYxxI/Lx₇YxxI/L (Ein-Buchstaben-Code für Aminosäuren, x steht für eine beliebige Aminosäure) (RETH, 1989; SANCHEZ et al., 1993; FLASWINKEL and RETH, 1994; TADDIE et al., 1994). ITAMs enthalten zwei Tyrosinreste, die durch membranassoziierte PTK der Src-Familie phosphoryliert werden können und so als Ausgangspunkt intrazellulärer Signalkaskaden dienen. Im Gegensatz zu zellulären ITAM-tragenden Immunrezeptoren weist der N-Terminus von LMP2A die Topologie eines Typ-II Transmembranproteins auf. Verglichen mit zellulären ITAMs, die im Kontext von Typ-I Transmembranproteinen vorliegen, ist das LMP2A-ITAM somit entgegengesetzt orientiert. Welche Rolle diese inverse Orientierung des LMP2A-ITAMs bei der LMP2A-Signalleitung spielt, wurde bisher nicht untersucht.

Zwei konservierte prolinreiche Motive der Sequenz PPPPY im N-Terminus von LMP2A ermöglichen die Bindung von E3-Ubiquitin-Ligasen der *neuronally expressed developmentally downregulated 4*-Familie (Nedd4), die die Stabilität

von LMP2A und der assoziierten Src-Kinasen durch Ubiquitylierung regulieren können (IKEDA et al., 2000; LONGNECKER et al., 2000; WINBERG et al., 2000). Neben diesen Interaktionsmotiven enthält LMP2A zwei Konsensus-Serin-phosphorylierungsmotive (S^{15} und S^{102}), die durch *mitogen-activated protein kinases* (MAPKs) phosphoryliert werden können (PANOUSIS and ROWE, 1997). Während die 12 Transmembrandomänen die subzelluläre Lokalisation von LMP2A beeinflussen können, ist über den 27 Aminosäuren umfassenden C-Terminus von LMP2A bislang nur wenig bekannt. Es wird vermutet, dass dieser die Selbstaggregation von LMP2A vermitteln kann (MATSKOVA et al., 2001).

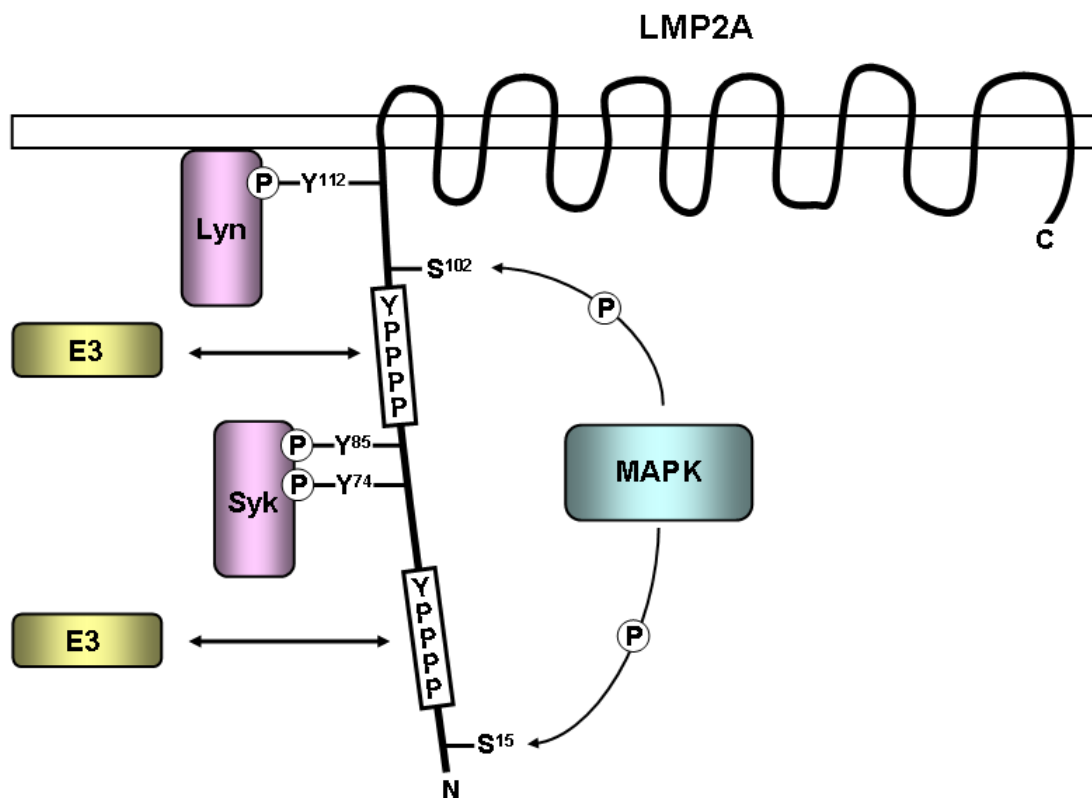


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung von LMP2A

Der 119 Aminosäuren umfassende N-Terminus von LMP2A enthält unterschiedliche Signalmotive, die die Interaktion mit zellulären Signalmolekülen ermöglichen. Die Tyrosine 74 und 85 befinden sich im Kontext eines ITAMs und ermöglichen nach ihrer Phosphorylierung die SH2-Domänen-vermittelte Bindung der PTK Syk. Die Src-Kinase Lyn bindet über ihre SH2-Domäne an das phosphorylierte Tyrosin 112. Zwei prolinreiche Regionen der Sequenz PPPPY ermöglichen die SH3-Domänen-vermittelte Assoziation mit E3-Ubiquitin-Ligasen der Nedd4-Familie. Die Serine 15 und 102 können durch Kinasen der MAPK-Familie phosphoryliert werden.

Die Vielzahl der Protein-Protein-Interaktionsmotive, insbesondere das ITAM, ermöglicht es LMP2A in die intrazelluläre Signalleitung EBV-infizierter B-Zellen einzugreifen und so BCR-vermittelte Signalwege zu beeinflussen.

2.4 Grundlagen der BCR-Signalleitung

Der BCR auf der Lymphocytenoberfläche ist wie viele andere Immunrezeptoren ein Multiproteinkomplex. Ein ligandenbindender Proteinkomplex vermittelt die Antigenbindung, während eine signalleitende Untereinheit die extrazelluläre Antigenbindung an die intrazelluläre Signalgebung koppelt (RETH, 1992; NEUBERGER et al., 1993; RETH and WIENANDS, 1997). Die ligandenbindende Untereinheit des BCRs wird durch ein membranständiges Immunglobulin (mIg) gebildet. Immunglobuline sind aus jeweils zwei identischen Ig-schweren und Ig-leichten Ketten aufgebaut, die über Disulfidbrücken kovalent miteinander verbunden sind. Die Antigenerkennung und -bindung wird durch die komplementaritätsbestimmenden Regionen (*complementarity determining regions*, CDRs) je einer Ig-schweren und -leichten Kette ermöglicht. Diese Bereiche legen sich zusammen und bilden so die zwei identischen Antigenbindestellen im Ig (RETH, 1992). Die signalleitende Untereinheit des BCRs besteht aus einem disulfidverbrückten Heterodimer der Typ-I Transmembranproteine Ig α (CD79a) und Ig β (CD79b) (CAMPBELL and CAMBIER, 1990; HOMBACH et al., 1990). Diese ist in einer 1:1 Stöchiometrie mit dem mIg assoziiert und ermöglicht so die intrazelluläre Signalweiterleitung nach der extrazellulären Bindung von Antigen an das mIg des BCRs (SCHAMEL and RETH, 2000). Vermittelt wird die Signalgebung des BCRs durch ITAMs in den cytosolischen Domänen von Ig α und Ig β .

Die Bindung von Antigen an den BCR setzt in B-Lymphocyten intrazelluläre Signalprozesse in Gang, die über die Tyrosinphosphorylierung von Proteinen und die Erhöhung des intrazellulären Ca²⁺-Spiegels die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren vermitteln und so die Aktivierung und Differenzierung von B-Zellen einleiten können.

Als eines der ersten intrazellulären Ereignisse nach Antigenbindung werden die Tyrosinreste der cytosolischen ITAMs in Ig α und Ig β phosphoryliert (RETH and WIENANDS, 1997). Dies wird durch membranassoziierte PTKs der Src-Familie

vermittelt, von denen in B-Zellen *lck/yes-related novel kinase* (Lyn), *B cell lymphoma kinase* (Blk) und *fgr/yes-related novel PTK* (Fyn) exprimiert werden (SEFTON and CAMPBELL, 1991; YAMANASHI et al., 1991; CAMPBELL and SEFTON, 1992; SOHN et al., 2006). PTKs der Src-Familie sind N-terminal über Palmitoyl- und Myristoylreste konstitutiv in der Plasmamembran der Zelle verankert. Dies gewährleistet, dass sie unmittelbar nach Rezeptorstimulation aktiviert werden und so die Phosphorylierung der ITAM-Tyrosine des signalleitenden $Ig\alpha/Ig\beta$ -Heterodimers induzieren können (BURKHARDT et al., 1991; SEFTON and CAMPBELL, 1991). Doppelt tyrosinphosphorylierte ITAMs bilden den Ausgangspunkt intrazellulärer Signalkaskaden, indem sie ein Bindemotiv für die cytosolische PTK Syk darstellen (WIENANDS et al., 1995; RETH and WIENANDS, 1997; FUTTERER et al., 1998). Die PTK Syk besitzt, wie auch viele andere Proteine, die an der Signalleitung beteiligt sind, SH2-Domänen, die die sequenzspezifische Bindung an phosphorylierte Tyrosinreste vermitteln (SONGYANG et al., 1993). Die tandemartige Anordnung der zwei SH2-Domänen ermöglicht es Syk, hochspezifisch an tyrosinphosphorylierte ITAMs zu binden, was zur Rekrutierung der PTK aus dem Cytosol an die Plasmamembran führt und gleichzeitig die katalytische Aktivierung von Syk induziert (KUROSAKI et al., 1994; KUROSAKI et al., 1995; ROWLEY et al., 1995; KIMURA et al., 1996).

Eines der ersten Substrate der aktivierten PTK Syk ist das Adapterprotein *SH2 domain-containing leukocyte protein of 65 kDa* (SLP-65), auch *B cell linker protein* (BLNK) oder *B cell adapter containing SH2-domain* (BASH) genannt (FU et al., 1998; GANGI-PETERSON et al., 1998; GOITSUKA et al., 1998; WIENANDS et al., 1998). Das Adapterprotein SLP-65 besitzt keine intrinsische enzymatische Aktivität, bildet aber nach seiner Tyrosinphosphorylierung die Organisationsplattform des sogenannten Ca^{2+} -Initiationskomplexes, der die intrazelluläre Mobilisierung von Ca^{2+} -Ionen vermittelt. SLP-65 besitzt N-terminal ein *leucine-zipper*-Motiv, gefolgt von einem sauren Bereich, der fünf spezieübergreifend konservierte Tyrosinphosphorylierungsmotive enthält, einer prolinreichen Region, die die konstitutive, stimulationsunabhängige Interaktion mit SH3-Domänen- (*Src-homology 3*) enthaltenden Proteinen vermittelt, sowie C-terminal eine SH2-Domäne. Das N-terminale *leucine-zipper*-Motiv vermittelt im Zusammenspiel mit der C-terminalen SH2-Domäne die Translokation von SLP-65 an die Plasmamembran und rekrutiert

SLP-65 somit in die räumliche Nähe des aktivierten Antigenrezeptors (KÖHLER et al., 2005; ABUDULA et al., 2007; Ingo Goldbeck, Dissertation). Die nachfolgende Phosphorylierung von SLP-65 durch Syk bildet die Grundlage für die Bindung und Aktivierung der Tec-Kinase *Bruton's tyrosine kinase* (Btk) und der Phospholipase C- γ 2 (PLC- γ 2) an SLP-65 (FU et al., 1998; WIENANDS et al., 1998; ISHIAI et al., 1999; SU et al., 1999; CHIU et al., 2002).

Die SH2-Domänen-vermittelte Bindung von PLC- γ 2 und Btk an phosphoryliertes SLP-65 führt zur Bildung des Ca^{2+} -Initiationskomplexes (FU et al., 1998; KORETZKY et al., 2006). Die trimolekulare Komposition dieses Signalmoduls sowie die räumlich Nähe zu den membranassoziierten PTKs Lyn und Syk ermöglichen die Phosphorylierung von PLC- γ 2 durch Btk (FLUCKIGER et al., 1998; KUROSAKI et al., 2000; BABA et al., 2001; RODRIGUEZ et al., 2001; WATANABE et al., 2001; HUMPHRIES et al., 2004; KIM et al., 2004). Die Tyrosinphosphorylierung von PLC- γ 2 aktiviert die Lipase-Funktion des Enzyms und ermöglicht so die Spaltung des Membranlipids Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP2) in die *second messenger* Diacylglycerin (DAG) und Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP3) (KUROSAKI et al., 2000; HIKIDA and KUROSAKI, 2005). DAG verbleibt in der Plasmamembran und rekrutiert so verschiedene Isoformen der Serin/Threonin-spezifischen *protein kinase C* (PKC) sowie *Ras guanine-nucleotide release proteins* (RasGRPs). Dies führt in B-Lymphocyten über Aktivierung der *extracellular signal-regulated kinase* (Erk) zu transkriptionellen Veränderungen in der Zelle (OANCEA and MEYER, 1998; OH-HORA et al., 2003; SPITALER and CANTRELL, 2004).

Der lösliche Botenstoff IP3 diffundiert in das Cytosol und löst durch die Bindung an IP3-Rezeptoren in der Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER) die intrazelluläre Freisetzung von Ca^{2+} -Ionen aus (PATTERSON et al., 2004). Der Anstieg der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration und die Entleerung des ERs ist mit der Öffnung weiterer Ca^{2+} -Kanäle in der Plasmamembran der Zelle verbunden und ermöglicht so den Einstrom von extrazellulären Ca^{2+} -Ionen in das Cytosol (PAREKH and PENNER, 1997; PUTNEY and MCKAY, 1999; PUTNEY et al., 2001; PAREKH and PUTNEY, 2005).

Der Anstieg des cytosolischen Ca^{2+} -Spiegels führt zur Aktivierung Ca^{2+} -abhängiger Enzyme (WINSLOW et al., 2003). So aktiviert die Ca^{2+} /Calmodulin abhängige Phosphatase Calcineurin über die Dephosphorylierung regulatorischer

Serin- und Threoninreste den Transkriptionsfaktor *nuclear factor of activated T cells* (NFAT) (CRABTREE and CLIPSTONE, 1994; SHIBASAKI et al., 1996; TIMMERMAN et al., 1996; CRABTREE and OLSON, 2002). Die Dephosphorylierung ermöglicht es NFAT in den Zellkern zu translocieren, wo es über die Bindung an spezifische Erkennungssequenzen die Expression verschiedener Gene regulieren kann. Das Zusammenspiel zwischen aktivierten PKCs und der Erhöhung des cytosolischen Ca^{2+} -Spiegels führt auch zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors *nuclear factor for κ gene in B lymphocytes* (NF- κ B) (BAEUERLE and HENKEL, 1994; SAIJO et al., 2002; SU et al., 2002). Untersuchungen belegen, dass die Intensität und Dauer des Ca^{2+} -Signals in B-Zellen entscheidend für die differentielle Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NFAT und NF- κ B ist (DOLMETSCH et al., 1997). Während ein lang anhaltendes, eher niedriges Ca^{2+} -Plateau zur selektiven Aktivierung von NFAT führt, wird NF- κ B durch einen starken, transienten Ca^{2+} -Einstrom in das Cytosol aktiviert (DOLMETSCH et al., 1997). Zusätzlich beeinflussen Oszillationen der Ca^{2+} -Konzentrationen diese Vorgänge. Schnelle, gleichmäßige Oszillationen aktivieren beide Transkriptionsfaktoren, wohingegen ungleichmäßige Schwankungen oder Oszillationen niedriger Frequenz nur NF- κ B aktivieren (DOLMETSCH et al., 1998).

2.5 Modellsysteme zur Analyse der LMP2A-Funktion in B-Zellen

Zur detaillierten Analyse der LMP2A-Funktion in B-Lymphocyten wurden unterschiedliche Modellsysteme generiert, die es ermöglichen, den Einfluss von LMP2A auf BCR-abhängige Signalleitungsprozesse zu untersuchen.

Untersuchungen transgener Mäuse zeigen, dass LMP2A in der Lage ist, BCR-vermittelte Signale während der Entwicklung und Reifung von B-Lymphocyten zu substituieren. So hebt die Expression von LMP2A in transgenen Mäusen, die keinen funktionellen BCR auf der Lymphocytenoberfläche exprimieren, den Entwicklungsstopp dieser BCR-negativen Zellen während ihrer Reifung auf (CALDWELL et al., 1998). Reife B-Zellen benötigen für ihr Überleben in der Peripherie ein sogenanntes *maintenance signal*, das in Abwesenheit von Antigen durch den BCR vermittelt wird. *In vivo*-Studien genetisch manipulierter Mäuse belegen, dass das Fehlen dieses Signals den Eintritt peripherer B-Zellen in die Apoptose zur Folge hat (LAM et al., 1997). Dieses BCR-vermittelte *maintenance*

signal kann ebenfalls durch LMP2A ersetzt werden, die Substitution ist dabei abhängig von einem funktionellen LMP2A-ITAM (CALDWELL et al., 1998; MERCHANT et al., 2000). Ein weiteres Modellsystem zur Analyse der LMP2A-Signalgebung stellen *in vitro* EBV-infizierte B-Zellen dar. Infiziert man primäre B-Lymphocyten *in vitro* mit EBV, so immortalisieren diese und werden zu sogenannten Lymphoblastoiden Zelllinien (LCLs) transformiert. In LCLs wird die BCR-Signalleitung durch LMP2A inhibiert (MILLER et al., 1993; MILLER et al., 1994). In diesen Zellen liegen die PTKs Lyn und Syk konstitutiv phosphoryliert vor. Es wird vermutet, dass Lyn dabei zunächst Tyrosinreste in LMP2A phosphoryliert und somit seine eigene, SH2-Domänen-vermittelte Bindung an das Tyrosin 112 sowie die Bindung von Syk an das LMP2A-ITAM ermöglicht (MILLER et al., 1995; FRUEHLING and LONGNECKER, 1997). Beide PTKs sind in LCLs konstitutiv mit LMP2A assoziiert. Die Rekrutierung von Lyn und Syk an LMP2A verhindert möglicherweise, dass diese für die Initiation der BCR-Signalkaskade zur Verfügung stehen, und unterbindet so die BCR-abhängige Aktivierung der Zellen. Zusätzlich beeinflusst LMP2A über die Bindung von Ubiquitin-Ligasen die Stabilität von Lyn, was zu einer schnellen Degradation von Lyn führt (IKEDA et al., 2000; IKEDA et al., 2001). Neben den PTKs Syk und Lyn liegt auch das Adapterprotein SLP-65 konstitutiv phosphoryliert vor (ENGELS et al., 2001). Ein entscheidendes, SLP-65-nachgeschaltetes Effektormolekül in B-Lymphocyten ist PLC- γ 2. PLC- γ 2 ist in LCLs weder konstitutiv aktiviert, noch kann es nach BCR-Stimulation phosphoryliert werden. Obwohl alle weiteren Komponenten des Ca^{2+} -Initiationskomplexes sowie Lyn und Syk konstitutiv phosphoryliert vorliegen, verbleibt PLC- γ 2 auch nach BCR-Stimulation in einem inaktiven Zustand. (MILLER et al., 1993; MILLER et al., 1994; ENGELS et al., 2001). Als Folge zeigen LCLs keine BCR-vermittelte intrazelluläre Ca^{2+} -Mobilisierung. Untersuchungen an chimären Transmembranproteine zeigen jedoch, dass das LMP2A-ITAM prinzipiell in der Lage ist, die intrazelluläre Ca^{2+} -Mobilisierung in B-Zellen zu vermitteln und somit als aktivierendes Signalmotiv fungieren kann (ALBER et al., 1993; BEAUFILS et al., 1993). Eine Ursache für diese scheinbar LMP2A-vermittelte Inhibition der BCR-Signalleitung und die fehlende Aktivierung von PLC- γ 2 in LCLs könnte in dem Transformationsprozess während der *in vitro*-Infektion primärer B-Lymphocyten liegen. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass durch die

konstitutive Expression EBV-codierter Genprodukte während der Transformation humaner B-Zellen Selektionsmechanismen greifen, die Signalleitungsprozesse in diesen Zellen nachhaltig beeinflussen. Zudem exprimieren LCLs neben LMP2A weitere EBV-codierte Proteine sowie mehrere nicht-proteincodierende RNAs, wodurch sich die isolierte Funktion von LMP2A unabhängig von weiteren Genprodukten des EBV nicht eindeutig ableiten lässt.

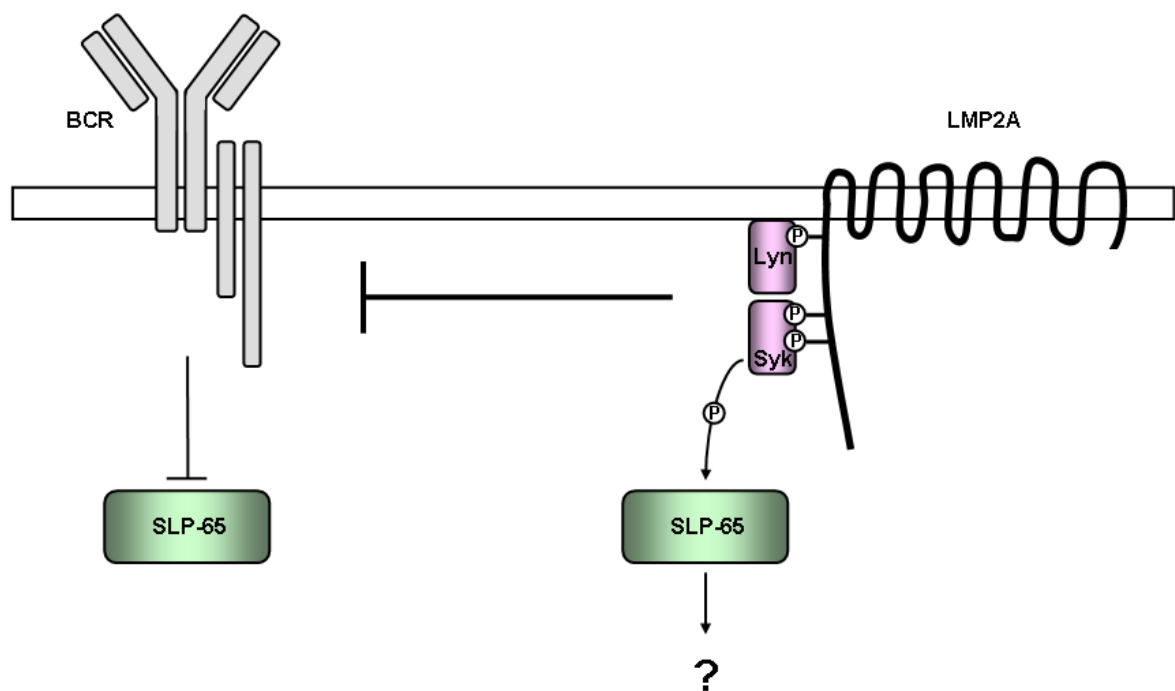


Abbildung 2.2: LMP2A inhibiert die BCR-Signalleitung in LCLs

In LCLs liegen die PTKs Syk und Lyn konstitutiv phosphoryliert und mit LMP2A assoziiert vor. Über die Rekrutierung und Aktivierung von Syk induziert LMP2A die Phosphorylierung des Adapterproteins SLP-65. Gleichzeitig inhibiert LMP2A in LCLs die BCR-abhängige Aktivierung SLP-65-nachgeschalteter Signalprozesse.

Um die Signalleitungskompetenz von LMP2A *in statu nascendi* und in Abwesenheit weiterer EBV-codierter Genprodukte zu untersuchen, wurde in unserer Arbeitsgruppe ein Cre/loxP-basiertes System zur induzierbaren Expression von LMP2A in B-Lymphocyten entwickelt (Alexander Hennemann, Diplomarbeit; Niklas Engels, unveröffentlicht). Auf der Grundlage dieses Systems konnte gezeigt werden, dass LMP2A unabhängig von weiteren EBV-Proteinen die konstitutive Tyrosinphosphorylierung BCR-signalleitender Proteine induziert

(Niklas Engels, unveröffentlicht). So liegen die PTK Syk sowie das Adapterprotein SLP-65 konstitutiv phosphoryliert vor. Das Ausmaß der Phosphorylierung korreliert mit der Stärke der LMP2A-Expression. Gleichzeitig konnte demonstriert werden, dass die BCR-vermittelte Signalgebung in diesen Zellen nicht durch LMP2A inhibiert wird. Die Cre/loxP-basierte Expression von LMP2A stellt somit ein geeignetes System zur Analyse der LMP2A-vermittelten Signalleitung *in statu nascendi* in B-Lymphocyten dar.

Die vorgestellten Arbeiten verdeutlichen, dass LMP2A BCR-Signalleitungsprozesse entscheidend beeinflussen kann. Die Aufklärung molekularer Details der LMP2A-vermittelten Signalgebung kann wichtige Hinweise auf allgemeine Prinzipien der zellulären Signalleitung liefern. Gleichzeitig kann ein umfassendes Verständnis der LMP2A-abhängigen Beeinflussung der BCR-Signalleitung dazu beitragen, die Mechanismen der EBV-Reaktivierung aus latent infizierten B-Zellen zu verstehen und Hinweise auf die Ursachen maligner Transformationen von B-Zellen durch EBV geben.

3. Ziele der Arbeit

Bisherige Untersuchungen der LMP2A-vermittelten Signalleitung stützen sich überwiegend auf *in vitro* mit EBV infizierte, sogenannte Lymphoblastoiden Zelllinien (LCLs), die neben LMP2A eine Vielzahl weiterer EBV-codierter Genprodukte exprimieren. Im Rahmen dieser Arbeit sollte die LMP2A-vermittelte Signalleitung in B-Lymphocyten *in statu nascendi* und unabhängig von weiteren EBV-codierten Proteinen untersucht werden. Dazu wurde ein Cre/loxP-basiertes Expressionssystem zur Analyse der LMP2A-Signalleitung in DT40 B-Lymphocyten verwendet. Neben dem Einfluss der LMP2A-Expression auf BCR-proximale Signalwege sollte zudem die Rolle von LMP2A bei der Aktivierung des EBV-Promotors pZ untersucht werden, der von entscheidender Bedeutung für die Initiation des lytischen EBV-Replikationszyklus ist.

4. Material

4.1 Chemikalien und Reagenzien

Alle Chemikalien und Reagenzien wurden von den Firmen Amersham Bioscience, Applichem, Becton Dickinson, Invitrogen (Gibco, Molecular Probes), Invivogen, J. T. Baker, Merck, Roth, Serva und Sigma-Aldrich (Fluka) bezogen und, sofern nicht anders angegeben, in pA-Qualität eingesetzt.

4.2 Geräte

Autoklav	Webeco
BioPhotometer	Eppendorf
Brutschrank HERAcell 150	Heraeus
Durchfluscytometer FACScalibur	Becton Dickinson
Durchfluscytometer LSR II	Becton Dickinson
Elektrophorese-Kammern (SDS-PAGE)	Amersham
	Bioscience, BioRad
Elektrophorese-Kammern (Agarose)	Peqlab (EQUIBIO)
Gel Imager	Intas
GenePulser & Capacitance Extender	BioRad
Imager ChemiLux	Intas
Inkubator Kelvitron®t	Heraeus
Inkubator Unitron	INFORS
Luminometer MiniLumat LB 9506	Perkin Elmer
Mastercycler eppgradient	Eppendorf
Mastercycler personal	Eppendorf
MicroMAX Digital CCD Kamera	Visitron
Mikroskop Axioskop 2	Zeiss
Mikroskop LEITZ DMIL	Leitz
pH-Meter pH Level 1	inoLab®
Schüttler Duomax 1030	Heidolph
Sterilbank HERAsafe	Heraeus
Thermomixer comfort	Eppendorf

Thermostat plus	Eppendorf
Ultraschallhomogenisator Sonopuls HD 2070	Bandelin
Waage TE 612	Sartorius
Water Purification System Milli-Q	Millipore
Westernblotsystem Semi-dry Transfer Unit TE70/77	Amersham Bioscience
Zentrifuge 5417 R	Eppendorf
Zentrifuge RC 3B Plus, RC 26 Plus	Sorvall®
Zentrifuge Multifuge 3 S-R	Heraeus
Zentrifuge Galaxy Mini	VWR

4.3 Lösungen, Puffer und Medien

Die Zusammensetzungen aller Lösungen und Puffer sind in Abschnitt 5 Methoden entsprechend ihrer experimentellen Verwendung aufgeführt. Sämtliche Lösungen und Puffer werden in doppelt destilliertem Wasser angesetzt und wurden, sofern nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur gelagert. Allgemein genutzte Puffer:

PBS	137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 1,5 mM KH ₂ PO ₄ ; 8,6 mM Na ₂ HPO ₄ ; pH ~ 7,3
PBS-T	PBS, 0,1 % (v/v) Tween 20
Tris/HCl	0,5-1,5 M Tris; pH 6,8-8,8 mit HCl
TE-Puffer	10 mM Tris/HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA, pH 8,0

4.4 Enzyme

Restriktionsendonucleasen	New England Biolabs
<i>Calf Intestine Phosphatase</i> (CIP)	New England Biolabs
T4 DNA Ligase	New England Biolabs
Taq DNA Polymerase	New England Biolabs
LA-Taq DNA Polymerase	Takara (Cambrex)
Pfu DNA Polymerase	Invitrogen
Pfx ₅₀ DNA Polymerase	Invitrogen
DNA Polymerase I (Klenow-Fragment)	New England Biolabs
Proteinase K	New England Biolabs

4.5 Antikörper

Primär-Antikörper	Quelle	Verwendung
Kaninchen-anti-Aktin	Sigma	IB
Kaninchen-anti-CD72 (H-96)	Santa Cruz Biotech.	IB, IP
Kaninchen-anti-ER α (MC-20)	Santa Cruz Biotech.	IB
Maus-anti-BZLF1 (BZ-1)	Dako	IB
Maus-anti-CD8 (MEM-87)	ImmunoTools	IB, IP
Maus-anti-CD8 FITC	Immunotech	FACS-Analyse
Maus-anti-CD72 FITC (K10.6)	BD Bioscience	FACS-Analyse
Maus-anti-Phosphotyrosin (4G10)	Upstate Biotechnology	IB, IP
Ziege-anti-Hühner-IgM FITC	Bethyl Laboratories	FACS-Analyse
Sekundär-Antikörper	Quelle	Verwendung
Ziege-anti-Maus-IgG1 HRPO-konjugiert	Santa Cruz Biotech.	IB
Ziege-anti-Maus-IgG2B HRPO-konjugiert	Santa Cruz Biotech.	IB
Ziege-anti-Maus-IgG HRPO-konjugiert	Pierce	IB
Ziege-anti-Kaninchen-IgG HRPO-konjugiert	Pierce	IB

Tabelle 4.1: verwendete Antikörper

(IB: Immunoblot, IP: Immunpräzipitation)

4.6 Vektoren

Vektor	Quelle	Verwendung
pAN-Hygromycin-MCM	ZHANG et al., 1998	Expression von MCM
pBS82-Bsr-BZLF1	C. Emmerich, Zell. & Mol. Immunologie, Göttingen	Expression von BZLF1
pcDNA 3.0	Invitrogen	Expression in DT40
pcDNA 3.0 blast	I. Goldbeck, Zell. & Mol. Immunologie, Göttingen	Expression in DT40
pcDNA 3.0 puro	eigene Herstellung	Expression in DT40
pEGFP-N1/N2/N3	BD Bioscience Clontech	Klonierung
pHCMV-VSV-G	M. Jücker, UKE Hamburg	Expression von VSV-G
pMSCV puro	BD Bioscience Clontech	Expression in DT40
pMSCV blast	B. Stork, Zell. & Mol. Immunologie, Göttingen	Expression in DT40
pNFAT-luc	G. Crabtree, Stanford University	Analyse der NFAT/AP-1-Aktivierung
pGL2/7xNF κ B-tkpro	E. Serfling, Institut für Pathologie, Würzburg	Analyse der NF- κ B-Aktivierung
pCMV β	BD Bioscience Clontech	<i>lacZ</i> -Expressionsvektor

Tabelle 4.2: verwendete Vektoren

4.7 cDNA-Konstrukte

Konstrukt	Aufbau	Herstellung
CD72/LMP2A Y ¹¹² F	Fusionsprotein aus LMP2A Y ¹¹² F (AS 1-121) und murinem CD72 (AS 95-354)	Mutagenese
CD72/LMP2A Y ^{74,85} F	Fusionsprotein aus LMP2A Y ^{74,85} F (AS 1-121) und murinem CD72 (AS 95-354)	Mutagenese
CD8/Ig α	Fusionsprotein aus humanem CD8 α (AS 1-209) und humanem Ig α (AS 131-187)	Mutagenese, Klonierung
CD8/Ig β	Fusionsprotein aus humanem CD8 α (AS 1-209) und humanem Ig β (AS 78-125)	Mutagenese, Klonierung
CD8/LMP2A	Fusionsprotein aus humanem CD8 α (AS 1-209) und LMP2A (AS 7-122)	Mutagenese, Klonierung
CD8/LMP2A Y ¹¹² F	Fusionsprotein aus humanem CD8 α (AS 1-209) und LMP2A Y ¹¹² F (AS 7-122)	Mutagenese
CD8/LMP2A Y ^{74,85} F	Fusionsprotein aus humanem CD8 α (AS 1-209) und LMP2A Y ^{74,85} F (AS 7-122)	Mutagenese

Tabelle 4.3: cDNA-Konstrukte

Die cDNAs codierend für humanes Ig α und Ig β wurden von Michael Reth (MPI für Immunbiologie, Freiburg) zur Verfügung gestellt. Die cDNA codierend für CD72/LMP2A wurden von Niklas Engels zur Verfügung gestellt.

4.8 Oligonucleotide

Primer	Sequenz 5'→3'	Verwendung
Y74F fwd	cgt cac tcg gac ttt caa cca cta gga	Mutagenese
Y74F rev	tcc tag tgg ttg aaa gtc cga gtg acg	Mutagenese
Y85F fwd	gat caa agt ctg ttc ttg gga ttg caa c	Mutagenese
Y85F rev	ggt gca atc cca aga aca gac ttt gat c	Mutagenese
Y112F fwd	tca tct caa cac ata ttc gaa gaa gcg ggc aga gga	Mutagenese
Y112F rev	tcc tct gcc cgc ttc ttc gaa tat gtg ttg aga tga	Mutagenese
CD8 KpnI fwd	gca acc aca ggg tac caa gac gtg ttt gca aat gtc	Mutagenese/ Klonierung
CD8 KpnI rev	gac att tgc aaa cac gtc ttg gta ccc tgt ggt tgc	Mutagenese/ Klonierung
Igβ fwd	gct aag ctt gca gct atg gta cca gac aag gat gac	Mutagenese/ Klonierung
Igβ rev	aag ttt gaa ttc att tcc tgg cct gga tgc tct cc	Mutagenese/ Klonierung
BglII fwd	gag aac cca gat ctt act ggc tta tcg	Klonierung
BglII rev	gct gat cag cga gat cta gca ttt agg	Klonierung
Kozak fwd	gct tcc acc atg gcc tta cca gtg	Mutagenese
Kozak rev	ggc cat ggt gga agc ttg ggt ctc	Mutagenese

Tabelle 4.4: verwendete Oligonucleotide

Alle Oligonucleotide wurden von MWG-Biotech bezogen.

4.9 Bakterienstämme

<i>E. coli</i> -Stamm	Genotyp	Verwendung
DH5 α	F ⁻ Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>endA1 recA1 relA1 gyrA96 hsdR17</i> (<i>r_K⁻</i> , <i>m_K⁺</i>) <i>phoA supE44 thi-1 λ-T1R</i>	Plasmid-Amplifikation
TOP10F'	F[<i>lacI^q Tn10</i> (Tet ^R)] <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-</i> <i>mcrBC</i>) Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74 recA1</i> <i>araD139</i> Δ (<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU galK rpsL</i> <i>endA1 nupG</i>	Plasmid-Amplifikation
XL1 blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17</i> <i>supE44 relA1 lac</i> [F ⁻ <i>proAB lacI^qZ</i> Δ M15 <i>Tn10</i> (Tet ^R)]	Plasmid-Amplifikation

Tabelle 4.5: verwendete Bakterienstämme

4.10 Zelllinien

DT40 (ATCC Number: CRL-2111)

Die Hühner B-Zelllinie DT40 entstammt einem bursalen Lymphom, das durch Infektion mit ALV (*avian leucosis virus*) etabliert wurde (BABA and HUMPHRIES, 1984; BABA et al., 1985). DT40-Zellen exprimieren auf ihrer Oberflächen IgM.

DT40-Variante	Quelle
DT40 <i>dok-3</i> ^{-/-}	STORK et al., 2007
DT40 <i>grb2</i> ^{-/-}	HASHIMOTO et al., 1998
DT40 <i>lyn</i> ^{-/-}	TAKATA et al., 1994
DT40 MCM	ZHANG et al., 1998
DT40 <i>slp-65</i> ^{-/-}	ISHIAI et al., 1999
DT40 <i>syk</i> ^{-/-}	TAKATA et al., 1994
DT40 <i>plc-γ2</i> ^{-/-}	TAKATA et al., 1995

Tabelle 4.6: verwendete DT40-Zelllinien

Platinum-E (Plat-E)

Plat-E-Zellen sind eine auf HEK293T-Zellen basierende Verpackungszelllinie für die Produktion rekombinanter Retroviren. Die Plat-E-Zellen exprimieren die viralen Gene (MMLV) *gag-pol* und *env* unter der Kontrolle des EF1 α -Promotors. Die Expression beider Gene ist dabei über eine IRES (*internal ribosome entry site*) direkt mit der Expression Selektionsmarker-codierender Gene für Blasticidin (*gag-pol*) und Puromycin (*env*) verknüpft (MORITA et al., 2000).

4.11 Sonstige Materialien

1 kb DNA-Größenstandard GeneRuler™	MBI Fermentas
Elektroporationsküvetten (4 mm)	Peqlab (EQUIBIO)
Westernblot-Filterpapier	Schleicher & Schell
Glutathion-Sepharose 4FastFlow	Amersham Bioscience
Nitrocellulose Filter Hybond™ ECL™	Amersham Bioscience
Protein A/G-Agarose	Santa Cruz Biotech.
Protease-Inhibitor-Cocktail (P2714)	Sigma
Proteingrößenstandard Broad Range (Prestained)	New England Biolabs
Sterilfilter	Roth
Transfektionsreagenz FuGENE®	Roche
Westernblot-Detektionsreagenz ECL™	Amersham Bioscience
Zellkulturmaterialien	Greiner, Nunc, Falcon

4.12 Software

Adobe® Photoshop® CS2
 CellQuest Pro
 CorelDraw 12
 FlowJo 6.1.1
 Gel-Dokumentationssoftware, GDS
 Mac OS 9.2
 MatLab® 7.5.0
 MS Windows XP, MS Office 2003
 pDRAW 3.1
 WinView (Visitron)

5. Methoden

5.1 Molekularbiologische Methoden

5.1.1 Restriktionsspaltung von DNA

Die sequenzspezifische, hydrolytische Spaltung von DNA zur weiteren Verwendung für Klonierungen und Transfektionen erfolgte durch Restriktionsendonucleasen. Die entsprechenden Enzyme wurden dabei gemäß den Herstellerangaben in den mitgelieferten Puffern eingesetzt.

5.1.2 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ermöglicht die Auftrennung von DNA-Fragmenten anhand ihrer Größe. Zur Herstellung von Agarosegelen wurde eine 0,8-2 %ige Agarose-TAE-Pufferlösung (w/v) bis zum vollständigen Lösen der Agarose aufgekocht, nach dem Abkühlen auf etwa 60 °C mit Ethidiumbromid versetzt (Endkonzentration: 0,5 µg/mL) und zum Aushärten in eine Elektrophoresekammer gefüllt. Die Proben wurden vor dem Auftragen zur Beschwerung der DNA mit einem entsprechenden Volumen an 6x DNA-Ladepuffer versetzt. Parallel dazu wurde ein DNA-Größenstandard aufgetragen. Die Gelelektrophorese erfolgte in einer mit TAE-Puffer gefüllten Elektrophoresekammer bei einer Spannung von 5 V/cm Elektrodenabstand. Durch Bestrahlung der aufgetrennten DNA-Fragmente mit UV-Licht (302 nm) wurden diese anschließend visualisiert (590 nm).

50x TAE-Puffer 2 M Tris/Essigsäure, pH 7,8; 0,5 M NaOAc; 50 mM
EDTA, pH 8,0

6x DNA-Ladepuffer 10 mM Tris/HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA; 0,25 % (w/v)
Bromphenolblau; 15 % (w/v) Ficoll

5.1.3 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Die Isolierung und Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte mit dem *NucleoSpin[®] Extract II-kit* (Macherey-Nagel) oder mittels des *QIAEX[®] II Gel Extraction Kit* (Qiagen) gemäß Herstellerangaben. Die DNA wurde dabei in 20-50 µL ddH₂O eluiert.

5.1.4 Phenol-Chloroform-Extraktion von Proteinen

Zur Fällung von Proteinen aus einem DNA-Protein-Gemisch wurde eine Phenol-Chloroform-Extraktion durchgeführt. Dazu wurde die DNA-Lösung zunächst mit demselben Volumen einer Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol-Lösung (25:24:1; v/v/v) versetzt, durchmischt und für 15 Minuten bei 14000 g und 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurde die wässrige Phase, die die DNA enthält, in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

5.1.5 Ethanolpräzipitation von DNA

Zur Präzipitation von DNA aus einer wässrigen Lösung wurde die DNA-Lösung zunächst mit einem Zehntel ihres Gesamtvolumens einer 5 M NaCl-Lösung versetzt. Die Lösung wurde durchmischt, mit dem 2 ¹/₂ fachen Volumen absolutem, eiskaltem Ethanol versetzt und für 15 Minuten bei -80 °C inkubiert. Anschließend wurde die Lösung 15 Minuten bei 14000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt, das DNA-Pellet bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend in 20-50 µL ddH₂O aufgenommen.

5.1.6 Photometrische DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration und Reinheit einer DNA-Lösung wurde durch photometrische Messung bestimmt. Die Messung erfolgte bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm. Dabei gilt für die optische Dichte der Lösung folgende Abhängigkeit:

$$OD_{260}=1 \cong 50\mu\text{g/mL dsDNA in H}_2\text{O}$$

$$OD_{260}=1 \cong 40\mu\text{g/mL ssDNA in H}_2\text{O}$$

Der Reinheitsgrad der DNA wird durch den Quotienten OD_{260}/OD_{280} angegeben. Dieser liegt bei reiner DNA zwischen 1,7 und 2,0.

5.1.7 5'-Dephosphorylierung von Vektor-DNA

Durch die Abspaltung der 5'-PO₄-Enden eines linearisierten Vektors verhindert man bei einer nachfolgenden Ligation die Bildung von religiertem Vektor und Vektor-Konkatameren. Dazu erfolgte im direkten Anschluss an die Restriktionsspaltung der Vektor-DNA die enzymatische Dephosphorylierung der 5'-PO₄-Enden der linearisierten Vektor-DNA mit Hilfe der *calf intestine phosphatase* (CIP). Ein 20-30 µL Restriktionsansatz wurde zu diesem Zweck mit einer Enzymeinheit CIP versetzt und 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die dephosphorylierte Vektor-DNA einer Gelelektrophorese unterzogen (5.1.2) oder direkt aufgereinigt (5.1.3).

5.1.8 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation eines DNA-Fragments (*Insert*) in einen linearisierten Vektor erfolgte mittels der DNA-Ligase des Bakteriophagen T4. Dieses Enzym ist in der Lage, die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen den 3'-Hydroxy-Enden des Vektors und 5'-Phosphat-Enden des *Inserts* zu katalysieren. Ein Standard-Ligationsansatz von 10 µL setzte sich dabei wie folgt zusammen:

1 µL Vektor

7,5 µL *Insert*

1 µL 10x Ligase-Puffer

0,5 µL T4-DNA-Ligase (3 U)

Parallel zum Ligationsansatz wurde zusätzlich ein Kontrollansatz angefertigt, der bis auf das *Insert* alle Komponenten des Ligationsansatzes enthielt. Nach Inkubation für mindestens 20 Minuten bei 22 °C wurden die Reaktionsansätze direkt für die Transformation kompetenter Bakterien eingesetzt.

5.1.9 Herstellung transformationskompetenter *E.coli*-Bakterien

Zur Herstellung transformationskompetenter *E.coli*-Bakterien wurden 150 mL LB-Medium mit 900 µL einer frischen Übernachtskultur eines entsprechenden *E.coli*-Stammes angeimpft und bei 37 °C bis zum Erreichen einer OD_{578nm} von 0,45-0,55 unter Schütteln inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde 10 Minuten auf Eis

gekühlt und anschließend bei 2000 rpm und 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das erhaltene Bakterienpellet in 30 mL TFB I-Puffer resuspendiert und für 10 Minuten auf Eis gelagert. Nach erneuter Zentrifugation bei 2000 rpm und 4 °C für 10 Minuten wurde das Bakterienpellet in 6 mL eiskaltem TFB II-Puffer aufgenommen und die Suspension in 50 µL Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die nun transformationskompetenten Bakterien wurden bis zum weiteren Gebrauch bei -80 °C gelagert.

LB-Medium	10 g Pepton; 5 g Hefeextrakt; 10 g NaCl; auf 1000 mL H ₂ O auffüllen; autoklavieren; 4 °C
TFB I-Puffer	50 mM MnCl ₂ · 4 H ₂ O; 100 mM KCl; 10 mM CaCl ₂ · 2 H ₂ O; 30 mM KOAc, pH 6,0; 15 % (v/v) Glycerin; pH mit HOAc auf 6,1; sterilfiltrieren; 4 °C
TFB II-Puffer	75 mM CaCl ₂ · 2 H ₂ O; 10 mM KCl; 10 mM MOPS; 15 % (v/v) Glycerin; pH mit KOH auf 7,0 einstellen; sterilfiltrieren; 4 °C

5.1.10 Transformation kompetenter *E.coli*-Bakterien

Transformationskompetente *E.coli*-Bakterien können an ihrer Oberfläche DNA binden, die infolge eines Hitzeimpulses die Zellmembran passieren kann. Zur Transformation wurden 50 µL kompetente *E.coli*-Bakterien auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe von 5-10 µL eine DNA-Lösung wurde die Bakteriensuspension für 30 Minuten auf Eis gelagert. Anschließend wurden die Bakterien für 40-50 Sekunden einem Hitzeschock bei 42 °C ausgesetzt, für 5 Minuten auf Eis abgekühlt und mit 300 µl vorgewärmten LB-Medium versetzt. Die Bakteriensuspension wurde für 20-30 Minuten bei 37 °C unter Schütteln inkubiert und im Anschluss auf vorgewärmte LB-Ampicillin- bzw. LB-Kanamycin-Agarplatten ausgestrichen. Nach Inkubation dieser Platten über Nacht bei 37 °C wurde das Wachstum der transformierten Bakterien begutachtet. Bei Plasmiden, die eine blau/weiß-Selektion erlauben, wurden die Agarplatten vor dem Ausstreichen der Bakterien mit IPTG und X-Gal behandelt.

LB-Agarplatten	20 g Select Agar auf 1000 mL LB-Medium; autoklavieren und auf 60 °C abkühlen lassen; Zugabe von 50-100 µg/mL Ampicillin bzw. 30-50 µg/mL Kanamycin; 4 °C
IPTG/X-Gal-Platten	40 µL IPTG (0,1 M) und 40 µL X-Gal (40 mg/mL) pro LB-Agarplatte

5.1.11 Analytischen und präparative Isolierung von Plasmid-DNA

Zur analytischen Isolierung von Plasmid-DNA wurden 5 mL LB-Ampicillin- oder LB-Kanamycin-Medium mit einer einzelnen Bakterienkolonie angeimpft und über Nacht bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte unter Verwendung des *Nucleospin[®] Plasmid Kit* (Macherey-Nagel) gemäß den vom Hersteller gemachten Angaben. Die Elution der Plasmid-DNA erfolgte mit 100 µL ddH₂O. Zur präparativen Aufreinigung von Plasmid-DNA wurden 100-200 mL LB-Ampicillin- bzw. LB-Kanamycin-Medium mit einer Bakterienkolonie angeimpft und über Nacht bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Im Anschluss daran erfolgte die Isolierung der Plasmid-DNA unter Verwendung des *Nucleospin[®] PC 100 Kits* bzw. *Nucleospin[®] PC 500 Kits* (Macherey-Nagel) nach den Angaben des Herstellers. Die isolierte Plasmid-DNA wurde nach Bestimmung der DNA-Konzentration auf 1 µg/µL eingestellt.

5.1.12 Langzeitlagerung von Bakterienstämmen

Die Langzeitlagerung von *E.coli*-Stämmen erfolgte in Glycerinkulturen. Dazu wurden 2-4 mL einer frischen Übernachtskultur für 5 Minuten bei 5000 rpm und 4 °C abzentrifugiert und das Bakterienpellet anschließend in 1 mL LB-Ampicillin-Medium resuspendiert. Zu dieser Bakteriensuspension wurde 1 mL steriles Glycerin zugegeben und die Mischung nach kurzer Inkubation auf Eis bei -80 °C eingefroren.

5.1.13 Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) stellt eine effektive Methode zur *in vitro*-Amplifikation spezifischer DNA-Sequenzen dar (MULLIS et al., 1986; MULLIS and FALOONA, 1987; SAIKI et al., 1988). Der DNA-Bereich, der amplifiziert werden soll, liegt zwischen zwei synthetischen Oligonucleotide, die sich antiparallel an die komplementäre Sequenzen der Matrizen-DNA anlagern und so den Startpunkt für die DNA-Synthese darstellen. Zur Amplifikation der Ziel-DNA wurden die DNA-Polymerasen Pfu, Pfx₅₀ oder LA-Taq verwendet, die alle über eine 3'-5'-Korrekturleseaktivität verfügen.

Ein Standard-PCR-Ansatz wurde in einem Volumen von 50 µL durchgeführt. Dieser wurde auf Eis angesetzt und unmittelbar in einen auf 95 °C vorgeheizten PCR-Cycler eingesetzt.

Komponenten	Standard-Ansatz
DNA-Templat	0,4 ng/µL
5'-Primer	1 pmol/µL
3'-Primer	1 pmol/µL
dNTPs	0,2 mM
PCR-Puffer	1fach
LA-Taq/Pfu/Pfx ₅₀	0,06 U/µL

Tabelle 5.1: Standard-PCR-Ansatz

Die PCR-Programme wurden auf die Prozessivität der verwendeten Polymerasen und die Schmelztemperatur T_m der eingesetzten Primer wie folgt abgestimmt:

Reaktion	T [°C]	t	Zyklen
Initiale Denaturierung	95	2 min	-
Denaturierung	95	30 s	25
Primeranlagerung	55-65	30 s	
Primerelongation	72 (LA-Taq) 68 (Pfu/Pfx ₅₀)	1 min/kb (LA-Taq/ Pfx ₅₀) 2 min/kb (Pfu)	
Finale Elongation	72	10 min	-
Reaktionsende	10	∞	-

Tabelle 5.2 Standard-PCR-Programm

5.1.14 Zielgerichtete Mutagenese

Im Unterschied zur herkömmlichen PCR erfolgt die zielgerichtete Mutagenese mit Hilfe von Oligonucleotid-Primern, die die gewünschte Nucleotidsequenz (Deletion, Insertion, Substitution) in einer ansonsten zur Matrizen-DNA komplementären Primersequenz tragen. Für die Mutagenese terminaler-DNA-Abschnitte wurden die modifizierten Sequenzabschnitte in den 5'-Bereich der Primer gelegt.

Die Mutagenese von Plasmiden erfolgte mit Hilfe von Primern, in denen die gewünschte Mutation mittig in die komplementären Primersequenzen platziert war. Zum Verdau der methylierten Templat-DNA wurde der Reaktionsansatz im Anschluß an die Mutagenese-PCR mit der Endonuclease DpnI versetzt (1 µL pro 50 µL Reaktionsansatz, Inkubation für 1 Stunde bei 37 °C) und das verbleibende PCR-Produkt in kompetente TOP10F'-Bakterien transformiert.

5.1.15 Sicherung von PCR-Fragmenten mit Hilfe der T/A-Klonierung

Die T/A-Klonierung zur Sicherung von PCR-Fragmenten erfolgt mit Hilfe des *TOPO-Cloning Kits* (Invitrogen). Dieses basiert auf der komplementären Bindung von 3'-A-Überhängen im PCR-Produkt an 5'-T-Überhänge des pCR-II-TOPO-Vektors. Erfolgte die PCR mit Polymerase, die keine 5'-T-Überhänge generieren, musste zuvor eine *Taq*-Nachbehandlung der PCR-Produkte durchgeführt werden. Dazu wurde der PCR-Ansatz mit 1 µL *Taq*-Polymerase (3U) und 1 µL dNTPs (10 mM) versetzt und 10 Minuten bei 72 °C inkubiert. Anschließend wurde nach den Herstellerangaben verfahren und der TOPO-Reaktionsansatz in TOP10F'-Bakterien transformiert.

5.1.16 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA-Proben wurde durch die Firma MWG Biotech nach der Didesoxymethode durchgeführt (SANGER et al., 1977).

5.2 Zellbiologische Methoden

5.2.1 Allgemeine Aspekte

Sämtliche Zellkulturarbeiten wurden mit sterilen Hilfsmitteln unter HERAsafe-Sterilbänken (Heraeus) durchgeführt. Die verwendeten Zelllinien wurden bei 37 °C unter wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit 5 %igem CO₂-Anteil in HERAcell 150-Inkubatoren (Heraeus) kultiviert. Alle Zentrifugationsschritte erfolgten bei 300 g und 4 °C für 4 Minuten in der Multifuge 3 S-R (Heraeus).

5.2.2 Kulturbedingungen

DT40-Zellen wurden in RPMI 1640 mit 10 % *fetal calf serum* (FCS), 1 % *chicken serum* (CS), 3 mM L-Glutamin, 50 µM β-Mercaptoethanol, 50 U/mL Penicillin und 50 µg/mL Streptomycin kultiviert. Die adhärente Zelllinie Plat-E wurde in DMEM mit 10 % FCS, 2 mM L-Glutamin, 10 µg/mL Blasticidin S, 2 µg/mL Puromycin, 50 U/mL Penicillin und 50 µg/mL Streptomycin kultiviert. Die Teilung der Plat-E-Zellen erfolgt mit Hilfe einer Trypsin/EDTA-Lösung. Komplementfaktoren, die in CS und FCS enthalten sind, wurden vor der Benutzung der Seren durch Inkubation für 30 Minuten bei 56 °C inaktiviert.

5.2.3 Einfrieren und Auftauen eukaryotischer Zellen

Zum Einfrieren eukaryotischer Zellen wurden $1-1,5 \times 10^7$ Zellen bei 300 g und 4 °C für 4 Minuten pelletiert und anschließend in etwa 1 mL Einfriermedium (90 % (v/v) hitzeinaktiviertes FCS; 10 % (v/v) DMSO) aufgenommen. Die Zellsuspension wurde in Cryo-Röhrchen (Greiner-Bio-One) überführt, auf Eis gelagert, und anschließend bei -80 °C eingefroren. Die langfristige Lagerung der Zellen erfolgte bei -140 °C eingelagert.

Zum Auftauen wurden eukaryotischer Zellen in einem Wasserbad bei 37 °C erwärmt und anschließend in 10 mL Zellkulturmedium aufgenommen. Im Anschluss daran wurden die Zellen abzentrifugiert und in 10 mL frischem Medium ausgesät.

5.2.4 Zellzählung

Die Bestimmung der Zelldichte erfolgte mit Hilfe einer geeigneten Verdünnung der Zellen in einer Neubauer-Zählkammer.

5.2.5 Transfektion von DT40-Zellen durch Elektroporation

Die Transfektion eukaryotischer Zellen erfolgte mittels Elektroporation. Bei dieser Methode wird die Zellmembran durch einen elektrischen Impuls für kurze Zeit permeabilisiert, wodurch sie für Makromoleküle wie DNA durchlässig wird. Die Integration der transfizierten Plasmid-DNA ins Genom der Zellen wird dabei durch vorheriges Linearisieren der eingesetzten DNA gewährleistet (ANDREASON and EVANS, 1988; POTTER, 1993).

Zur Elektroporation von DT40-Zellen wurden 30 µg Plasmid-DNA linearisiert, aufgereinigt und in 30 µL ddH₂O eluiert. 1×10^7 DT40-Zellen wurden geerntet, mit PBS gewaschen und in 700 µL PBS resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in eine Elektroporationsküvette mit 4 mm Elektrodenabstand (Peqlab Biotechnologie GmbH) überführt und mit der linearisierten DNA versetzt. Die Zellsuspension wurde 10 Minuten auf Eis gelagert, bei 250 V und 960 µF elektroporiert (GenePulser & Capacitance Extender, BioRad) und im Anschluss daran für weitere 10 Minuten auf Eis inkubiert. Die elektroporierten Zellen wurden in 12 mL DT40-Medium resuspendiert und 24 Stunden kultiviert. Anschließend wurden die Zellen in 50 mL Selektionsmedium (1 µg/mL Puromycin bzw. 50 µg/mL Blastocidin S) aufgenommen und auf zwei 24-well-Platten ausgesät. Nach 7-10 Tagen wurden stabile Transfektanden ausgewählt und weiterkultiviert.

5.2.6 Transfektion von DT40-Zellen durch rekombinanten Retroviren

Der retrovirale Gentransfer stellt eine effiziente Methode zur Transfektion von Zellen dar. In dieser Arbeit wurde ein retrovirales Gentransfer-Verfahren der sogenannten dritten Generation verwendet. Durch die getrennte Bereitstellung von retroviralen Expressionsvektoren und den *gag*-, *pol*- und *env*-codierten Virusstrukturproteine durch eine Verpackungszelllinie (Plat-E, 4.10) wird bei diesem Verfahren die Replikationsdefizienz des Retrovirus gewährleistet. Das zu transfizierende Gen wird in die retroviralen Expressionsvektoren pMSCV-puro bzw. pMSCV-blast kloniert, die neben einem entsprechenden Selektionsmarker

über das Verpackungssignal Ψ sowie die Transkriptions- und Prozessierungselemente 5'- und 3'-LTRs (*long terminal repeats*) verfügen. Nach Transfektion des retroviralen Vektors in Plat-E-Zellen steuert Ψ die Integration der viralen Vektortranskripte in die Virusstruktur. Dadurch entstehen infektiöse, aber replikationsinkompetente Viren, die die rekombinante, retrovirale RNA tragen. Das Infektionsspektrum der Viren wird durch das von der Verpackungszelllinie bereitgestellte, virale Hüllprotein bestimmt, das durch *env* codiert wird. Mit Hilfe des Hüllproteins des *vesicular stomatitis* Virus (VSV-Glycoprotein) wurde die ecotrophe Verpackungszelllinie Plat-E (spezifische Erkennung von Membranrezeptoren auf Nagerzellen) in eine pantrophe Verpackungszelllinie überführt (rezeptorunabhängige Fusion des Virus mit der Plasmamembran). Da die stabile Expression des VSV-G Hüllproteins toxisch ist, wurden Plat-E-Zellen parallel zum retroviralen Expressionsvektor mit pHCMV-VSV-G cotransfiziert. Die dadurch gebildeten VSV-G-pseudotypisierten Retroviren sind für die Infektion von DT40-Zellen geeignet.

5.2.6.1 Transfektion von Plat-E-Zellen mit FuGENE®

Plat-E-Zellen wurden einen Tag vor der Transfektion so auf 6 cm Schalen ausgesät, dass sie zum Transfektionszeitpunkt eine Konfluenz von etwa 50 % erreichten. Folgende Komponenten wurden in der angegebenen Reihenfolge gemischt:

200 μ L serumfreies RPMI 1640
7,5 μ L FuGENE® (Roche Diagnostics)
2 μ g retroviraler Expressionsvektor
0,7 μ g pHCMV-VSV-G

Der Reaktionsansatz wurde 15 Minuten bei RT inkubiert. Parallel dazu wurde das Medium der Plat-E-Kultur abgenommen und vorsichtig durch 4 mL DT40-Medium ersetzt. Im Anschluss daran wurde der Transfektionsansatz tropfenweise auf die Plat-E-Zellen gegeben und die Zellen für 48 Stunden bei 37 °C kultiviert. Die gebildeten Retroviren im Zellüberstand wurden anschließend zur Infektion von DT40-Zellen eingesetzt.

5.2.6.2 Retrovirale Infektion von DT40-Zellen

DT40-Zellen wurden mit VSV-G-pseudotypisierten Retroviren infiziert. Dazu wurde zunächst 1,5 mL DT40-Medium und 4 μ L einer frischen 3 mg/mL Polybren/PBS-Lösung auf eine 6 cm Schale gegeben. Parallel dazu wurde der Überstand der transfizierten Plat-E-Zellen (5.2.6.1) abzentrifugiert. Anschließend wurden 1×10^6 pelletierte DT40-Zellen in 2,5 mL des retroviralen Überstandes resuspendiert und diese Zellsuspension auf die 6 cm Schale überführt. Nach 24 Stunden Kultivierung wurden die Zellen abzentrifugiert und in frischem DT40-Medium aufgenommen. Nach weiteren 24 Stunden wurden die Zellen durch Zugabe von 1 μ g/mL Puromycin bzw. 50 μ g/mL Blastocidin S unter Selektion genommen. Alle Arbeiten mit VSV-G-pseudotypisierten Retroviren erfolgten ausschließlich unter S2-Bedingungen gemäß den S2-Sicherheitsanweisungen.

5.2.7 Durchflusscytometrische Analyse der Expression von Oberflächenproteinen (FACS-Analyse)

Zur Analyse der Oberflächenexpression von Proteinen wurden $0,5-1 \times 10^6$ Zellen geerntet, mit PBS gewaschen und in 100 μ L PBS aufgenommen. Anschließend erfolgte die Zugabe von 1 μ L des FITC-markierten Antikörpers (Maus-anti-CD8 FITC, Maus-anti-CD72 FITC, Ziege-anti-Hühner-IgM FITC) und die Zellen wurden im Dunkeln für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einem erneuten Waschschrift mit PBS wurden die Zellen in 500 μ L PBS aufgenommen zur Messung am Durchflusscytometer eingesetzt.

5.2.8 Durchflusscytometrische Ca^{2+} -Fluxanalyse

Die durchflusscytometrische Analyse der cytosolischen Ca^{2+} -Mobilisierung in DT40-Zellen erfolgte mit Hilfe des Ca^{2+} -sensitiven Fluorophors Indo-1. Das Emissionsspektrum von Indo-1 unterliegt bei einer konstanten Anregungswellenlänge von 355 nm (UV-Festkörper-Laser, Lightwave electronics) einer Ca^{2+} -abhängigen Verschiebung von 475 nm (Indo-*blue*, Ca^{2+} -frei) zu 400 nm (Indo-*violet*, Ca^{2+} -gebunden). Somit ist es möglich, die zeitliche Veränderung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration von Indo-1-beladenen Zellen durch die parallele Messung der Emission bei 530 nm und 405 nm zu untersuchen.

Effekte, die durch unterschiedliche Zellgrößen innerhalb einer Zellpopulation und die ungleiche Beladung von Zellen mit Ca^{2+} -sensitiven Fluorophoren hervorgerufen werden können, werden bei dieser Art der ratiometrischen Ca^{2+} -Fluxanalyse minimiert. Die Beladung der Zellen erfolgte mit dem membrangängigen Acetoxymethylester-Derivat Indo-1-AM, der innerhalb der Zellen durch cytosolische Esterasen gespalten wird. Dies erschwert die Membranpassage der freien Carbonsäureform von Indo-1 und führt zur Anreicherung des Fluorophors in der Zelle. Durch Zugabe des nichtionischen Detergenz Pluronic F-127 wird zusätzlich die Indo-1-AM-Aufnahme durch die Zellen erleichtert. Zur durchflusscytometrischen Ca^{2+} -Fluxanalyse wurden 1×10^6 DT40-Zellen geerntet, in 700 μL DT40-Medium mit 5 % FCS aufgenommen und unter leichtem Vortexen mit 0,7 μL Indo-1-AM (1 mM in DMSO) und 2,1 μL Pluronic F-127 (5 % (w/v) in ddH₂O) versetzt. Die Zellsuspension wurde anschließend für 25 Minuten unter leichtem Schütteln bei 30 °C im Dunklen inkubiert. Nach Zugabe von 700 μL vorgewärmten DT40-Medium mit 10 % FCS wurden die Zellen für weitere 10 Minuten bei 37 °C im Dunklen geschüttelt und nachfolgend zweimal mit Ca^{2+} -haltiger Krebs-Ringer-Lösung gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 600 μL Ca^{2+} -haltiger Krebs-Ringer-Lösung aufgenommen und bis zur Messung bei 25 °C inkubiert.

Die Ca^{2+} -Fluxanalyse Indo-1-beladener Zellen erfolgte mit Hilfe des Durchflusscytometers LSR II (Becton Dickinson). Das Indo-1-*violet*/Indo-1-*blue*-Verhältnis wurde zunächst für 30 Sekunden dokumentiert. Anschließend wurden die DT40-Zellen mit 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ M4 oder anti-CD8-Antikörpern stimuliert und die resultierende Veränderung der Fluoreszenzrelation für 5 Minuten aufgezeichnet. Die Messdaten wurden mit Hilfe der Software FlowJo 6.1.1 und Excel ausgewertet.

Krebs-Ringer-Lösung	10 mM HEPES, pH 7,0; 140 mM NaCl; 4 mM KCl; 1 mM MgCl_2 ; 10 mM Glucose
Ca^{2+} -haltige K-R-Lösung	+ 1 mM CaCl_2

5.2.9 Ca²⁺-Fluxanalysen auf Einzelzellebene

Die Analyse der cytosolischen Ca²⁺-Mobilisierung auf Einzelzellebene erfolgte mit Hilfe des Ca²⁺-sensitiven Fluorophors Fura-2. Bei einer Emissionswellenlänge von etwa 510 nm unterliegt die Anregungswellenlänge von Fura-2 einer Ca²⁺-abhängigen Verschiebung von 363 nm (Ca²⁺-frei) zu 335 nm (Ca²⁺-gebunden). Die zeitliche Veränderung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration von Fura-2-beladenen Zellen kann somit durch die Messung der Emission bei 510 nm nach alternierender Anregung bei 340 nm und 380 nm ratiometrisch untersucht werden. Die Beladung der DT40-Zellen mit dem Acetoxymethylester-Derivat Fura-2-AM erfolgt analog zur der unter 5.2.8 beschriebenen Beladung der Zellen mit Indo-1-AM. Im Anschluss an die Beladung wurden 300 µL der Zellsuspension auf einem Objektträger ausgesät und nach 30 Minuten Sedimentation für die Ca²⁺-Fluxanalyse eingesetzt. Die ratiometrische Ca²⁺-Fluxanalyse Fura-2-beladener Zellen erfolgt unter Verwendung des Axioskop 2 (Zeiss). Die Zellen wurden alternierend bei 340 nm und 380 nm für jeweils 100 ms angeregt und die Emission bei 510 nm mit Hilfe der CCD-Kamera Micromax (Visitron) für die Dauer der Messung softwarebasiert (Winview, Visitron) dokumentiert. Zur Analyse der Einzelaufnahmen wurden diese in MatLab[®] 7.5.0 exportiert und repräsentative Bildausschnitte ausgewertet.

5.2.10 Induktion der Cre/loxP-basierten Expression von Proteinen

Die Expression der Proteine LMP2A und CD72/LMP2A in DT40-Zellen erfolgt mit Hilfe des Cre/loxP-Rekombinationssystems. Die verwendeten DT40 MCM-Zellen exprimieren ein Fusionsprotein bestehend aus der Cre-Rekombinase des Bakteriophagen P1 und zwei mutierten Östrogenrezeptor-Ligandenbindedomänen (Mer), die die Rekombinase N- und C-terminal flankieren. In Abwesenheit des Liganden liegt dieses Fusionprotein (MCM) konstitutiv im Cytosol der Zellen gebunden an das *heat shock protein 90* (Hsp90) vor. Durch Zugabe des Östrogen-Derivats 4-Hydroxytamoxifen (4-HT) dissoziiert das MCM-Fusionsprotein von Hsp90 und translociert in den Zellkern. Dort erkennt die Cre-Rekombinase des Fusionsproteins eine 34 bp lange Signalsequenz (*locus of crossover x in P1*; loxP-

Sequenz) und kann so die Rekombination loxP-flankierter DNA-Abschnitte einleiten.

Zur Induktion der Proteinexpression wurden die Zellen geerntet und in DT40-Medium mit 200 nM 4-HT aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen auf Kulturschalen ausgebracht und bis zur weiteren Verwendung bei 37 °C inkubiert.

5.2.11 Induktion der BZLF1-Expression

Zur Analyse der BZLF1-Expression in Abhängigkeit unterschiedlicher Stimuli wurden 1×10^7 Zellen mit M4 bzw. anti-CD8-Antikörpern stimuliert oder mit 4-HT bzw. dem Phorbol-ester *phorbol-12-myristate-13-acetate* (PMA) behandelt. Dabei wurden folgende Konzentrationen verwendet:

M4/anti-CD8-Antikörper	2 µg/mL in DT40-Medium
4-HT	200 nM in DT40-Medium
PMA	25 ng/mL in DT40-Medium

Nach 24 Stunden Inkubation bei 37 °C wurden die Zellen lysiert (5.3.1) und die geklärten Lysate zur SDS-PAGE (5.3.3) und Westerblot-Analyse (5.3.4) eingesetzt.

5.3 Biochemische Methoden

5.3.1 Stimulation und Lyse von DT40-Zellen

Zur Stimulation von DT40 B-Lymphocyten wurden die Zellen geerntet, mit RPMI 1640 ohne Zusätze gewaschen und auf eine Dichte von 3×10^7 Zellen/1 mL mit RPMI 1640 ohne Zusätze eingestellt. Anschließend wurde die Zellsuspension für 10 Minuten bei 37 °C unter leichtem Schütteln inkubiert. Die Stimulation der Zellen erfolgte durch Zugabe von 2 µg/mL M4 bzw. anti-CD8-Antikörpern. Nach Zugabe des Antikörpers wurden die Zellen kurz gevortext und anschließend für 3 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden abzentrifugiert, in 200 µL eiskaltem Lysispuffer/ 1×10^7 Zellen lysiert und die Lysate für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Im Anschluss daran wurden die Zelllysate durch Zentrifugation für 10 Minuten bei 20.000 g und 4 °C von unlöslichen Zelltrümmern befreit und die Überstände in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die so erhaltenen geklärten Lysate (*cleared cellular lysates*, CCLs) wurden entweder mit 1/4 Volumen 5x Lämmli-Puffer versetzt und für 5 Minuten auf 95 °C erhitzt oder unmittelbar für Affinitätsaufreinigungen eingesetzt.

Lysis-Puffer	20 mM Tris/HCl, pH 7,5; 150 mM NaCl; 0,5 mM EDTA, pH 8,0; 10 mM NaF; 10 µM Na ₂ MoO ₄ ; 1 mM Na ₃ VO ₄ ; 1x Protease-Inhibitor-Cocktail, 1 % (v/v) NP-40
5x Lämmli-Puffer	156,25 mM Tris/HCl, pH 6,8; 15 % (w/v) SDS; 50 % (v/v) Glycerin; 50 mM DTT; 0,05 % (w/v) Bromphenolblau

5.3.2 Immunpräzipitation (IP)

Die Immunpräzipitation von Proteinen aus den geklärten Lysaten (CCLs, 5.3.1) erfolgte durch Zugabe von 2 µg des entsprechenden Antikörpers und 25 µL Protein A/G-Agarose (Santa Cruz Biotech.) pro 600 µL der geklärten Lysate. Die Lysate wurden für mindestens eine Stunde unter Rotation bei 4 °C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Agarose-Matrix mit 1 mL Lysis-Puffer wurde diese mit 50 µL 5x Lämmli-Puffer versetzt und 5 Minuten bei 95 °C aufgeköcht. Die Untersuchung der präzipitierten Proteine erfolgte mittels SDS-PAGE (5.3.3) und nachfolgender Westernblot-Analyse (5.3.4).

5.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die diskontinuierliche SDS-PAGE ermöglicht die Auftrennung SDS-denaturierter, reduzierter Proteine anhand ihres Molekulargewichts über eine Polyacrylamid-Matrix (WEBER and OSBORN, 1969; LAEMMLI, 1970). Bei der Elektrophorese wurden die Proteine zunächst in einem 4,8 % Polyacrylamid-Gel (Sammelgel) konzentriert und nachfolgend in der sich anschließenden Trenngel-Matrix (10 % Acrylamid) aufgetrennt. Ein parallel aufgetrennter Proteinstandard (*broad range prestained protein marker*, New England Biolabs) ermöglichte die relative Größenbestimmung der aufgetrennten Proteine. Die Elektrophorese erfolgte in vertikalen Gelkammern (Biorad) bei einer Stromstärke von 25 mA im Sammelgel und 35 mA im Trenngel. Die aufgetrennten Proteine wurden nachfolgend im Westernblot-Verfahren analysiert.

Sammelgel	125 mM Tris/HCl, pH 6,8; 4,8 % Acrylamid; 0,1 % SDS; 0,25 mM EDTA; 0,1 % TEMED; 0,1 % APS
Trenngel	375 mM Tris/HCl, pH 8,8; 8-12,5 % Acrylamid; 0,1 % SDS; 0,25 mM EDTA; 0,1 % TEMED; 0,1 % APS
SDS-PAGE-Laufpuffer	25 mM Tris; 192 mM Glycin; 0,1 % SDS

5.3.4 Westerblot-Analyse

Zur spezifischen, immunochemischen Detektion von SDS-PAGE-aufgetrennten Proteinen werden diese zunächst mittels vertikaler Elektrophorese aus der Gelmatrix auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Der Transfer der Proteine erfolgte unter Verwendung der *semidry-transfer*-Einheit (Amersham Bioscience). Dabei wurde zunächst ein Filterpapier (Schleicher & Schell), gefolgt von der Nitrocellulosemembran (Nitrocellulose Filter Hybond™ ECL™, Amersham Bioscience), dem Polyacrylamid-Gel und einem weiteren Filterpapier in Transfer-Puffer getränkt und anschließend luftblasenfrei auf der Anode übereinander gelegt. Nach dem Anbringen der Kathode erfolgte der elektrophoretische Transfer bei einer Stromstärke von $\leq 0,8 \text{ mA/cm}^2$ Gel für 50 Minuten. Im Anschluss wurden die auf der Westernblot-Membran immobilisierten Proteine mit Hilfe von Antikörpern spezifisch analysiert. Dazu wurden zunächst proteinfreie Bereiche auf

der Membran durch Inkubation in Blocking-Puffer für eine Stunde bei RT unter Schütteln abgesättigt. Die Membran wurde anschließend mit PBST gewaschen und für eine Stunde mit dem Primär-Antikörper bei 4 °C inkubiert. Nach erneutem, dreimaligem Waschen der Membran mit PBST für jeweils 10 Minuten erfolgte die Inkubation mit Meerrettichperoxidase-gekoppelten (*horseradish peroxidase*, HRPO) anti-Immunglobulin-Antikörpern. Im Anschluss wurde die Membran wiederum dreimal für jeweils 10 Minuten mit PBST gewaschen und zur digitalen Entwicklung (ChemiLux Imager, Intas) mit Hilfe der Westernblot-Detektionslösung ECL™ (Amersham Bioscience) eingesetzt.

Zur mehrfachen Entwicklung einer Westernblot-Membran mit unterschiedlichen Primär-Antikörpern verschiedener Spezies oder Isotyps wurde der zuvor eingesetzte Sekundär-Antikörper durch die Inkubation der Membran in einer 0,1 % NaN₃/PBST-Lösung für eine Stunde bei RT inaktiviert. Der anschließend eingesetzte Primär-Antikörper wurde mit Hilfe von Sekundär-Antikörpern entsprechend der Spezies oder des Isotyps detektiert.

Blotting-Puffer 39 mM Glycin; 48 mM Tris; 0,0375 % (w/v) SDS; 0,01 % (w/v) NaN₃; 20 % MeOH

Blocking-Puffer 5 % (w/v) BSA in PBST

5.3.5 Reporterassay zur Analyse der Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NFAT/AP-1 und NF-κB

Die Analyse der Regulation von Transkriptionsfaktoren erfolgte mit Hilfe eines Luciferase-basierten Reporterassay. Bei diesem Verfahren dient das rekombinante *luciferase*-Gen des Leuchtkäfers (*Photinus pyralis*) als Reporterassay, dessen Expression unter der Kontrolle der zu analysierenden Promotorelemente steht. Die Luciferase katalysiert die ATP-abhängige Umsetzung des artifiziellen Substrats D-Luciferin zu D-oxy-Luciferin. Die resultierende Lichtemission dieser Reaktion bei 562 nm kann zur luminometrischen Quantifizierung der Luciferase-Expression herangezogen werden und korreliert mit der Aktivierung der zu analysierenden Promotorelemente (LINDQVIST et al., 1994).

Zur Untersuchung der LMP2A-vermittelten NFAT/AP-1-Aktivierung wurde das Plasmid pNFAT-luc aus dem Labor von Gerald Crabtree verwendet. Das Plasmid verfügt über drei Kopien von NFAT/AP-1-Elementen, die in 5'-Richtung vor einem minimalen Interleukin 2 (IL2) Promotor und dem *luciferase*-Gen kloniert wurden. Die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B wurde mit Hilfe des Plasmid pGL2/7xNF κ B-tkpro analysiert. Dieses enthält sieben Bindestellen für NF- κ B, die sich in 5'-Richtung vor dem Thymidinkinase-Promotor und dem *luciferase*-Gen befinden.

Zur Analyse der NFAT/AP-1- und NF- κ B-Aktivierung wurden 2×10^7 Zellen geerntet und mit 20 μ g der Plasmide pNFAT-luc oder pGL2/7xNF κ B-tkpro transfiziert. Dazu wurden die Zellen wie unter 5.2.5 beschrieben vorbereitet und die Plasmide mittels Elektroporation transient in die Zellen eingebracht. Parallel zu den Plasmiden pNFAT-luc oder pGL2/7xNF κ B-tkpro wurden die Zellen mit 10 μ g des *lacZ*-Expressionsvektors pCMV β cotransfiziert. Die β -Galactosidase-Aktivität dient bei der Messung als Maß für die Transfektionseffizienz und ermöglicht somit die Normierung der gemessenen Luciferase-Aktivität. Die Zellen wurden für 48 Stunden bei 37 °C kultiviert, anschließend abzentrifugiert und in 10 mL RPMI 1640 (1 % FCS, 0,1 % CS, 0,3 mM L-Glutamin, 5 U/mL Penicillin und 5 μ g/mL Streptomycin) resuspendiert. Nach 12 Stunden Inkubation bei 37 °C wurden die Zellen auf eine Dichte von 3×10^6 Zellen pro mL RPMI 1640 (1 % FCS, 0,1 % CS, 0,3 mM L-Glutamin, 5 U/mL Penicillin und 5 μ g/mL Streptomycin) eingestellt und entweder für 12 Stunden mit 2 μ g/mL M4 BCR-stimuliert oder für 16 Stunden mit 4-HT (200 nM) behandelt. Im Anschluss wurden 3×10^6 Zellen in 30 μ L Lysepuffer (Applied Biosystems) mit 0,5 mM DTT lysiert, 10 Minuten auf Eis inkubiert und bei 11000 g für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bis zur Messung bei -80 °C gelagert.

Die Messung der Luciferase- und β -Galactosidase-Aktivität erfolgte mit Hilfe des *Dual Light System* (Applied Biosystems). Dazu wurden die Lysate nach den Herstellerangaben vorbereitet und zur Messung an dem Luminometer MiniLumat LB 9506 (Perkin Elmer) eingesetzt. Die Messung erfolgte mit folgenden Einstellungen:

Einstellungen	β-Galactosidase	Luciferase
Probenvolumen	250 μ L	350 μ L
Verzögerung	5 sec	5 sec
Messdauer	3 sec	3 sec

Tabelle 5.3: Einstellungen des Luminometers

Pro Messung wurden 7 μ L Lysat eingesetzt, von dem zunächst die Luciferase- und nachfolgend die β -Galactosidase-Aktivität jeweils in Doppelbestimmung ermittelt wurden. Die Auswertung der Daten erfolgt mittels Excel.

6. Ergebnisse

6.1 Cre/loxP-basiertes Expressionssystem zur Analyse der LMP2A-Signalleitung in B-Lymphocyten

Das Latente Membranprotein 2A des Epstein-Barr Virus ist in der Lage, Signalleitungsprozesse in B-Lymphocyten zu beeinflussen. Die Signalleitungskompetenz von LMP2A *in statu nascendi* wurde im Rahmen dieser Arbeit mit Hilfe eines Cre/loxP-basierten Systems zur induzierbaren Expression von LMP2A in DT40 B-Lymphocyten untersucht. Die verwendeten DT40 MCM-Zellen exprimieren ein Fusionsprotein bestehend aus der Cre-Rekombinase des Bakteriophagen P1 und zwei mutierten Östrogenrezeptor-Ligandenbindedomänen (Mer), die die Rekombinase N- und C-terminal flankieren. In Abwesenheit des Liganden liegt das MerCreMer-Fusionprotein (MCM) konstitutiv im Cytosol der Zellen gebunden an das *heat shock protein 90* (Hsp90) vor. Durch Zugabe des Östrogen-Derivats 4-Hydroxytamoxifen (4-HT) dissoziiert das MCM-Fusionsprotein von Hsp90 und translociert in den Zellkern. Dort erkennt die Cre-Rekombinase des Fusionsproteins eine 34 bp lange Signalsequenz (*locus of crossover x in P1*; loxP-Sequenz) und kann so die Rekombination loxP-flankierter DNA-Abschnitte einleiten. Je nach Orientierung dieser loxP-Sequenzen wird dabei der zwischen zwei Erkennungssequenzen liegende DNA-Abschnitt deletiert (bei gleicher Orientierung der loxP-Erkennungssequenzen) oder invertiert (bei entgegengesetzter Orientierung).

Zur induzierbaren Expression von LMP2A wurde in unserer Arbeitsgruppe ein Konstrukt generiert, in dem 5' der LMP2A-cDNA eine Puromycin-Resistenzkassette eingebracht wurde, die von zwei gleichgerichteten loxP-Sequenzen flankiert wird (Abb. 6.1) (Alexander Hennemann, Diplomarbeit; Niklas Engels, unveröffentlicht). Durch die Position dieser Kassette zwischen dem CMV-Promotor (P_{cmv}) und der LMP2A-cDNA wird die Transkription der cDNA für LMP2A inhibiert. 4-HT-induziert kann das MCM-Fusionsprotein in den Zellkern translocieren und dort die von loxP-Erkennungssequenzen flankierte Puromycin-Resistenzkassette deletieren. Dadurch gelangt die LMP2A-cDNA unter die Kontrolle des CMV-Promotors und wird transkribiert.

Zur Detektion des Proteins wurde innerhalb der cDNA für LMP2A ein für ein dreifaches FLAG-Epitop codierender DNA-Abschnitt eingefügt, der die Detektion und Aufreinigung des Proteins mittels anti-FLAG-Antikörper ermöglicht (Niklas Engels, unveröffentlicht).

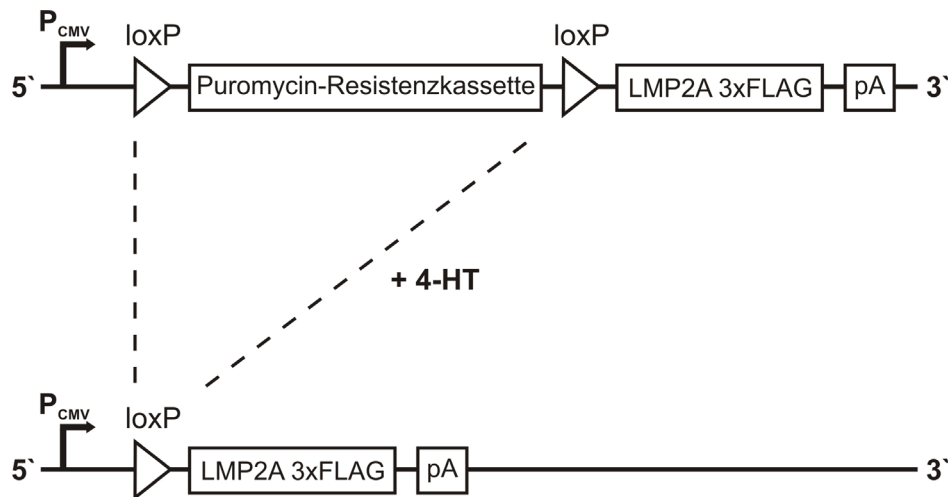


Abbildung 6.1: Cre/loxP-basiertes Expressionssystem für LMP2A

4-HT-induziert vermittelt die Cre-Rekombinase die Deletion einer loxP-flankierten Puromycin-Resistenzkassette, wodurch die cDNA für FLAG-markiertes LMP2A (LMP2A 3xFLAG) unter die Kontrolle des CMV-Promotors (P_{cmv}) gelangt und transkribiert wird.

Basierend auf diesem Expressionssystem wurden im Rahmen dieser Arbeit LMP2A-vermittelte Signalleitungsprozesse in DT40 B-Lymphocyten analysiert.

6.2 LMP2A induziert Oszillationen der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration

Die Expression von LMP2A führt in LCLs zu einer konstitutiven Aktivierung der PTKs Lyn, Syk und Btk sowie zur Phosphorylierung des Adapterproteins SLP-65 (FRUEHLING and LONGNECKER, 1997; ENGELS et al., 2001). Dennoch unterbleibt in LCLs die Aktivierung von PLC- γ 2, einem Schlüsselenzym der BCR-induzierten Ca^{2+} -Mobilisierung. LCLs zeigen auch nach BCR-Stimulation kein cytosolisches Ca^{2+} -Signal, die genauen Mechanismen dieser Inhibition sind bislang unklar (MILLER et al., 1993). Das in dieser Arbeit vorgestellte induzierbare Expressionssystem für LMP2A ermöglicht erstmalig die Analyse der Beeinflussung

der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration durch LMP2A unabhängig des Einflusses weiterer EBV-codierter Proteine. DT40 MCM-Zellen, die induzierbar LMP2A exprimieren, wurden für 14 Stunden mit 4-HT behandelt und anschließend Ca^{2+} -Fluxanalysen unterzogen, die die zeitliche Veränderung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration fluoreszenzmikroskopisch auf Einzelzellebene dokumentieren. Als Kontrolle dienten DT40 MCM-Kontrollzellen, die für den gleichen Zeitraum mit 4-HT behandelt wurden. Die Zellen wurden mit dem Ca^{2+} -sensitiven Fluorophor Fura2-AM beladen und die Kinetik der intrazellulären Ca^{2+} -Mobilisierung für 5 Minuten in Gegenwart extrazellulärer Ca^{2+} -Ionen analysiert. Parallel dazu wurde die BCR-induzierte Ca^{2+} -Mobilisierung in wildtypischen DT40-Zellen für 5 Minuten analysiert.

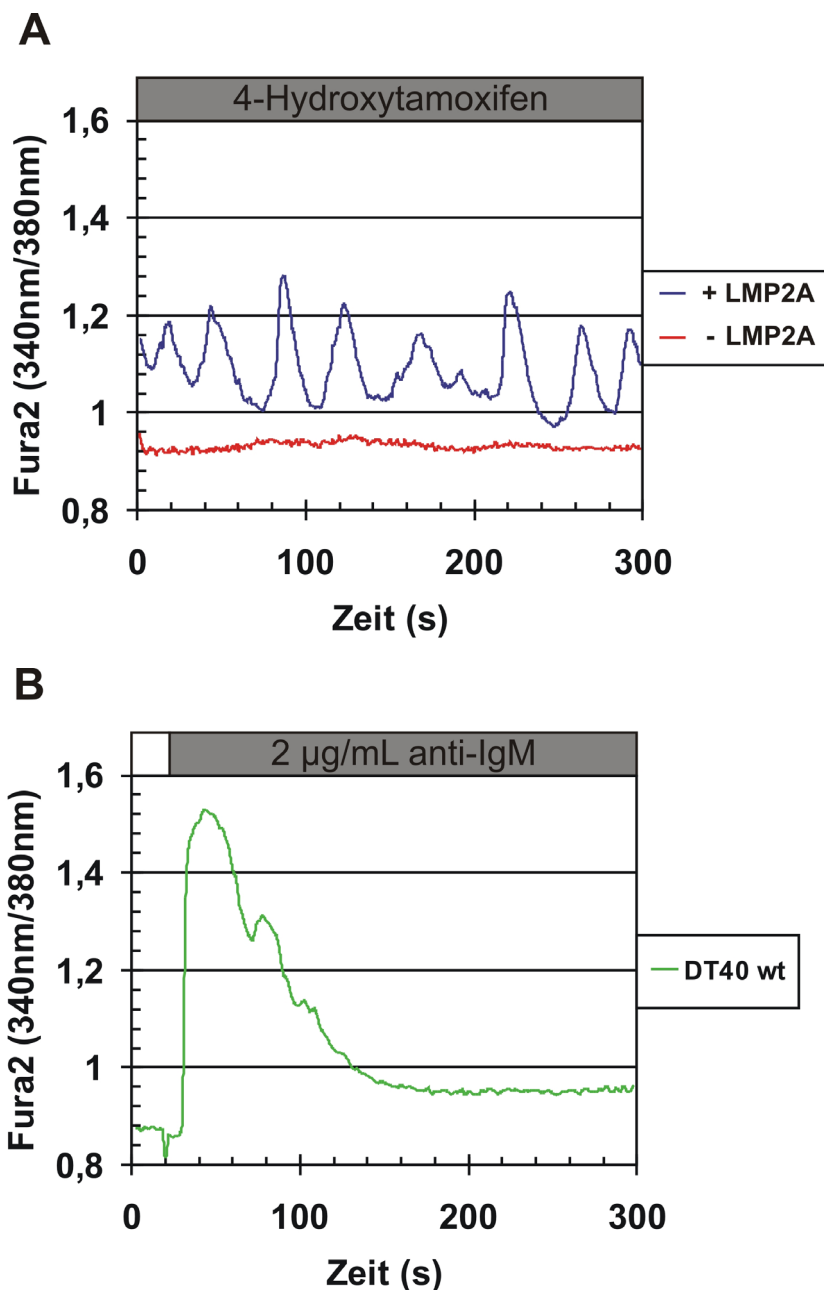


Abbildung 6.2: LMP2A induziert Ca^{2+} -Oszillationen

Ca^{2+} -Fluxanalysen 4-HT-behandelter DT40 MCM-Zellen, die induzierbar LMP2A exprimieren (blaue Linie), und 4-HT-behandelter Kontrollzellen (rote Linie) (**A**). Ca^{2+} -Fluxanalysen wildtypischer DT40-Zellen nach BCR-Stimulation (grüne Linie) (**B**). Die Zellen wurden mit Fura2-AM beladen und die zeitliche Veränderung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration $[\text{Ca}^{2+}]_i$ für 5 Minuten fluoreszenzmikroskopisch auf Einzelzellebene dokumentiert. Dargestellt ist jeweils eine repräsentative Einzelzellmessung. Insgesamt wurden 4 bis 8 Messungen mit mindestens 50 Einzelzellanalysen pro Messung vorgenommen.

Die Expression von LMP2A führt zu Oszillationen der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration (Abb. 6.2A, blaue Linie), die in 4-HT-behandelten Kontrollzellen nicht zu detektieren sind (Abb. 6.2A, rote Linie). Im Vergleich zu den durch LMP2A hervorgerufen Ca^{2+} -Oszillationen zeigen BCR-stimulierte, wildtypische DT40-Zellen unmittelbar nach Rezeptorstimulation einen transienten Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration (Abb. 6.2B, grüne Linie). Nach etwa 3 Minuten erreicht das intrazelluläre Ca^{2+} -Niveau wieder den Ausgangswert. Oszillationen sind während der angegebenen Messdauer nicht zu beobachten.

Zusammengenommen zeigt die Analyse der intrazellulären Ca^{2+} -Mobilisierung, dass die Expression von LMP2A ohne weiteren externen Stimulus zu Oszillationen des cytosolischen Ca^{2+} -Spiegels führt, die in BCR-stimulierten, LMP2A-negativen Zellen unmittelbar nach Rezeptorstimulation nicht zu beobachten sind.

6.2.1 BCR-induzierte Ca^{2+} -Oszillationen

Um zu überprüfen, ob in wildtypischen DT40-Zellen nach einem längeren Zeitraum BCR-vermittelte Ca^{2+} -Oszillationen auftreten, wurden DT40-Zellen mit Fura2-AM beladen und die Veränderung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration nach BCR-Stimulation über einen Zeitraum von 30 Minuten auf Einzelzellebene dokumentiert (Abb. 6.3). Nach einem initialen Ca^{2+} -Signal dauert es in diesen Zellen etwa 2 Minuten bis die cytosolische Ca^{2+} -Konzentration wieder ihr Ausgangsniveau erreicht. Dieses bleibt für etwa 8 Minuten erhalten. Ungefähr 10 Minuten nach BCR-Stimulation setzen Oszillationen im cytosolischen Ca^{2+} -Spiegel ein, die in Frequenz und Amplitude denen entsprechen, die durch die Expression von LMP2A in DT40-Zellen ausgelöst werden (siehe Abb. 6.2A, blaue Linie). Diese Ca^{2+} -Oszillationen sind über die gesamte Restdauer der Messung zu beobachten.

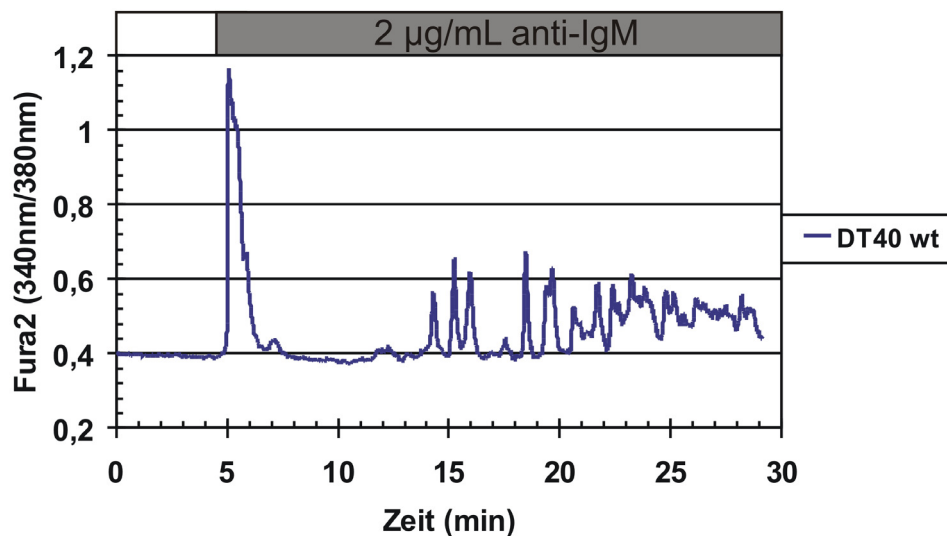
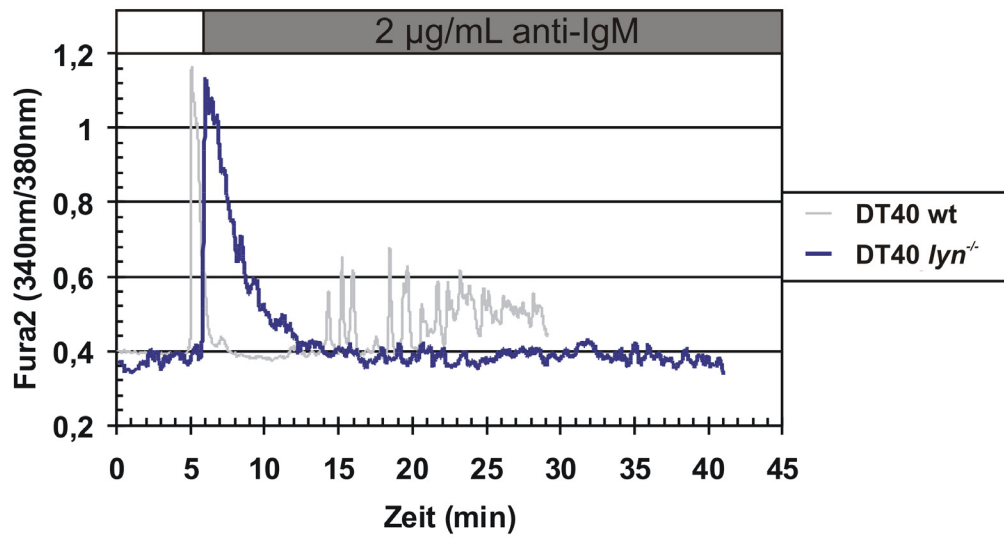


Abbildung 6.3: BCR-induzierte Ca^{2+} -Oszillationen in wildtypischen DT40 B-Zellen

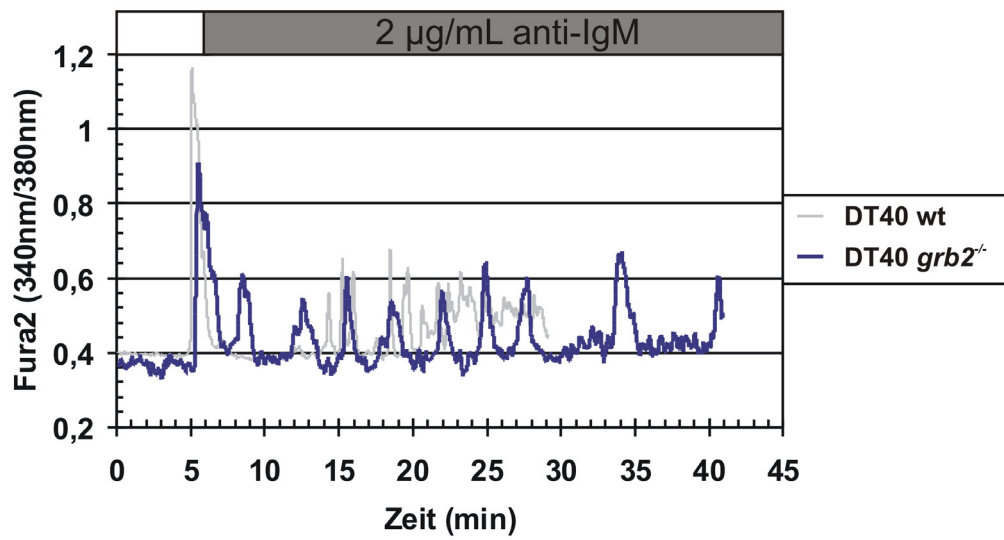
Ca^{2+} -Fluxanalysen wildtypischer DT40-Zellen. Die Zellen wurden mit Fura2-AM beladen und die zeitliche Veränderung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nach BCR-Stimulation für 30 Minuten fluoreszenzmikroskopisch auf Einzelzellebene dokumentiert. Dargestellt ist eine repräsentative Einzelzellmessung. Insgesamt wurden 5 Messungen mit mindestens 50 Einzelzellanalysen pro Messung vorgenommen.

Das Ca^{2+} -Signal in B-Lymphocyten unterliegt als entscheidender Schritt der BCR-Signalleitung einer ausgeprägten Regulation. So wurde für die PTK Lyn sowohl ein positiv- als auch negativregulatorischer Einfluss auf die BCR-induzierte, cytosolische Ca^{2+} -Mobilisierung nachgewiesen (TAKATA et al., 1994; XU et al., 2005). Das cytosolische Adapterprotein Grb2 bildet im Zusammenspiel mit dem membranassoziierten Adapter Dok-3 ein negativregulatorisches Modul der Ca^{2+} -Antwort in B-Lymphocyten (STORK et al., 2004; STORK et al., 2007). Um den Einfluss der PTK Lyn und der Adapterproteine Grb2 und Dok-3 auf die BCR-induzierten Oszillationen der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen näher zu untersuchen, wurden Einzelzellmessungen Lyn-, Grb2- und Dok-3-defizienter DT40-Zellen durchgeführt. Die BCR-abhängige Ca^{2+} -Antwort der Zellen wurde für 40 Minuten fluoreszenzmikroskopisch dokumentiert (Abb 6.4).

A



B



C

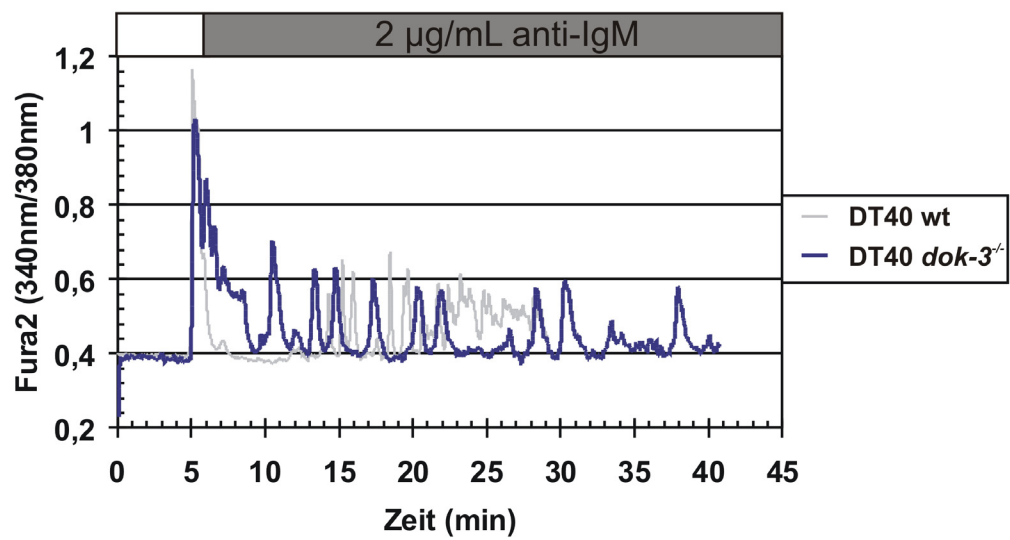


Abbildung 6.4: Ca²⁺-Fluxanalysen Lyn-, Grb2- und Dok-3-defizienter DT40-Zellen

DT40-Zellen wurden mit Fura2-AM beladen und die zeitliche Veränderung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration [Ca²⁺]_i nach BCR-Stimulation für 40 Minuten fluoreszenzmikroskopisch auf Einzelzellebene dokumentiert. Dargestellt ist eine repräsentative Einzelzellmessung *lyn*^{-/-} (A), *grb2*^{-/-} (B) und *dok-3*^{-/-} (C) DT40-Zellen (jeweils blaue Linie). Als Kontrolle dienten wildtypische DT40-Zellen (graue Linie). Insgesamt wurden 4 bis 6 Messungen mit mindestens 50 Einzelzellanalysen pro Messung vorgenommen.

Lyn-defiziente DT40-Zellen zeigen nach BCR-Stimulation eine im Vergleich zu wildtypischen DT40-Zellen verzögerte Initiation der Ca²⁺-Antwort. (Abb. 6.4A, blaue Linie). Nach dem Erreichen der maximalen cytosolischen Ca²⁺-Konzentration dauert es in diesen Zellen etwa 6 Minuten bis das Ausgangsniveau wieder erreicht ist. Im Gegensatz zu wildtypischen DT40-Zellen, bei denen etwa 10 Minuten nach Rezeptorstimulation Oszillationen des intrazellulären Ca²⁺-Spiegels auftreten (Abb. 6.4A, graue Linie), weisen Lyn-defiziente DT40-Zellen keinerlei Ca²⁺-Oszillationen nach BCR-Stimulation auf. Grb2- und Dok3-defiziente DT40-Zellen zeigen unmittelbar nach BCR-Stimulation einen starken, transienten Anstieg der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration, der, ähnlich wie in wildtypischen Zellen, nach 2 bis 3 Minuten wieder das Ausgangsniveau erreicht (Abb. 6.4B und C, blaue Linien). Der anschließende Signalverlauf ist in beiden Zelllinien durch Ca²⁺-Oszillationen mit unterschiedlichen Frequenzen und Amplituden gekennzeichnet, die über den gesamten weiteren Verlauf der Messungen zu beobachten sind.

Zusammengefasst zeigen die Ca²⁺-Fluxanalysen, dass in wildtypischen DT40-Zellen etwa 10 Minuten nach BCR-Stimulation Ca²⁺-Oszillationen auftreten, die in Frequenz und Amplitude denen ähneln, die durch LMP2A vermittelt werden. Zusätzlich konnte durch die Analyse Lyn-, Grb2- und Dok-3-defizienter DT40-Zellen demonstriert werden, dass die PTK Lyn eine wichtige Funktion für die beobachteten Ca²⁺-Oszillationen nach BCR-Stimulation besitzt, und der negativregulatorischen Einfluss der Adapterproteine Grb2 und Dok-3 auf die BCR-induzierte Ca²⁺-Mobilisierung belegt werden.

6.3 Die Membrantopologie des LMP2A-N-Terminus gewährleistet die konstitutive Signalleitung

Unter 6.2 konnte gezeigt werden, dass allein Expression von LMP2A in DT40-Zellen zur konstitutiven Aktivierung BCR-proximaler Signalprozesse führt. Da der N-Terminus von LMP2A die Topologie eines Typ-II Transmembranprotein aufweist, ist die Orientierung des LMP2A-ITAMs in Bezug auf die Plasmamembran im Vergleich zu allen anderen bekannten, zellulären ITAM-tragenden Rezeptoren, die als Typ-I Transmembranproteine exprimiert werden, invertiert. Die Bedeutung dieser reversen Orientierung des LMP2A-ITAMs auf die ligandenunabhängige Aktivierung von BCR-proximalen Signalprozessen wurde bislang nicht näher untersucht. Um den Einfluss der Orientierung des LMP2A-ITAMs auf dessen Signalleitungseigenschaften zu untersuchen, wurden chimäre Transmembranproteine hergestellt, in denen die N-terminale, cytosolische Region von LMP2A an das Typ-II Transmembranprotein CD72 fusioniert wurde und somit in ihrer viralen Orientierung vorliegt (CD72/LMP2A, Abb. 6.5B). Gleichzeitig wurde der LMP2A-N-Terminus entgegen seiner viralen Orientierung im Kontext eines Typ-I Transmembranproteins als chimäres CD8-Fusionsprotein exprimiert (CD8/LMP2A, Abb. 6.5C). Zur Expression des CD72/LMP2A-Fusionsproteins wurde wie im Fall des wildtypischen LMP2A auf ein Cre/loxP-basiertes System zur induzierbaren Expression zurückgegriffen (vergleiche 6.1). Die maximale Proteinexpression wurde 6 Stunden nach Zugabe des Induktors 4-HT erreicht.

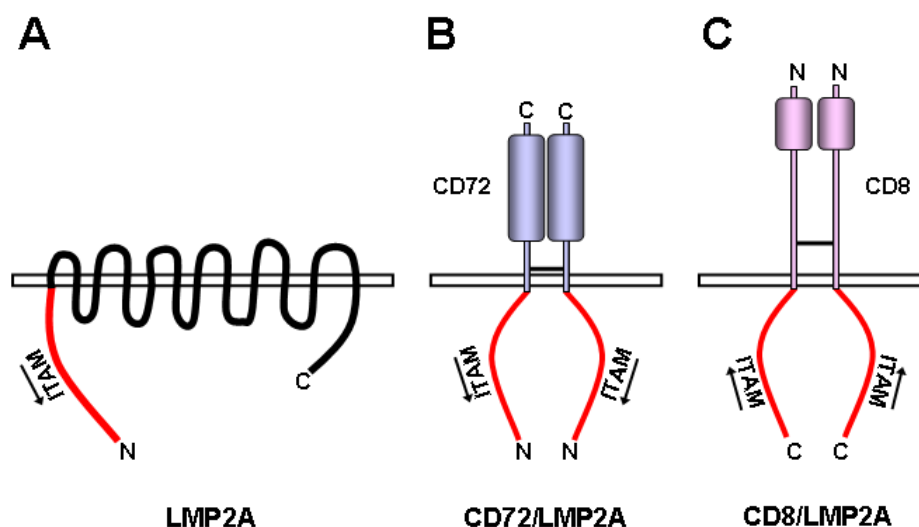


Abbildung 6.5: Schematische Darstellung der CD72- und CD8-Transmembranchimären im Vergleich zu wildtypischem LMP2A

Der Einfluss der Orientierung des LMP2A-ITAMs auf die Signalleitungskompetenz des Proteins wurde mit Hilfe chimärer Transmembranproteine untersucht. Die N-terminale, cytosolische Region von LMP2A (in rot dargestellt) wurde dabei an das Typ-II Transmembranprotein CD72 fusioniert (CD72/LMP2A) und liegt dort in wildtypischer Orientierung vor (B). Ferner wurde ein CD8/LMP2A-Fusionsprotein hergestellt, in dem die N-terminale Region von LMP2A im Kontext des Typ-I Transmembranproteins CD8 exprimiert wird. Die Orientierung des LMP2A-ITAMs in diesem Protein ist im Vergleich zu wildtypischem LMP2A invertiert (C).

Um den Einfluss der chimären Fusionsproteine auf die Tyrosinphosphorylierung zellulärer Proteine zu untersuchen, wurde in DT40 MCM-Zellen die CD72/LMP2A-Expression durch Zugabe von 4-HT gestartet und die Zellen nach 6 Stunden entweder für 3 Minuten mit anti-CD72-Antikörpern behandelt oder unbehandelt belassen. Als Kontrolle wurden DT40 MCM-Zellen ohne 4-HT-Inkubation für 3 Minuten BCR-stimuliert oder unbehandelt belassen. Parallel dazu wurden CD8/LMP2A exprimierende DT40-Zellen unstimuliert belassen, für 3 Minuten BCR-stimuliert oder für 3 Minuten mit anti-CD8-Antikörpern behandelt. Aus den geklärten Lysate der Zellen wurden anschließend die Phosphoproteine durch anti-pTyr-Antikörper aufgereinigt, einer Auftrennung mittels SDS-PAGE unterzogen und nachfolgend zur anti-Phosphotyrosin-Immunoblot-Analyse eingesetzt.

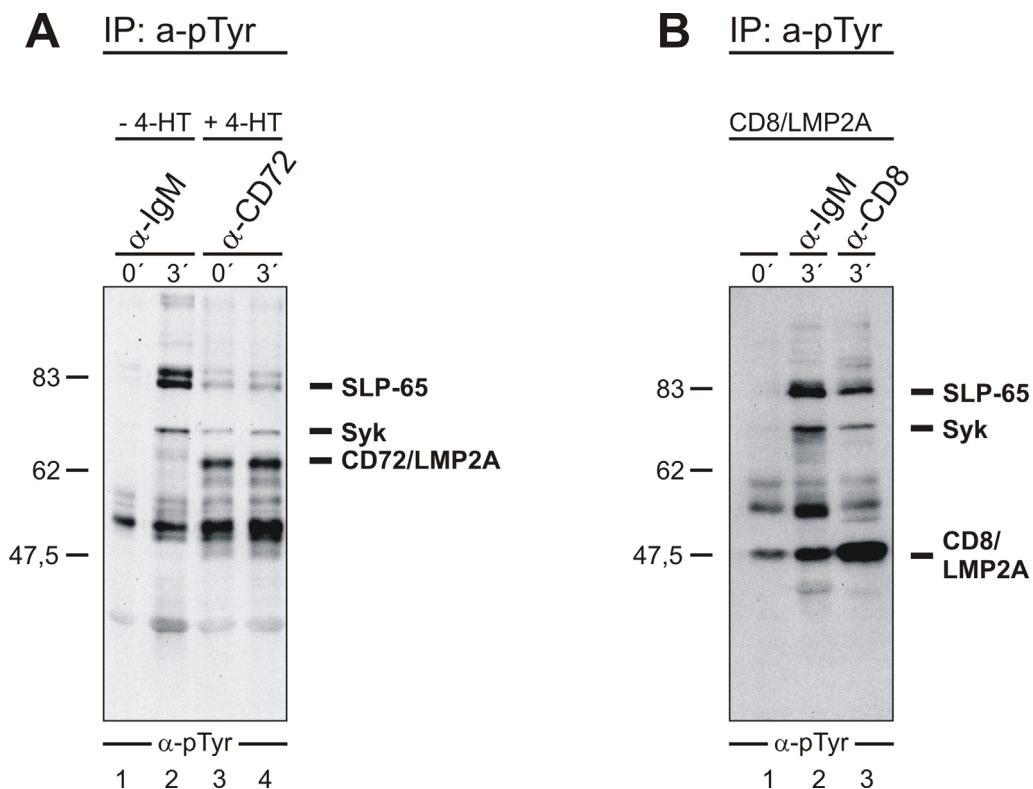


Abbildung 6.6: Die Orientierung des LMP2A-N-Terminus ist entscheidend für die konstitutive Beeinflussung der B-Zell-Signalleitung

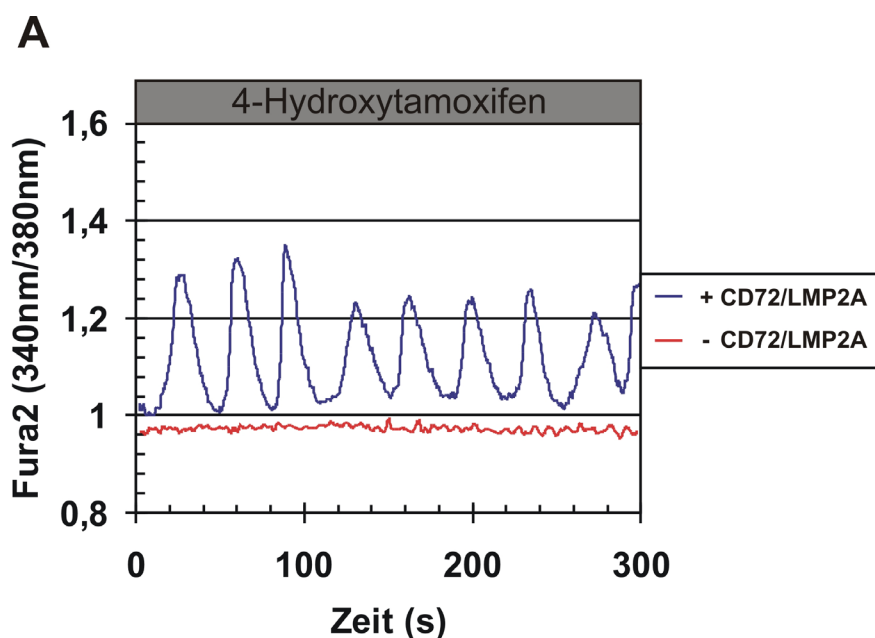
DT40 MCM-Zellen wurden zur Induktion der CD72/LMP2A-Expression für 6 Stunden mit 4-HT-behandelt (Spuren 3 und 4) oder als Kontrolle unbehandelt belassen (Spuren 1 und 2). 4-HT-induzierte Zellen wurden unstimuliert belassen (Spur 3) oder für 3 Minuten mit anti-CD72-Antikörpern behandelt (Spur 4). Kontrollzellen wurden unstimuliert belassen (Spur 1) oder für 3 Minuten BCR-stimuliert (Spur 2) (**A**). CD8/LMP2A-exprimierende Zellen wurden unstimuliert belassen (Spur 1), für 3 Minuten BCR-stimuliert (Spur 2) oder für 3 Minuten mit anti-CD8-Antikörpern behandelt (Spur 3). Aus den Lysaten der Zellen wurden tyrosinphosphorylierte Proteine durch anti-pTyr-Immünpräzipitation aufgereinigt und im anti-pTyr-Immünoblot-Verfahren analysiert (**B**). Die relativen Massen eines Molekulargewicht-Standards sind linksseitig in kDa angegeben.

Wie im Fall des wildtypischen LMP2A führt die Expression des CD72/LMP2A-Fusionsproteins in DT40-Zellen zu einer konstitutiven, stimulationsunabhängigen Tyrosinphosphorylierung signalleitender Proteine wie der PTK Syk und des Adapterproteins SLP-65 (Abb. 6.6A, Spur 3), die vergleichbar ist mit derjenigen BCR-stimulierter Kontrollzellen (Abb. 6.6A, Spur 2). Die Kreuzvernetzung von CD72/LMP2A mit anti-CD72-Antikörpern hat keine Auswirkung auf das Muster bzw. die Intensität der Tyrosinphosphorylierung (Abb. 6.6A, Spur 4). Im Gegensatz dazu ruft die Expression des chimären CD8/LMP2A-Proteins keine konstitutive Phosphorylierung in DT40-Zellen hervor (Abb. 6.6B, Spur 1). Erst die Quervernetzung von CD8/LMP2A mit anti-CD8-Antikörpern (Abb. 6.6B, Spur 3) führt zu einem Tyrosinphosphorylierungsmuster, das mit dem BCR-stimulierten Zellen nahezu identisch ist (Abb. 6.6B, Spur 2).

Zusammengefasst zeigt die Analyse der Transmembranchimären CD72/LMP2A und CD8/LMP2A, dass die Orientierung der N-terminalen Region in LMP2A entscheidend für die konstitutive Beeinflussung der zellulären Signalleitung in B-Lymphocyten ist. In wildtypischer Orientierung als Typ-II Transmembranprotein im Falle des CD72/LMP2A-Fusionsproteins induziert allein die Expression die konstitutive Tyrosinphosphorylierung signalleitender Proteine, ohne dass ein externer Stimulus benötigt wird. Die Expression des N-Terminus von LMP2A im Kontext eines Typ-I Transmembranprotein als CD8/LMP2A-Chimäre ruft keine konstitutive Phosphorylierung zellulärer Proteine in DT40-Zellen hervor. Nur nach antikörperinduzierter Kreuzvernetzung der CD8/LMP2A-Chimäre wird in diesen Zellen die Phosphorylierung zellulärer Proteine induziert.

6.3.1 CD72/LMP2A-induzierte Ca^{2+} -Oszillationen sind abhängig von einem funktionellen LMP2A-ITAM

Die Expression von wildtypischem LMP2A ruft in B-Lymphocyten Oszillationen der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration hervor (siehe Abschnitt 6.2). Inwieweit auch die Expression des chimären Typ-II Transmembranproteins CD72/LMP2A Oszillationen der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration induziert, wurde durch Ca^{2+} -Fluxanalysen auf Einzelzellebene untersucht. Um zusätzlich den Einfluss der Konsensus-Phosphorylierungsmotive innerhalb des LMP2A-N-Terminus zu bestimmen, wurden Varianten analysiert, in denen die ITAM-Tyrosine 74 und 85 (CD72/LMP2A Y74,85F) oder das Tyrosin 112, das ein Lyn-Bindemotiv darstellt (CD72/LMP2A Y112F), durch Phenylalanine substituiert wurden. Die Zellen wurden zur Induktion der Proteinexpression für 6 Stunden in 4-HT-haltigem Medium kultiviert. Als Kontrolle dienten wildtypische DT40 MCM-Zellen, die für 6 Stunden mit 4-HT behandelt wurden. Die Zellen wurden mit Fura2-AM beladen und anschließend Ca^{2+} -Fluxanalysen auf Einzelzellebene unterzogen (Abb. 6.7).



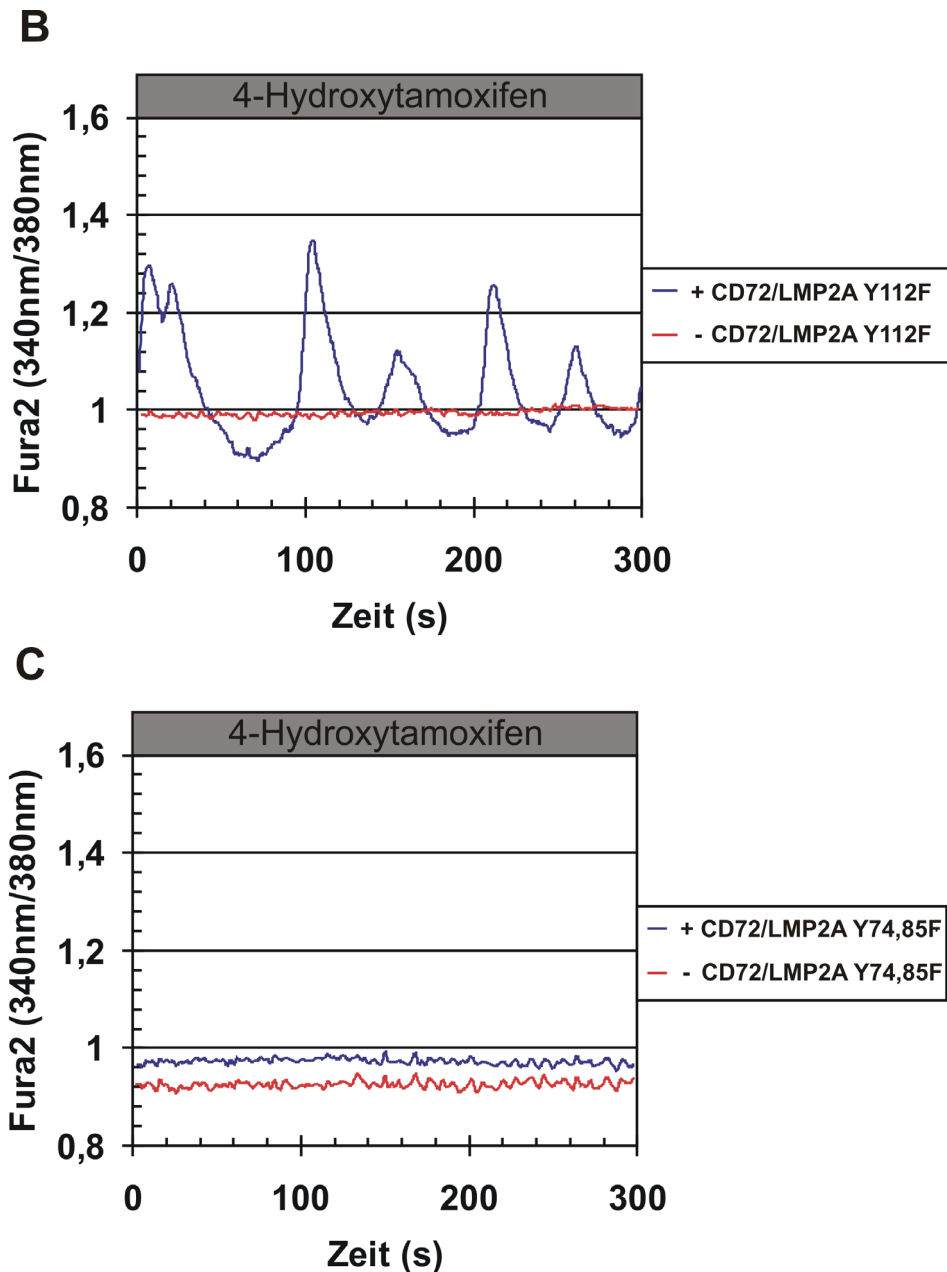


Abbildung 6.7: CD72/LMP2A-induzierte Ca^{2+} -Oszillationen benötigen ein funktionelles ITAM

Ca^{2+} -Fluxanalysen 4-HT-behandelter DT40 MCM-Zellen, die induzierbar CD72/LMP2A (A, blaue Linie) sowie die Punktmutanten CD72/LMP2A Y112F (B, blaue Linie) und CD72/LMP2A Y74,85F (C, blaue Linie) exprimieren. Als Kontrolle dienten 4-HT-behandelte DT40 MCM-Kontrollzellen (A, B, C, rote Linien). Die Zellen wurden mit Fura2-AM beladen und die zeitliche Veränderung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration $[\text{Ca}^{2+}]_i$ für 5 Minuten fluoreszenzmikroskopisch auf Einzelzellebene dokumentiert. Dargestellt ist jeweils eine repräsentative Einzelzellmessung. Insgesamt wurden 4 bis 6 Messungen mit mindestens 50 Einzelzellanalysen pro Messung vorgenommen.

Die Expression des CD72/LMP2A-Fusionsproteins in DT40-Zellen führt zu Oszillationen der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration, die in Frequenz und Amplitude denen gleichen, die wildtypisches LMP2A hervorruft (Abb. 6.7A, blaue Linie). Ähnliche Schwankungen im cytosolischen Ca^{2+} -Spiegel treten auch bei der Expression der Mutante CD72/LMP2A Y112F auf (Abb. 6.7B, blaue Linie). Die Phenylalaninsubstitution der beiden ITAM-Tyrosine im Fall der Variante CD72/LMP2A Y74,85F führt dagegen zum Ausbleiben der Ca^{2+} -Oszillationen (Abb. 6.7C, blaue Linie).

Die Analyse der chimären CD72-Fusionsproteine zeigt, dass die Expression von CD72/LMP2A stimulationsunabhängig zu Oszillationen der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration führt. Entscheidend für diesen Vorgang sind die beiden ITAM-Tyrosine, wohingegen das Tyrosin 112 keine Rolle spielt.

6.4 Funktioneller Vergleich der ITAMs von $\text{Ig}\alpha$, $\text{Ig}\beta$ und LMP2A

Zur vergleichenden Analyse der Signalleitungskompetenz zellulärer ITAMs mit dem LMP2A-ITAM wurden CD8-basierte Fusionsproteine generiert, in denen die ITAM-tragenden Regionen von $\text{Ig}\alpha$, $\text{Ig}\beta$ oder LMP2A an den T-Zell-Corezeptors CD8 fusioniert wurden (CD8/ $\text{Ig}\alpha$, CD8/ $\text{Ig}\beta$ sowie CD8/LMP2A; siehe Abbildung 6.8). Die Expression der ITAM-enthaltenden Bereiche im Kontext des Typ-I Transmembranproteins CD8 gewährleistet, dass die zellulären ITAMs und das LMP2A-ITAM relativ zur Plasmamembran in gleicher Orientierung vorliegen. Im Fall von $\text{Ig}\alpha$ und $\text{Ig}\beta$ entspricht dies ihrer physiologischen Orientierung, während das LMP2A-ITAM in Bezug auf wildtypisches LMP2A in inverser Orientierung vorliegt. Zusätzlich zur wildtypischen, cytosolischen Domäne von LMP2A wurde dabei eine Substitutionsvariante hergestellt, in der das nicht-ITAM-Tyrosin 112 in LMP2A durch Phenylalanin ersetzt wurde (CD8/LMP2A Y112F).

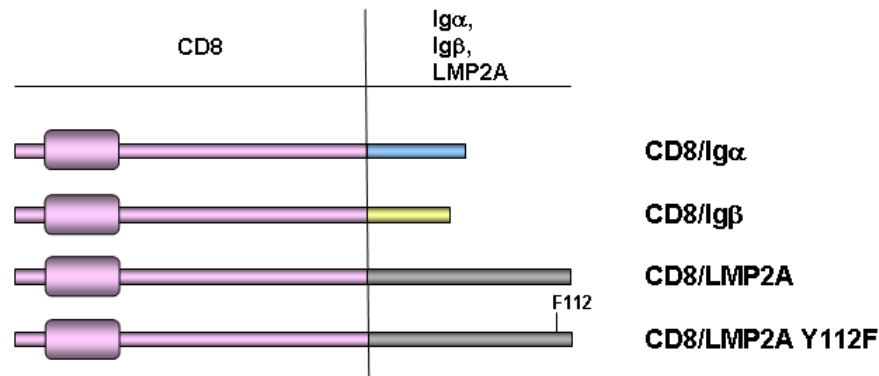


Abbildung 6.8: Schematische Darstellung der chimären CD8-Fusionsproteine

Die ITAM-tragenden Regionen von Ig α (AS 131-187), Ig β (AS 78-125) und LMP2A (AS 7-122), wurden an den transmembranen T-Zell-Corezeptor CD8 (AS 1-209) fusioniert. Zusätzlich wurden eine CD8/LMP2A-Variante hergestellt, in der das nicht-ITAM-Tyrosin 112 durch Phenylalanin substituiert wurde.

Nach retroviraler Transduktion wildtypischer DT40-Zellen wurde die Oberflächenexpression der CD8-Fusionsproteine durchflusscytometrisch bestätigt. Die Signalleitungskompetenz der Fusionsproteine in Bezug auf die Initiation BCR-proximaler Signalkaskaden wurde durch Kreuzvernetzung der CD8-Fusionsproteine für 3 Minuten mittels anti-CD8-Antikörper und anschließender Westernblot-Analyse ermittelt. Als Kontrolle dienten wildtypische DT40-Zellen, die unstimuliert belassen oder für 3 Minuten BCR-stimuliert wurden. Aus den geklärten Lysaten dieser Zellen wurden Phosphoproteine mittels anti-pTyr-Antikörper aufgereinigt und nachfolgend zur anti-Phosphotyrosin-Immunoblot-Analyse eingesetzt (Abb. 6.9). Zellen, die die Chimären CD8/Ig α (Abb. 6.9, Spur 4), CD8/Ig β (Abb. 6.9, Spur 6) oder CD8/LMP2A (Abb. 6.9, Spur 8) exprimieren, zeigen nach Behandlung mit anti-CD8-Antikörpern ein Tyrosinphosphorylierungsmuster, das dem wildtypischer Zellen nach BCR-Stimulation ähnelt (Abb. 6.9, Spur 2). Dabei werden sowohl zelluläre Proteine als auch die Fusionsproteine selbst phosphoryliert. Die Tyrosinphosphorylierung der Variante CD8/LMP2A Y112F nach anti-CD8-Kreuzvernetzung ist verglichen mit den übrigen CD8-Fusionsproteinen verringert. Ebenso ist in diesen Zellen die Phosphorylierung zellulärer Proteine im Vergleich zu den übrigen CD8-Chimären signifikant reduziert. (Abb. 6.9, Spur 10).

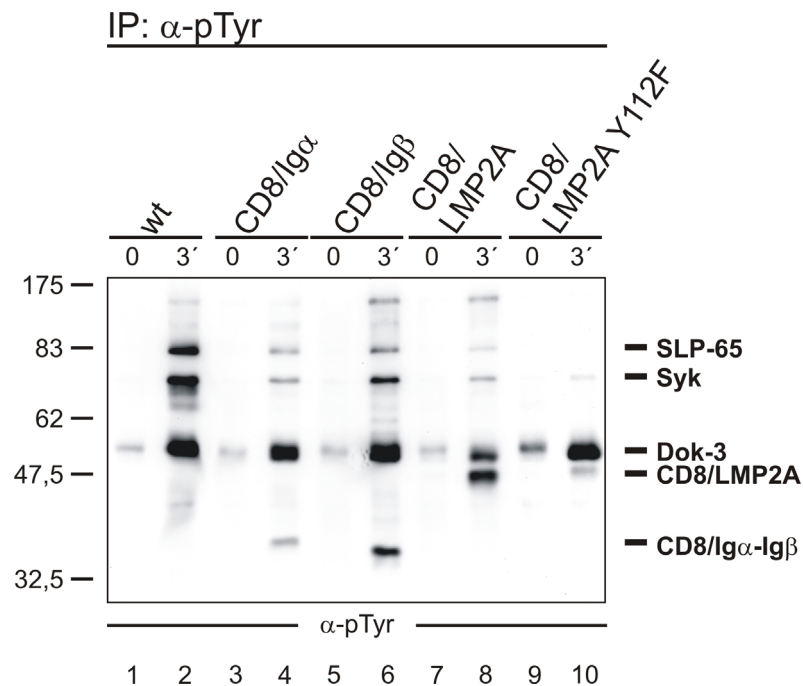


Abbildung 6.9: ITAM-haltige CD8-Fusionsproteine initiieren die BCR-proximale Signalleitung

Wildtypische DT40-Zellen, die nach retroviraler Transduktion CD8/Ig α (Spuren 3 und 4), CD8/Ig β (Spuren 5 und 6), CD8/LMP2A (Spuren 7 und 8) oder CD8/LMP2A Y112F (Spuren 9 und 10) exprimieren, wurden unstimuliert belassen (0) oder für 3 Minuten mit anti-CD8-Antikörpern behandelt (3'). Als Kontrolle dienten unstimulierte oder für 3 Minuten BCR-stimulierte wildtypische Zellen (Spuren 1 und 2). Die Lysate der Zellen wurden einer anti-pTyr-Immunpräzipitation unterzogen und die aufgereinigten Proteine im anti-pTyr-Immunoblot-Verfahren analysiert. Die relativen Massen eines Molekulargewicht-Standards sind linksseitig in kDa angegeben.

Um den Phosphorylierungsstatus der CD8-Fusionsproteine in Abhängigkeit der anti-CD8-Behandlung direkt zu untersuchen, wurden die chimären Proteine aus Lysaten unstimulierter und anti-CD8-kreuzvernetzter Zellen mit Hilfe einer anti-CD8-Immunpräzipitation aufgereinigt und ihre Tyrosinphosphorylierung im anti-Phosphotyrosin-Immunoblot-Verfahren analysiert (Abb. 6.10). Alle chimären Fusionsproteine unterliegen einer anti-CD8-induzierten Tyrosinphosphorylierung (Abb. 6.10, Spuren 4, 6, 8 und 10). Im Fall der CD8/LMP2A-Variante ist eine schwache basale Phosphorylierung zu erkennen (Abb. 6.10, Spur 7).

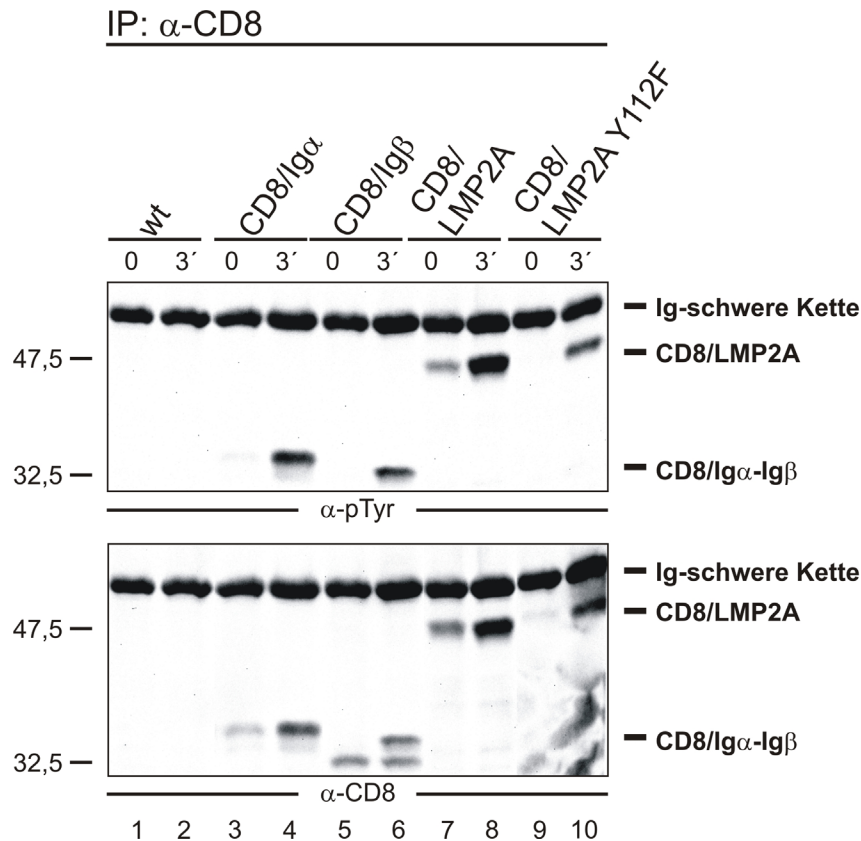


Abbildung 6.10: ITAM-tragende CD8-Fusionsproteine werden in Abhängigkeit der CD8-Kreuzvernetzung tyrosinphosphoryliert

Wildtypische DT40-Zellen, die nach retroviraler Transduktion CD8/Ig α (Spuren 3 und 4), CD8/Ig β (Spuren 5 und 6), CD8/LMP2A (Spuren 7 und 8) oder CD8/LMP2A Y112F (Spuren 9 und 10) exprimieren, wurden unstimuliert belassen (0) oder für 3 Minuten mit anti-CD8-Antikörpern behandelt (3'). Als Kontrolle dienten unstimulierte oder für 3 Minuten BCR-stimulierte wildtypische Zellen (Spuren 1 und 2). Die Lysate der Zellen wurden einer anti-CD8-Immunpräzipitation unterzogen und die Tyrosinphosphorylierung und Aufreinigung der Chimären durch sequentielle anti-pTyr- und anti-CD8-Entwicklung derselben Westernblot-Membran detektiert. Die relativen Massen eines Molekulargewicht-Standards sind linksseitig in kDa angegeben.

Die Fähigkeit der CD8-Chimären, die Ca²⁺-Mobilisierung zu initiieren, wurde durch Ca²⁺-Fluxanalysen der entsprechenden Zellen, die CD8/Ig α , CD8/Ig β , CD8/LMP2A oder CD8/LMP2A Y112F exprimieren, untersucht. Dazu wurden die Zellen mit dem Ca²⁺-sensitiven Fluorophor Indo1-AM beladen und die zeitliche Veränderung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration nach anti-CD8-Behandlung für 5 Minuten durchflusscytometrisch analysiert (Abb. 6.11). Alle CD8-Fusionsproteine sind kompetente Initiatoren der cytosolischen Ca²⁺-Mobilisierung. Im Fall der Fusionsproteine CD8/Ig α (Abb. 6.11, grüne Linie), CD8/Ig β (Abb. 6.11, rote Linie) und CD8/LMP2A (Abb. 6.11, schwarze Linie) erfolgt nach Zugabe des anti-CD8-

Antikörpers ein starker, transientser Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration, der nach etwa 2 Minuten wieder auf das Ausgangsniveau zurückfällt. Der Signalverlauf entspricht dem wildtypischer DT40-Zellen nach BCR-Stimulation (Abb. 6.11, graue Linie). Auch CD8/LMP2A Y112F ist in der Lage, die Ca^{2+} -Mobilisierung in DT40-Zellen zu vermitteln, allerdings unterscheidet sich die Kinetik der Ca^{2+} -Mobilisierung deutlich von der der übrigen CD8-Fusionsproteine. Nach Zugabe der anti-CD8-Antikörper steigt die cytosolische Ca^{2+} -Konzentration langsam an und erreicht nach etwa 2 Minuten ein Plateau, das für die gesamte Restdauer der Messung erhalten bleibt (Abb. 6.11, blaue Linie).

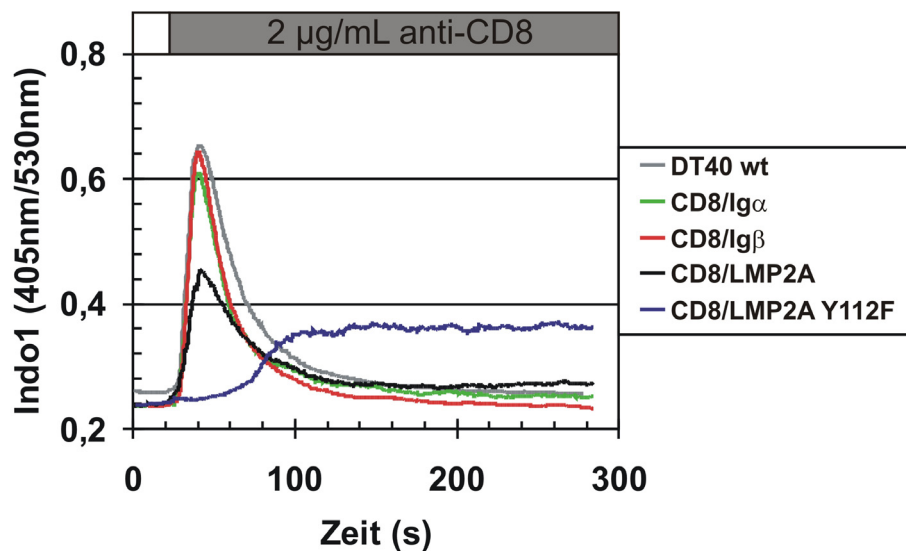


Abbildung 6.11: CD8-Fusionsproteine sind Ca^{2+} -kompetent

Ca^{2+} -Fluxanalysen wildtypischer DT40-Zellen, die nach retroviraler Transduktion die chimären CD8-Fusionsproteine CD8/Ig α (grüne Linie), CD8/Ig β (rote Linie), CD8/LMP2A (schwarze Linie) und CD8/LMP2A Y112F (blaue Linie) exprimieren. Als Kontrolle dienten wildtypische, BCR-stimulierte DT40-Zellen (graue Linie). Die Zellen wurden mit Indo1-AM beladen und in Gegenwart von extrazellulären Ca^{2+} -Ionen mit CD8-Antikörpern behandelt. Die zeitliche Veränderung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration $[\text{Ca}^{2+}]_i$ wurde für 4 Minuten durchflusscytometrisch dokumentiert.

Zusammengefasst zeigen die biochemischen Untersuchungen und die Ca^{2+} -Fluxanalysen der DT40-Zellen, die CD8-Fusionsproteine exprimieren, dass das LMP2A-ITAM ebenso wie die ITAMs von Ig α und Ig β Ca^{2+} -kompetent ist und die Tyrosinphosphorylierung BCR-proximaler Signalproteine induzieren kann. Im Unterschied zu Ig α und Ig β wird für diese vollständige Funktionalität nicht nur das LMP2A-ITAM benötigt, sondern auch das Tyrosin 112, das Bestandteil des Lyn-Bindungsmotivs Y¹¹²EEA in LMP2A ist.

6.5 LMP2A induziert die Expression des EBV-Transaktivators BZLF1

Ein entscheidender Schritt für die Initiation des lytischen Replikationszyklus in latent EBV-infizierten B-Lymphocyten stellt die Expression des viralen *bzlf1*-Gens dar (SPECK et al., 1997). Der Transkriptionsfaktor BZLF1 ist für den Übergang in den lytischen Zyklus essentiell, da sich das Protein transaktivierend auf verschiedene Promotoren im EBV-Genom auswirkt. Die Expression des *bzlf1*-Gens wird dabei über die Aktivierung des viralen pZ-Promotors gesteuert. Studien in konditional EBV-infizierten B-Zellen der EREB2.5-Zelllinie zeigen, dass die Aktivierung des viralen pZ-Promotors und damit die Expression des *bzlf1*-Gens in Abhängigkeit von LMP2A erfolgt oder durch BCR-Stimulation induziert werden kann (SCHAADT et al., 2005).

6.5.1 BCR-abhängige Aktivierung des viralen pZ-Promotors

Zur detaillierten Analyse, welche Signalwege nach BCR-Stimulation zur Aktivierung des EBV-Promotors pZ und somit zur Expression des viralen Transaktivators BZLF1 führen, wurde ein Reporterkonstrukt verwendet, in dem das *bzlf1*-Gen unter der Kontrolle des viralen pZ-Promotors vorliegt. Dieses Reporterplasmid wurde durch Transfektion in DT40-Zellen eingebracht, die defizient für verschiedene BCR-proximale Signalmoleküle sind. Zur Analyse der BCR-abhängigen BZLF1-Expression wurden die Zellen für 24 Stunden BCR-stimuliert oder als Kontrolle unstimuliert belassen (Abb. 6.12A).

Wildtypische DT40-Zellen zeigen eine BCR-induzierte Aktivierung des pZ-Promotors, die die Expression von BZLF1 induziert (Abb. 6.12A, Spur 2). Eine ähnlich starke, stimulationsabhängige BZLF1-Expression zeigt sich in Lyn-defizienten DT40-Zellen (Abb. 6.12A, Spur 4). DT40-Zellen, die defizient für Syk, SLP-65 oder PLC- γ 2 sind, weisen dagegen keine BZLF1-Expression nach BCR-Stimulation auf (Abb. 6.12A, Spuren 6, 8 und 10).

Um die erfolgreiche Integration des BZLF1-Reporterplasmids zu kontrollieren, wurden die Zellen zusätzlich für 24 Stunden in PMA-haltigem Medium kultiviert und nachfolgend die BZLF1-Expression untersucht (Abb. 6.12B). PMA ist in der Lage, PLC- γ 2-abhängige Signalwege zu substituieren und durch Aktivierung der MAPK-Signalkaskade direkt den pZ-Promotor zu aktivieren.

In allen generierten Zelllinien erfolgt nach PMA-Behandlung der Zellen die Aktivierung des pZ-Promotors und somit die Expression von BZLF1. Diese Daten zeigen, dass die Komponenten des Ca^{2+} -Initiationskomplexes und deren Aktivierung von entscheidender Bedeutung für die BCR-abhängige Induktion der BZLF1-Expression sind. Die PTK Lyn spielt bei diesem Vorgang keine Rolle.

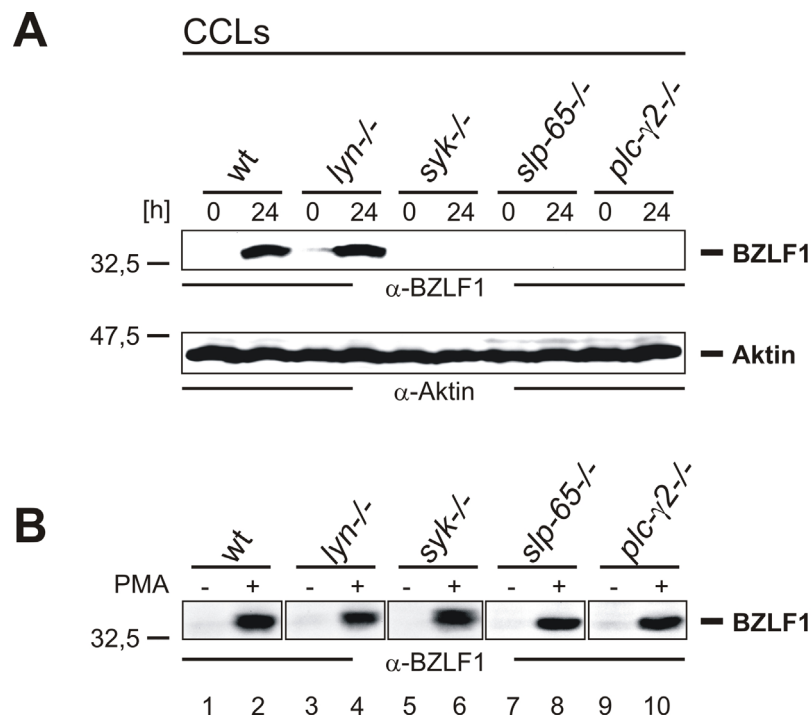


Abbildung 6.12: BCR-abhängige BZLF1-Expression

Wildtypische DT40-Zellen und DT40-Zellen, die defizient für Lyn, Syk, SLP-65 oder PLC- γ 2 sind, wurden mit dem BZLF1-Reporterplasmid transfiziert und bezüglich der BCR-induzierten Aktivierung des pZ-Promotors analysiert. Die Zellen wurden unstimuliert belassen oder für 24 Stunden BCR-stimuliert. Die geklärten Lysate (CCLs) dieser Zellen wurden für eine anti-BZLF1- und anti-Aktin-Immunoblot-Analyse eingesetzt (**A**). Zur Analyse der erfolgreichen Integration des BZLF1-Reporterplasmids wurden die Zellen für 24 Stunden in PMA-haltigem Medium kultiviert. Anschließend wurden die geklärten Lysate zur anti-BZLF1-Immunoblot-Analyse eingesetzt (**B**). Die relativen Massen eines Molekulargewicht-Standards sind linksseitig in kDa angegeben.

6.5.2 LMP2A aktiviert den EBV-Promotor pZ

Zur Analyse der LMP2A-abhängigen Aktivierung des pZ-Promotors wurden DT40 MCM-Zellen, die 4-HT-induziert LMP2A exprimieren, mit dem Reporterplasmid zur BZLF1-Expression transfiziert und für 24 Stunden in 4-HT-haltigem Medium kultiviert oder unbehandelt belassen. Als Kontrolle wurden wildtypische DT40 MCM-Zellen mit dem BZLF1-Reporterplasmid transfiziert und anschließend für 24 Stunden BCR-stimuliert oder unstimuliert belassen. Im Anschluss wurde die BZLF1-Expression der Zellen mittels Immunoblot-Analyse der geklärten Lysate untersucht (Abb. 6.13).

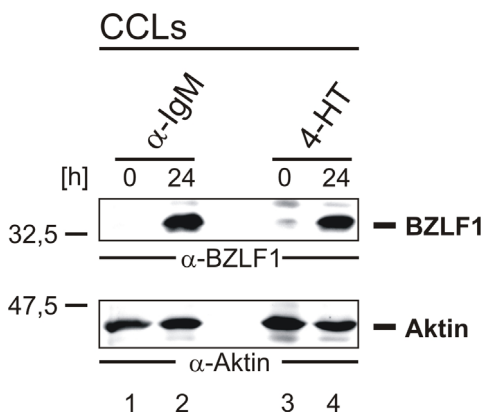


Abbildung 6.13: LMP2A induziert die Expression des viralen *bzlf1*-Gens

Wildtypische DT40 MCM-Zellen wurden unstimuliert belassen (Spur 1) oder für 24 Stunden BCR-stimuliert (Spur 2). Parallel dazu wurden induzierbar LMP2A-exprimierende Zellen unbehandelt belassen (Spur 3) oder für 24 Stunden mit 4-HT behandelt (Spur 4). Die geklärten Lysate (CCLs) dieser Zellen wurden für eine anti-BZLF1- und anti-Aktin-Immunoblot-Analyse eingesetzt. Die relativen Massen eines Molekulargewicht-Standards sind linksseitig in kDa angegeben.

Allein die 4-HT-abhängige LMP2A-Expression aktiviert den viralen pZ-Promotor und führt so stimulationsunabhängig zur Expression des EBV-Transkriptionsfaktors BZLF1 (Abb. 6.13, Spur 4). Diese ist vergleichbar mit der BCR-induzierten BZLF1-Expression wildtypischer DT40 MCM-Zellen, die mit dem BZLF1-Reporterplasmid transfiziert wurden (Abb. 6.13, Spur 2). Die Expression von LMP2A ist also ausreichend, um über die Aktivierung des viralen pZ-Promotors die Expression des *bzlf1*-Gens zu induzieren.

6.5.3 Die Aktivierung des viralen pZ-Promotors ist abhängig von der Orientierung des LMP2A-N-Terminus

Unter 6.3 wurde gezeigt, dass die Membrantopologie der cytosolischen, N-terminalen Domäne von LMP2A die Signalleitungskompetenz von LMP2A entscheidend beeinflusst. Inwieweit die Orientierung des LMP2A-N-Terminus auch für die Aktivierung des pZ-Promotors von Bedeutung ist, wurde anhand der Typ-II Transmembranchimäre CD72/LMP2A sowie der Typ-I Transmembranchimäre CD8/LMP2A analysiert.

Das Reporterkonstrukt zur Bestimmung der Aktivierung des viralen pZ-Promotors wurde in wildtypische DT40 MCM-Zellen mittels Elektroporation eingebracht. Anschließend wurde die Zellen mit Expressionsvektoren zur induzierbaren Expression von CD72/LMP2A, CD72/LMP2A Y112F oder CD72/LMP2A Y74,85F transfiziert. Zur Analyse der BZLF1-Expression wurden die Zellen für 24 Stunden in 4-HT-haltigem Medium kultiviert oder unbehandelt belassen. Die geklärten Lysate der Zellen wurden anschließend im anti-BZLF1-Immunoblot-Verfahren untersucht (Abb. 6.14). Wie für LMP2A gezeigt (siehe Abb. 6.13) führt auch die Expression der Typ-II Transmembranchimäre CD72/LMP2A zur Aktivierung des viralen pZ-Promotors und induziert so die Expression des Transkriptionsfaktors BZLF1 (Abb. 6.14A, Spur 2). Die Substitution des Tyrosins 112 durch Phenylalanin hat keinen Einfluss auf die BZLF1-Expression. Die Mutante CD72/LMP2A Y112F induziert in gleichem Maß die BZLF1-Expression wie wildtypisches CD72/LMP2A (Abb. 6.14A, Spur 4). Die Inaktivierung der beiden ITAM-Tyrosine (CD72/LMP2A Y74,85F) unterbindet dagegen die Aktivierung des pZ-Promotors und somit die BZLF1-Expression (Abb. 6.14A, Spur 6).

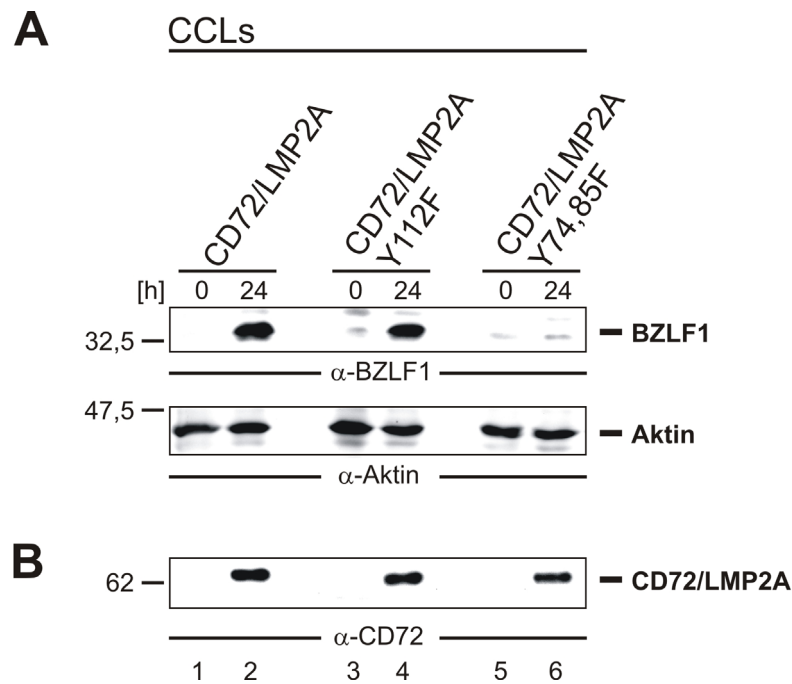


Abbildung 6.14: Die Aktivierung des pZ-Promotors benötigt ein funktionelles ITAM

DT40 MCM-Zellen wurden mit dem BZLF1-Reporterplasmid transfiziert. Im Anschluß wurden Expressionsvektoren zur induzierbaren Expression von CD72/LMP2A, CD72/LMP2A Y112F oder CD72/LMP2A Y74,85F per Elektroporation eingebracht. Die Zellen wurden unstimuliert belassen oder für 24 Stunden mit 4-HT behandelt. Die geklärten Lysate (CCLs) dieser Zellen wurden für eine anti-BZLF1- und anti-Aktin-Immunoblot-Analyse eingesetzt (**A**). Die erfolgreiche Induktion der CD72/LMP2A-Varianten nach 4-HT-Behandlung wurde im Westernblot-Verfahren mittels anti-CD72-Antikörper analysiert (**B**). Die relativen Massen eines Molekulargewicht-Standards sind linksseitig in kDa angegeben.

Zur Expression der N-terminalen Region von LMP2A entgegen ihrer viralen Orientierung im Kontext eines Typ-I Transmembranproteins wurde auf die in 6.3 vorgestellten, CD8-basierten Fusionsproteine zurückgegriffen. In wildtypische DT40-Zellen, die mit dem BZLF1-Reporterkonstrukt transfiziert worden waren, wurden mittels retroviralen Gentransfer die Transmembranchimären CD8/LMP2A, CD8/LMP2A Y112F sowie als Kontrolle die Fusionsproteine CD8/Igα und CD8/Igβ zur Expression gebracht. Zur Analyse der BZLF1-Expression wurden die Zellen unstimuliert belassen oder für 24 Stunden mit anti-CD8-Antikörpern behandelt. Die geklärten Lysate der Zellen wurden im Anschluss per SDS-PAGE aufgetrennt und die BZLF1-Expression im Westernblot-Verfahren mittels anti-BZLF1-Antikörper untersucht (Abb. 6.15).

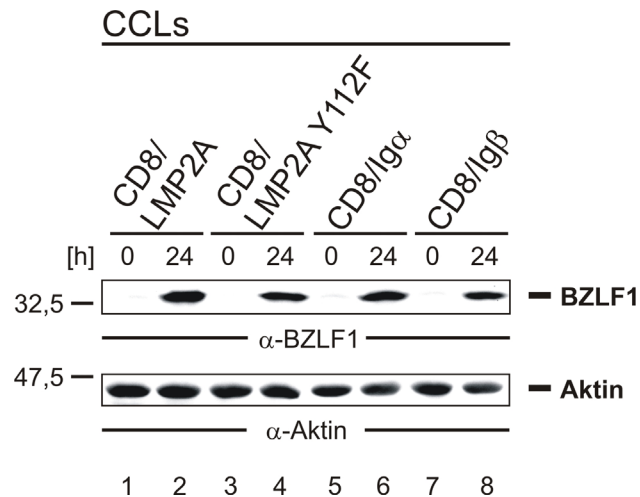


Abbildung 6.15: Die Aktivierung des pZ-Promotors durch CD8/LMP2A erfolgt in Abhängigkeit eines externen Stimulus

DT40-Zellen, die die CD8-Transmembranchimäre CD8/LMP2A, CD8/LMP2A Y112F, CD8/Ig α oder CD8/Ig β exprimieren, wurden unstimuliert belassen oder für 24 Stunden mit anti-CD8-Antikörpern behandelt. Die geklärten Lysate (CCLs) dieser Zellen wurden im Immunoblot-Verfahren mit anti-BZLF1- und anti-Aktin-Antikörpern analysiert. Die relativen Massen eines Molekulargewicht-Standards sind linksseitig in kDa angegeben.

CD8/LMP2A sowie die Variante CD8/LMP2A Y112F sind beide in der Lage, nach Behandlung der Zellen mit anti-CD8-Antikörpern die BZLF1-Expression zu induzieren (Abb. 6.15, Spuren 2 und 4). Eine konstitutive, stimulationsunabhängige Expression von BZLF1 wird nicht beobachtet (Abb. 6.15, Spuren 1 und 3). Ähnlich verhalten sich die Fusionsproteine CD8/Ig α und CD8/Ig β . Auch in diesen Fällen erfordert die Aktivierung des pZ-Promotors und die damit verbundene BZLF1-Expression einen externen Stimulus durch die Behandlung der Zellen mit anti-CD8-Antikörpern (Abb. 6.15, Spuren 6 und 8).

Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse erstmalig, dass die Aktivierung des EBV-Promotors pZ in Abhängigkeit der Membrantopologie des LMP2A-N-Terminus erfolgt. In seiner viralen Orientierung im Kontext des Typ-II Transmembranproteins CD72/LMP2A induziert der LMP2A-N-Terminus stimulationsunabhängig die Expression des *bzlf1*-Gens. Von entscheidender Bedeutung sind dafür die beiden ITAM-Tyrosine 74 und 85. Das nicht ITAM-Tyrosin 112 spielt für diesen Vorgang keine Rolle. Bei der Expression der N-terminale Region von LMP2A im Kontext eines Typ-I Transmembranproteins hingegen wird zur Aktivierung des viralen pZ-Promotors ein externer Stimulus

benötigt, wie die Untersuchungen der CD8-basierten Fusionsproteine zeigen. Auch in diesem Fall hat das LMP2A-Tyrosin 112 keine Funktion in Bezug auf die Aktivierung der BZLF1-Expression.

6.6 LMP2A aktiviert die Transkriptionsfaktoren NFAT und NF- κ B

Im Abschnitt 6.2 konnte gezeigt werden, dass die Expression von LMP2A in DT40-Zellen über die Aktivierung BCR-proximaler Signalleitungsmoleküle zu Oszillationen des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels führt. In B-Zellen werden BCR-induziert Signalkaskaden in Gang gesetzt, die über die Phosphorylierung signalleitender Moleküle und den nachfolgenden transienten Anstieg der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NFAT, NF- κ B und AP-1 induzieren (MACIAN et al., 2001; CRABTREE and OLSON, 2002; SERFLING et al., 2004). Inwieweit LMP2A-vermittelte Signalmechanismen auch die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NFAT, AP-1 und NF- κ B steuern, wurde mit Hilfe eines Reporterassay untersucht. Dazu wurden DT40 MCM-Zellen, die induzierbar LMP2A exprimieren, transient mit den Luciferase-basierten Reporterkonstrukten NFAT-luc und NF- κ B-luc transfiziert, in denen das Luciferase-Gen unter der Kontrolle von Promotoren steht, die drei Bindestellen für NFAT/AP-1 bzw. sieben Bindestellen für NF- κ B aufweisen. Die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NFAT/AP-1 und NF- κ B resultiert somit in der Transkription des *luciferase*-Gens. Die Expression der Luciferase wird über die Umsetzung des artifiziellen Substrats D-Luciferin zu D-oxy-Luciferin luminometrisch ermittelt und dient somit als Maß für die NFAT/AP-1- bzw. NF- κ B-Aktivierung. Zur Normierung der Transfektionseffizienz wurden die Zellen zusätzlich mit einem Expressionsvektor für β -Galactosidase cotransfiziert. 48 Stunden nach Transfektion wurden Zellen, die induzierbar LMP2A exprimieren, für 12 Stunden BCR-stimuliert, für 18 Stunden mit 4-HT-behandelt oder unstimuliert belassen. Als Kontrolle wurden wildtypische DT40 MCM-Zellen mit 4-HT-behandelt und unstimuliert belassen. Im Anschluss daran wurden die Zellen lysiert und die Luciferase- bzw. β -Galactosidase-Aktivität bestimmt (Abb. 6.16).

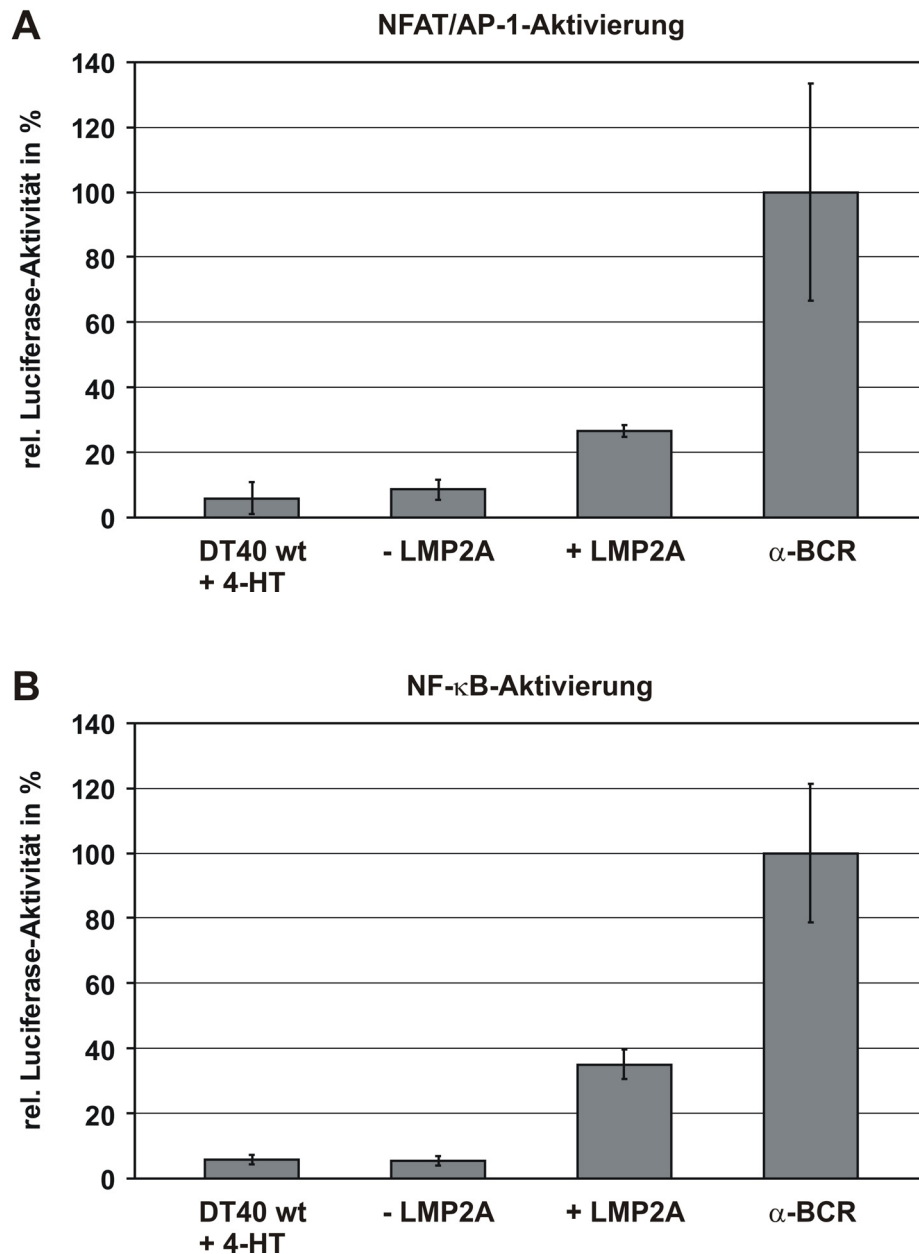


Abbildung 6.16: LMP2A aktiviert die Transkriptionsfaktoren NFAT/AP-1 und NF κ B

Wildtypische DT40 MCM-Zellen und Zellen, die induzierbar LMP2A exprimieren, wurden mit den Plasmiden NFAT-luc und pCMV- β (A) oder NF- κ B-luc und pCMV- β (B) transient cotransfiziert. Nach 48 Stunden wurden die Zellen entweder für 18 Stunden mit 4-HT behandelt, für 12 Stunden BCR-stimuliert oder unbehandelt belassen. Anschließend wurden die Zellen lysiert und die Luciferase- und β -Galactosidase-Aktivität bestimmt. Zur Auswertung wurden die Luciferase-Werte anhand der β -Galactosidase-Werte normiert und die Luciferase-Aktivität nach BCR-Stimulation auf 100 % gesetzt. Es wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt. Insgesamt wurden die Ergebnisse durch jeweils drei unabhängige Experimente ermittelt.

Die Expression von LMP2A führt zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NFAT/AP-1 (Abb. 6.16A). Diese erfolgt im Vergleich zu BCR-stimulierten Zellen in einem geringeren Ausmaß, liegt aber deutlich über der Luciferase- bzw. NFAT/AP-1-Aktivierung in unstimulierten bzw. 4-HT-behandelten Kontrollzellen. Ein ähnliches Bild zeigt sich bei der Analyse der LMP2A-abhängigen NF- κ B-Aktivierung (Abb. 6.16B). In diesem Fall entspricht die NF- κ B-Aktivierung in LMP2A-exprimierenden Zellen etwa 35 % der BCR-induzierten NF- κ B-Aktivierung. LMP2A ist also in der Lage über die Aktivierung von PLC- γ 2 hinaus, die Transkriptionfaktoren NFAT/AP-1 und NF- κ B zu aktivieren und so die Genexpression in DT40-Zellen zu beeinflussen.

7. Diskussion

Das onkogene Epstein-Barr-Virus, der Erreger der infektiösen Mononukleose, gehört zur Gruppe der humanpathogenen γ -Herpesviren. Durch Etablierung eines latenten Zustands, in dem keine infektiösen Viruspartikel gebildet werden, kann das Virus seiner vollständigen Eliminierung durch das Immunsystem entgehen und im Organismus persistieren. EBV etabliert die Latenz in einer Population ruhender B-Gedächtniszellen, aus denen es reaktiviert werden kann und den lytischen Zyklus initiieren kann (MIYASHITA et al., 1997). Welche Signale bei der Initiation des lytischen Infektionszyklus eine Rolle spielen, ist bislang wenig verstanden. Ein EBV-codiertes Protein, für das signalgebende Eigenschaften im Zusammenspiel mit zellulären Proteinen nachgewiesen werden konnte, ist LMP2A. Der N-Terminus von LMP2A enthält ein *immunoreceptor tyrosin-based activation motif* (ITAM) (FRUEHLING and LONGNECKER, 1997). ITAMs bilden die Grundlage der BCR-vermittelten Signalleitung. Aufgrund dieser Analogie wird vermutet, dass LMP2A im Verlauf der EBV-Infektion BCR-Signalleitungsmechanismen instrumentalisieren kann. In der Tat zeigen Untersuchungen transgener Mäuse, dass LMP2A in Abwesenheit eines funktionellen BCRs dessen Überlebenssignale substituieren und dadurch sowohl die Entwicklung als auch das Überleben von B-Zellen ermöglichen kann. Für diese Vorgänge ist das LMP2A-ITAM von entscheidender Bedeutung (CALDWELL et al., 1998; MERCHANT et al., 2000).

Ein Modellsystem zur Analyse der LMP2A-Signalgebung stellen primäre B-Zellen dar, die *in vitro* mit EBV infiziert wurden. Diese Zellen immortalisieren und werden zu sogenannten Lymphoblastoiden Zelllinien (LCLs) transformiert (SUGDEN and MARK, 1977). In LCLs induziert LMP2A die Aktivierung der PTKs Lyn und Syk sowie die Phosphorylierung von SLP-65 und Btk (MILLER et al., 1995; ENGELS et al., 2001; FRUEHLING and LONGNECKER, 1997; MERCHANT and LONGNECKER, 2001). Dennoch unterbleibt in LCLs die Aktivierung von PLC- γ 2, einem nachgeschalteten Signalmolekül von phosphoryliertem SLP-65. Auch nach BCR-Stimulation ist in LCLs keine Aktivierung von PLC- γ 2 und die damit verbundene cytosolische Ca²⁺-Mobilisierung zu beobachten (MILLER et al., 1993; MILLER et al., 1994). Wieso in LCLs die BCR-induzierte Aktivierung von PLC- γ 2 ausbleibt, ist bislang nicht verstanden.

Im Gegensatz dazu konnte in früheren Studien unter Verwendung von chimären Transmembranproteinen gezeigt werden, dass das LMP2A-ITAM prinzipiell in der Lage ist, die PLC- γ 2-abhängige Ca^{2+} -Mobilisierung in B-Lymphocyten zu vermitteln (ALBER et al., 1993; BEAUFILS et al., 1993). LCLs exprimieren neben LMP2A eine Vielzahl anderer EBV-codierter Genprodukte, unter anderem LMP1, 6 verschiedene *EBV nuclear antigens* (EBNAs) sowie mehrere nicht proteincodierende RNAs (*EBV-encoded RNAs*, EBERs). Es kann also nicht ausgeschlossen werden, dass diese viralen Genprodukte LMP2A-vermittelte Signalprozesse beeinflussen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher zur isolierten Analyse der LMP2A-Signalgebung *in statu nascendi* ein Cre/loxP-basiertes System zur induzierbaren Expression von LMP2A in DT40 B-Lymphocyten verwendet. Mithilfe dieses Systems wurde der Einfluss von LMP2A auf BCR-abhängige Signalprozesse sowie die mögliche Bedeutung LMP2A-vermittelter Signale bei der Induktion des lytischen Infektionszyklus untersucht. Es wurden folgende Erkenntnisse gewonnen:

1. LMP2A aktiviert ligandenunabhängig BCR-proximale Signalwege. Die Aktivierung beschränkt sich dabei nicht auf membrannaher Signalprozesse wie die Phosphorylierung von Lyn, Syk und SLP-65, sondern umfasst auch die cytosolische Ca^{2+} -Mobilisierung und die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NFAT und NF- κ B.
2. Die konstitutive, ligandenunabhängige Signalleitung durch LMP2A ist abhängig von der Membrantopologie des cytosolischen N-Terminus. In seiner viralen Orientierung im Kontext des chimären Typ-II Transmembranproteines CD72 vermittelt das LMP2A-ITAM konstitutive und ligandenunabhängige Signale. Die Expression des LMP2A-N-Terminus entgegen seiner viralen Orientierung als chimäres CD8-Fusionsprotein erfordert zur Signalinitiation die Behandlung mit anti-CD8-Antikörpern.
3. LMP2A-vermittelte Signale führen über die Aktivierung des viralen pZ-Promotors zur Expression des EBV-Transkriptionsfaktors BZLF1 und können so zur Initiation des lytischen Replikationszyklus beitragen.

7.1 LMP2A induziert die Aktivierung BCR-proximaler Signalkaskaden

Bisherige Untersuchungen LMP2A-vermittelter Signalmechanismen in B-Lymphocyten basieren überwiegend auf Analysen von LCLs. Die dort erzielten Ergebnisse zeigen, dass LMP2A die Aktivierung BCR-proximaler PTKs und des Adapterproteins SLP-65 induzieren kann (MILLER et al., 1995; FRUEHLING and LONGNECKER, 1997; ENGELS et al., 2001). PLC- γ 2 kann dagegen auch nach BCR-Stimulation der Zellen nicht aktiviert werden, weshalb LCLs keine BCR-induzierte, intrazelluläre Ca²⁺-Mobilisierung zeigen, wie sie für LMP2A-negative B-Zellen nach BCR-Kreuzvernetzung typisch ist (MILLER et al., 1993; MILLER et al., 1994; ENGELKE et al., 2007). Die Gründe für das Ausbleiben des cytosolischen Ca²⁺-Signals sind unklar. LCLs werden durch *in vitro*-Infektion primärer B-Zellen mit EBV hergestellt (SUGDEN and MARK, 1977). Sie exprimieren neben LMP2A eine Vielzahl viraler Genprodukte, deren Einfluss auf die BCR- und LMP2A-vermittelte Signalleitung nicht eindeutig geklärt ist. Zur Analyse der Signalwege, die durch LMP2A in B-Lymphocyten reguliert werden, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Cre/loxP-basiertes Expressionssystem für LMP2A verwendet. Dieses erlaubt erstmalig die Untersuchung LMP2A-vermittelter Signalprozesse *in statu nascendi*.

In Übereinstimmung mit Untersuchungen der LMP2A-Signalleitung in LCLs konnte in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass LMP2A ligandenunabhängig die Phosphorylierung und Aktivierung von Syk und SLP-65 vermitteln kann (Niklas Engels, unveröffentlicht). Das Ausmaß der LMP2A-induzierten Tyrosinphosphorylierung zellulärer Proteine korreliert mit dem Expressionsniveau von LMP2A. Dies legt die Vermutung nahe, dass LMP2A nicht nur BCR-abhängige Signalprozesse anschalten kann, sondern über sein Expressionsniveau auch in der Lage ist, die Signalstärke zu modulieren. Letzteres wurde auch durch Analysen transgener Mäusen gezeigt, in denen LMP2A in Abwesenheit eines funktionellen BCRs je nach Expressionsstärke unterschiedliche B-Zell-Entwicklungswege induzieren kann (CASOLA et al., 2004).

Im Gegensatz zur Tyrosinphosphorylierung von Syk und SLP-65 kann in LCLs keine Aktivierung von PLC- γ 2 induziert werden (MILLER et al., 1993; MILLER et al., 1994). Die Aktivierung von PLC- γ 2 führt in B-Zellen über die Hydrolyse des Membranlipids Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat zur Bildung der *second messenger* Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP3) und Diacylglycerin (DAG) (ENGELKE et al., 2007). Die Bindung des löslichen Botenstoffs IP3 an IP3-Rezeptoren in der Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER) führt zur Freisetzung von Ca^{2+} -Ionen aus dem ER in das Cytosol. Das Membranlipid DAG induziert die Aktivierung verschiedener Isoformen der Serin/Threonin-spezifischen Protein Kinase C, was zusammen mit der Erhöhung des cytosolischen Ca^{2+} -Spiegels zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NFAT und NF- κ B führt (BAEUERLE and HENKEL, 1994; CRABTREE and OLSON, 2002; SU et al., 2002). Weiterhin rekrutiert DAG Proteine der *Ras guanine-nucleotide exchange protein*-Familie (RasGRPs) an die Plasmamembran, die über die Aktivierung einer Phosphorylierungskaskade die MAPK *extracellular signal regulated kinase* (Erk) aktivieren und so transkriptionelle Vorgänge beeinflussen (OH-HORA et al., 2003).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass LMP2A nicht nur das Syk-SLP-65-Modul aktiviert, sondern darüber hinaus PLC- γ 2-abhängige Oszillationen des cytosolischen Ca^{2+} -Spiegel vermittelt. Nishida et al. konnten demonstrieren, dass die Lipase-Aktivität von PLC- γ 2 entscheidend für Ca^{2+} -Oszillationen in B-Lymphocyten ist (NISHIDA et al., 2003). Zusätzlich konnte in unserer Arbeitsgruppe eine PLC- γ 2-Aktivierung durch LMP2A über die Bildung des *second messenger* IP3 sowie über die DAG-abhängige Aktivierung der MAPK Erk nachgewiesen werden (Christoph Emmerich, Diplomarbeit; Niklas Engels, unveröffentlicht).

Die Expression von LMP2A in DT40-Zellen induziert also ligandenunabhängig Ca^{2+} -Oszillationen, die in LMP2A-negativen Zellen nur nach BCR-Stimulation auftreten. In diesen Kontrollzellen kommt es nach BCR-Stimulation zu einem transienten Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration. Etwa 10 Minuten nachdem dieses initiale Ca^{2+} -Signal abgeklungen ist, treten Ca^{2+} -Oszillationen auf, die noch bis zu 60 Minuten nach BCR-Stimulation zu detektieren sind. Die Frequenz und Amplitude der Ca^{2+} -Oszillationen, die nach BCR-Stimulation in

den Zellen auftreten, entsprechen dabei denen, die durch die Expression von LMP2A vermittelt werden. Unklar ist, ob den LMP2A-vermittelten Ca^{2+} -Oszillationen ein initialer, transients Anstieg der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration vorausgeht wie er unmittelbar nach BCR-Stimulation zu detektieren ist. Möglicherweise akkumuliert nach Induktion der Proteinexpression zunächst eine kritische Menge von LMP2A, die ein initiales Ca^{2+} -Signal auslöst, an das sich die beobachteten Ca^{2+} -Oszillationen anschließen. Weitere Einzelzellmessungen zu unterschiedlichen Induktionszeiten könnten Aufschluss darüber geben, ob die Kinetik und der Verlauf der LMP2A-induzierten Ca^{2+} -Signale auch in diesem Punkt der BCR-abhängigen Ca^{2+} -Mobilisierung entsprechen.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte zudem gezeigt werden, dass für BCR-induzierte Ca^{2+} -Oszillationen Lyn notwendig ist. Lyn-defiziente DT40-Zellen zeigen zwar nach BCR-Stimulation einen transienten Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration, Ca^{2+} -Oszillation sind allerdings nicht zu nachzuweisen. Dies unterstützt die Vermutung, dass LMP2A neben $\text{PLC-}\gamma 2$ auch die PTK Lyn aktivieren kann, da in Lyn-defizienten DT40-Zellen keine Ca^{2+} -Oszillationen auftreten.

Oszillationen der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration sind nicht auf B-Lymphocyten beschränkt. Verschiedene Studien belegen die Bedeutung oszillatorischer Ca^{2+} -Signale für die Differenzierung, Proliferation und Aktivierung verschiedenster Zell- und Gewebetypen (BERRIDGE et al., 2000). Gut untersucht ist der funktionelle Zusammenhang zwischen Ca^{2+} -Oszillationen und der Regulation der Genexpression in T-Lymphocyten. Dolmetsch et al. konnten zeigen, dass TCR-induzierte Ca^{2+} -Oszillation entscheidenden Einfluss auf die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NFAT und NF- κ B haben (DOLMETSCH et al., 1998). Die Art der Ca^{2+} -Oszillationen moduliert sowohl die Effizienz als auch eine differenzielle Aktivierung der Transkriptionsfaktoren. Schnelle, gleichmäßige Oszillationen aktivieren sowohl NFAT als auch NF- κ B, ungleichmäßige Oszillationen fördern dagegen die Aktivierung von NF- κ B.

Auch in B-Zellen hat die Art des Ca^{2+} -Signals entscheidenden Einfluss auf zellulären Prozesse. Obwohl detaillierte Analysen der Zusammenhänge zwischen Ca^{2+} -Oszillationen und der Genregulation in B-Zellen ausstehen, ist bekannt, dass die differenzielle Aktivierung der Transkriptionfaktoren NFAT und NF- κ B über die

Intensität und Dauer des cytosolischen Ca^{2+} -Signals reguliert werden kann (DOLMETSCH et al., 1997). Während ein starker, transienter Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration eher in der Aktivierung von NF- κ B resultiert, ist für die Aktivierung von NFAT ein gemäßigtes, anhaltendes Ca^{2+} -Signal erforderlich. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die in B-Zellen durch LMP2A-induzierten Ca^{2+} -Oszillationen in der Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NFAT/AP-1 und NF- κ B resultieren. LMP2A-vermittelte Signalprozesse führen also ähnlich der BCR-Stimulation zur Aktivierung von NFAT und NF- κ B. Inwieweit LMP2A- und BCR-induzierte Ca^{2+} -Oszillationen bedeutsam für die differenzielle Aktivierung von Transkriptionsfaktoren sind, bleibt zu untersuchen.

Das Modell einer BCR-analogen Signalgebung durch LMP2A wird zudem durch Experimente an transgenen Mäusen unterstützt. LMP2A kann in diesen Tieren die Entwicklung und das Überleben von B-Zellen in Abwesenheit eines funktionellen BCRs vermitteln (CALDWELL et al., 1998; MERCHANT and LONGNECKER, 2001). Für diese Vorgänge ist neben einem funktionellen BCR auch die Aktivierung von PLC- γ 2 notwendig, wie Untersuchungen PLC- γ 2-defizienter Mäuse belegen (WANG et al., 2000). Die Substitution des BCRs durch LMP2A erfordert also in diesen Modellsystemen die Aktivierung von PLC- γ 2 durch LMP2A, was die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse bestätigt.

LMP2A wirkt sich also aktivierend auf die B-Zell-Signalleitung aus. Die Signalgebung durch LMP2A beschränkt sich dabei nicht auf membranproximale Signalereignisse, wie Beobachtungen in LCLs nahe legen, sondern kann vielmehr darüber hinaus durch die Aktivierung von PLC- γ 2 transkriptionellen Veränderungen in B-Zellen induzieren.

7.2 Induktion des lytischen Replikationszyklus durch LMP2A

Das Epstein-Barr-Virus kann wie alle Herpesviren nach einer Primärinfektion durch Etablierung eines latenten Infektionszyklus seiner vollständigen Eliminierung durch das Immunsystem entgehen. Das Virus persistiert in einer Population ruhender B-Gedächtniszellen, aus denen es durch bislang unverstandene Signale reaktiviert werden kann und in den lytischen Replikationszyklus übergehen kann.

Ein entscheidender Schritt bei der Reaktivierung des Virus stellt die Aktivierung des viralen pZ-Promotors und die dadurch induzierte Expression des *bzlf1*-Gens dar (SPECK et al., 1997). Die Expression von BZLF1 wirkt sich transaktivierend auf eine Vielzahl von Promotoren im EBV-Genom aus und leitet so den lytischen Replikationszyklus über die Expression viraler *delayed early*- und Strukturproteine ein. Zusätzlich bindet BZLF1 an die Sequenzen des Ori_{lyt}, dem Ausgangspunkt für die lytische Genomreplikation, und kann dadurch die Vermehrung des EBV-Genoms initiieren (SCHEPERS et al., 1993).

Für LMP2A-negative, EBV-infizierte B-Zellen konnte gezeigt werden, dass die BCR-Stimulation der Zellen die Expression von BZLF1 initiiert (TOVEY et al., 1978; TAKADA, 1984; TAKADA and ONO, 1989). Mit Hilfe eines Luciferase-basierten Reporterkonstrukts haben Lavens et al. zusätzlich ermittelt, dass zur BCR-induzierten Aktivierung des pZ-Promotors die Kinasen Syk und Btk notwendig sind, während Lyn bei diesem Vorgang keine Rolle spielt (LAVENS et al., 2004). Diese Ergebnisse konnten im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden. Zudem konnte ich über die Analyse PLC- γ 2-defizienter DT40-Zellen zeigen, dass die Aktivierung von PLC- γ 2 durch Syk und Btk essentiell für die Aktivierung des pZ-Promotors ist. Beobachtungen, dass die Behandlung latent EBV-infizierter Zellen mit PMA zur Induktion des lytischen Zyklus führt, bestätigen dieses Ergebnis (LAVENS et al., 2004). Bei dem Phorbol-ester PMA handelt es sich um ein membranpermeables Analogon des enzymatisch durch PLC- γ 2 gebildeten *second messenger* DAG. Die Bildung von DAG durch PLC- γ 2 stellt also einen entscheidenden Schritt bei der BCR-induzierten Initiation des lytischen Zyklus dar. In unserer Arbeitsgruppe konnte weitergehend gezeigt werden, dass durch die DAG-vermittelte Aktivierung der MAPK Erk die Expression von BZLF1 initiiert wird. Experimente unter Verwendung von Inhibitoren, die die Erk-Aktivierung

unterbinden, konnten eindeutig belegen, dass dies zum Ausbleiben der BCR-induzierten pZ-Aktivierung führt (Christoph Emmerich, Diplomarbeit).

In LMP2A-exprimierenden LCLs ist die Aktivierung des pZ-Promotors nach BCR-Stimulation der Zellen unterbunden (MILLER et al., 1994). Dieses führte zu der Vermutung, dass sich LMP2A inhibierend auf die Induktion des lytischen Replikationszyklus auswirkt. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stellen diese Beobachtungen in Frage. Die isolierte Expression von LMP2A kann über die Aktivierung des pZ-Promotors die Expression von BZLF1 induzieren. LMP2A fungiert also keineswegs als Inhibitor, sondern vielmehr als Aktivator der lytischen EBV-Replikation. LMP2A verwendet bei diesem Vorgang die gleichen PLC- γ 2-abhängigen Signalwege, die auch nach BCR-Stimulation zur Aktivierung des pZ-Promotors führen. Diese Daten werden durch Untersuchungen in konditional EBV-positiven Zellen der EREB2.5-Zelllinie bestätigt. Die transiente Expression von LMP2A in diesen Zellen führt zur Expression von BZLF1 und induziert darüber hinaus auch die Bildung von *virus capsid antigen* (VCA) (SCHAADT et al., 2005). Interessanterweise konnten Schaadt et al. zusätzlich zeigen, dass in diesen Zellen sowohl die BCR- also auch die LMP2A-induzierte Expression von BZLF1 durch die transiente Coexpression von LMP1 inhibiert werden kann. Dies könnte der Grund für das Ausbleiben der BZLF1-Expression in LCLs sein. LCLs exprimieren sowohl LMP2A als auch LMP1, so dass die LMP2A-vermittelte Aktivierung des pZ-Promotors analog zu den Untersuchungen von Schaadt et al. durch LMP1 unterbunden werden kann. Wie LMP1 die Signalgebung durch LMP2A beeinflusst, ist bislang unklar. Weitere Analysen basierend auf der Coexpression von LMP2A und LMP1 in DT40-Zellen könnten Aufschluss darüber geben, ob und an welcher Stelle die Inhibition LMP2A-vermittelter Signalwege durch LMP1 erfolgt.

Die Expression des viralen Transkriptionsfaktors BZLF1 kann also sowohl über LMP2A als auch den BCR induziert werden. Inwieweit eine BCR-abhängige Expression von BZLF1 *in vivo* von Bedeutung ist und einen alternativen Mechanismus zur LMP2A-abhängigen Induktion des lytischen Zyklus darstellt, bleibt zu untersuchen. Möglicherweise spiegelt die BCR-abhängige BZLF1-Expression lediglich die Instrumentalisierung BCR-vermittelter Signalwege über LMP2A durch EBV wider.

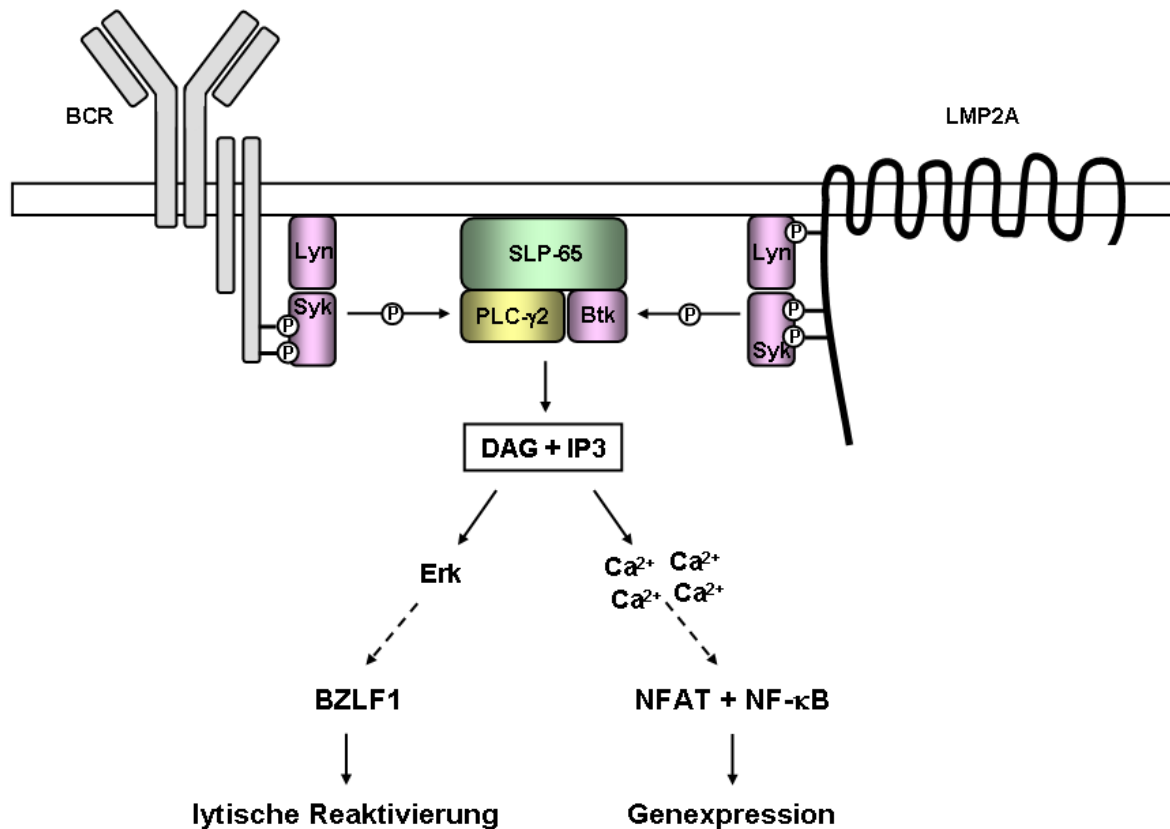


Abbildung 7.1: LMP2A ist ein aktivierendes Element der BCR-Signalleitung

Die Expression von LMP2A führt über die Aktivierung von PLC- γ 2 zur Bildung der *second messenger* DAG und IP3. Im Gegensatz zur BCR-induzierten Aktivierung erfolgt diese konstitutiv und ligandenunabhängig. Auf diese Weise induziert LMP2A sowohl die Aktivierung zelleigener Transkriptionsfaktoren als auch die Expression des EBV-Transaktivators BZLF1 und kann so über die Manipulation zellulärer Signalwege den lytischen Replikationszyklus von EBV initiieren.

7.3 Die Membrantopologie des N-Terminus ist verantwortlich für die konstitutive Signalleitung durch LMP2A

Das im cytosolischen N-Terminus von LMP2A enthaltene ITAM ist entscheidend für die Beeinflussung von Signalleitungsprozessen in B-Lymphocyten. Da der LMP2A-N-Terminus die Topologie eines Typ-II Transmembranproteins aufweist, ist die Orientierung des LMP2A-ITAMs in Bezug auf die Plasmamembran im Vergleich zu allen anderen bekannten zellulären ITAM-Rezeptoren, die als Typ-I Transmembranproteine exprimiert werden, invertiert. Eine funktionelle Relevanz dieser inversen Orientierung ist bislang nicht untersucht worden.

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmalig ermittelt werden, dass die Orientierung des LMP2A-ITAMs entscheidend für die konstitutive, ligandenunabhängige Signalleitung durch LMP2A ist. Zelluläre ITAM-tragende Rezeptoren benötigen für die Signalinitiation einen externen Stimulus. Im Fall des BCR wird dieser durch die Bindung des mlg an extrazelluläres Antigen und die dadurch induzierte Kreuzvernetzung der BCRs geliefert. LMP2A dagegen besitzt die Fähigkeit zur konstitutiven und ligandenunabhängigen Signalinitiation. Durch Analyse der Signalkompetenz chimärer Fusionsproteine konnte die konstitutive Signalleitungsfähigkeit von LMP2A erstmalig mit der Membrantopologie seines ITAM-tragenden N-Terminus in Verbindung gebracht werden.

Die Expression des LMP2A-N-Terminus in seiner viralen Orientierung als Fusionsprotein mit dem Typ-II Transmembranprotein CD72 führt ebenso wie die Expression von wildtypischem LMP2A zu einer konstitutiven Aktivierung BCR-abhängiger Signalwege. Das chimäre CD72/LMP2A-Fusionsprotein induziert wie wildtypisches LMP2A die Phosphorylierung zellulärer Proteine, die Aktivierung von PLC- γ 2 sowie die Expression von BZLF1. Das nicht-ITAM Tyrosin 112 im N-Terminus von LMP2A, das nach Phosphorylierung die Assoziation mit Lyn ermöglicht, spielt bei diesen Prozessen keine Rolle. Die Substitution dieses Tyrosinrestes durch Phenylalanin beeinträchtigt nicht die Signalleitungsfähigkeit des CD72/LMP2A-Fusionsproteins. Exprimieren DT40-Zellen dagegen den LMP2A-N-Terminus entgegen seiner wildtypischen Orientierung im Kontext des Typ-I Transmembranproteins CD8, so verliert dieser die Fähigkeit zur konstitutiven Signalleitung. CD8/LMP2A-Chimären sind zwar noch in der Lage, die Signalinitiation in B-Zellen zu vermitteln, benötigen zur Signalauslösung aber einen Stimulus in Form von Kreuzvernetzung mit anti-CD8-Antikörpern.

Die Gründe für die unterschiedliche Kompetenz der CD72/LMP2A- bzw. CD8/LMP2A-Fusionsproteine, die Signalinitiation in B-Zellen zu induzieren sind unklar. Eine mögliche Ursache könnte in der unterschiedlichen Bindung von Syk an die phosphorylierten ITAMs liegen. Die Assoziation der tandemartig angeordneten SH2-Domänen von Syk an die phosphorylierten ITAM-Tyrosine findet in einer strikten *head-to-tail* Orientierung statt (FUTTERER et al., 1998). Aufgrund der entgegengesetzten Orientierung des LMP2A-ITAMs führt dies im Fall von wildtypischem LMP2A bzw. der CD72/LMP2A-Chimäre zur Ausbildung

eines Komplexes, in dem Syk in inverser Ausrichtung an die Plasmamembran rekrutiert wird. Dies könnte direkt die Kinaseaktivität von Syk beeinflussen und somit die konstitutive Signalleitung durch LMP2A und das CD72/LMP2A-Fusionsproteine vermitteln. Das CD8/LMP2A-Fusionsprotein hingegen ermöglicht die Bindung von Syk in seiner physiologischen Orientierung, wie sie auch bei Ig α und Ig β vorzufinden ist, was die Stimulationsabhängigkeit der Signalinitiation erklären könnte.

Andererseits könnte durch die inverse Bindung von Syk an LMP2A der Zugang für Protein-Tyrosin-Phosphatasen (PTPs) zu diesem Komplex beeinflusst werden (RETH, 2002). In B-Zellen herrscht ein dynamisches Gleichgewicht zwischen PTKs, die die Phosphorylierung von Tyrosinresten vermitteln, und PTPs die deren Dephosphorylierung katalysieren (VEILLETTE et al., 2002). Möglicherweise erschwert die atypische Assoziation von Syk an LMP2A und die Chimäre CD72/LMP2A die Zugänglichkeit dieser Komplexe für die PTPs und führt zu einer Verschiebung des PTK/PTP-Gleichgewichts und löst so die Syk-vermittelte Aktivierung nachgeschalteter Signalwege aus.

In dieser Arbeit wurden LMP2A-vermittelte Signalmechanismen *in statu nascendi* und unabhängig von weiteren EBV-codierten Genprodukten untersucht. Es konnte so gezeigt werden, dass allein die Expression von LMP2A ohne weiteren Stimulus zur konstitutiven Aktivierung von BCR-Signalkaskaden führt. Auf diese Weise werden zentrale Signalereignisse in B-Lymphocyten wie die Ca²⁺-Mobilisierung und die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren durch LMP2A beeinflusst. LMP2A kann nicht nur die zelluläre Signalmaschinerie manipulieren, sondern instrumentalisiert diese zur Expression des EBV-Proteins BZLF1 und kann so den lytischen Replikationszyklus von EBV einleiten.

Die vorgestellten Daten stellen einen Ausgangspunkt für weiterführende Analysen LMP2A-vermittelter Signalereignisse in B-Lymphocyten dar. Eine detaillierte Analyse der Beeinflussung der B-Zell-Signalleitung durch virale Proteine wie LMP2A kann wertvolle Hinweise auf allgemeine Prinzipien der zellulären Signaltransduktion und deren Manipulation durch Viren liefern. Insbesondere im Fall des Epstein-Barr-Virus können so wichtige Erkenntnisse in Bezug auf die Entstehung und Behandlung EBV-assoziiierter Tumorerkrankungen gewonnen werden.

8. Literatur

- Abudula, A., A. Grabbe, M. Brechmann, C. Polaschegg, N. Herrmann, I. Goldbeck, K. Dittmann, and J. Wienands (2007). SLP-65 signal transduction requires Src homology 2 domain-mediated membrane anchoring and a kinase-independent adaptor function of Syk. *J Biol Chem* **282**,29059-29066.
- Alber, G., K. M. Kim, P. Weiser, C. Riesterer, R. Carsetti, and M. Reth (1993). Molecular mimicry of the antigen receptor signalling motif by transmembrane proteins of the Epstein-Barr virus and the bovine leukaemia virus. *Curr Biol* **3**,333-339.
- Andreason, G. L., and G. A. Evans (1988). Introduction and expression of DNA molecules in eukaryotic cells by electroporation. *Biotechniques* **6**,650-660.
- Baba, T. W., B. P. Giroir, and E. H. Humphries (1985). Cell lines derived from avian lymphomas exhibit two distinct phenotypes. *Virology* **144**,139-151.
- Baba, T. W., and E. H. Humphries (1984). Differential response to avian leukosis virus infection exhibited by two chicken lines. *Virology* **135**,181-188.
- Baba, Y., S. Hashimoto, M. Matsushita, D. Watanabe, T. Kishimoto, T. Kurosaki, and S. Tsukada (2001). BLNK mediates Syk-dependent Btk activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**,2582-2586.
- Babcock, G. J., D. Hochberg, and A. D. Thorley-Lawson (2000). The expression pattern of Epstein-Barr virus latent genes in vivo is dependent upon the differentiation stage of the infected B cell. *Immunity* **13**,497-506.
- Baeuerle, P. A., and T. Henkel (1994). Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annu Rev Immunol* **12**,141-179.
- Baumforth, K. R., L. S. Young, K. J. Flavell, C. Constandinou, and P. G. Murray (1999). The Epstein-Barr virus and its association with human cancers. *Mol Pathol* **52**,307-322.
- Beaufils, P., D. Choquet, R. Z. Mamoun, and B. Malissen (1993). The (YXXL/I)2 signalling motif found in the cytoplasmic segments of the bovine leukaemia virus envelope protein and Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A can elicit early and late lymphocyte activation events. *Embo J* **12**,5105-5112.
- Berridge, M. J., P. Lipp, and M. D. Bootman (2000). The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**,11-21.
- Bornkamm, G. W., and W. Hammerschmidt (2001). Molecular virology of Epstein-Barr virus. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **356**,437-459.

- Burkhardt, A. L., M. Brunswick, J. B. Bolen, and J. J. Mond (1991). Anti-immunoglobulin stimulation of B lymphocytes activates src-related protein-tyrosine kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**,7410-7414.
- Caldwell, R. G., J. B. Wilson, S. J. Anderson, and R. Longnecker (1998). Epstein-Barr virus LMP2A drives B cell development and survival in the absence of normal B cell receptor signals. *Immunity* **9**,405-411.
- Campbell, K. S., and J. C. Cambier (1990). B lymphocyte antigen receptors (mIg) are non-covalently associated with a disulfide linked, inducibly phosphorylated glycoprotein complex. *Embo J* **9**,441-448.
- Campbell, M. A., and B. M. Sefton (1992). Association between B-lymphocyte membrane immunoglobulin and multiple members of the Src family of protein tyrosine kinases. *Mol Cell Biol* **12**,2315-2321.
- Casola, S., K. L. Otipoby, M. Alimzhanov, S. Humme, N. Uyttersprot, J. L. Kutok, M. C. Carroll, and K. Rajewsky (2004). B cell receptor signal strength determines B cell fate. *Nat Immunol* **5**,317-327.
- Chiu, C. W., M. Dalton, M. Ishiai, T. Kurosaki, and A. C. Chan (2002). BLNK: molecular scaffolding through 'cis'-mediated organization of signaling proteins. *Embo J* **21**,6461-6472.
- Corcoran, A. E. (2005). Immunoglobulin locus silencing and allelic exclusion. *Semin Immunol* **17**,141-154.
- Crabtree, G. R., and N. A. Clipstone (1994). Signal transmission between the plasma membrane and nucleus of T lymphocytes. *Annu Rev Biochem* **63**,1045-1083.
- Crabtree, G. R., and E. N. Olson (2002). NFAT signaling: choreographing the social lives of cells. *Cell* **109 Suppl**,S67-79.
- Dolmetsch, R. E., R. S. Lewis, C. C. Goodnow, and J. I. Healy (1997). Differential activation of transcription factors induced by Ca²⁺ response amplitude and duration. *Nature* **386**,855-858.
- Dolmetsch, R. E., K. Xu, and R. S. Lewis (1998). Calcium oscillations increase the efficiency and specificity of gene expression. *Nature* **392**,933-936.
- Emmerich, Christoph (2005). Etablierung eines Modellsystems zur Analyse von Signalleitungsmechanismen des Epstein-Barr Virus-codierten Latenten Membranprotein 2A. Diplomarbeit, Universität Bielefeld.
- Engelke, M., N. Engels, K. Dittmann, B. Stork, and J. Wienands (2007). Ca²⁺ signaling in antigen receptor-activated B lymphocytes. *Immunol Rev* **218**,235-246.

- Engels, N., M. Merchant, R. Pappu, A. C. Chan, R. Longnecker, and J. Wienands (2001). Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A (LMP2A) employs the SLP-65 signaling module. *J Exp Med* **194**,255-264.
- Farrell, P. J., D. T. Rowe, C. M. Rooney, and T. Kouzarides (1989). Epstein-Barr virus BZLF1 trans-activator specifically binds to a consensus AP-1 site and is related to c-fos. *Embo J* **8**,127-132.
- Flaswinkel, H., and M. Reth (1994). Dual role of the tyrosine activation motif of the Ig-alpha protein during signal transduction via the B cell antigen receptor. *Embo J* **13**,83-89.
- Fluckiger, A. C., Z. Li, R. M. Kato, M. I. Wahl, H. D. Ochs, R. Longnecker, J. P. Kinet, O. N. Witte, A. M. Scharenberg, and D. J. Rawlings (1998). Btk/Tec kinases regulate sustained increases in intracellular Ca²⁺ following B-cell receptor activation. *Embo J* **17**,1973-1985.
- Fruehling, S., and R. Longnecker (1997). The immunoreceptor tyrosine-based activation motif of Epstein-Barr virus LMP2A is essential for blocking BCR-mediated signal transduction. *Virology* **235**,241-251.
- Fruehling, S., R. Swart, K. M. Dolwick, E. Kremmer, and R. Longnecker (1998). Tyrosine 112 of latent membrane protein 2A is essential for protein tyrosine kinase loading and regulation of Epstein-Barr virus latency. *J Virol* **72**,7796-7806.
- Fu, C., C. W. Turck, T. Kurosaki, and A. C. Chan (1998). BLNK: a central linker protein in B cell activation. *Immunity* **9**,93-103.
- Futterer, K., J. Wong, R. A. Grucza, A. C. Chan, and G. Waksman (1998). Structural basis for Syk tyrosine kinase ubiquity in signal transduction pathways revealed by the crystal structure of its regulatory SH2 domains bound to a dually phosphorylated ITAM peptide. *J Mol Biol* **281**,523-537.
- Gangi-Peterson, L., S. N. Peterson, L. H. Shapiro, A. Golding, R. Caricchio, D. I. Cohen, D. H. Margulies, and P. L. Cohen (1998). bca: an activation-related B-cell gene. *Mol Immunol* **35**,55-63.
- Goitsuka, R., Y. Fujimura, H. Mamada, A. Umeda, T. Morimura, K. Uetsuka, K. Doi, S. Tsuji, and D. Kitamura (1998). BASH, a novel signaling molecule preferentially expressed in B cells of the bursa of Fabricius. *J Immunol* **161**,5804-5808.
- Goldbeck, Ingo (2007). Studien zur subzellulären Navigation von Signalmolekülen der Ca²⁺-Antwort in aktivierten B-Lymphocyten. Dissertation, Universität Bielefeld.

- Hashimoto, A., H. Okada, A. Jiang, M. Kurosaki, S. Greenberg, E. A. Clark, and T. Kurosaki (1998). Involvement of guanosine triphosphatases and phospholipase C-gamma2 in extracellular signal-regulated kinase, c-Jun NH2-terminal kinase, and p38 mitogen-activated protein kinase activation by the B cell antigen receptor. *J Exp Med* **188**,1287-1295.
- Henle, W., G. Henle, and E. T. Lennette (1979). The Epstein-Barr virus. *Sci Am* **241**,48-59.
- Hennemann, Alexander (2005). Etablierung eines Systems zur induzierbaren Expression des Adapterproteins p120 in Lymphozyten. Diplomarbeit, Universität Bielefeld.
- Hikida, M., and T. Kurosaki (2005). Regulation of Phospholipase C-gamma2 Networks in B Lymphocytes. *Adv Immunol* **88**,73-96.
- Hombach, J., T. Tsubata, L. Leclercq, H. Stappert, and M. Reth (1990). Molecular components of the B-cell antigen receptor complex of the IgM class. *Nature* **343**,760-762.
- Humphries, L. A., C. Dangelmaier, K. Sommer, K. Kipp, R. M. Kato, N. Griffith, I. Bakman, C. W. Turk, J. L. Daniel, and D. J. Rawlings (2004). Tec kinases mediate sustained calcium influx via site-specific tyrosine phosphorylation of the phospholipase Cgamma Src homology 2-Src homology 3 linker. *J Biol Chem* **279**,37651-37661.
- Ikeda, M., A. Ikeda, L. C. Longan, and R. Longnecker (2000). The Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A PY motif recruits WW domain-containing ubiquitin-protein ligases. *Virology* **268**,178-191.
- Ikeda, M., A. Ikeda, and R. Longnecker (2001). PY motifs of Epstein-Barr virus LMP2A regulate protein stability and phosphorylation of LMP2A-associated proteins. *J Virol* **75**,5711-5718.
- Ishiai, M., M. Kurosaki, R. Pappu, K. Okawa, I. Ronko, C. Fu, M. Shibata, A. Iwamatsu, A. C. Chan, and T. Kurosaki (1999a). BLNK required for coupling Syk to PLC gamma 2 and Rac1-JNK in B cells. *Immunity* **10**,117-125.
- Ishiai, M., H. Sugawara, M. Kurosaki, and T. Kurosaki (1999b). Cutting edge: association of phospholipase C-gamma 2 Src homology 2 domains with BLNK is critical for B cell antigen receptor signaling. *J Immunol* **163**,1746-1749.
- Kaschka-Dierich, C., A. Adams, T. Lindahl, G. W. Bornkamm, G. Bjursell, G. Klein, B. C. Giovanella, and S. Singh (1976). Intracellular forms of Epstein-Barr virus DNA in human tumour cells in vivo. *Nature* **260**,302-306.
- Khan, G., E. M. Miyashita, B. Yang, G. J. Babcock, and D. A. Thorley-Lawson (1996). Is EBV persistence in vivo a model for B cell homeostasis? *Immunity* **5**,173-179.

- Kim, Y. J., F. Sekiya, B. Poulin, Y. S. Bae, and S. G. Rhee (2004). Mechanism of B-cell receptor-induced phosphorylation and activation of phospholipase C-gamma2. *Mol Cell Biol* **24**,9986-9999.
- Kimura, T., H. Sakamoto, E. Appella, and R. P. Siraganian (1996). Conformational changes induced in the protein tyrosine kinase p72syk by tyrosine phosphorylation or by binding of phosphorylated immunoreceptor tyrosine-based activation motif peptides. *Mol Cell Biol* **16**,1471-1478.
- Kohler, F., B. Storch, Y. Kulathu, S. Herzog, S. Kuppig, M. Reth, and H. Jumaa (2005). A leucine zipper in the N terminus confers membrane association to SLP-65. *Nat Immunol* **6**,204-210.
- Koretzky, G. A., F. Abtahian, and M. A. Silverman (2006). SLP76 and SLP65: complex regulation of signalling in lymphocytes and beyond. *Nat Rev Immunol* **6**,67-78.
- Kuppers, R. (2003). B cells under influence: transformation of B cells by Epstein-Barr virus. *Nat Rev Immunol* **3**,801-812.
- Kurosaki, T., S. A. Johnson, L. Pao, K. Sada, H. Yamamura, and J. C. Cambier (1995). Role of the Syk autophosphorylation site and SH2 domains in B cell antigen receptor signaling. *J Exp Med* **182**,1815-1823.
- Kurosaki, T., A. Maeda, M. Ishiai, A. Hashimoto, K. Inabe, and M. Takata (2000). Regulation of the phospholipase C-gamma2 pathway in B cells. *Immunol Rev* **176**,19-29.
- Kurosaki, T., M. Takata, Y. Yamanashi, T. Inazu, T. Taniguchi, T. Yamamoto, and H. Yamamura (1994). Syk activation by the Src-family tyrosine kinase in the B cell receptor signaling. *J Exp Med* **179**,1725-1729.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**,680-685.
- Lam, K. P., R. Kuhn, and K. Rajewsky (1997). In vivo ablation of surface immunoglobulin on mature B cells by inducible gene targeting results in rapid cell death. *Cell* **90**,1073-1083.
- Laux, G., M. Perricaudet, and P. J. Farrell (1988). A spliced Epstein-Barr virus gene expressed in immortalized lymphocytes is created by circularization of the linear viral genome. *Embo J* **7**,769-774.
- Lavens, S., E. A. Faust, F. Lu, M. Jacob, M. Leta, P. M. Lieberman, and E. Pure (2004). Identification of protein tyrosine kinases required for B-cell-receptor-mediated activation of an Epstein-Barr Virus immediate-early gene promoter. *J Virol* **78**,8543-8551.

- Lindahl, T., A. Adams, G. Bjursell, G. W. Bornkamm, C. Kaschka-Dierich, and U. Jehn (1976). Covalently closed circular duplex DNA of Epstein-Barr virus in a human lymphoid cell line. *J Mol Biol* **102**,511-530.
- Lindqvist, C., M. Karp, K. Akerman, and C. Oker-Blom (1994). Flow cytometric analysis of bioluminescence emitted by recombinant baculovirus-infected insect cells. *Cytometry* **15**,207-212.
- Longnecker, R., and E. Kieff (1990). A second Epstein-Barr virus membrane protein (LMP2) is expressed in latent infection and colocalizes with LMP1. *J Virol* **64**,2319-2326.
- Longnecker, R., M. Merchant, M. E. Brown, S. Fruehling, J. O. Bickford, M. Ikeda, and R. N. Harty (2000). WW- and SH3-domain interactions with Epstein-Barr virus LMP2A. *Exp Cell Res* **257**,332-340.
- Longnecker, R., C. L. Miller, X. Q. Miao, A. Marchini, and E. Kieff (1992). The only domain which distinguishes Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A (LMP2A) from LMP2B is dispensable for lymphocyte infection and growth transformation in vitro; LMP2A is therefore nonessential. *J Virol* **66**,6461-6469.
- Macian, F., C. Lopez-Rodriguez, and A. Rao (2001). Partners in transcription: NFAT and AP-1. *Oncogene* **20**,2476-2489.
- Malissen, M., J. Trucy, E. Jouvin-Marche, P. A. Cazenave, R. Scollay, and B. Malissen (1992). Regulation of TCR alpha and beta gene allelic exclusion during T-cell development. *Immunol Today* **13**,315-322.
- Manet, E., H. Gruffat, M. C. Trescol-Biemont, N. Moreno, P. Chambard, J. F. Giot, and A. Sergeant (1989). Epstein-Barr virus bicistronic mRNAs generated by facultative splicing code for two transcriptional trans-activators. *Embo J* **8**,1819-1826.
- Matskova, L., I. Ernberg, T. Pawson, and G. Winberg (2001). C-terminal domain of the Epstein-Barr virus LMP2A membrane protein contains a clustering signal. *J Virol* **75**,10941-10949.
- Merchant, M., R. G. Caldwell, and R. Longnecker (2000). The LMP2A ITAM is essential for providing B cells with development and survival signals in vivo. *J Virol* **74**,9115-9124.
- Merchant, M., and R. Longnecker (2001). LMP2A survival and developmental signals are transmitted through Btk-dependent and Btk-independent pathways. *Virology* **291**,46-54.
- Miller, C. L., A. L. Burkhardt, J. H. Lee, B. Stealey, R. Longnecker, J. B. Bolen, and E. Kieff (1995). Integral membrane protein 2 of Epstein-Barr virus regulates reactivation from latency through dominant negative effects on protein-tyrosine kinases. *Immunity* **2**,155-166.

- Miller, C. L., J. H. Lee, E. Kieff, and R. Longnecker (1994). An integral membrane protein (LMP2) blocks reactivation of Epstein-Barr virus from latency following surface immunoglobulin crosslinking. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**,772-776.
- Miller, C. L., R. Longnecker, and E. Kieff (1993). Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A blocks calcium mobilization in B lymphocytes. *J Virol* **67**,3087-3094.
- Miyashita, E. M., B. Yang, G. J. Babcock, and D. A. Thorley-Lawson (1997). Identification of the site of Epstein-Barr virus persistence in vivo as a resting B cell. *J Virol* **71**,4882-4891.
- Morita, S., T. Kojima, and T. Kitamura (2000). Plat-E: an efficient and stable system for transient packaging of retroviruses. *Gene Ther* **7**,1063-1066.
- Mullis, K., F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn, and H. Erlich (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **51 Pt 1**,263-273.
- Mullis, K. B., and F. A. Faloona (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* **155**,335-350.
- Nemerow, G. R., and N. R. Cooper (1984). Early events in the infection of human B lymphocytes by Epstein-Barr virus: the internalization process. *Virology* **132**,186-198.
- Nemerow, G. R., R. A. Houghten, M. D. Moore, and N. R. Cooper (1989). Identification of an epitope in the major envelope protein of Epstein-Barr virus that mediates viral binding to the B lymphocyte EBV receptor (CR2). *Cell* **56**,369-377.
- Neuberger, M. S., K. J. Patel, P. Dariavach, K. Nelms, C. J. Peaker, and G. T. Williams (1993). The mouse B-cell antigen receptor: definition and assembly of the core receptor of the five immunoglobulin isotypes. *Immunol Rev* **132**,147-161.
- Nishida, M., K. Sugimoto, Y. Hara, E. Mori, T. Morii, T. Kurosaki, and Y. Mori (2003). Amplification of receptor signalling by Ca²⁺ entry-mediated translocation and activation of PLCgamma2 in B lymphocytes. *Embo J* **22**,4677-4688.
- Nussenzweig, M. C., A. C. Shaw, E. Sinn, D. B. Danner, K. L. Holmes, H. C. Morse, 3rd, and P. Leder (1987). Allelic exclusion in transgenic mice that express the membrane form of immunoglobulin mu. *Science* **236**,816-819.
- Oancea, E., and T. Meyer (1998). Protein kinase C as a molecular machine for decoding calcium and diacylglycerol signals. *Cell* **95**,307-318.

- Oh-Hora, M., S. Johmura, A. Hashimoto, M. Hikida, and T. Kurosaki (2003). Requirement for Ras guanine nucleotide releasing protein 3 in coupling phospholipase C-gamma2 to Ras in B cell receptor signaling. *J Exp Med* **198**,1841-1851.
- Packham, G., A. Economou, C. M. Rooney, D. T. Rowe, and P. J. Farrell (1990). Structure and function of the Epstein-Barr virus BZLF1 protein. *J Virol* **64**,2110-2116.
- Panousis, C. G., and D. T. Rowe (1997). Epstein-Barr virus latent membrane protein 2 associates with and is a substrate for mitogen-activated protein kinase. *J Virol* **71**,4752-4760.
- Parekh, A. B., and R. Penner (1997). Store depletion and calcium influx. *Physiol Rev* **77**,901-930.
- Parekh, A. B., and J. W. Putney, Jr. (2005). Store-operated calcium channels. *Physiol Rev* **85**,757-810.
- Patterson, R. L., D. Boehning, and S. H. Snyder (2004). Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors as signal integrators. *Annu Rev Biochem* **73**,437-465.
- Potter, H. (1993). Application of electroporation in recombinant DNA technology. *Methods Enzymol* **217**,461-478.
- Putney, J. W., Jr., L. M. Broad, F. J. Braun, J. P. Lievremont, and G. S. Bird (2001). Mechanisms of capacitative calcium entry. *J Cell Sci* **114**,2223-2229.
- Putney, J. W., Jr., and R. R. McKay (1999). Capacitative calcium entry channels. *Bioessays* **21**,38-46.
- Reth, M. (1989). Antigen receptor tail clue. *Nature* **338**,383-384.
- Reth, M. (1992). Antigen receptors on B lymphocytes. *Annu Rev Immunol* **10**,97-121.
- Reth, M. (2002). Hydrogen peroxide as second messenger in lymphocyte activation. *Nat Immunol* **3**,1129-1134.
- Reth, M., and J. Wienands (1997). Initiation and processing of signals from the B cell antigen receptor. *Annu Rev Immunol* **15**,453-479.
- Rivailler, P., C. Quink, and F. Wang (1999). Strong selective pressure for evolution of an Epstein-Barr virus LMP2B homologue in the rhesus lymphocryptovirus. *J Virol* **73**,8867-8872.

- Rodriguez, R., M. Matsuda, O. Perisic, J. Bravo, A. Paul, N. P. Jones, Y. Light, K. Swann, R. L. Williams, and M. Katan (2001). Tyrosine residues in phospholipase Cgamma 2 essential for the enzyme function in B-cell signaling. *J Biol Chem* **276**,47982-47992.
- Rowe, D. T. (1999). Epstein-Barr virus immortalization and latency. *Front Biosci* **4**,D346-371.
- Rowen, L., B. F. Koop, and L. Hood (1996). The complete 685-kilobase DNA sequence of the human beta T cell receptor locus. *Science* **272**,1755-1762.
- Rowley, R. B., A. L. Burkhardt, H. G. Chao, G. R. Matsueda, and J. B. Bolen (1995). Syk protein-tyrosine kinase is regulated by tyrosine-phosphorylated Ig alpha/Ig beta immunoreceptor tyrosine activation motif binding and autophosphorylation. *J Biol Chem* **270**,11590-11594.
- Saijo, K., I. Mecklenbrauker, A. Santana, M. Leitger, C. Schmedt, and A. Tarakhovsky (2002). Protein kinase C beta controls nuclear factor kappaB activation in B cells through selective regulation of the IkappaB kinase alpha. *J Exp Med* **195**,1647-1652.
- Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis, and H. A. Erlich (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**,487-491.
- Sample, J., D. Liebowitz, and E. Kieff (1989). Two related Epstein-Barr virus membrane proteins are encoded by separate genes. *J Virol* **63**,933-937.
- Sanchez, M., Z. Misulovin, A. L. Burkhardt, S. Mahajan, T. Costa, R. Franke, J. B. Bolen, and M. Nussenzweig (1993). Signal transduction by immunoglobulin is mediated through Ig alpha and Ig beta. *J Exp Med* **178**,1049-1055.
- Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**,5463-5467.
- Schaadt, E., B. Baier, J. Mautner, G. W. Bornkamm, and B. Adler (2005). Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A mimics B-cell receptor-dependent virus reactivation. *J Gen Virol* **86**,551-559.
- Schamel, W. W., and M. Reth (2000). Monomeric and oligomeric complexes of the B cell antigen receptor. *Immunity* **13**,5-14.
- Schatz, D. G., M. A. Oettinger, and M. S. Schlissel (1992). V(D)J recombination: molecular biology and regulation. *Annu Rev Immunol* **10**,359-383.
- Schepers, A., D. Pich, and W. Hammerschmidt (1993). A transcription factor with homology to the AP-1 family links RNA transcription and DNA replication in the lytic cycle of Epstein-Barr virus. *Embo J* **12**,3921-3929.

- Sefton, B. M., and M. A. Campbell (1991). The role of tyrosine protein phosphorylation in lymphocyte activation. *Annu Rev Cell Biol* **7**,257-274.
- Serfling, E., F. Berberich-Siebelt, A. Avots, S. Chuvpilo, S. Klein-Hessling, M. K. Jha, E. Kondo, P. Pagel, J. Schulze-Luehrmann, and A. Palmetshofer (2004). NFAT and NF-kappaB factors-the distant relatives. *Int J Biochem Cell Biol* **36**,1166-1170.
- Shibasaki, F., E. R. Price, D. Milan, and F. Mckeon (1996). Role of kinases and the phosphatase calcineurin in the nuclear shuttling of transcription factor NF-AT4. *Nature* **382**,370-373.
- Sinclair, A. J. (2003). bZIP proteins of human gammaherpesviruses. *J Gen Virol* **84**,1941-1949.
- Sohn, H. W., P. Tolar, T. Jin, and S. K. Pierce (2006). Fluorescence resonance energy transfer in living cells reveals dynamic membrane changes in the initiation of B cell signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**,8143-8148.
- Songyang, Z., S. E. Shoelson, M. Chaudhuri, G. Gish, T. Pawson, W. G. Haser, F. King, T. Roberts, S. Ratnofsky, R. J. Lechleider, and Et Al. (1993). SH2 domains recognize specific phosphopeptide sequences. *Cell* **72**,767-778.
- Speck, S. H., T. Chatila, and E. Flemington (1997). Reactivation of Epstein-Barr virus: regulation and function of the BZLF1 gene. *Trends Microbiol* **5**,399-405.
- Spitaler, M., and D. A. Cantrell (2004). Protein kinase C and beyond. *Nat Immunol* **5**,785-790.
- Stork, B., M. Engelke, J. Frey, V. Horejsi, A. Hamm-Baarke, B. Schraven, T. Kurosaki, and J. Wienands (2004). Grb2 and the non-T cell activation linker NTAL constitute a Ca(2+)-regulating signal circuit in B lymphocytes. *Immunity* **21**,681-691.
- Stork, B., K. Neumann, I. Goldbeck, S. Alers, T. Kahne, M. Naumann, M. Engelke, and J. Wienands (2007). Subcellular localization of Grb2 by the adaptor protein Dok-3 restricts the intensity of Ca²⁺ signaling in B cells. *Embo J* **26**,1140-1149.
- Su, T. T., B. Guo, Y. Kawakami, K. Sommer, K. Chae, L. A. Humphries, R. M. Kato, S. Kang, L. Patrone, R. Wall, M. Teitell, M. Leitges, T. Kawakami, and D. J. Rawlings (2002). PKC-beta controls I kappa B kinase lipid raft recruitment and activation in response to BCR signaling. *Nat Immunol* **3**,780-786.
- Su, Y. W., Y. Zhang, J. Schweikert, G. A. Koretzky, M. Reth, and J. Wienands (1999). Interaction of SLP adaptors with the SH2 domain of Tec family kinases. *Eur J Immunol* **29**,3702-3711.

- Sugden, B., and W. Mark (1977). Clonal transformation of adult human leukocytes by Epstein-Barr virus. *J Virol* **23**,503-508.
- Taddie, J. A., T. R. Hurley, B. S. Hardwick, and B. M. Sefton (1994). Activation of B- and T-cells by the cytoplasmic domains of the B-cell antigen receptor proteins Ig-alpha and Ig-beta. *J Biol Chem* **269**,13529-13535.
- Takada, K. (1984). Cross-linking of cell surface immunoglobulins induces Epstein-Barr virus in Burkitt lymphoma lines. *Int J Cancer* **33**,27-32.
- Takada, K., and Y. Ono (1989). Synchronous and sequential activation of latently infected Epstein-Barr virus genomes. *J Virol* **63**,445-449.
- Takata, M., Y. Homma, and T. Kurosaki (1995). Requirement of phospholipase C-gamma 2 activation in surface immunoglobulin M-induced B cell apoptosis. *J Exp Med* **182**,907-914.
- Takata, M., H. Sabe, A. Hata, T. Inazu, Y. Homma, T. Nukada, H. Yamamura, and T. Kurosaki (1994). Tyrosine kinases Lyn and Syk regulate B cell receptor-coupled Ca²⁺ mobilization through distinct pathways. *Embo J* **13**,1341-1349.
- Tanner, J., J. Weis, D. Fearon, Y. Whang, and E. Kieff (1987). Epstein-Barr virus gp350/220 binding to the B lymphocyte C3d receptor mediates adsorption, capping, and endocytosis. *Cell* **50**,203-213.
- Timmerman, L. A., N. A. Clipstone, S. N. Ho, J. P. Northrop, and G. R. Crabtree (1996). Rapid shuttling of NF-AT in discrimination of Ca²⁺ signals and immunosuppression. *Nature* **383**,837-840.
- Tonegawa, S. (1983). Somatic generation of antibody diversity. *Nature* **302**,575-581.
- Tovey, M. G., G. Lenoir, and J. Begon-Lours (1978). Activation of latent Epstein-Barr virus by antibody to human IgM. *Nature* **276**,270-272.
- Veillette, A., S. Latour, and D. Davidson (2002). Negative regulation of immunoreceptor signaling. *Annu Rev Immunol* **20**,669-707.
- Wang, D., J. Feng, R. Wen, J. C. Marine, M. Y. Sangster, E. Parganas, A. Hoffmeyer, C. W. Jackson, J. L. Cleveland, P. J. Murray, and J. N. Ihle (2000). Phospholipase Cgamma2 is essential in the functions of B cell and several Fc receptors. *Immunity* **13**,25-35.
- Watanabe, D., S. Hashimoto, M. Ishiai, M. Matsushita, Y. Baba, T. Kishimoto, T. Kurosaki, and S. Tsukada (2001). Four tyrosine residues in phospholipase C-gamma 2, identified as Btk-dependent phosphorylation sites, are required for B cell antigen receptor-coupled calcium signaling. *J Biol Chem* **276**,38595-38601.

- Weber, K., and M. Osborn (1969). The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J Biol Chem* **244**,4406-4412.
- Weigert, M., R. Perry, D. Kelley, T. Hunkapiller, J. Schilling, and L. Hood (1980). The joining of V and J gene segments creates antibody diversity. *Nature* **283**,497-499.
- Wienands, J., F. Freuler, and G. Baumann (1995). Tyrosine-phosphorylated forms of Ig beta, CD22, TCR zeta and HOSS are major ligands for tandem SH2 domains of Syk. *Int Immunol* **7**,1701-1708.
- Wienands, J., J. Schweikert, B. Wollscheid, H. Jumaa, P. J. Nielsen, and M. Reth (1998). SLP-65: a new signaling component in B lymphocytes which requires expression of the antigen receptor for phosphorylation. *J Exp Med* **188**,791-795.
- Winberg, G., L. Matskova, F. Chen, P. Plant, D. Rotin, G. Gish, R. Ingham, I. Ernberg, and T. Pawson (2000). Latent membrane protein 2A of Epstein-Barr virus binds WW domain E3 protein-ubiquitin ligases that ubiquitinate B-cell tyrosine kinases. *Mol Cell Biol* **20**,8526-8535.
- Winslow, M. M., J. R. Neilson, and G. R. Crabtree (2003). Calcium signalling in lymphocytes. *Curr Opin Immunol* **15**,299-307.
- Xu, Y., K. W. Harder, N. D. Huntington, M. L. Hibbs, and D. M. Tarlinton (2005). Lyn tyrosine kinase: accentuating the positive and the negative. *Immunity* **22**,9-18.
- Yamanashi, Y., T. Kakiuchi, J. Mizuguchi, T. Yamamoto, and K. Toyoshima (1991). Association of B cell antigen receptor with protein tyrosine kinase Lyn. *Science* **251**,192-194.
- Zhang, Y., J. Wienands, C. Zurn, and M. Reth (1998). Induction of the antigen receptor expression on B lymphocytes results in rapid competence for signaling of SLP-65 and Syk. *Embo J* **17**,7304-7310.

9. Anhang

9.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 2.1: Schematische Darstellung von LMP2A.....	9
Abb. 2.2: LMP2A inhibiert die BCR-Signalleitung in LCLs.....	15
Abb. 6.1: Cre/loxP-basiertes Expressionssystem für LMP2A.....	46
Abb. 6.2: LMP2A induziert Ca ²⁺ -Oszillationen.....	47
Abb. 6.3: BCR-induzierte Ca ²⁺ -Oszillationen in wildtypischen DT40 B-Zellen.....	49
Abb. 6.4: Ca ²⁺ -Fluxanalysen Lyn-, Grb2- und Dok-3-defizienter DT40-Zellen.....	50
Abb. 6.5: Schematische Darstellung der CD72- und CD8- Transmembranchimären im Vergleich zu wildtypischem LMP2A.....	52
Abb. 6.6: Die Orientierung des LMP2A-N-Terminus ist entscheidend für die konstitutive Beeinflussung der B-Zell-Signalleitung.....	52
Abb. 6.7: CD72/LMP2A-induzierte Ca ²⁺ -Oszillationen benötigen ein funktionelles ITAM.....	55
Abb. 6.8: Schematische Darstellung der chimären CD8-Fusionsproteine.....	58
Abb. 6.9: ITAM-haltige CD8-Fusionsproteine initiieren die BCR-proximale Signalleitung.....	59
Abb. 6.10: ITAM-tragende CD8-Fusionsproteine werden in Abhängigkeit der CD8-Kreuzvernetzung tyrosinphosphoryliert.....	60
Abb. 6.11: CD8-Fusionsproteine sind Ca ²⁺ -kompetent.....	61
Abb. 6.12: BCR-abhängige BZLF1-Expression.....	63
Abb. 6.13: LMP2A induziert die Expression des viralen <i>bzlf1</i> -Gens.....	64
Abb. 6.14: Die Aktivierung des pZ-Promotors benötigt ein funktionelles ITAM.....	66
Abb. 6.15: Die Aktivierung des pZ-Promotors durch CD8/LMP2A erfolgt in Abhängigkeit eines externen Stimulus.....	67
Abb. 6.16: LMP2A aktiviert die Transkriptionsfaktoren NFAT/AP-1 und NFκB.....	69
Abb. 7.1: LMP2A ist ein aktivierendes Element der BCR-Signalleitung.....	79

Abb. 9.1: Aminosäuresequenz von FLAG-markiertem LMP2A.....	96
Abb. 9.2: Aminosäuresequenz von CD72/LMP2A.....	97
Abb. 9.3: Aminosäuresequenz von CD8/Ig α	97
Abb. 9.4: Aminosäuresequenz von CD8/Ig β	98
Abb. 9.5: Aminosäuresequenz von CD8/LMP2A.....	98

9.2 Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1: Latenztypen von EBV (KUPPERS, 2003).....	5
Tab. 4.1: verwendete Antikörper.....	20
Tab. 4.2: verwendete Vektoren.....	21
Tab. 4.3: cDNA-Konstrukte.....	22
Tab. 4.4: verwendete Oligonucleotide.....	23
Tab. 4.5: verwendete Bakterienstämme.....	24
Tab. 4.6: verwendete DT40-Zelllinien.....	24
Tab. 5.1: Standard-PCR-Ansatz.....	31
Tab. 5.2: Standard-PCR-Programm.....	31
Tab. 5.3: Einstellungen des Luminometers.....	44

9.3 Aminosäuresequenzen

FLAG-markiertes LMP2A

```

MGSLEMVPMGAGPPSPGGDPDGYDGGNNSQYPSASGSSGNTPTPPNDEER  50
ESNEEPPPPYEDPYWGNGDRHSDYQPLGTQDQSLYLGLQHDGNDGLPPPP 100
YSPRDDSSQHIYEEAGRGSMNPVCLPVIVAPYLFWLAAIAASCFTDYKDD 150
DDKLDYKDDDDKDYKDDDDKASVSTVVTATGLALSLLLLAAVASSYAAAQ 200
RKLLTPVTVLTAVVTFFAICLTWRIEDPPFNSSLFALLAAAGGLQGIYVL 250
VMLVLLILAYRRRWRLTVC GGIMFLACVLVLI VDAVLQLSPLLGA VTVV 300
SMTLLLLAFVLWLS SPGGLGTLGAALLTLAAALALLASLILGTLNLTTFM 350
LLMLLWTLVLLICSSCSSLKILLARFLYALALLLLASALIAGGSI 400
LQTNFKSLSSSTEFIPNLFCMLLLIVAGILFILAILTEWGS GNR TYGPVFM 450
CLGGLLTMVAGAVWLTVM SNTLLSAWILTAGFLIFLIGFALFGVIRCCRY 500
CCYYCLTLESEERPPTPYRTTV*

```

Abbildung 9.1: Aminosäuresequenz von FLAG-markiertem LMP2A

Die Aminosäuresequenz von FLAG-markiertem LMP2A ist in schwarz dargestellt. Das dreifache FLAG-Epitop ist blau markiert.

CD72/LMP2A

MGSLEMVPMGAGPPSPGGDPDGYDGGNNSQYPSASGSSGKTPTPPNDEER 50
ESNEEPPPPYEDPYWGNDRHSDYQPLGTQDQSLYLGLQHDGNDGLPPPP 100
YSPRDDSSPHIYEEAGRGSMSNFLLGLLLSCLMLGVAVICLGVRYLQVS 150
QQFQEGTRIWEATNSSLQQQLREKISQLGQKEVELQESQKELISSQDTLQ 200
EKQRTHKDTEQQQLQACQAERAKTENLNKTEEERRRDLQRLTSTRETLRR 250
LSSCSSDTCCPCGWIPYQERCIFYISHTLRSLEESQKYCTSLSSKLAAFDE 300
PSKYYYEVSLPSGLEELLDRSKSYWIQMSKKWRHDYDSQSRYCDKIKKYY 350
QKWKRTFSECAELHPCICESEAFRFPDGIHLN*

Abbildung 9.2: Aminosäuresequenz von CD72/LMP2A

Die Aminosäuresequenz von LMP2A ist in schwarz dargestellt. Die substituierten Tyrosinreste sind in rot hervorgehoben. Die murine CD72-Aminosäuresequenz ist blau dargestellt, verbindende Aminosäuren in grau.

CD8/Ig α

MALPVTALLLPLALLLHAARPSQFRVSPLDRTWNLGETVELKCQVLLSNP 50
TSGCSWLFQPRGAAASPTFLLYLSQNKPKAAEGLDTQRFSGKRLGDTFVL 100
TLSDFRRENEGYFYFCSALSNSIMYFSHFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAP 150
TIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSL 200
VITLYCNHRVWQNEKFGVDMPPDDYEDENLYEGLNLDDCSMYEDISRGLQ 250
GTYQDVGNLHIGDAQLEKNS*

Abbildung 9.3: Aminosäuresequenz von CD8/Ig α

Die Aminosäuresequenz von humanem CD8 α ist schwarz markiert. Die humane Ig α -Aminosäuresequenz ist in blau dargestellt, verbindende Aminosäuren in grau.

CD8/Ig β

```

MALPVTALLLPLALLLHAARPSQFRVSPLDRTWNLGETVELKCQVLLSNP  50
TSGCSWLFQPRGAAASPTFLLYLSQNKPKAAEGLDTQRFSGKRLGDTFVL 100
TLSDFRRENEGYYYFCSALSNSIMYFSHFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAP 150
TIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSL  200
VITLYCNHRVPDKDDGKAGMEEDHTYEGLNIDQTATYEDIVTLRTGEVKW 250
SVGEHPGQEMNS*

```

Abbildung 9.3: Aminosäuresequenz von CD8/Ig β

Die Aminosäuresequenz von humanem CD8 α ist schwarz markiert. Die humane Ig β -Aminosäuresequenz ist in blau dargestellt, verbindende Aminosäuren in grau.

CD8/LMP2A

```

MALPVTALLLPLALLLHAARPSQFRVSPLDRTWNLGETVELKCQVLLSNP  50
TSGCSWLFQPRGAAASPTFLLYLSQNKPKAAEGLDTQRFSGKRLGDTFVL 100
TLSDFRRENEGYYYFCSALSNSIMYFSHFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAP 150
TIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSL  200
VITLYCNHRVPMGAGPPSPGGDPDGYDGGNNSQYPSASGSSGNTPTPPND 250
EERESNEEPPPPYEDPYWNGDRHSDYQPLGTQDQSLYLGLQHDGNDGLP 300
PPPYSPRDDSSQHIYEEAGRSMNS*

```

Abbildung 9.3: Aminosäuresequenz von CD8/LMP2A

Die Aminosäuresequenz von humanem CD8 α ist schwarz markiert. Die LMP2A-Aminosäuresequenz ist in blau dargestellt, verbindende Aminosäuren in grau. Die substituierten Tyrosinreste sind in rot hervorgehoben.

Lebenslauf

Gökhan Yigit

Geburtsdatum 03. Juni 1979
Geburtsort Gelsenkirchen
Familienstand ledig
Nationalität türkisch

Schulbildung

1985-1989 Grundschule An der Turfstraße, Gelsenkirchen
1989-1998 Max-Planck-Gymnasium, Gelsenkirchen
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Studium

1998-2004 Studiengang Biochemie an der Universität Bielefeld
Diplomarbeit in der Abteilung Biochemie und Molekulare Immunologie, Fakultät für Chemie, Universität Bielefeld, Prof. Dr. J. Wienands
Titel: Etablierung eines neuen Modellsystems zur Untersuchung des viralen LMP2A-ITAMs in seiner physiologischen Orientierung
12.03.2004 Abschluss: Diplom Biochemiker

Berufserfahrung

06/2004-09/2004 Wissenschaftlicher Angestellter in der Abteilung Biochemie und Molekulare Immunologie, Fakultät für Chemie, Universität Bielefeld, Prof. Dr. J. Wienands
Seit 10/2004 Wissenschaftlicher Angestellter in der Abteilung Zelluläre und Molekulare Immunologie, Georg-August-Universität Göttingen, Prof. Dr. J. Wienands

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die vorliegende Dissertation selbständig und ohne unzulässige Hilfe Dritter unter ausschließlicher Nutzung der aufgeführten Materialien, Methoden und Literaturquellen an der Universität Bielefeld und an der Georg-August-Universität Göttingen unter der Leitung von Prof. Dr. Jürgen Wienands angefertigt zu haben. Diese Arbeit ist noch nicht zur Promotion eingereicht.

Göttingen, den 04.02.2008

Gökhan Yigit

