

Reaktion des Epstein-Barr Virus und seiner Wirtszelle B95-8
auf die Überexpression der extrazellulär-regulierten Kinase 3 (p97)

Von der Medizinischen Fakultät
der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen
zur Erlangung des akademischen Grades
einer Doktorin der Medizin
genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Anne Caroline Kaufmann

aus

Düsseldorf

Berichter: Herr Universitätsprofessor
Dr. med. Klaus Ritter

Herr Privatdozent
Dr. med. Sebastian W. Lemmen

Tag der mündlichen Prüfung: 16. Mai 2006

„Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek
online verfügbar.“

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1 Das Epstein-Barr Virus.....	1
1.2 Epidemiologie des Epstein-Barr Virus	1
1.3 Reaktivierung des Epstein-Barr Virus	2
1.4 Mechanismen der EBV-Reaktivierung.....	2
1.5 ERK3	3
1.6 Ziel und Arbeitsprogramm	4
2. Material und Methoden.....	6
2.1 Material.....	6
2.1.1 Geräte.....	6
2.1.2 Zelllinien.....	6
2.1.3 Plasmide.....	7
2.1.4 Bakterienstämme	8
2.1.5 Oligonukleotide	9
2.1.5.1 Primer (Sigma, ARK)	9
2.1.5.2 Hybridisierungs-Sonden (TIB Molbiol)	9
2.1.6 Antikörper.....	10
2.1.7 Kits und Chemikalien	11
2.2 Methoden	13
2.2.1 Zellkulturtechniken.....	13
2.2.1.1 Kultivierung von Bakterien	13
2.2.1.2 Herstellung von Glycerin „Stabs“	13
2.2.1.3 Kultivierung eukaryotischer Zellen	14
2.2.1.4 Quantifizierung eukaryotischer Zellen	14
2.2.2 Plasmidpräparation aus <i>E. coli</i>	14
2.2.3 Ethanol-fällung	15
2.2.4 Quantifizierung von DNA und RNA.....	15
2.2.5 Isolierung von Gesamt-DNA.....	16
2.2.6 Isolierung von Gesamt-RNA	16
2.2.7 Spaltung der DNA mit DNase I in RNA Lösungen	16
2.2.8 Reverse Transkription.....	17
2.2.9 Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen	17

2.2.10	Polymerase-Ketten Reaktion (PCR).....	18
2.2.10.1	Konventionelle PCR.....	18
2.2.10.2	Real time PCR.....	19
2.2.11	Sequenzieren von DNA.....	23
2.2.12	Agarose-Gelelektrophorese.....	25
2.2.13	Methoden der DNA-Übertragung auf Bakterien und eukaryotische Zellen.....	26
2.2.13.1	Hitzeschock-Transformation von <i>E. coli</i>	26
2.2.13.2	Transfektion von eukaryotischen Zellen durch Superfect™-vermittelten ...	27
	Transfer	27
2.2.14	Immunologische Methoden.....	27
2.2.14.1	Immunfluoreszenztest (IFT).....	27
2.2.14.2	Bestimmung der DNA-Syntheserate.....	29
2.2.14.3	Durchflusszytometrie.....	29
2.2.14.4	Isolierung von Proteinen aus eukaryotischen Zellen.....	30
2.2.14.5	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford (1976).....	31
2.2.14.6	Konzentrieren von Proteinlösungen.....	31
2.2.14.7	Western Blot.....	31
2.2.14.7.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	32
2.2.14.7.2	Elektro-Blot.....	35
2.2.14.7.3	Färbung mit Ponceau S.....	36
2.2.14.7.4	Immunblot.....	36
2.2.15	Statistische Auswertung.....	37
3.	Ergebnisse.....	38
3.1	Expression von pcDNA-ERK3 ^{antisense} in B95-8 Zellen.....	38
3.1.1	Präparation des Expressionsvektors pcDNA-ERK3 ^{antisense}	38
3.1.2	Kontrolle der Transfektionseffizienz.....	39
3.1.3	Nachweis der ERK3 (p97)-Überexpression auf Transkriptebene.....	40
3.1.4	Nachweis der ERK3 (p97)-Überexpression auf Proteinebene.....	46
3.2	Untersuchung der Effekte der Überexpression von ERK3 (p97) auf die Reaktivierung des lytischen Zyklus in B95-8 Zellen.....	49
3.2.1	Erhöhung der Transkription von BZLF1 und BRLF1 in ERK3 (p97)-überexprimierenden Zellen.....	49
3.2.2	Expression von EBV-Early Antigen in pcDNA-ERK3 ^{antisense} transfizierten...52	52

B95-8 Zellen	52
3.3 Untersuchung der Signaltransduktionswege bei der ERK3 (p97)-getriggerten Reaktivierung des EBV	54
3.3.1 Expression von 14-3-3 ζ /PLA2 in ERK3 (p97)-überexprimierenden Zellen auf Proteinebene	54
3.3.2 Expression von ERK3 (p97) in SAH, PKB und 14-3-3 ζ /PLA2-überexprimierenden Zellen.....	55
3.4 Untersuchungen von Zellwachstum und Zelldifferenzierung in B95-8- Zellen nach Transfektion mit pcDNA-ERK3 <i>antisense</i> und pcDNA3.1-E.....	60
3.4.1 Modulation der DNA-Syntheserate in ERK3 (p97)-transfizierten Zellen.....	61
3.4.2 Modulation der Oberflächenantigene in ERK3 (p97)-transfizierten Zellen.....	62
4. Diskussion	64
4.1 Die extrazellulär regulierte Kinase 3 (ERK3)	64
4.2 Wirkung der Transfektion von B95-8-Zellen mit pcDNA-ERK3 <i>antisense</i>	67
4.3 Effekte der ERK3 (p97)-Überexpression in B95-8-Zellen.....	69
4.3.1 Expression von ERK3 (p63).....	69
4.3.2 Reaktivierung des lytischen EBV-Zyklus	69
4.3.2.1 Expression der <i>immediate early</i> Gene BZLF1 und BRLF1:	69
4.3.2.2 Expression des delayed early Gens Early Antigen (EA-D).....	70
4.3.3 Untersuchungen zu Wachstumshemmung und Zelldifferenzierung	71
4.4 Untersuchungen der Signaltransduktionswege bei der ERK3 (p97)- getriggerten Reaktivierung des EBV	73
4.4.1 Die Gene SAH, PKB und 14-3-3 ζ /PLA2.....	73
4.4.2 ERK3 (p97)-Überexpression und PLA2-Proteinexpression.....	76
4.4.3 Einfluss der Gene SAH, PKB und 14-3-3 ζ /PLA2 auf die ERK3 (p97)-Expression auf Transkriptebe- ne	76
4.5 Ausblick.....	81
5. Zusammenfassung	82
6. Literaturverzeichnis	84
A Anhang.....	93
Abkürzungsverzeichnis.....	93
Abbildungsverzeichnis	95

Danksagung	97
Lebenslauf.....	98

1. Einleitung

1.1 Das Epstein-Barr Virus

Das Epstein-Barr Virus (EBV) ist ein humanes Herpesvirus, das der Subfamilie γ *Herpesviridae*, Gattung Lymphocryptoviren, angehört. Es wurde 1964 von Anthony Epstein und Yvonne Barr elektronenmikroskopisch in Zellen eines Burkitt-Lymphoms nachgewiesen und nach seinen Entdeckern Epstein-Barr Virus benannt (Barr & Achong, 1964). Epidemiologische Untersuchungen von Gertrude und Werner Henle (1968) zeigten eine weltweite Verbreitung des Virus. Die altersabhängige Durchseuchung ist allerdings regional sehr unterschiedlich.

Das Genom des EBV hat eine Länge von ca. 180.000 Basenpaaren und kodiert für mehr als 100 Proteine (Baer *et al.*, 1984), von denen etwa 30 näher charakterisiert sind. Den meisten EBV-kodierten Proteinen wird eine Rolle im lytischen Vermehrungszyklus zugeordnet. In der Latenzphase werden 11 Gene exprimiert. Dabei handelt es sich um 6 nukleäre Proteine (EBNA1, EBNA2, EBNA3A, EBNA3B, EBNA3C und EBNA-LP), 2 RNAs (EBER1 und 2; EB-encoded RNA) und 3 Membranproteine (LMP1, 2A, 2B) (Liebowitz & Kieff, 1993).

1.2 Epidemiologie des Epstein-Barr Virus

Das Epstein-Barr Virus ist weltweit verbreitet. Mehr als 95 % aller Erwachsenen sind seropositiv. Das Virus wird durch Speichel übertragen und infiziert zirkulierende B-Lymphozyten und Epithelzellen des Oro- und Nasopharynx. Epithelzellen und B-Lymphozyten werden lytisch infiziert; in einigen B-Lymphozyten etabliert sich jedoch eine latente Virusinfektion, die zu einer lebenslangen Persistenz des Virus führt. Diese B-Lymphozyten werden durch das EBV immortal.

Die EBV-Infektion verläuft bei Kindern meist asymptomatisch. Die Infektion von Jugendlichen und Erwachsenen dagegen führt in etwa 50 % der Fälle zu einer klinisch manifesten Erkrankung, die sogenannte *infektiöse Mononukleose* (Pfeiffersches Drüsenfieber), eine selbstlimitierende, lymphoproliferierende Erkrankung (Henle, 1968; Ritter *et al.*, 1994). Das EBV ist nicht nur fähig Zellen zu immortalisieren, sondern ist auch an der onkogenen Transformation der Zellen beteiligt. Es ist mit einigen Tumorerkrankungen wie z.B. dem Burkitt-

Lymphom (Epstein & Achong, 1964), dem Nasopharynxkarzinom (zur Hausen, 1970) und dem Hodgkin-Lymphom, assoziiert.

1.3 Reaktivierung des Epstein-Barr Virus

Das Epstein-Barr Virus kann aus dem Latenzstadium entweder spontan oder durch externe Stimuli reaktiviert in den lytischen Zyklus übergehen. Die lytische Vermehrung des EBV führt zum Zelltod der Wirtszelle. Zahlreiche Substanzen können *in vitro* die Virusreaktivierung induzieren wie z.B. 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetat (TPA) (zur Hausen, 1978), Anti-Ig Antikörper (Daibata, 1993), Kalzium-Ionophore, Natriumbutyrate (Chung *et al.*, 2000), halogenierte Pyrimidine, spezifische Histon Deacetylase (HDAC) Inhibitoren wie TSA (Trichostatin A), das Demethylierungagens Azatyridin, Superinfektion mit HHV6 (Grado-ville, 2002), NF- κ B (Brown *et al.*, 2003) oder Ganglioside (Schaade *et al.*, 2000). LM1 (IV³NeuAc-nLc₄) ist ein Makrophagengangliosid, das eine Rolle bei der Zellerkennung, Zellproliferation und –differenzierung spielt (Schaade *et al.*, 1999). Nach Stimulation von Zellen der Burkitt-Lymphom-Linie Raji mit LM1 wurde Wachstumshemmung, Zelldifferenzierung sowie die Induktion des lytischen Zyklus des EBV beobachtet. Durch *differential-display-RT-PCR* und durch *suppression-subtractive-hybridization-PCR* wurden 35 Gene identifiziert, deren Genexpressionsmuster nach LM1-Behandlung verändert worden war (Schaade *et al.*, 2000; Kleines *et al.*, 2000). Eines dieser Gene kodiert für ERK3, eine extrazellulär regulierte Kinase, die zur Familie der MAP-Kinasen (mitogen-aktivierte-Kinase) gehört.

1.4 Mechanismen der EBV-Reaktivierung

Die Reaktivierung des EBV aus der Latenzphase ist abhängig von der Aktivierung der *immediate-early*-Gene BZLF1, BRLF1 und BFLF4 (Modrow & Falke, 2002). Das BZLF1-Gen kodiert für Zta (ZEBRA), ein sequenzspezifisches DNA-Bindungsprotein, das homolog ist zur Familie der zellulären AP-1 Transkriptionsfaktoren. Zta transaktiviert zahlreiche virale und zelluläre Promotoren über ZREs (*Zta-responsive-elements*) (Baumann *et al.*, 1998) und bindet außerdem an den lytischen Replikationsursprung des EBV, *ori-lyt*, über den die lytische Genomreplikation initiiert wird (Scheepers *et al.*, 1993). Dem BZLF1-Gen sind 2 Promotoren vorgeschaltet, Zp und Rp. Über den Rp-Promotor werden sowohl BZLF1 als auch BRLF1 transkribiert, über Zp nur BZLF1. Das von BRLF1 kodierte Protein Rta ist ebenfalls ein Transkriptionsfaktor, der zusammen mit Zta mehrere frühe virale Gene transaktiviert. Zta und Rta können beide unabhängig voneinander Zp und Rp aktivieren. Für die volle Virusre-

plication werden beide Transaktivatoren benötigt (Feederle *et al.*, 2000). Jedoch sind die Mechanismen zur Aktivierung der beiden Transaktivatoren sehr stark abhängig von der EBV-positiven Zelllinie (Gradoville *et al.*, 2002).

Obwohl die Mechanismen zur EBV-Aktivierung auf viraler Ebene und eine Reihe chemischer Induktoren bereits gut charakterisiert sind, fehlen Kenntnisse über die Induktor-getriggerten Signaltransduktionswege, die zur Aktivierung der *immediate-early*-Gene führen. Ein Modell geht von einer Proteinkinase C (PKC) getriggerten Reaktivierung des lytischen Zyklus über Induktion des viralen *immediate-early*-Gens BZLF1 aus. Die Proteinkinase C ist eine Serin/Threonin-Kinase, die bei Proliferations- und Differenzierungsvorgängen eine Rolle spielt. So ist die PKC auch an der durch TPA und anti-Ig-Antikörper getriggerten EBV-Induktion beteiligt, wenn auch in beiden Fällen direkte Aktivierungswege auf Transkriptionsebene bekannt sind (Shimizu & Takada, 1993). Die Induktion über PKC ist allerdings Zelllinien spezifisch (Gradoville, 2002). In einigen Zelllinien findet die EBV-Reaktivierung PKC-unabhängig statt. Für die anti-Ig vermittelte EBV-Induktion wurde ein Aktivierungsmodell formuliert, das die Tyrosin-Kinase getriggerte Aktivierung von Phospholipase C (PLC) mit anschließender Induktion zweier Signaltransduktionswege durch anti-Ig-Bindung postuliert.

Neben der PKC-getriggerten Aktivierung wurde eine PKC-unabhängige simultane Aktivierung der Rp und Zp Promotoren über HDAC-Inhibitoren beobachtet, was auf eine Regulation der Gen-Expression via Histon-Acetylierung schließen lässt (El-Guindy *et al.*, 2002). Bei der TGF- β 1 getriggerten BZLF1-Induktion wird die Beteiligung unterschiedlicher Signaltransduktionswege diskutiert. So wurde in unterschiedlichen Zelllinien Zusammenhänge sowohl mit PKC- als auch mit dem MAPK Kinase (MEK)-Signalweg beobachtet (Fahmi *et al.*, 2000). Für die TGF- β 1 getriggerte BZLF1-Aktivierung scheint die Bildung eines Smad3/Smad4-c-Jun/c-Fos Komplexes verantwortlich zu sein (Liang *et al.*, 2002).

1.5 ERK3

Die Proteinkinase ERK3, eine extrazellulär regulierte Kinase, gehört zur Familie der mitogen-aktivierten-Proteinkinasen (MAP-Kinasen). MAP-Kinasen sind Serin/Threonin-Proteinkinasen, die in Protein-Kinase-Kaskaden eingebunden sind und an der Übertragung extrazellulärer Signale in den Zellkern beteiligt sind, wo sie durch Phosphorylierung und Aktivierung von Transkriptionsfaktoren Einfluss auf die Regulation der Genexpression nehmen (Pearson *et al.* 2001; Davis, 1995).

Die Proteinkinase ERK3 wurde bisher bei den Spezies Ratte (p63), Mensch (p97; p63) und Maus (p100) entdeckt und untersucht. Die ERK3 der drei Spezies wird prinzipiell in allen Geweben, jedoch vermehrt in der Skelettmuskulatur und im Hirn exprimiert. Die Kinase unterscheidet sich in vielen Punkten von anderen MAP-Kinasen. Sie phosphoryliert keines der bekannten Substrate anderer MAP-Kinasen (Cheng, 1995). Dies lässt darauf schließen, dass ERK3 eine sehr spezifische regulatorische Funktion in der Zelle einnimmt (Cheng, 1996). Darüber hinaus unterscheiden sich ERK3s aller Spezies in ihrem Phosphorylierungsmodus von anderen MAP-Kinasen. ERK3 ist ein sehr instabiles Protein mit einer Halbwertszeit von weniger als 30 Minuten (Coulombe *et al.*, 2003). Über die Funktion von ERK3 ist wenig bekannt. Die Enzyme konnten bis heute keinem bekannten Signaltransduktionsweg zugeordnet werden. Während der Differenzierung von P12- (Phäochromozytom-Zelllinie der Ratte) und C2C12-Zellen (Myoblasten der Maus) wurde eine Stabilisierung von ERK3 mit einhergehender verlängerter Halbwertszeit sowie eine Akkumulation der Kinase beobachtet (Coulombe *et al.*, 2003). Die Expression der stabilisierten ERK3-Form verhindert den Übergang von NIH3T3-Zellen (Fibroblasten der Maus) in die S-Phase. Somit scheint ERK3 zumindest in den Spezies Maus und Ratte eine Rolle bei Zelldifferenzierungsvorgängen zu spielen (Coulombe *et al.*, 2003).

1.6 Ziel und Arbeitsprogramm

Nachdem in vorangegangenen Arbeiten bereits ein Expressionsvektor für ERK3 (p97) hergestellt worden war, der einen Teil der ERK3 (p97)-Sequenz in *antisense*-Richtung enthält (Flosdorff, persönliche Mitteilung), wird in dieser Arbeit die Bedeutung von ERK3 (p97) für die LM1 getriggerte Aktivierung des EBV untersucht

Ziel ist es, zu zeigen, welchen Effekt die Transfektion von EBV-positiven B95-8-Zellen mit dem ERK3 (p97)-Expressionsvektor, pcDNA-ERK3*antisense*, auf die Reaktivierung des lytischen EBV-Zyklus und Differenzierungsvorgänge in transformierten B-Zellen hat.

Dazu sollten folgende Untersuchungen durchgeführt werden:

- Nachweis von Veränderungen in der Expression des Gens ERK3 (p97) auf Transkriptebene und Proteinebene in B95-8-Zellen mittels semiquantitativer RT-PCR und Western Blot-Analyse nach Transfektion von B95-8-Zellen mit pcDNA-ERK3*antisense*.
- Untersuchungen der mit pcDNA-ERK3*antisense* transfizierten B95-8-Zellen auf Expression des viralen *delayed early*-Gens *Early Antigen (EA-D)* und der *immediate early*-Gene BZLF1 und BRLF1 durch Immunfluoreszenztest und semiquantitative RT-PCR.
- Charakterisierung der Funktion von ERK3 (p97) für die s-Adenosylhomocystein-Hydrolase (SAH), Proteinkinase B (PKB) und 14-3-3/Phospholipase A2 (PLA2)-getriggerte EBV-Reaktivierung mittels semiquantitativer RT-PCR und Western Blot Analyse.
- Untersuchung der mit pcDNA-ERK3*antisense* transfizierten B95-8-Zellen auf Wachstumsverhalten und Zelldifferenzierungsvorgänge von B95-8-Zellen durch Untersuchung der DNA-Syntheserate und der Zellzahl durch BrdU-Test und Zellzählung sowie Analyse ausgewählter Oberflächenantigene mittels Durchflusszytometrie.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

-BioDoc Analyze (Kamera)	-Biometra, Göttingen
-CASY 1, Zellzähler	-Schärfe-System, Reutlingen
-Gene Quant II (Photometer)	-PharmaciaBiotech, Freiburg
-Light Cycler	-Roche, Mannheim
-Microplate Scanning Spectrometer (PowerWave 200)	-Bio-Tek Instruments, USA
-Speed Vac, concentrator 5301	-Eppendorf, Hamburg
-Thermocycler UNO II	-Biometra, Göttingen
-Thermomixer 5436	-Eppendorf, Hamburg
-Transphor electrophoresis unit	-Hoefer, San Francisco, USA
-FACSCalibur	-BectonDickenson, Heidelberg
-ABI-Prism™ 310 Genetic Analyser	-Applied Biosystems, USA

2.1.2 Zelllinien

Zelllinie B95-8 (Müller & Lippman, 1973)

Bei der Zelllinie B95-8 handelt es sich um EBV-Genom haltige Schimpansen-Lymphozyten. In den Zellen findet eine produktive Virusvermehrung statt, bei der nach Lyse der Zellen infektiöse Viren freigesetzt werden.

Zelllinie BJAB

Die humane Zelllinie BJAB ist EBV-Genom negativ. Sie dient in meiner Arbeit als Negativkontrolle für EBV spezifische Immunfluoreszenztests. Die Zellen wurden freundlicherweise

von Frau Prof. Dr. S. Modrow, Institut für Medizinische Mikrobiologie der Universität Regensburg, zur Verfügung gestellt.

2.1.3 Plasmide

pcDNA3.1-E

Das Plasmid pcDNA 3.1-E ist ein 5,4 kb großer Expressionsvektor für eukaryotische Zellen. In diesen Vektor ist die Klonierung eines Gens von Interesse möglich. Zur Selektierung und Identifizierung trägt das Plasmid ein Ampicillin-Resistenz-Gen. Der Leervektor 3.1-E fungiert als Negativkontrolle bei Transfektionen mit pcDNA 3.1-E Derivaten, die ein Gen tragen, dessen Überexpression gezeigt werden soll.

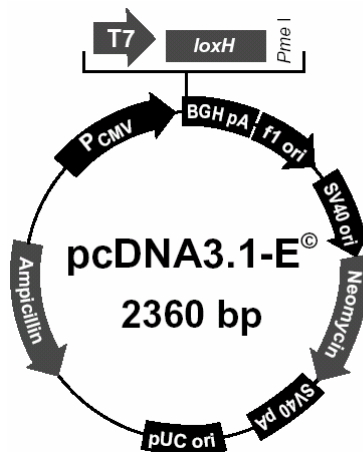


Abb. 2.1: pcDNA 3.1-E

pcDNA-AHCY

Der Expressionsvektor pcDNA-AHCY ist ein Fusionsvektor aus pUni/V5-His-TOPO und pcDNA3.1-E. In dem Expressionsvektor ist das Gen *AHCY* enthalten, das für das Enzym S-Adenosylhomocystein-Hydrolase kodiert. Zu Selektions- und Identifizierungszwecken enthält der Vektor außerdem ein Kanamycin-Resistenzgen.

pcDNA-ERK3antisense

Der Expressionsvektor pcDNA-ERK3antisense ist ein Derivat des Vektors pcDNA3.1/V5-His-TOPO, in den ein Teil des Gens ERK3 (p97) in antisense-Richtung kloniert wurde. ERK3

kodiert für die extrazellulär regulierte Kinase 3. Zusätzlich enthält der Expressionsvektor ein Ampicillin-Resistenzgen.

pcDNA-PLA2

Der Expressionsvektor pcDNA-PLA2 ist ein Derivat des Vektors pcDNA3.1/V5-His-TOPO, in den das Gen PLA2, welches für das Enzym Phospholipase A2 kodiert, kloniert wurde. Der Vektor enthält zusätzlich ein Ampicillin-Resistenzgen zur Selektion und Identifizierung.

pcDNA-rac

Der Expressionsvektor pcDNA rac ist ein Derivat des Fusionsvektors aus pUni/rac5 und pcDNA3.1-E, in welchen das *rac*-Gen kloniert ist. Das *rac*-Gen kodiert für die Proteinkinase B. Zur Selektion und Identifizierung enthält er ein Ampicillin-Resistenzgen.

pCMVZ (Labor Schwarzmann, Regensburg)

pCMVZ ist ein 4,5 kb großes Plasmid, das sich vom pUC18-Vektor ableitet. Es enthält den Replikationsursprung des Plasmids Col E1. Darüber hinaus verfügt es über ein Ampicillin-Resistenz-Gen und einige virale Sequenzen wie z.B. den Replikationsursprung der Polyoma Viren. Zusätzlich enthält es eine Expressionskassette für das EBV-Gen BZLF1.

2.1.4 Bakterienstämme

One Shot Top10 –*E. coli* (Invitrogen)

One Shot Top 10 –*E. coli* sind chemisch kompetente Zellen, die für Transformationsreaktionen eingesetzt werden.

Genotyp:

F mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 deoR recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG

2.1.5 Oligonukleotide

2.1.5.1 Primer (Sigma, ARK)

Amp 3'	(10 pmol/ μ l)	18 mer	5' gaa ctg gat ctc aac agc 3'
Amp 5'	(10 pmol/ μ l)	19 mer	5' gct aga gta agt agt tgc 3'
BRLF1 3' (außen)	(10 pmol/ μ l)	19 mer	5' gtt cca gac tat ggt ctc g 3'
BRLF1 5' (außen)	(10 pmol/ μ l)	19 mer	5' ctg cta tcc aag gct gtt c 3'
BZLF1-NEST3'	(10 pmol/ μ l)	20 mer	5' cag tct ccg aca taa ccc ag 3'
BZLF1-NEST5'	(10 pmol/ μ l)	20 mer	5' ggc aca tct gct tca aca gg 3'
ERK3-kurz3'	(10 pmol/ μ l)	19 mer	5' aca tga gga agg att tct g 3'
ERK3-kurz5'	(10 pmol/ μ l)	19 mer	5' gat aaa tgt ctg ctg agt g 3'
GAPDH-A	(10 pmol/ μ l)	24 mer	5' cgg agt caa cgg att tgg tgc tat 3'
GAPDH-B	(10 pmol/ μ l)	24 mer	5' agc ctt ctc cat ggt ggt gaa gac 3'

2.1.5.2 Hybridisierungs-Sonden (TIB Molbiol)

GAPDH-Hyb-3' (LCRed-markiert)	(8 μ M)	23 mer	5' gag atc cct cca aaa tca agt gg 3'
GAPDH-Hyb-5' (Fluoreszenz-markiert)	(8 μ M)	21 mer	5' ccc atc acc atc ttc cag gag 3'

ERK3-kurz-3' (Fluoreszenz-markiert)	(8 µM)	22 mer	5' gat tcc tca caa aac ata cag c 3'
ERK3-kurz-5' (LCRed-markiert)	(8 µM)	19 mer	5' gca ttc tga aac atc tga a 3'

2.1.6 Antikörper

Maus anti-EBV-EA-D, (R3)	-Applied Biosystems
Kaninchen anti-Maus-IgG, FITC	-Dako, DK
Kaninchen anti-β, ζ 14-3-3 Protein, polyklonal	-Upstate Biotechnology
Schwein anti-Kaninchen-IgG, HRP	-Dako, DK
Kaninchen anti-ERK3-I-15, polyklonal	-Santa Cruze Biotechnology
Schwein anti-Kaninchen-IgG, HRP	-Dako, Denmark
Ziege anti-ERK3-C19, polyklonal	-Santa Cruze Biotechnology
Kaninchen anti-Ziege-IgG, HRP	-Dako, Denmark
Anti-human CD30, FITC	-PharMingen, San Diego
Anti-human CD40, FITC	-PharMingen, San Diego
Anti-CD44 (Leu TM -44), FITC	-Becton Dickinson, USA
Anti-human CD11a/LFA-1, PE	-PharMingen, San Diego
Anti-CD54 (Leu TM -54), PE	-Becton Dickinson, USA
Anti-CD58 (Leu TM -58), PE	-Becton Dickinson, USA
Anti-CD19, PerCP (467)	-Becton Dickinson, USA
Anti-CD23, APC	-Becton Dickinson, USA

2.1.7 Kits und Chemikalien

100 bp-DNA-Marker (Fragmentgröße 1-3000 bp)	-MBI, Fermentas, St Leon
1 kb-DNA-Marker (Fragmentgröße 250 bp-10000 bp)	-MBI, Fermentas, St Leon
1 M H ₂ SO ₄	-Merck, Darmstadt
β-Mercaptoethanol	-Merck, Darmstadt
ABI PRISM dRhodamine Terminator	-Applied Biosystems, USA
Cycle Sequencing Reaction Kit	-Applied Biosystems
Agarose	-Sigma, Deisenhofen
Ammoniumpersulfat	-Sigma, Deisenhofen
Anorganische Salze	-Sigma, Deisenhofen
Anti-Fading Reagenz	-BAG, Lich
Bam H I	-MBI, Fermentas, St Leon
Bradford Reagenz	-Sigma, Deisenhofen
Cell Proliferation ELISA (BrdU-Test)	-Roche, Mannheim
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	-Sigma, Deisenhofen
Dithiothreitol (DTT)	-Sigma, Deisenhofen
Ethanol	-Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	-Sigma, Deisenhofen
Evans Blue	-Sigma, Deisenhofen
Fetales Kälber Serum	-Sigma, Deisenhofen
Glycin	-Sigma, Deisenhofen
Hind III	-MBI, Fermentas, St Leon.
Isopropanol	-Sigma, Deisenhofen
L-Glutamine (200 mM)	-Sigma, Deisenhofen
LightCycler-FastStart DNA Master SYBR Green I-Kit	-Roche, Mannheim
LightCycler-FastStart DNA Master Hybrid. Probes-Kit	-Roche, Mannheim
Microcon®Centrifugal Filter Devices	-Milipore, Redford
M-Per™Mammalian Extraction Reagenz	-Pierce, Rockford
Methanol	-Merck, Darmstadt
N,N,N',N'-tetramethylethyldiamine (TEMED)	-Serva, Heidelberg
Nicht-essentielle Aminosäuren (100 x)	-Biochrom KG, Berlin
Penicillin-(200 mM)-Streptomycin (1 mg/ml)-Lösung	-Sigma, Deisenhofen
Ponceau S	-Serva, Heidelberg

PVDF Western Blotting Membranes	-Roche, Mannheim
Protease	-Qiagen, Hilden
Puffer Bam H I	-MBI, Fermentas, St Leon
Puffer rot (10 x)	-MBI, Fermentas, St Leon
QIAamp DNA Blood Mini Kit	-Qiagen, Hilden
Qiagen Plasmid Maxi Kit	-Qiagen, Hilden
RNase Inhibitor	-Roche, Mannheim
RNeasy Mini Kit	-Qiagen, Hilden
RPMI-1640 Medium	-Sigma, Deisenhofen
Sartolab P-Filter, 0,2 µm Porengröße	-Sartorius, Göttingen
SOC-Medium	-Invitrogen
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	-Sigma, Deisenhofen
Superfect™ Transfection Reagent	-Qiagen, Hilden
Taq DNA Polymerase	-Qiagen, Hilden
Tris base	-Sigma, Deisenhofen
Tween 20	-Sigma, Deisenhofen
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	-Merck, Darmstadt
Whatman-Papier	-Schleicher & Schuell, Dassel
Xho I	-MBI, Fermentas, St Leon.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkulturtechniken

2.2.1.1 Kultivierung von Bakterien

Bakterien können auf zwei verschiedene Arten kultiviert werden. Bei 37 °C über Nacht in flüssigem LB (Luria Bertani)-Medium schüttelnd oder auf einem durch 1,5 % Agarose verfestigtem LB-Medium.

Zusammensetzung des Luria Bertani-Mediums:

NaCl	1,0 % (w/v)	
Pepton	1,0 % (w/v)	
Hefeextrakt	0,5 % (w/v)	in Aqua bidest.

Die Nährmedien wurden vor Gebrauch autoklaviert. Zur Selektion eines bestimmten *E. coli*-Klons wurde den Medien unmittelbar vor Gebrauch ein Antibiotikum, z. B. Ampicillin oder Kanamycin zugefügt.

Antibiotikum	Konzentration Stammlösung (mg/ml)	Endkonzentration (µg/ml)
Ampicillin	100	100
Kanamycin	20	10

2.2.1.2 Herstellung von Glycerin „Stabs“

Zur Archivierung von *E.coli* wurden 800 µl einer übernacht-Kultur mit 200 µl Glycerin gründlich vermischt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70 °C aufbewahrt.

2.2.1.3 Kultivierung eukaryotischer Zellen

Die Zell-Linien B95-8 und BJAB wurden in 50 ml Zellkulturflaschen bei 37 °C Atmosphäre mit 5 % CO₂ in Wasserdampf gesättigt kultiviert. Als Nährmedium wurde supplementiertes RPMI 1640 – Medium (2.1.7) verwendet. Um einen optimalen Gasaustausch zu gewährleisten, wurden die Kulturflaschen maximal mit 15 ml Zellsuspension gefüllt. Die Zellen wurden einmal in der Woche mit frischem Medium versorgt.

Zusätze für RPMI 1640:

Fetales Kälber Serum (FKS)	10,0 %
Penicillin-(200 mM)-Streptomycin (1 mg/ml)-Lösung	2,0 %
L-Glutamin (200 mM)	2,0 %
Nicht essentielle Aminosäuren (100 x)	0,2 %

Die Zusätze wurden vor Zugabe zu RPMI 1640 steril filtriert.

2.2.1.4 Quantifizierung eukaryotischer Zellen

Für das Zählen der Zellen wurde das Zellzählgerät CASY1 (2.1.1) eingesetzt. Die Zahl der Zellen in den Kulturen wurde in einer 1:200 Verdünnung in 10 ml Casyton gemessen. Die Messung erfolgte in einer 150 µm Kapillare. Das Messprinzip beruht auf einer Widerstandsbestimmung der die Messkapillare durchfließenden Lösung. Der Widerstand am Messpunkt ist abhängig vom Volumen und physiologischem Zustand der Zelle, wobei lebende von toten Zellen unterschieden werden können. Intakte Zellen haben eine Größe von 8-20 µm.

2.2.2 Plasmidpräparation aus *E. coli*

Für die Isolierung kleiner Plasmid–DNA–Mengen (10 µg) wurde eine Minipräparation durchgeführt. Größere Plasmid–DNA–Mengen wurden durch eine Maxipräparation gewonnen. Es wurde bei beiden Methoden nach Herstellerangaben verfahren (2.1.7).

Bei der Minipräparation wurden die Zellwände der Bakterien durch alkalische Lyse aufgelöst. Zum Abbau bakterieller RNA wurde das Lysat mit RNase A behandelt. Zellreste und chromosomale DNA wurden ausgefällt. Zusammen mit einem Puffer hoher Salzkonzentration wurde der Überstand auf eine Nukleinsäure – bindende Säule transferiert. Es folgten Wasch-

schritte zur Eliminierung von Proteinen, Salzen, RNA und anderer Zellkontaminationen. Die Plasmid-DNA wurde mit einem Puffer niedriger Salzkonzentration eluiert. Bei der Maxipräparation wird eine modifizierte Form der alkalischen Lyse vorgenommen. Zunächst wurde die Plasmid-DNA mit Puffern niedriger Salzkonzentration an eine Anionenaustauschersäule gebunden. RNA, Proteine und Zellreste wurden mit Puffern höherer Salzkonzentration entfernt. Die Plasmid-DNA wurde nach Zugabe eines Hochsalzpuffers eluiert. Anschließend wurde eine Ethanol-fällung (2.2.3) durchgeführt.

2.2.3 Ethanol-fällung

Die Fällung der Plasmid-DNA mit Ethanol dient der Reinigung, Konzentrierung oder Änderung der Pufferbedingungen. Der DNA-Lösung wurden 0,1 Volumen 3 M NaAcetat und 2 Volumen eiskaltes absolutes Ethanol (2.1.7) hinzugefügt. Nach vorsichtigem Durchmischen wurde die Lösung 30 Minuten bei 4 °C und 15000 rpm (Tischzentrifuge, 5403, Eppendorf) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 70 % igem Ethanol versetzt und für 10 Minuten bei 4 °C und 15000 rpm (Tischzentrifuge, 5403, Eppendorf) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet luftgetrocknet und anschließend in TE-Puffer oder A. bidest. resuspendiert.

TE-Puffer:	Tris	1 M	10 ml
	Na ₂ EDTA	0,5 M	2 ml
	A. bidest.		ad 1000 ml

2.2.4 Quantifizierung von DNA und RNA

Die Messung der DNA- und RNA-Konzentrationen erfolgte photometrisch mit dem Gene Quant II Photometer (2.1.1).

Eine Extinktion von 1,0 entsprach einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml und einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml.

2.2.5 Isolierung von Gesamt-DNA

Für die Isolierung von DNA aus B95-8-Zellen wurde das QIAmp® DNA Blood Mini Kit (2.1.7) verwendet. Bei der DNA-Isolierung wurde nach Herstellerangaben verfahren. Die Zellyse erfolgte durch Zugabe von Protease (Qiagen); die DNA wurde an eine Säule gebunden. Danach wurden Proteine, RNA und Zellreste durch mehrere Waschschrirte entfernt und die DNA mit AE-Puffer eluiert.

2.2.6 Isolierung von Gesamt-RNA

Für die Isolierung von RNA wurde das RNA Mini Kit (2.1.7) verwendet.

Pro Ansatz wurden 3×10^5 Zellen bei 1600 rpm (Tischzentrifuge, 5415C, Eppendorf) abzentrifugiert. Das Pellet wurde in einem Puffer aufgenommen, der zur Inhibierung von RNasen β -Mercaptoethanol (2.1.7) enthielt. Zur Homogenisierung wurde das Pellet-Puffer-Gemisch auf eine Qiaschredder™- Säule gegeben. Das Lysat wurde auf eine RNA-bindende Säule überführt. Nach mehreren Waschschrirten wurde mit 40 μ l RNase freiem DEPC (2.1.7) Wasser eluiert. Zur Vermeidung von Kontaminationen mit RNasen wurde Handschuhe getragen und doppelt autoklavierte Spitzen benutzt.

2.2.7 Spaltung der DNA mit DNase I in RNA Lösungen

Nach einer Isolierung von RNA (2.2.6) muss davon ausgegangen werden, dass immer noch DNA-Reste im Eluat vorhanden sind. Da diese DNA in späteren PCRs zu falschen Ergebnissen führen kann, wurde die Lösung anschließend mit DNase I, einer Doppelstrang-spezifischen Endonuklease, nach folgendem Schema behandelt.

Pipettierschema:

RNase Inhibitor (40 U/ μ l)	0,5 μ l
10x Puffer für DNase I	5,0 μ l
DNase I (10 U/ μ l)	2,0 μ l
RNase-freies Wasser	2,5 μ l
RNA-Lösung	40,0 μ l

Die Lösung wurde 45 Minuten bei 37 °C inkubiert und zum Stoppen der Reaktion für 10 Minuten auf 95 °C erhitzt.

2.2.8 Reverse Transkription

Um eine PCR durchführen zu können, musste die RNA zunächst in cDNA umgeschrieben werden. Diese Reaktion wird von der Reversen Transkriptase (RT), einer RNA abhängigen DNA-Polymerase, katalysiert. Mit Hilfe des freien 3'-OH Endes eines Primers, der an die RNA bindet, synthetisiert sie so einen homologen DNA-Strang. Als Primer wurden hier Oligo (dt) Primer verwendet, die an den 3'-poly (A)-Schwanz der mRNA binden. Zunächst wurde die DNA-freie RNA 10 Minuten bei 65 °C denaturiert. Der RNA wurde ein Mastermix gemäß dem unten angegebenen Pipettierschema hinzugefügt. Die Umschreibung erfolgte für eine Stunde bei 37 °C. Anschließend wurde der Ansatz für 5 Minuten bei 95 °C erhitzt um die Reaktion durch Denaturierung des Enzyms zu stoppen.

Pipettierschema des Mastermix:

RNase Inhibitor	0,5 µl
10xPuffer RT	4,0 µl
dNTPs	4,0 µl
Oligo(dt)Primer	4,0 µl
Omniscript RT	2,0 µl
RNase freies Wasser	10,5 µl
RNA	15,0 µl

2.2.9 Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen

Zur Identifizierung von Plasmid- DNA wurde eine Spaltung mit Restriktions-Endonukleasen (2.1.7) durchgeführt. Restriktions-Endonukleasen können eine spezifische Basensequenz einer Länge von vier bis acht Basen in doppelsträngiger DNA erkennen und schneiden beide Stränge. Dabei entstehen Fragmente einer vorhersagbaren Größe. Die Restriktion erfolgte nach Herstellerangaben mit enzyspezifischen Reaktionspuffern. Für die analytische Spaltung wurde ein Standardansatz verwendet, der eine Stunde bei 37 °C inkubierte. Das Produkt wurde durch Agarose-Gelelektrophorese (2.2.12) identifiziert.

Standard-Reaktionsansatz:

DNA (200 ng-1 µg)	x µl
Puffer (10x)	1 µl
Restriktionsenzym (10 U/µl)	1 µl
Aqua bidest.	ad 10 µl

2.2.10 Polymerase-Ketten Reaktion (PCR)

Die PCR (*polymerase chain reaction*) ist eine *in-vitro* Methode mit der selektiv definierte Nukleinsäureabschnitte einer Länge bis zu 20 kb amplifiziert werden können. Das Prinzip der Methode ist die Verlängerung von Oligonukleotiden (Primern), die homolog zu den Enden der Ziel-DNA sind. Die doppelsträngige DNA wird denaturiert. An die beiden Enden der jetzt einzelsträngigen Ziel-DNA hybridisiert jeweils ein Primer (Annealing). Die hitzestabile Taq-Polymerase synthetisiert nun in einer Verlängerungsreaktion (Elongation) mit Hilfe von Nukleotiden die komplementären Stränge der DNA-Matrize. Die DNA wird durch Wiederholung der Schritte Denaturierung, Annealing und Elongation exponentiell amplifiziert.

2.2.10.1 Konventionelle PCR

Für die konventionelle PCR in einem Thermocycler mit beheizbarem Deckel (105 °C) wurde das Taq DNA Polymerase Kit (2.1.7) verwendet. Das Gesamtvolumen der PCR-Reaktionen betrug 50 µl.

Standardansatz für die PCR-Reaktion:


DNA	x µl
PCR-Puffer (10x)	5,0 µl
Taq-Polymerase (5U/µl)	0,5 µl
dNTPs (2,5mM)	5,0 µl
3'-Primer (10µM)	2,0 µl
5'-Primer (10µM)	2,0 µl
Aqua bidest.	ad 50,0 µl

Thermocyclerbedingungen für spezifische PCR-Reaktionen:

Ampicillin-PCR:

Das Ampicillin-Resistenz-Gen befindet sich auf vielen Vektoren. Die Ampicillin PCR wurde als Nachweis für eine erfolgreiche Transfektion verwendet.

Amp-PCR; Primer: Amp:

1. 2 min 94 °C
 2. 1 min 94 °C
 3. 45 s 56 °C
 4. 1 min 72 °C
 5. 7 min 72 °C
 6. ∞ 4 °C
-  35 x

2.2.10.2 Real time PCR

Der LightCycler (2.1.1) besteht aus zwei verschiedenen Komponenten: einem Thermocycler und einem Fluorimeter. Zusammen mit diesen beiden Komponenten können Operationen wie Produktanalyse, Quantifizierung und Mutationsanalyse durchgeführt werden. Während die Gesamtlaufzeit einer PCR auf dem konventionellen Thermoblock mehrere Stunden dauert, beträgt die Laufzeit auf dem LightCycler nur ca. 1 Stunde. Die PCR-Reaktion wird in Glaskapillaren mit einem Volumen von maximal 20 µl durchgeführt. Dadurch wird das Oberflächen-Volumen-Verhältnis optimiert und ein schnellerer Wärmeaustausch wird möglich. Die Dauer eines Zyklus beträgt so nur 15-20 Sekunden. Zur Identifizierung des amplifizierten Produkts wird eine Schmelzpunktanalyse am Ende der Amplifikationsreaktion durchgeführt. Die Detektion der amplifizierten Produkte geschieht entweder über Erfassung von Doppelstrang-DNA mit dem Farbstoff SYBR-Green I oder über den Nachweis von PCR-Produkten mit Hilfe von Hybridisierungssonden. Die Detektion von PCR-Amplifikaten mit Hilfe von SYBR Green I erfolgt nach der Elongationsphase. Hier bindet SYBR Green I sequenzunspezifisch an Doppelstrang-DNA (dsDNA). Durch UV-Licht-Bestrahlung wird SYBR Green I

zur Aussendung von Fluoreszenzlicht angeregt. Dieses wird detektiert und ermöglicht die Quantifizierung des PCR-Produkts. Bei den Hybridisierungs-Sonden handelt es sich um zwei mit verschiedenen Farbstoffen markierte sequenzspezifische Oligonukleotide. Diese hybridisieren während des Annealing mit der Zielsequenz. Die SONDENSEQUENZEN werden so gewählt, dass ihre Zielfrequenzen auf dem PCR-Amplifikat unmittelbar benachbart liegen, so dass die Farbstoffe in eine räumliche Nähe gebracht werden. Der Donor-Farbstoff Fluorescein befindet sich am 3'-Ende der ersten Sonde. Durch eine blaue Lichtquelle wird der zur Emission von grünem Licht einer längeren Wellenlänge angeregt. Dieses Licht regt jetzt den Farbstoff LC Red 640 am 5'-Ende der zweiten Sonde an. Der Farbstoff reagiert mit der Aussendung von rotem Fluoreszenzlicht der Wellenlänge 640 nm. Dieses wird vom LightCycler detektiert Für die Durchführung der PCR wurde je nach Detektion-Methode das entsprechenden Kit verwendet: FastStart DNA Master SYBR Green I Kit (2.1.7) und FastStart DNA Master Hybridization Probes-Kit (2.1.7). Beide Kits enthalten einen FastStart Reaktionsmix, der eine modifizierte *Taq* DNA-Polymerase, dNTPs (dUTP anstatt dTTP) 10 x Puffer und 10 mM MgCl₂ enthält. Der Standard-Reaktionsansatz und die cDNA-Proben wurden in die LightCycler-Kapillaren gegeben und mit einem Deckel verschlossen. Die Kapillaren wurden für 15 Sekunden bei 3000 rpm zentrifugiert und anschließend in den Rotor des LightCycler gesetzt.

Standard-Reaktionsansatz für FastStart DNA Master Hybridization Probes:

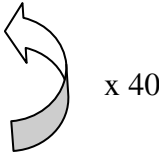
DNA oder cDNA	2,0 µl
FastStart Reaktionsmix	2,0 µl
MgCl ₂ (Enkonzentration 3 mM)	1,6 µl
3'-Fluorescein-markierte Sonde (8 µM)	0,5 µl
5'-LC Red640-markierte Sonde (8 µM)	0,5 µl
3'-Primer (10 µM)	1,0 µl
5'-Primer (10 µM)	1,0 µl
Aqua bidest.	ad 20,0 µl

Standard-Reaktionsansatz für FastStart DNA Master SYBR Green I:


DNA oder cDNA	2,0 µl
FastStart Reaktionsmix	2,0 µl
MgCl ₂ (Endkonzentration 3mM)	1,6 µl
3'-Primer (10 µM)	1,0 µl
5'-Primer (10 µM)	1,0 µl
Aqua bidest.	ad 20,0 µl

Bedingungen für spezifische Light Cycler PCR:


BRLF1-PCR; Primer: BRLF1a:

1.	10 min	95 °C		Denaturierung
2.	0 s	95 °C		Amplifikation
3.	10 s	53 °C		
4.	23 s	72 °C		
5.	0 s	95 °C		
6.	10 s	50 °C		
7.	0 s	99 °C		
8.	1 min	40 °C		Kühlung


Innere BZLF1-PCR; Primer: BZLF1i:

1.	10 min	95 °C		Denaturierung
2.	0 s	95 °C		Amplifikation
3.	10 s	58 °C		
4.	14 s	72 °C		
5.	0 s	95 °C		Schmelzkurve
6.	10 s	50 °C		
7.	0 s	95 °C		
8.	1min	40 °C		Kühlung

GAPDH-PCR; Primer: GAPDH:

1.	10 min	95 °C		Denaturierung
2.	0 s	95 °C		Amplifikation
3.	10 s	56 °C		
4.	13 s	72 °C		
5.	0 s	95 °C		Schmelzkuve
6.	10 s	65 °C		
7.	0 s	95 °C		
8.	1 min	40 °C		Kühlung

ERK3-kurz-PCR; Primer: ERK3-kurz:

1.	10 min	95 °C		Denaturierung
2.	0 s	95 °C		Amplifikation x 40
3.	10 s	54 °C		
4.	11 s	72 °C		
5.	0 s	95 °C		
6.	10 s	40 °C		
7.	0 s	95 °C		
8.	1 min	40 °C		Kühlung

2.2.11 Sequenzieren von DNA

Zur Überprüfung der Identität eines PCR-Produkts wurde eine Sequenzierung durchgeführt. Dabei wurde nach der Didesoxy-Kettenabbruch-Methode nach Sanger *et al.* (1977) vorgegangen. Das Prinzip dieser Methode ist die zufällige Inkorporierung von fluoreszenzmarkierten ddNTP (2', 3'-didesoxy-Nukleosidtriphosphat) anstelle dNTPs (2'-desoxy-Nukleosidtriphosphat) in einen wachsenden DNA-Strang. Der Kettenabbruch kommt durch die fehlenden 3'-OH-Gruppen der ddNTPs zu stande. Diese werden daher auch als Terminatoren bezeichnet. Die Menge der eingesetzten ddNTPs ist sehr gering, Statistisch gesehen findet der Kettenabbruch einmal an jeder Base statt, so dass Fragmente aufsteigender Länge entstehen. Zur Detektion der Terminatoren sind diese mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Die Fragmente des Sequenzierungsansatzes werden im Sequenator (2.1.1) durch Gelelektrophorese (2.2.12) aufgetrennt und an einem Argon-Laser vorbeigeführt, der die Terminatorfarbstoffe der letzten Base anregt. Die Base wird anhand ihres Fluoreszenzspektrums identifiziert. Anschließend erfolgte die Auswertung der Ergebnisse über einen Sequenzvergleich in Datenbanken. Für die Sequenzreaktion wurde der Terminator Ready Reaction Mix aus dem ABI Prism dRhodamine Terminator Reaction Kit (2.1.7) benutzt. Die Auftrennung der Sequenzreaktion erfolgte im ABI Prism[™] 310 Genetic Analyser (Applied Biosystems) durch das Performance Optimized Polymer 6' (Pop[™]-6, ABI Prism) (2.1.1).

Terminator Ready Reaction Mix:

- Desoxynukleosidtriphosphate: Desoxyadenosin-, Desoxycytidin-, Desoxyguanosin- und Desoxythymidintriphosphat (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
- Fluoreszenzmarkierte 2'3'-Didesoxynukleosidtriphosphate (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP)
- Taq-Polymerase, FS, mit temperaturstabiler Pyrophosphatase
- MgCl₂
- Tris/HCl-Puffer, pH 9,0

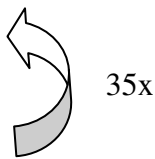
Zusammensetzung der ddNTPs im Terminator Ready Reaction Mix:

Terminator	Akzeptor Farbstoff	Farbe im AB Prism 310 Elektropherogram
ddATP	dR6G	grün
ddCTP	dROX	rot
ddGTP	dR110	blau
ddTTP	dTAMRA	schwarz

Standard-Sequenzierungsansatz:

DNA	200-500 ng
DRhodamin Terminator Reaction Mix	8 µl
Primer (3,2 pmol/µl)	1 µl
A. dest.	ad 20 µl

Thermocycler-Bedingungen:

2 min	96 °C	
30 s	96 °C	
15 s	50 °C	
4 min	60 °C	

Nach der Sequenzreaktion wurde eine Ethanolfällung der PCR-Produkte durchgeführt (2.2.3). Anders als bei der unter 2.2.3 beschriebenen Ethanolfällung wurde das Pellet mit 250 µl 70 % Ethanol gewaschen. Anschließend wurde das Pellet für 5 Minuten bei 30 °C in der Speed Vac-Zentrifuge (2.1.1) getrocknet. Das Pellet wurde in 24 µl Template Suppression Reagent resuspendiert, 2 Minuten bei 95 °C denaturiert, danach 2 Minuten auf Eis gekühlt und in die Sequenzierungsgefäße überführt. Anschließend erfolgte die Sequenzierung der Proben im ABI Prism™ 310 Genetic Analyser (Applied Biosystems).

2.2.12 Agarose-Gelelektrophorese

Die Elektrophorese ist eine gerichtete Bewegung von Ionen im elektrischen Feld und dient der analytischen Auftrennung von Proteinen oder Nukleinsäuren. Agarosegele verfügen über eine definierte Durchlässigkeit für Moleküle. Die Auftrennung erfolgt durch Gelfiltration im elektrischen Feld. Diese Form der Analyse von DNA nach Spaltung mit Restriktionsenzymen oder einer PCR dient dem Nachweis der Größe von DNA -Fragmenten. Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten der Länge 1-15 kb wurden 0,8 %ige TAE-Gele verwendet, für kleinere Fragmente 1,5 %ige TBE-Gele. Den Gelen wurde Ethidiumbromid zugesetzt. Dieses interkaliert mit der α -Helix der DNA und emittiert unter UV-Bestrahlung eine rötliche Fluoreszenz. Für die Herstellung eines 0,8 %igen TAE-Gels wurden 4 g Agarose mit 500 ml 1x TAE-Puffer, für 1,5 %ige TBE-Gele 7,5 g Agarose mit 500 ml 0,5x TBE-Puffer versetzt. Die Lösungen wurden in einer Mikrowelle gekocht, bis sich die Agarose vollständig gelöst hatte. Nach Abkühlung auf 65 °C wurde den Lösungen Ethidium-Bromid (Stammlösung 10 mg/ml) in einer Endkonzentration von 0,1 µg/ml zugegeben. Das flüssige Gel wurde dann in einen Gelträger mit Probenkamm gegossen. Nach 20 Minuten war das Gel auspolymerisiert. Der Kamm wurde entfernt und das Gel in eine Gelkammer gesetzt, welche entsprechend dem Gel

mit 1x TAE-Puffer bzw. 0,5 x TBE-Puffer gefüllt war. Die Proben wurden mit 1/10 Volumen Blaumarker versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Parallel dazu wurde ein Größenmarker aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 5 V/cm Elektrodenabstand bei Raumtemperatur bis zur gewünschten Auftrennung. Anschließend wurde das Gel zur Dokumentation unter UV-Licht (302 nm) fotografiert.

1x TAE-Puffer:	Tris	40 mM
	Essigsäure	40 mM
	EDTA	1 mM

0,5x TBE-Puffer:	Tris	45 mM
	Borsäure	45 mM
	EDTA	1 mM

10x Blaumarker:	Ficoll Polymer	10,0 % (w/v)
	Bromphenolblau	0,25 % (w/v)
	Xylemcyanol	0,25 % (w/v)
	EDTA	0,25 M

2.2.13 Methoden der DNA-Übertragung auf Bakterien und eukaryotische Zellen

2.2.13.1 Hitzeschock-Transformation von *E. coli*

Bei dieser Methode zur DNA-Übertragung werden kompetente Zellen (*E. coli* Top 10, 2.1.4) durch Hitzeschock behandelt.

Je Ansatz wurde ein Reaktionsgefäß kompetenter Zellen auf Eis aufgetaut, um die Kompetenz zu erhalten. 0,5-2-µl Plasmid-DNA wurden vorsichtig mit den Zellen vermischt und 15 Minuten auf Eis inkubiert. In dieser Zeit bindet die DNA an die Zellen. Nach der Inkubationszeit erfolgte der Hitzeschock in einem 42 °C warmen Wasserbad für genau 30 Sekunden. Nachdem der Reaktionsansatz für 2 Minuten auf Eis gestellt worden war, wurden 250 µl auf 37 °C

vorgewärmtes SOC-Medium (2.1.7) hinzugefügt. Das Reaktionsgefäß wurde für eine Stunde bei 37 °C und 225 rpm geschüttelt und anschließend auf Eis gestellt. Je 50 µl und 200 µl eines Ansatzes wurden auf Agar, der zu Selektionszwecken Ampicillin oder Kanamycin enthielt, ausplattiert und über Nacht bei 37 °C bebrütet. Zur Identifizierung des gewünschten Plasmids wurde mit einzelnen Kolonien der Platten eine Minipräparation durchgeführt.

2.2.13.2 Transfektion von eukaryotischen Zellen durch Superfect™-vermittelten Transfer

Diese Methode bedient sich Liposomen, also künstlichen Membranvesikeln, die DNA oder RNA einschließen und durch Fusion mit der Zellmembran in die Zelle schleusen können.

Pro Transfektionsansatz wurden 3×10^5 Zellen für 10 Minuten bei 1600 rpm (Zentrifuge RC 5C Plus, Sorvall) abzentrifugiert und 2 x mit PBS (2.2.14.7.4) gewaschen. Die Ansätze wurden in je 500 µl supplementiertem RPMI-Medium (2.1.7) aufgenommen und in eine Vertiefung einer 24-Loch-Platte überführt. Parallel dazu wurden in 1,5 ml Gefäßen je 60 µl nicht-supplementiertes RPMI-Medium vorgelegt. Pro Gefäß wurden 4 µg pcDNAERK3antisense oder pcDNA3.1-E und 10 µl Superfect™ (2.1.7) hinzugefügt. Es wurden zwei Kontrollansätze mitgeführt, einer mit 5 µl Superfect™, einer ohne Zusätze. Die Ansätze wurden 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, damit sich der DNA/Superfect™-Komplex bilden konnte. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde jedem Ansatz 1 ml supplementiertes RPMI-1640-Medium zugefügt. Durch auf- und ab-Pipettieren wurden die Ansätze vorsichtig durchmischt und tropfenweise in die entsprechende Lochplatte überführt. Nach Zugabe weiterer 500 µl pro Vertiefung wurden die Ansätze bei 37 °C, 5 % CO₂ und 90 % Luftfeuchtigkeit 4, 8 oder 24 Stunden inkubiert.

2.2.14 Immunologische Methoden

2.2.14.1 Immunfluoreszenztest (IFT)

Mit dem IFT können Antigene in Zellen und Geweben oder spezifische Antikörper in Seren nachgewiesen werden.

Bei einem indirekten IFT werden Zellen auf einem Objektträger (OT) fixiert und mit einem Antikörper (primärer Antikörper) überschichtet, der an das gesuchte Antigen bindet. Ein zweiter fluoreszenzmarkierter Antikörper bindet jetzt an den primären Antikörper. Die fluo-

reszierenden Immunkomplexe können durch Anregung mit kurzwelligem Licht ausgewählter Wellenlänge im Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden. Hier wurde der IFT zum Nachweis des „Early Antigen“, einem Antigen, das zu Beginn des lytischen Zyklus exprimiert wird und somit als Indikator für den lytischen Zyklus herangezogen werden kann, in B95-8 Zellen angewendet.

Zunächst wurden 3×10^5 mit pcDNA ERK3antisense und pcDNA 3.1 transfizierte und unbehandelte B95-8 Zellen bei 1600 rpm (Tischzentrifuge, 5415C, Eppendorf) abzentrifugiert, zweimal mit 1 ml PBS gewaschen und danach in 50 µl PBS (2.2.14.1) resuspendiert. Auf jede Öffnung eines fettfreien Objektträger wurden 20 µl Zellsuspension aufgetragen. Unter dem Mikroskop wurde die Zelldichte kontrolliert. Dabei sollten die Zellen auf den Öffnungen des OT möglichst nicht überlappen. Anschließend wurde der OT bei RT luftgetrocknet. Nach dem Trocknen wurden die Zellen 10 Minuten bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ in Aceton fixiert. Der erste Antikörper wurde im Verhältnis 1:500 verdünnt und je 10 µl der Lösung in eine OT-Öffnung pipetiert. Nach 30 minütiger Inkubation in einer feuchten Kammer wurde der OT aufrecht stehend 3 x je 5 Minuten mit PBS in einer Küvette gewaschen. Vor dem Auftragen des zweiten Antikörpers wurden die Zwischenräume mit einem Saugpapier getrocknet. Der zweite Antikörper war FITC-markiert. Er wurde 1: 20 in PBS verdünnt. Auf jede OT-Öffnung wurden 10 µl der Antikörperlösung aufgetragen. Nach erneuter Inkubation von 30 Minuten in einer feuchten Kammer wurde der OT wieder 3 x mit PBS gewaschen. Beim letzten Waschschrift wurde dem PBS ein Tropfen Kontrastmittel (Evans Blue) zugefügt. Zuletzt wurde der OT mit Anti-Fading-Reagenz (2.1.7) eingedeckt; er konnte für mehrere Tage bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert werden.

Early Antigen:

- | | |
|----------------------------------|--------|
| 1. Maus anti EBV-EA-D (R3), | 1:500 |
| 2. Kaninchen anti-Maus IgG, FITC | 1:20 |
| | in PBS |

PBS:

- | | | |
|----------------------------------|-------|---------------------|
| NaCl | (w/v) | 8 g |
| KCl | (w/v) | 0,2 g |
| Na ₂ HPO ₄ | (w/v) | 1,44 g |
| KH ₂ PO ₄ | (w/v) | 0,24 g |
| A. bidest | (w/v) | ad 1000 ml (pH 7,4) |

2.2.14.2 Bestimmung der DNA-Syntheserate

Die DNA-Syntheserate kann indirekt als Maß der Zellproliferation herangezogen werden.

Zur Bestimmung der DNA-Syntheserate wurde der Cell Proliferation ELISA (2.1.7) verwendet. Das Prinzip der Untersuchung beruht auf der Detektion der Inkorporation von 5-Bromo-2'-Deoxyuridin (BrdU) in die genomische DNA proliferierender Zellen.

Je 1×10^5 Zellen transfizierter und unbehandelter B95-8 Zellen wurden für 2 Stunden mit einer BrdU-Lösung inkubiert. In dieser Zeit wird BrdU anstelle von Thymidin in die neu synthetisierte DNA eingebaut. Nach Entfernen des Mediums wurden die Zellen fixiert und die DNA durch eine Fixierungs- und Denaturierungslösung denaturiert. Anschließend wurde ein anti-BrdU-POD Antikörper zugegeben, der an das eingebaute BrdU band. Es folgten mehrere Waschschrte und die Zugabe von POD-Substrat. Nach einer Inkubation von 5-30 Minuten bis zu einer deutlich sichtbaren Färbung, wurde die Reaktion mit H_2SO_4 gestoppt und die Absorption mit einem Spektralphotometer bei 430 nm (Referenzwellenlänge 690 nm) gemessen. (Model: Scanning Mutiwell, 2.1.1). Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben.

2.2.14.3 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie dient der Analyse einzelner Zellen auf der Grundlage von Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften. Für die Analyse wurde das FACSCalibur-Analysen Gerät (2.1.1) verwendet. Dieses Gerät enthält ein Flüssigkeitssystem und ein optisches System. Die Zellen werden durch ein unter Druck stehendes Flüssigkeitssystem geleitet und mit konstanter Geschwindigkeit einzeln an einem Laser vorbeigeführt. Das auf die Zellen treffende Licht wird in alle Richtungen gestreut. Dabei wird der größte Teil des auftreffenden Lichts entlang des einfallenden Lichtstrahls gestreut und somit als Vorwärtsstreulicht (Forward Scatter = FSC) bezeichnet. Kleine Zellen streuen weniger als große Zellen. Somit wird das Vorwärtsstreulicht als Maß für die Zellgröße herangezogen. Das im rechten Winkel zum einfallenden Lichtstrahl gestreute Licht dagegen ist überwiegend von der Granularität der Zellen abhängig. Es wird als Seitwärtsstreulicht bezeichnet (side-scatter = SSC). Der Laser kann außerdem an Antikörper gebundene Chromogene zum Aussenden von Lichtquanten anregen. Die Lichtquanten werden verstärkt, in elektrische Impulse umgewandelt und von Sensoren detektiert. Es wurden definierte Oberflächenmoleküle der Zellen von mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markierten Antikörpern gebunden. Das FACSCalibur-Gerät kann vier verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe gleichzeitig detektieren. Die Auswertung erfolgt mit Hilfe des Pro-

gramms CellQuest entweder einzeln im Histogramm oder gegeneinander im DotPlot. Zur Analyse wurden mit pcDNAERK3antisense und mit pcDNA3.1 transfizierte Zellen für 5 Minuten bei 1600 rpm (Tischzentrifuge, 5415C, Eppendorf) abzentrifugiert und anschließend mit 1 ml PBS (2.2.14.1) gewaschen. Das Pellet wurde in 600 µl sterilfiltriertem PBS aufgenommen. Gleichzeitig wurden pro Ansatz in drei FACS-Analysenröhrchen Antikörper vorgelegt. Jedem Röhrchen wurden je 200 µl der Zellsuspension zugefügt. Nach Mischen wurden die Ansätze für 15 Minuten im Dunkeln inkubiert. In dieser Zeit binden die Antikörper an die Oberflächenantigene. Zum Entfernen überschüssiger Antikörper wurden je 2 ml sterilfiltriertes PBS zu den Röhrchen gegeben und 5 Minuten bei 1600 rpm (Heraeus Septatech Megafuge 1.0 Rotor BF 4402/A) abzentrifugiert. Die Pellets wurden in 200 µl sterilfiltriertem PBS aufgenommen und bis zur Messung bei 4 °C im Dunkeln gelagert.

In FACS-Analyse eingesetzte Antikörper

Farbstoff	Röhrchen 1	Röhrchen 2	Röhrchen 3	Volumen
FITC	anti CD 44	anti CD 30	anti CD 40	je 20µl
PE	anti CD 11a	anti CD 54	anti CD 58	je 20µl
PerCP	anti CD 19	anti CD 19	anti CD 19	je 20µl
APC	anti CD 23			je 5µl

2.2.14.4 Isolierung von Proteinen aus eukaryotischen Zellen

Für die Isolierung von Proteinen aus kultivierten Zellen wurde das M-Per™Mammalian Protein Extraction Reagenz (2.1.7) verwendet. Dabei werden die Proteine durch Zell-Lyse isoliert. Bei dem im M-Per™Mammalian Extraction Reagenz enthaltenen Detergenz handelt es sich um 25 mM Bicin-Puffer (pH 7,6). Je 1×10^6 mit pcDNA-ERK3antisense bzw. pcDNA3.1-E transfizierte und unbehandelte B95-8 Zellen wurden 24 Stunden nach Transfektion für 10 Minuten bei 2500 rpm abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde mit 1 ml PBS (2.2.14.7.4) gewaschen. Danach wurden je zwei Ansätze in 50 µl M-Per™Mammalian Extraction Reagenz aufgenommen und 10 Minuten schüttelnd inkubiert. Die Zellreste wurden durch 15 minütige Zentrifugation bei 23.000 x g entfernt. Die Überstände wurden in neue Reaktionsgefäße überführt und bei -20 °C gelagert, das Pellet wurde verworfen.

2.2.14.5 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford (1976)

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde ein Bradford-Test durchgeführt. Zu den verdünnten Proben wird das Bradford Reagenz (2.1.7) gegeben. Dabei bildet sich ein Protein-Farbstoff-Komplex, der ein Absorptionsmaximum bei 595 nm aufweist. Die Höhe der Absorption ist proportional zur Proteinkonzentration. Zunächst wurde eine Standard-Verdünnungsreihe aus Rinderserumalbuminlösung mit Proteinkonzentrationen von 1 µg/ml bis 10 µg/ml hergestellt. 1 ml jedes Standards, 1 ml einer 1:100 Verdünnung der Untersuchungsproben, sowie 1 ml Wasser als Referenz wurden in Küvetten überführt und mit je 1 ml vorher aufgeschütteltem Bradford-Reagenz versetzt. Die Lösungen wurden sorgfältig durchmischt und 5 bis 60 Minuten im Dunkeln inkubiert. Die anschließende Messung erfolgte in einem Spektrophotometer bei 595 nm Wellenlänge. Mit den Werten der Standard-Verdünnungsreihe wurde eine Eichkurve erstellt, aus deren Geradengleichung die Proteinkonzentrationen der Untersuchungsproben berechnet wurden.

2.2.14.6 Konzentrieren von Proteinlösungen

Betrag der Proteingehalt weniger als 200 µg/ml, konnte die Lösung mit Hilfe von Microcon®Centrifugal Filter Devices (2.1.7) konzentriert werden. Mit den Microcon®Centrifugal Filter Devices werden makromolekulare Lösungen aufkonzentriert und entsalzt. Die Proteine werden dabei an eine anisotrope, hydrophile Cellulose-Membran gebunden

Dazu wurden bis zu 0,5 ml einer Proteinlösung auf einen Microcon®-Einsatz (10000 NMWL) gegeben und dieser auf einem Eppendorf-Gefäß platziert. Das Gefäß wurde für 30 Minuten bei 14000 x g zentrifugiert. Der Einsatz wurde nun umgedreht in ein anderes Eppendorf-Gefäß gesetzt und für 3 Minuten bei 1000 x g zentrifugiert. Der Einsatz wurde verworfen und das Proteinkonzentrat mit Lösung aus dem ersten Durchfluss auf 50 µl aufgefüllt. Die aufkonzentrierten Proteinlösungen wurden ebenfalls bei -20 °C gelagert.

2.2.14.7 Western Blot

Beim Western Blot werden gelelektrophoretisch getrennte Proteine von dem Gel auf eine Membran übertragen, auf welcher das gewünschte Antigen immunologisch und/oder durch Anfärben nachgewiesen werden kann.

Die Proteinproben wurden zunächst durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt und auf eine Trägermembran übertragen. Der Erfolg des Transfers wurde durch reversible Färbung der Membran mit Ponceau S nachgewiesen. Die Membran wurde zur Detektion des Zielproteins mit einem für dieses Protein spezifischen Primärantikörper versetzt. Der Primär-Antikörper wurde durch Zugabe eines Enzym-gekoppelten Sekundärantikörpers sichtbar gemacht.

2.2.14.7.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Im SDS-Polyacrylamid-Gel polymerisieren Acrylamid und N,N'-Methylenbisacrylamid in Anwesenheit von freien Radikalen. Die freien Radikale entstammen dem zerfallenden Ammoniumpersulfat. Diese freien Radikale werden durch die Zugabe von N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) stabilisiert. Die physikalischen Gegebenheiten des Gels wurden sowohl durch die Menge Acrylamid/bis-Acrylamid als auch durch das Mengenverhältnis der anderen Komponenten zueinander bestimmt. Das Gel besteht aus 2 Phasen. Die obere Phase ist das Sammelgel, die untere das Trenngel.

Acrylamid Stammlösung:

Acrylamid/bis-Acrylamid 30 % Lösung (Elektrophoreselösung, Sigma)

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

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

Ammonium-Persulfat:	Ammoniumpersulfat (aliquotiert bei -20 °C)	10 % (w/v)
----------------------------	---	------------

Probenpuffer (2 x, denat.):

Sammelgelpuffer	(s.o.)	12,5 ml
30 % SDS	6,0 % (w/v)	10,0 ml
Glycerin	22,3 % (v/v)	10,0 ml
1 %Bromphenolblau	0,003 % (w/v)	1,5 ml
Aqua bidest.		ad 45,0 ml

Der Probenpuffer (2x, denat.) wurde vor Gebrauch mit 10 % (w/v) Dithiothreitol (DTT) versetzt.

Elektrophoresepuffer:

Tris HCL	0,25 M	60,55 g
Glycin	1,9 M	285,27 g
SDS	1 % (w/v)	20 g
Aqua bidest.		ad 2000 ml

Ammoniumpersulfat wurde erst kurz vor Gebrauch aufgetaut. Alle anderen Lösungen waren sterilfiltriert bei 4 °C lagerbar.

Zur Auftrennung der Proteinlösungen wurde ein 13 % iges Polyacrylamidgel (PAA) verwendet. Im folgenden ist die Präparation von 2 Gelen mit 1,5 mm Durchmesser beschrieben.

Trenngel (13 %) für 2 Gele:

Acrylamid-Stammlösung	10,7 ml
Trenngelpuffer (s.o.)	6,27 ml
Aqua bidest.	7,7 ml
TEMED	20 µl
Bromphenolblau 1%(w/v)	33,3µ l
Ammonium-Persulfat	166,7 µl

Sammelgel (5 %) für 2 Gele:

Acrylamid-Stammlösung	1,7 ml
Sammelgelpuffer (s.o.)	2,5 ml
Aqua bidest.	5,8 ml
TEMED	10,0 µl
Bromphenolblau 1%	66,7µl
Ammonium-Persulfat	50,0 µl

Die Trenngelmischung wurde zur Vermeidung von Luftblaseneinschlüssen vor der Polymerisation 2 Minuten mit einer Wasserstrahlpumpe entgast. Unter vorsichtigem Schwenken wurde das Ammonium-Persulfat hinzugefügt. Dadurch wurde die Polymerisation gestartet. Die Lösung wurde bis zu 4/5 in die vorbereitete Gelkammer gegossen und zum Abschluss vor Sauerstoff mit Methanol überschichtet. Nach 30 Minuten war die Trenngellösung polymerisiert und das Methanol konnte entfernt werden. Die Sammelgelmischung wurde ebenfalls entgast. Nach Zugabe von Ammoniumpersulfat wurde die Lösung auf das Trenngel gegeben und der entsprechende Probenkamm eingefügt. Die Polymerisation erfolgte über 20 Minuten. Vor Gebrauch konnten die Gele, eingeschlagen in feuchte Tücher, 1 Woche bei 4 °C gelagert werden. Zur Gel-Elektrophorese wurde das Gel in die Elektrophoresekammer eingespannt. Die Kammer wurde mit Elektrophorese-Puffer (1x) aufgefüllt und der Probenkamm entfernt.

Die Proteinlösungen wurden nach Mischen 10 Minuten bei 95 °C denaturiert. Die errechneten Proteinmengen wurden mit der entsprechenden Menge Probenpuffer und 10 % DTT/Probenpuffer (w/v) versetzt und 10 Minuten bei 95 °C denaturiert. Die Lösungen wurden mittels Hamilton-Spritze auf das Gel aufgetragen. Auf jedes Gel wurde zusätzlich Rainbow™coloured protein molecular weight marker (Amersham Pharmacia Biotech) als Größenmarker aufgetragen, der genauso mit Probenpuffer und DTT versetzt und denaturiert wurde wie die Proteinlösungen. Die Elektrophorese wurde für 1,5 Stunden bei 50 mA durchgeführt, bis die Bromphenolblau-Lauffront des Sammelgels am unteren Gel-Ende austrat. Das Gel wurde vorsichtig aus von den es umgebenden Platten entfernt, das Sammelgel wurde abgetrennt und das Trenngel für den Elektroblot vorbereitet.

2.2.14.7.2 Elektro-Blot

Die im SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden über elektrophoretischen Transfer vom Gel auf eine PVDF-Membran übertragen. Dazu wurde das Gel direkt auf eine vorher mit Methanol angefeuchtete PVDF-Membran (2.1.7) gelegt. Gel und Membran wurde an beiden Seiten von Whatman 3MM-Papier (2.1.7) und je einer grobporösen Schaumstoffplatte in einer Plastikhalterung umschlossen (siehe Abbildung). Um Luftblasen zwischen Membran und Gel zu vermeiden, wurde alles mit Elektrophorese-Puffer überschichtet. Das Konstrukt wurde in den Elektrophorese-Behälter gestellt. In diesem Behälter sind zwei Platin-Elektroden angebracht. Dabei musste die Nitrocellulose-Membran in Richtung der Anode eingesetzt werden. Der Tank wurde mit Blotpuffer aufgefüllt. Über 16 Stunden wandern die Proteine im elektrischen Feld bei 20 V und 400 mA in Richtung Anode und haften auf der Membran.

Blotpuffer:

Tris	25 mM (w/v)	15,125 g
Glycin	192 mM w/v)	72,125 g
Methanol	10 % (v/v)	50,0 ml
A.bidest.		ad 5000,0 ml, pH 8,3

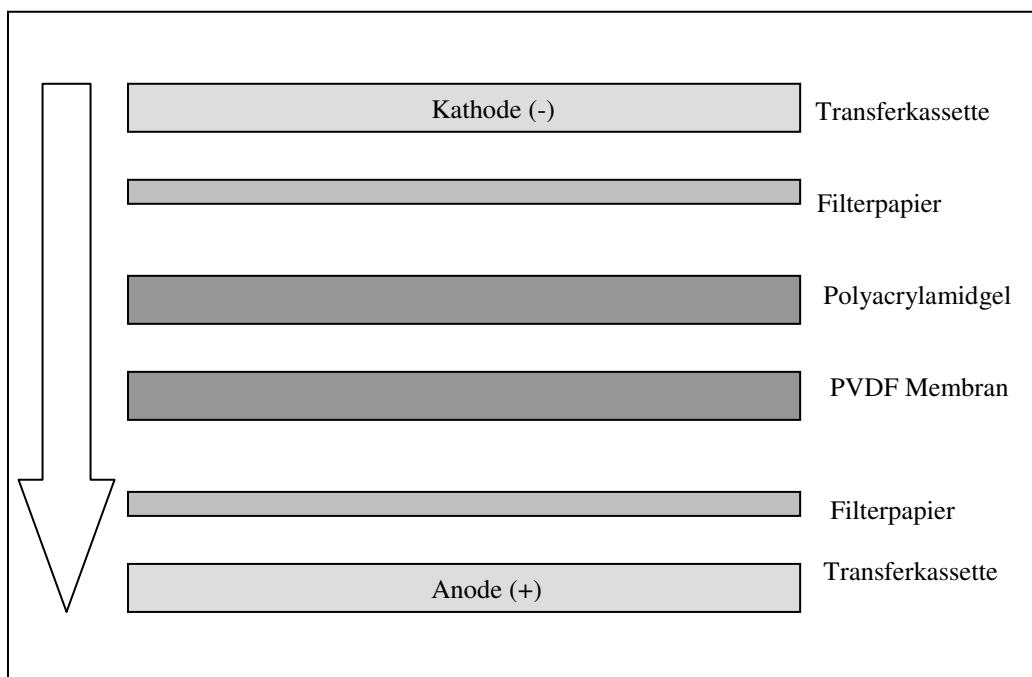


Abb. 2.2: Schematische Abbildung der Komponenten in der Transferkassette für den Western Blot

2.2.14.7.3 Färbung mit Ponceau S

Mit der Protein-Färbung durch Ponceau S-Lösung (2.1.7) können Proteine auf der PVDF-Membran (2.1.7) sichtbar gemacht werden. Die Ponceau-S Färbung ist reversibel und wird durch Wasser wieder entfernt. Die Färbung hat keinen Einfluss auf die spätere Antikörper-Bindung.

Nach dem Elektrobild wurde die feuchte Membran 5 Minuten leicht schwenkend in Ponceau-S-Lösung inkubiert. Nach dem Sichtbarwerden der Banden, wurde die Membran für 20 Minuten leicht schwenkend mit Wasser wieder entfärbt.

2.2.14.7.4 Immunblot

Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen auf der Membran wurde die Membran 30 Minuten in 10 % FKS/PBS (v/v) geschwenkt (Alternativ: TBS (2.2.14.7.4) mit 5 % Magermilchpulver). Es folgte die Inkubation mit dem Primär-Antikörper. Es wurde mit mehreren Antikörpern gearbeitet. Die entsprechenden Verdünnungen und Lösungen sind unten aufgelistet. Der Antikörper wurde in 10 % FKS/PBS (v/v) (Alternativ: TBS mit 5 % MMP) verdünnt. Die Antikörper-Bindung erfolgte in einer Petrischale 1 Stunde lang unter leichtem Schwenken. Nach drei Waschschrritten über 5 Minuten mit Waschpuffer (PBS und TWEEN20 oder TBS und TWEEN 20 (2.2.14.7.4)) erfolgte die Inkubation mit dem zweiten POD-markierten Sekundärantikörper ebenfalls in 10 % FKS/PBS (v/v) (Alternativ: TBS mit 1 % MMP) verdünnt, leicht schwenkend für eine Stunde. Auch hier schlossen sich drei Waschschrritte an. Danach wurde die Membran in POD-Substrat (2.2.14.7.4) geschwenkt. Bei der POD handelt es sich um eine Meerrettich-Peroxidase, die das farblose POD-Substrat zu einer farbigen Substanz reduzieren und somit das gesuchte Zielprotein sichtbar machen kann. Sobald die Banden sichtbar wurden, wurde die Reaktion mit Wasser gestoppt. Danach wurde die Membran getrocknet und im Dunkeln aufbewahrt.

Waschpuffer:

Tween 20	0,05 % (v/v)	5 ml
PBS ⁻		ad 1000 ml

PBS⁻:

KH ₂ PO ₄ [0,2M]	2 mM (v/v)	10,0 ml
Na ₂ HPO ₄ [0,2M]	9 mM (v/v)	45,0 ml

NaCl	180 mM (w/v)	10,52 g
A.bidest.		ad 1000,0 ml, pH 7,2

PBS:

NaCl	(w/v)	8,00 g
KCl	(w/v)	0,20 g
Na ₂ HPO ₄	(w/v)	1,44 g
KH ₂ PO ₄	(w/v)	0,24 g
A.bidest.		ad 1000,0 ml, pH 7,4

TBS (1x):

Tris	(50 mM)	6,05 g
NaCl	(150 mM)	8,76 g
H ₂ O		ad 1000 ml, pH 7,5

POD-Substrat:

Diaminobenzidinhydrochlorid	2 % (w/v)	2 g
Wasserstoffperoxid	(v/v)	200 µl
PBS ⁻		ad 100 ml

Es werden 2 g Diaminobenzidintetrahydrochlorid in 100 ml PBS- gelöst und in Aliquots von 1 ml bei -20 °C gelagert. Ein Aliquot wurde vor Gebrauch aufgetaut und mit 100 ml PBS⁻ verdünnt. Der Lösung wurden zusätzlich 200 µl 3 % Wasserstoffperoxid zugefügt.

2.2.15 Statistische Auswertung

Zur Beurteilung der Aussagekraft von Mittelwertunterschieden zwischen zwei Testpopulationen wurde im Rahmen dieser Arbeit der *Student`s-T-Test* verwendet. Es sollte geprüft werden, ob die Messwerte beider Testpopulationen einer Grundgesamtheit angehören (Nullhypothese). Die Ablehnung der Nullhypothese erfolgte ab einem Signifikanzniveau $p < 0,05$. Bei der behandelten Testpopulation war im Gegensatz zur Kontrollpopulation eine Erhöhung des Messwerts zu erwarten. Aus diesem Grund wurde ein einseitiger Test durchgeführt. Das Verfahren wurde für die p-Wert Erteilung auf den Seiten 46, 51, 53, 59, 60 und 70 dieser Arbeit verwendet

3. Ergebnisse

Voruntersuchungen haben gezeigt, dass das Gangliosid VI³NeuAc-nLcOse₄Cer (LM1) EBV in Raji-Zellen reaktiviert, eine Induktion der Differenzierung und Wachstumshemmung der Raji-Zellen sowie einer Modulation der Transkription von 35 Genen bewirkt (Kleines *et al*, 2000). Bei einem der 35 Gene handelte es sich um ERK3 (extrazellullär-regulierte-Kinase 3) (p97), eine MAP-Kinase (mitogen-aktivierte-Protein-Kinase).

Die Ergebnisse meiner Untersuchungen über den Einfluss von ERK3 (p97) auf die Reaktivierung des lytischen Zyklus des EBV und die Zelldifferenzierung in B95-8 Zellen sowie die Rolle von ERK3 (p97) innerhalb der an diesen Effekten beteiligten Signaltransduktionswegen werden nachfolgend dargestellt.

3.1 Expression von pcDNA-ERK3*antisense* in B95-8 Zellen

Um die Effekte von ERK3 (p97) in EBV-positiven Zellen untersuchen zu können, wurde ein Teil der ERK3 (p97)-Sequenz in *Antisense*-Richtung in einen Expressionsvektor kloniert (Flosdorff, persönliche Mitteilung). Das Genfragment hat eine Länge von 357 bp und umfaßte die Basen 151-519 des ERK3 (p97)-Gens (HSERK3, *Accession number*: X80692). Nach Transfektion von Raji-Zellen mit dem Expressionsvektor pcDNA-ERK3*antisense* wurde eine ERK3 (p97)-Überexpression beobachtet.

In dieser Arbeit wurde pcDNA-ERK3*antisense* verwendet, um die Effekte einer Überexpression von ERK3 (p97) in B95-8 Zellen zu untersuchen.

3.1.1 Präparation des Expressionsvektors pcDNA-ERK3*antisense*

Die ERK3 (p97)*antisense*-Sequenz wurde in den Expressionsvektor pcDNA3.1/V5-His-Topo kloniert (Flosdorff, persönliche Mitteilung). Dieser Vektor enthält zusätzlich ein Ampicillin-Resistenzgen. Der Expressionsvektor wurde als pcDNA-ERK3*antisense* bezeichnet. Um größere Mengen von pcDNA-ERK3*antisense* herzustellen, wurde der Expressionsvektor zunächst durch Hitzeschock-Transformation in *E. coli* One Shot™ Top10 überführt (2.2.13.1). Die den Expressionsvektor enthaltenden Klone wurden in Gegenwart von Ampicillin selektiert. Zur Gewinnung größerer Mengen Plasmid-cDNA wurde eine Maxi-Präparation durchgeführt (2.2.2). Außerdem wurden Glycerin-Präparate der *E. coli* Top10 Klone hergestellt, die bei -70 °C gelagert wurden (2.2.1.2).

Mit der durch die Maxi-Präparation isolierten Plasmid-DNA wurde eine Spaltung mit den Restriktionsenzymen *Hind III* und *Xho I* zur Identifizierung von pcDNA-ERK3*antisense* durchgeführt (2.2.9). Die pcDNA-ERK3*antisense*-Sequenz hat eine Größe von 351 bp. Die Abbildung 3.1 zeigt die Trennung der Restriktionsfragmente nach Spaltung der pcDNA (2.2.9). Es stellt sich ein Fragment mit einer Länge von 357 bp dar, bei dem es sich um die ERK3 (p97)-*antisense*-Sequenz handelt, sowie ein Restriktionsfragment der Länge von 4528 bp, das dem Vektor pcDNA3.1/V5-His-TOPO entspricht. Parallel zur Herstellung von pcDNA-ERK3*antisense* wurden bereits vorhandene Glycerin-Präparate von *E. coli* Top10 Klonen, die den Kontrollvektor pcDNA3.1-E enthielten, vermehrt und die Plasmid-DNA durch Maxi-Präparation isoliert (2.2.2).

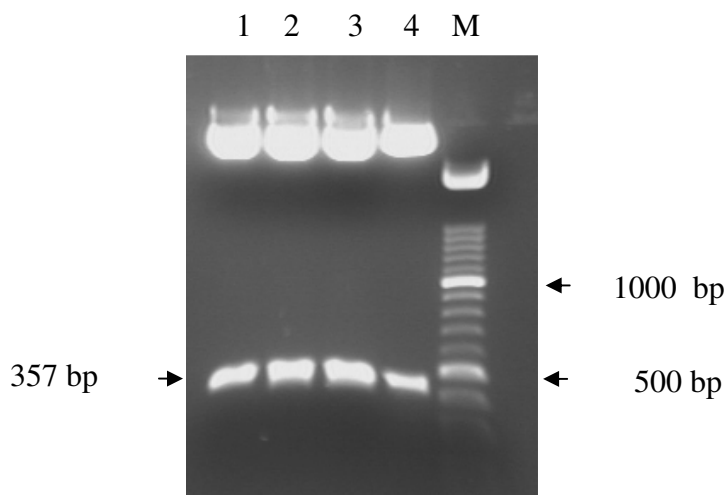


Abb. 3.1: Agarose-Gelelektrophorese von pcDNA-ERK3*antisense* nach Spaltung mit *Hind III* und *Xho I*

M: 100 bp Marker
Spuren1-4: DNA aus unterschiedlichen pcDNA-ERK3 <i>antisense</i> transfizierten Klonen nach Spaltung mit <i>Hind III</i> und <i>Xho I</i>

3.1.2 Kontrolle der Transfektionseffizienz

Mit dem Plasmid pcDNA-ERK3*antisense* und dem Kontrollvektor pcDNA3.1-E wurden B95-8 Zellen transfiziert. Um den Erfolg der Transfektion zu überprüfen, wurde 24 h nach Transfektion (2.2.13.2) aus den transfizierten B95-8 Zellen DNA isoliert (2.2.5). Die DNA wurde in eine Ampicillin-spezifische PCR eingesetzt (2.2.10.1; Primer: 2.1.5.1), mit der das

nur in erfolgreich transfizierten Zellen vorhandene β -Lactamase-Gen (Ampicillin-Resistenzgen) der Vektoren nachgewiesen werden konnte. Die PCR-Produkte wurden durch Agarose-Gelelektrophorese (2.2.12) aufgetrennt. Die erwartete Größe des PCR-Produktes beträgt 420 bp. In Abbildung 3.2 sind die gelelektrophoretisch aufgetrennten PCR-Produkte dargestellt. In allen untersuchten Versuchsansätzen wurde das Ampicillin-Resistenzgen nachgewiesen. Die Transfektion war somit erfolgreich.

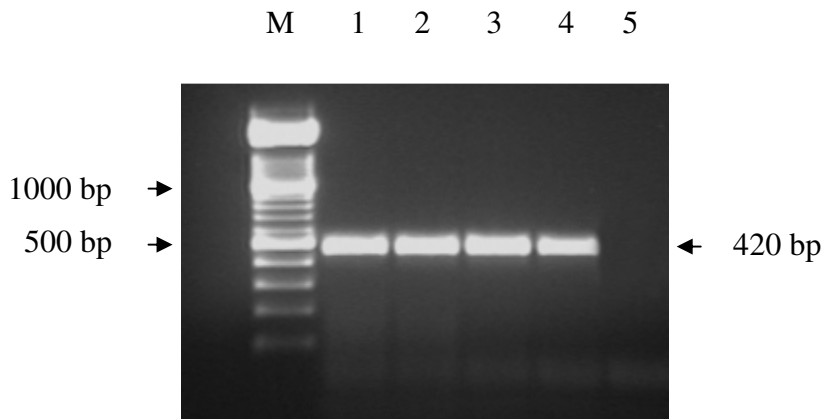


Abb. 3.2: Agarose-Gelelektrophorese von Amplifikaten nach PCR zum Nachweis des Ampicillin-Resistenzgens nach Transfektion von B95-8-Zellen mit pcDNA-ERK3 $antisense$ und pcDNA3.1-E

M: 100 bp Marker
1-2: pcDNA-ERK3 $antisense$ transfizierte B95-8-Zellen
3-4: pcDNA3.1-E transfizierte B95-8-Zellen
5: Negativ-Kontrolle

3.1.3 Nachweis der ERK3 (p97)-Überexpression auf Transkriptebene

Um zu überprüfen, ob die Transfektion von B95-8 Zellen mit pcDNA-ERK3 $antisense$ zu einer Überexpression von ERK3 (p97) führt, wurden 4, 8 und 24 h nach Transfektion (2.2.13.2) von B95-8 Zellen mit pcDNA-ERK3 $antisense$ und pcDNA3.1-E RNA isoliert (2.2.6) und in cDNA umgeschrieben (2.2.8). Die cDNA wurde in eine semiquantitative real time RT-PCR mit ERK3 (p97) spezifischen Primern und fluoreszenzmarkierten Hybridisierungssonden (2.1.5.2) auf dem LightCycler eingesetzt (2.2.10.2; Primer: 2.1.5.1). Die PCR-Produkte sollten durch Schmelzpunktanalyse charakterisiert werden. Der erwartete Schmelzpunkt betrug 55 °C. Allerdings gelang es nicht, für die PCR-Produkte einen Schmelzpunkt zu bestimmen.

Die PCR-Produkte wurden daher elektrophoretisch getrennt (2.2.12). Man erkennt in Abbildung 3.3 Banden der Länge von 220 bp, welche dem zu erwartenden Amplifikat für ERK3 (p97) entsprechen.

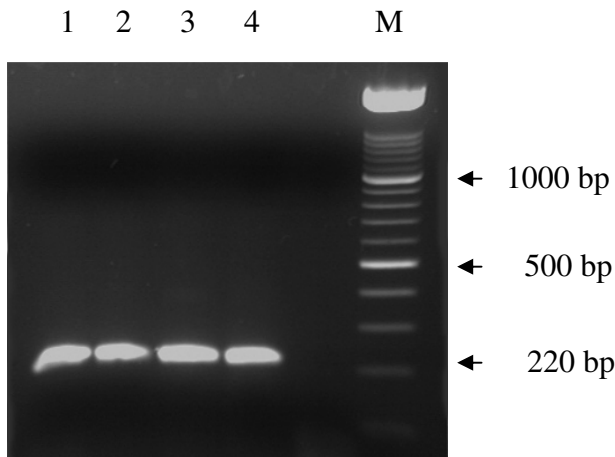


Abb.3.3: Agarose-Gelelektrophorese der Amplifikate nach ERK3 (p97)-PCR

M: 100 bp Marker
1-4: Amplifikate nach ERK3 (p97)-PCR aus mit pcDNA-ERK3 <i>antisense</i> transfizierten B95-8-Zellen

Es wurde vermutet, dass die Sequenz von ERK3 (p97) in der Schimpansenzelllinie B95-8 im Bereich der Bindungsstellen für die Hybridisierungs sonden von der humanen ERK3 (p97)-Sequenz abweicht. Zum Nachweis wurden die PCR-Produkte sequenziert (2.2.11). Die Abbildung 3.4 zeigt ein Chromatogramm nach Sequenzierung des ERK3 (p97)-Amplifikats.

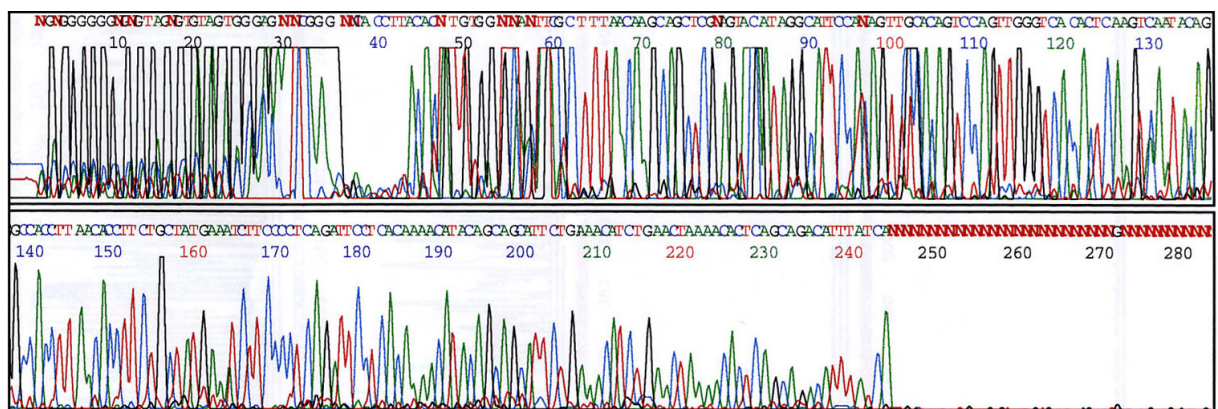


Abb.3.4: Chromatogramm nach Sequenzierung des ERK3 (p97)-Amplifikats.

Daraufhin wurden neue Hybridisierungssonden für die ERK3 (p97)-PCR eingesetzt. Es ließ sich der erwartete Schmelzpunkt bei 55 °C ermitteln (Abbildung 3.6).

Dies zeigt, dass ein ERK3 (p97)-Homolog auch in Schimpansen vorhanden ist, dessen Sequenz sich jedoch von der des humanem ERK3 (p97) unterscheidet. Durch die Verwendung der entsprechenden Hybridisierungssonden konnte nun eine ERK3 (p97)-spezifische PCR für B95-8-Zellen aus Schimpansen etabliert werden.

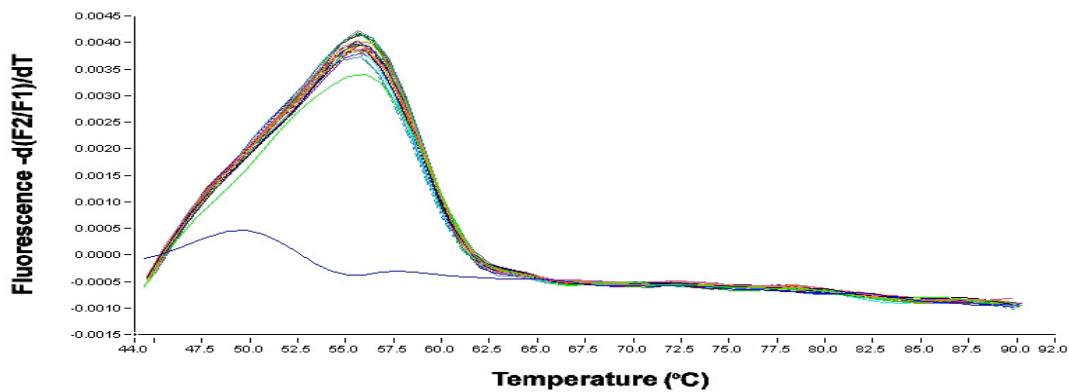


Abb. 3.6: Schmelzpunktanalyse der ERK3 (p97)-Amplifikate. Der charakteristische Schmelzpunkt liegt bei 55 °C

Zur Normierung der ERK3 (p97)-PCR wurde mit denselben cDNA-Populationen eine GAPDH-spezifische PCR (2.2.10.2) mit Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase spezifischen Primern und fluoreszenzmarkierten Hybridisierungssonden durchgeführt (2.1.5.1, 2.1.5.2). GAPDH, Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, ist ein Haushaltsgen, das in allen Zellen vorkommt und zur Normierung der Expression des untersuchten über- oder unterexprimierten Gens herangezogen werden kann. Der für das GAPDH-spezifische PCR-Produkt charakteristische Schmelzpunkt lag bei 65 °C (Abbildung 3.7).

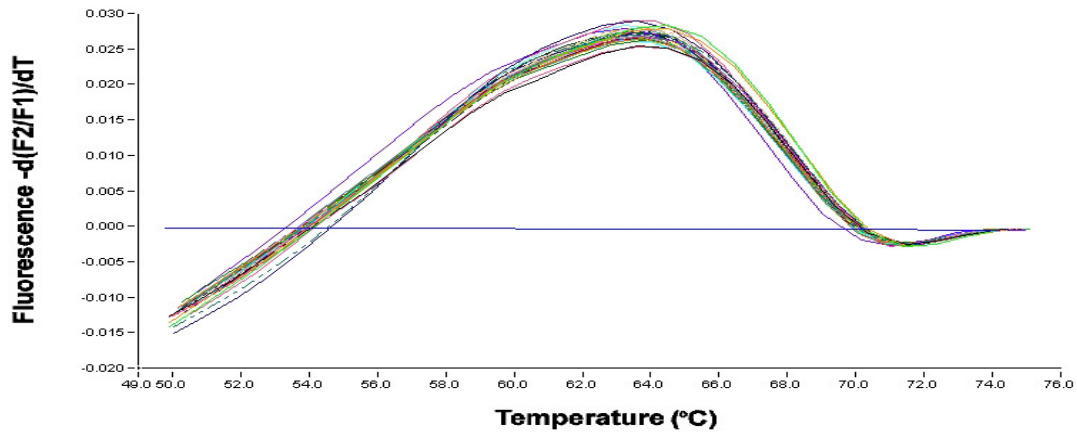


Abb. 3.7: Schmelzpunktanalyse der GAPDH-Amplifikate. Der charakteristische Schmelzpunkt liegt bei 65 °C

Die semiquantitativen Ergebnisse des LightCyclers ermöglichen die Normierung der Expression von ERK3 (p97) auf die Expression des Haushaltsgens GAPDH in B95-8 Zellen. Somit kann die ERK3(p97)-Expression der pcDNA-ERK3*antisense*-transfizierten B95-8 Zellen mit der ERK3 (p97)-Expression der pcDNA3.1-E transfizierten B95-8-Zellen verglichen werden. Zusätzlich zu den zu analysierenden cDNA-Proben wurde eine Standard-Verdünnungsreihe (1:10) des zu amplifizierenden Gens in die PCR auf dem LightCycler eingesetzt (Abbildung 3.8). Bei den cDNA-Proben der Standardverdünnungsreihe handelt es sich um cDNA aus nicht-transfizierten B95-8 Zellen. Das LightCycler Programm erstellt mit Hilfe dieser Standard-Verdünnungsreihe eine lineare Regression, anhand derer die relativen Konzentrationen der zu messenden cDNA-Populationen ermittelt werden können (Abbildung 3.8).

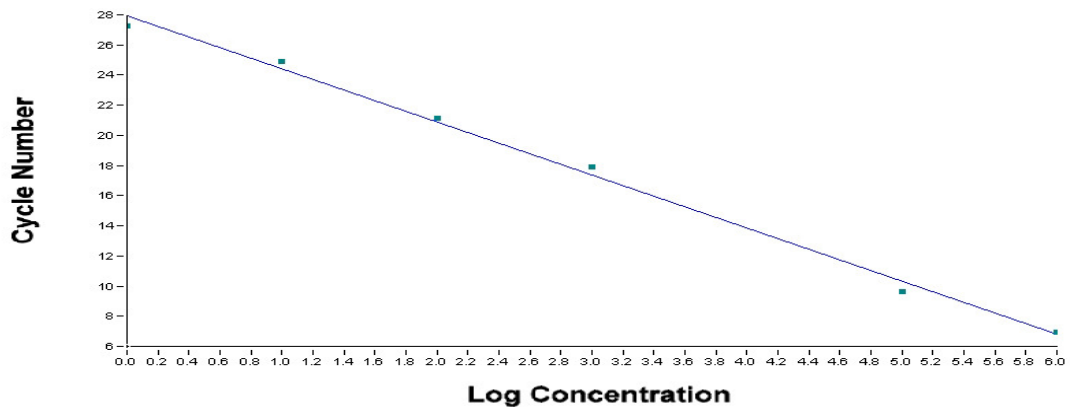


Abb. 3.8: Regressionsgerade, ermittelt aus der Standard-Verdünnungsreihe einer GAPDH-spezifischen PCR auf dem LightCycler

Der Korrelationskoeffizient „r“ sollte als Zeichen für die Validität der Verdünnungsreihe nahe bei 1 liegen und der Fehler (*error*) möglichst klein sein. Der Anstieg der Fluoreszenz während der Amplifikation der PCR-Produkte in einer GAPDH-spezifischen PCR ist in Abbildung 3.8 dargestellt. Die Kurven der Standard-Verdünnungsreihe gehen mit absteigender Konzentration in konstanten Zeitabständen in die logarithmische Phase über. Dies lässt auf eine exakte Verdünnung schließen. Die Konzentrationen der Standard-Verdünnungsreihe sollten im Bereich der Konzentrationen der zu analysierenden cDNA-Proben liegen.

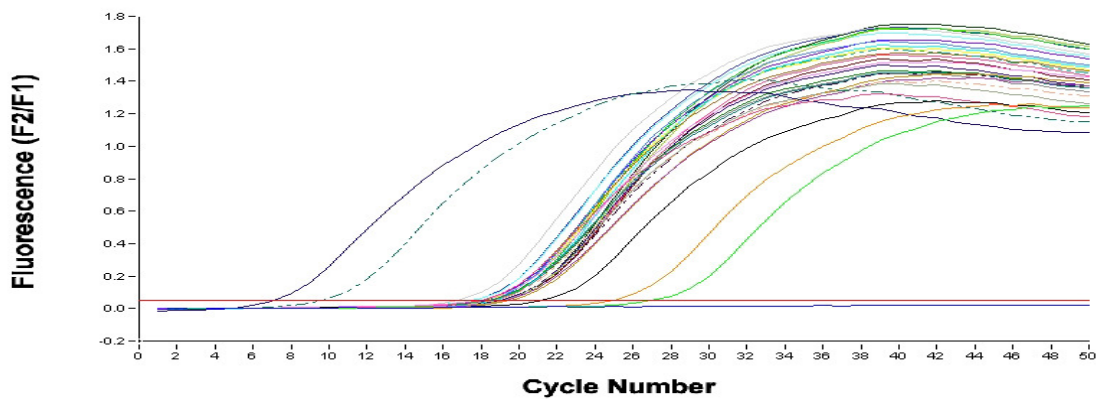


Abb. 3.9: Anstieg der Fluoreszenz während einer GAPDH-spezifischen PCR auf dem LightCycler; die Kurven: blau,türkis-gestrichelt, schwarz, gelb, grün repräsentieren den Amplifikationsverlauf von den Proben der Verdünnungsreihe

Bei einer PCR mit Hybridisierungssonden, sollte sich kein Anstieg der Fluoreszenz der Negativ-Kontrolle zeigen. Die während der PCR entstehenden Primer-Dimere können von den Hybridisierungssonden nicht detektiert werden. Wird in einer PCR dagegen SYBR Green I als Fluoreszenzfarbstoff verwendet (BZLF1-spezifische PCR), kann ein später Fluoreszenzanstieg der DNA-freien Negativ-Kontrolle durch eine unspezifische Bindung von SYBR Green I an Primer-Dimer-Strukturen zustande kommen. Die Konzentration der PCR-Produkte ist negativ korreliert mit der Zykluszahl der Schnittpunkte der Proben mit der Basislinie. Die LightCycler Software erfasst die Schnittpunkte aller Amplifikationsreaktionen und berechnet die relative Konzentration mit Hilfe der Standard-Verdünnungskurve. Der Überexpressionsfaktor von ERK3 (p97) wird mit folgender Formel berechnet:

$$\text{Überexpressionsfaktor} = \frac{\frac{\text{ERK3 (p97) (pcDNAERK3antisense)}}{\text{GAPDH (pcDNAERK3antisense)}}}{\frac{\text{ERK3 (p97) (pcDNA3.1-E)}}{\text{GAPDH (pcDNA3.1-E)}}}$$

In Abbildung 3.10 ist der Expressionquotient für ERK3 (p97) 4, 8 und 24 Stunden nach Transfektion von B95-Zellen unter Verwendung von 4 µg DNA dargestellt.

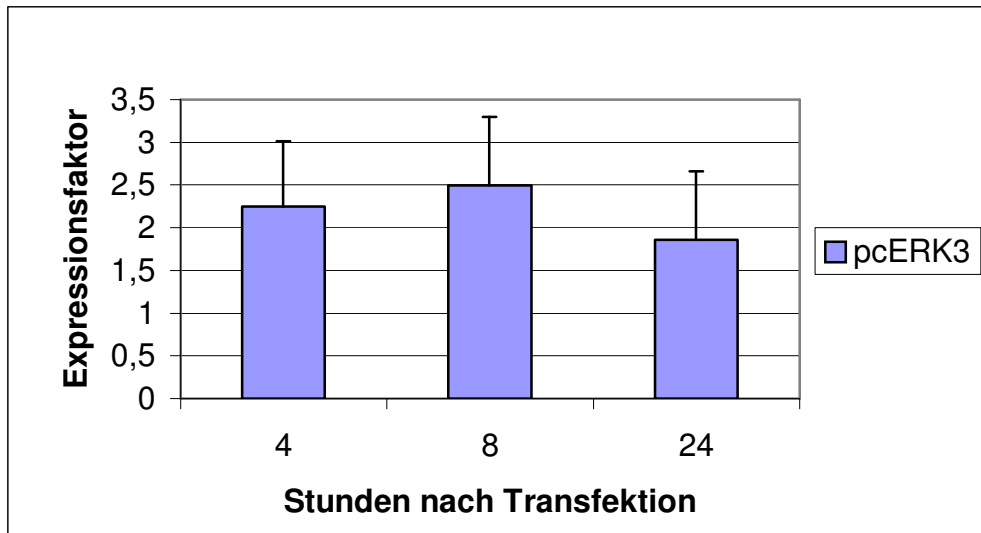


Abb. 3.10: ERK3 (p97)-Überexpression in pcDNAERK3antisense transfizierten B95-8-Zellen 4, 8 und 24 Stunden nach Transfektion (je $p < 0,001$), (Proben $n = 14$)

Das Diagramm zeigt eine signifikante Erhöhung der Expression von ERK3 (p97) nach Transfektion mit pcDNA-ERK3*antisense* um den Faktor 2,3 4 Stunden ($p < 0,001$) und um den Faktor 2,5 8 Stunden ($p < 0,001$) nach Transfektion. Nach 24 Stunden sinkt die Expression von ERK3 (p97) auf den Faktor 1,85 ($p < 0,001$). Dies zeigt, dass die Transfektion von pcDNA-ERK3*antisense* eine Überexpression von endogenem ERK3 (p97) in B95-8 Zellen zur Folge hat.

3.1.4 Nachweis der ERK3 (p97)-Überexpression auf Proteinebene

Um eine ERK3 (p97)-Überexpression auf Proteinebene nachweisen zu können, wurde 4 und 24 Stunden nach Transfektion pcDNA-ERK3*antisense* bzw. pcDNA3.1-E transfizierten und nicht-transfizierten B95-8 Zellen lysiert und die Zellproteine isoliert (2.2.14.4).

Diese Proteinextrakte wurden mittels SDS-Page getrennt. Zur Identifizierung spezifischer Proteine wurde ein Western-Immunblot durchgeführt. Dabei wurde für jede Probe gleichviel Protein (ca. 40 µg) innerhalb eines Western-Blots eingesetzt. Es existieren zwei Isoformen des ERK3 Proteins der Größe 97 kDa, welches in dieser Arbeit untersucht wird, und der Größe 63 kDa.

Für die Detektion der ERK3-Protein-Isoformen standen 2 kommerziell erhältliche Antikörper zur Verfügung: 1. C-19 goat polyclonal IgG, 2. I-15 rabbit polyclonal. In den Abbildungen 3.11 und 3.12 sind die entsprechenden Immunblots dargestellt. Der Antikörper C-19 sollte ein ERK3-Protein der Größe 97 kDa erkennen. Es wurden auch nach mehreren Versuchswiederholungen für keine der aufgetragenen Proben Banden der entsprechenden Größe sichtbar.

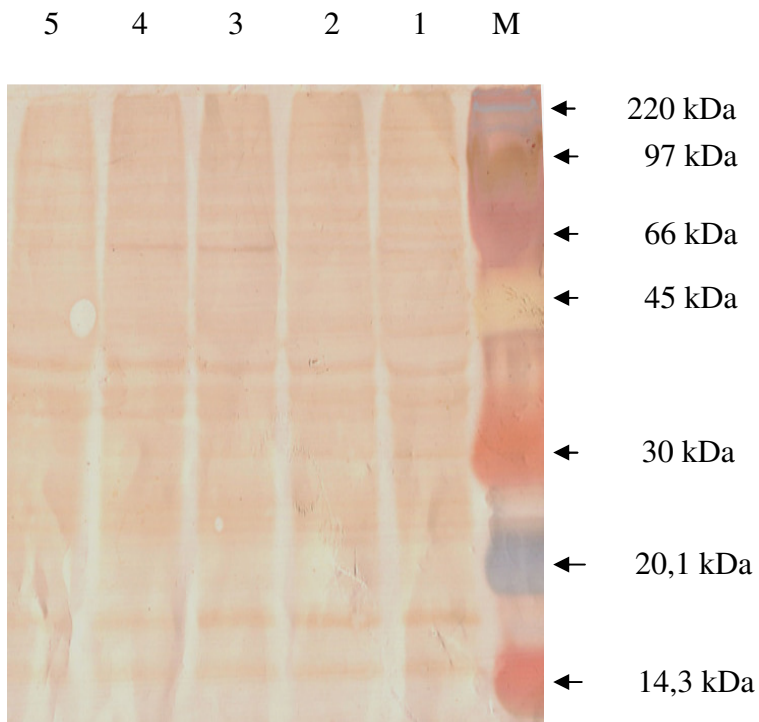


Abb. 3.11: Immunblot: Nachweis des ERK3 (p97)-Proteins durch den Antikörper C-19

M: Molekularmassenmarker
1-2: pcDNA-ERK3 <i>antisense</i> transfizierte B95-8-Zellen
3-4: pcDNA3.1-E transfizierte B95-8-Zellen
5: nicht transfizierte B95-8-Zellen

Der Antikörper I-15 sollte spezifisch für ein 45 kDa Produkt sein. In Abbildung 3.12 erkennt man Reaktionen des Antikörpers mit Antigenen unterschiedlicher Größe in jeder Probe. Neben einer sehr zarten Reaktion bei etwa 45 kDa sind noch zahlreiche weitere Banden nachweisbar. Ganz offensichtlich besitzt der verwendete Antikörper eine geringe Spezifität. Auf eine Auswertung wurde unter diesen Bedingungen verzichtet.

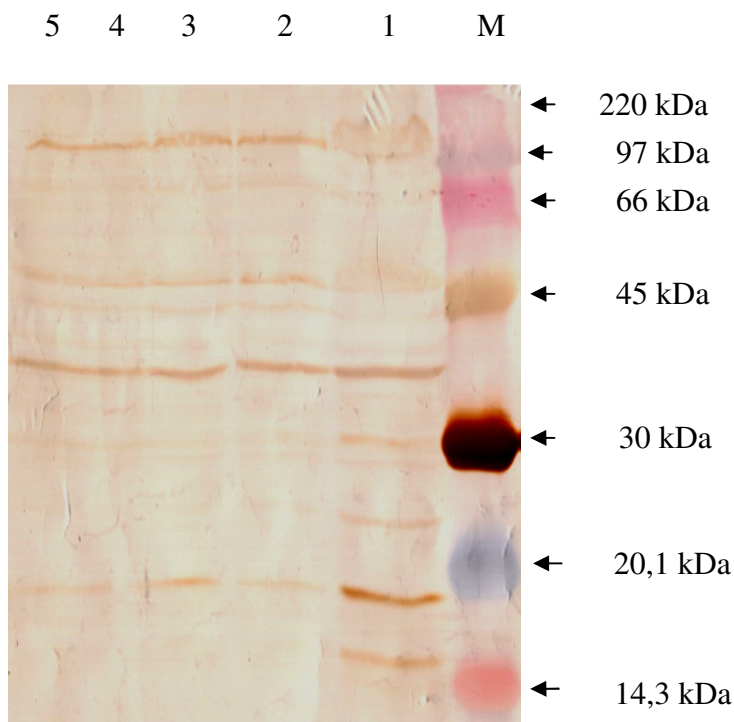


Abb. 3.12: Immunblot: Nachweis des ERK3 (p97)-Proteins durch den Antikörper I-15

M: Molekularmassenmarker
1-2: pcDNA-ERK3 <i>antisense</i> transfizierte B95-8-Zellen
3-4: pcDNA3.1-E transfizierte B95-8-Zellen
5: nicht transfizierte B95-8-Zellen

Es stellte sich die Frage, ob die eingesetzte Proteinmenge zu gering war. Aber auch eine Steigerung der Proteinkonzentration auf 74 bis 264 µg pro Ansatz führte nicht zum Nachweis von ERK3 (p97). Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass die Antikörper für den Nachweis von ERK3 (p97) aus B95-8-Zellen nicht geeignet sind. Andere kommerziell erhältliche Antikörper gibt es zur Zeit nicht.

Insgesamt haben die Ergebnisse gezeigt, dass es durch Transfektion von pcDNA-ERK3*antisense* zu einer Überexpression von endogenem ERK3 (p97) in B95-8 Zellen auf Transkriptebene kommt. Zu einer möglichen ERK3 (p97)-Überexpression auf Proteinebene ließ sich keine Aussage machen, da es für den Nachweis von ERK3 (p97) in Schimpansenzellen keinen geeigneten kommerziell erhältlichen Antikörper gibt.

3.2 Untersuchung der Effekte der Überexpression von ERK3 (p97) auf die Reaktivierung des lytischen Zyklus in B95-8 Zellen

Im Zusammenhang mit der Fragestellung ob ERK3 (p97) an der Reaktivierung des lytischen Zyklus des EBV beteiligt ist, wurden die Expression des Early-Antigens, eines der ersten Antigene, das während des lytischen Zyklus exprimiert wird, und die Transkription der *immediate early* Gene BZLF1 und BRLF1 untersucht. Die Expression von BZLF1 und BRLF1 gilt als Indikator des lytischen Zyklus.

Um die Wirkung von ERK3 (p97) auf die Expression dieser Indikatoren zu untersuchen, wurden B95-8 Zellen sowohl mit pcDNA-ERK3*antisense* als auch mit dem Kontrollvektor pcDNA3.1-E transfiziert.

3.2.1 Erhöhung der Transkription von BZLF1 und BRLF1 in ERK3 (p97)-überexprimierenden Zellen

Falls ERK3 (p97) an der Induktion des lytischen Zyklus des EBV in B95-8-Zellen beteiligt ist, müsste eine ERK3 (p97)-Überexpression eine Erhöhung der Transkription von BZLF1 oder BRLF1 zur Folge haben. Bei BZLF1 und BRLF1 handelt es sich um virale Gene, die zu Beginn des lytischen Zyklus aktiviert werden.

Um den Effekt von ERK3 (p97) auf die Transkription der beiden Gene zu zeigen, wurde 4, 8 und 24 Stunden nach Transfektion (2.2.13.2) RNA isoliert (2.2.6) und in cDNA umgeschrieben (2.2.8). Die cDNA-Populationen wurden in eine BZLF1- bzw. BRLF1-spezifische PCR auf dem LightCycler eingesetzt (2.2.10.2; Primer: 2.1.5.1). Die BZLF1-Produkte wurden durch Schmelzpunktanalyse analysiert. Ihr Schmelzpunkt lag bei 89 °C (Abbildung 3.13.). Für die BRLF1-Produkte dagegen konnte kein eindeutiger Schmelzpunkt bestimmt werden. Die Proben wurden stattdessen mittels Agarose-Gelelektrophorese (2.2.12) analysiert (Abbildung 3.14) um die BRLF1-spezifischen PCR-Produkte zu identifizieren.

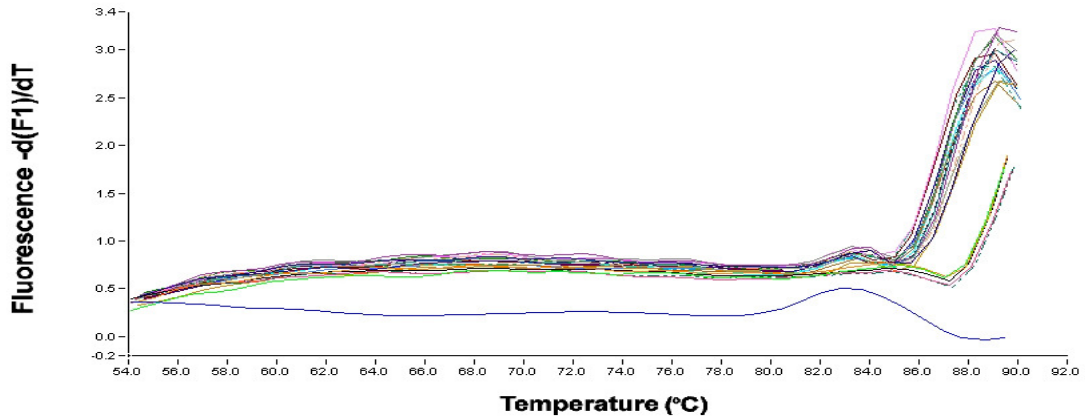


Abb. 3.13: Schmelzpunktanalyse einer BZLF1-spezifischen PCR. Der charakteristische Schmelzpunkt liegt bei 89 °C

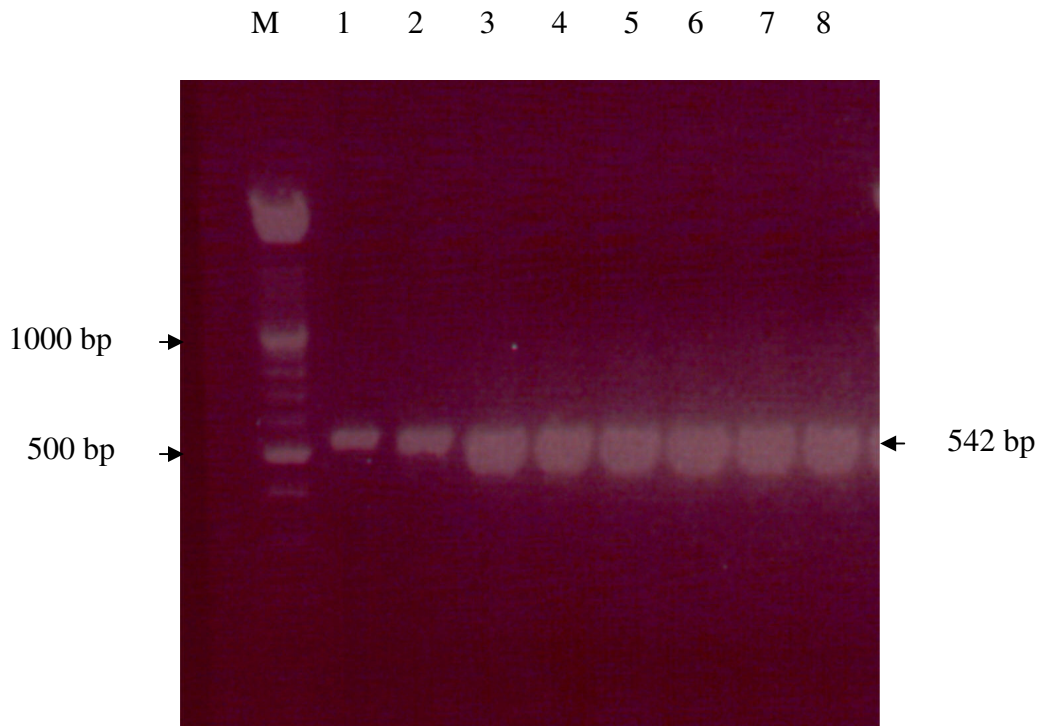


Abb. 3.14: Agarose-Gelelektrophorese von Amplifikaten einer BRLF1-PCR auf dem LightCycler, die sich durch Schmelzpunktanalyse nicht darstellen ließen.

M: 1000 bp Marker
1-4: pcDNA-ERK3 <i>antisense</i> transfizierte B95-8-Zellen
5-8: pcDNA3.1-E transfizierte B95-8-Zellen

Zur Normierung der Werte wurde mit denselben cDNA-Populationen ein GAPDH- spezifischen PCR auf dem LightCycler durchgeführt (2.2.10.2; Primer: 2.1.5.1). Die Berechnung des Überexpressionfaktor erfolgte analog der Formel aus 3.1.1 (Abbildung 3.15)

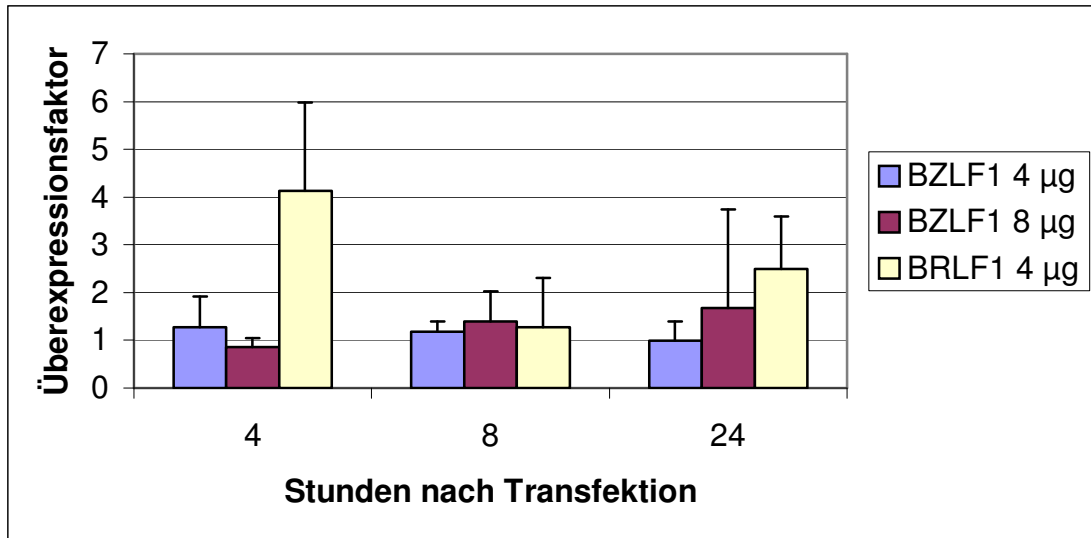


Abb. 3.15: BZLF1- und BRLF1-Überexpression 4,8 und 24 Stunden nach Transfektion von B95-8-Zellen mit pcDNA-ERK3antisense (BRLF1, 4 h $p < 0,001$; BRLF1, 24h $p < 0,005$) (BZLF1 4 µg n:4 h = 12, n: 8 h = 12, n: 24 h = 8), (BZLF1 8 µg n:4 h = 4, n:8 h = 4, n:24 h = 9), (BRLF1 4 µg n:4 h = 10, n:8 h = 10, n: 24 h = 10)

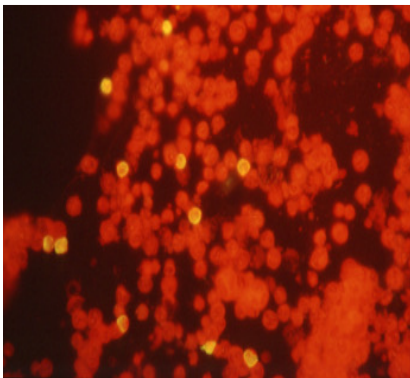
Für die Transfektion wurden 4 und 8 µg Plasmid-DNA verwendet.

Der BZLF1-Expressionfaktor normiert auf die GAPDH-Expression bei Transfektion mit 4 µg betrug für alle untersuchten Zeiträume ungefähr 1,00. Bei Transfektion mit 8 µg wurde nach 8 Stunden eine Erhöhung der Expression um den Faktor 1,4 und nach 24 Stunden um den Faktor 1,7 erreicht. Diese leichte Erhöhung der Expression ist jedoch nicht signifikant. Da sich die Transkription für die beiden unterschiedlichen Mengen Plasmid-DNA nicht wesentlich unterschied, wurden für die BRLF1-Expression nur cDNA-Populationen eingesetzt aus mit 4 µg Plasmid-DNA transfizierten B95-8-Zellen. Hierbei ließ sich ein Anstieg der BRLF1-Transkription um den Faktor 4 nach 4 Stunden ($p < 0,001$) und um den Faktor 2,5 ($p < 0,005$) nach 24 Stunden verzeichnen. Die Tatsache, dass die BRLF1-Transkription nach 8 Stunden nicht erhöht ist, lässt auf einen biphasischen Verlauf der Transkription schließen. Die Ergebnisse zeigen, dass die ERK3 (p97)-getriggerte Aktivierung des lytischen Zyklus zumindest in dem untersuchten Zeitraum über eine BRLF1-Induktion ausgelöst wird.

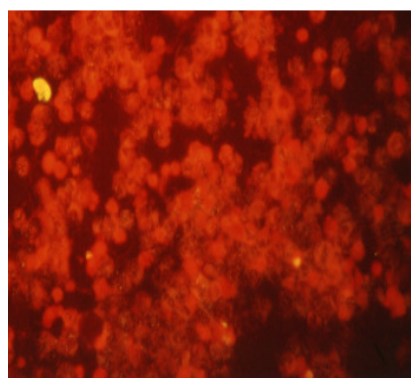
3.2.2 Expression von EBV-Early Antigen in pcDNA-ERK3*antisense* transfizierten B95-8 Zellen

Zum Nachweis der Expression des Early-Antigens wurde 24 Stunden nach Transfektion (2.2.13.2) ein Immunfluoreszenztest durchgeführt (2.2.14.1).

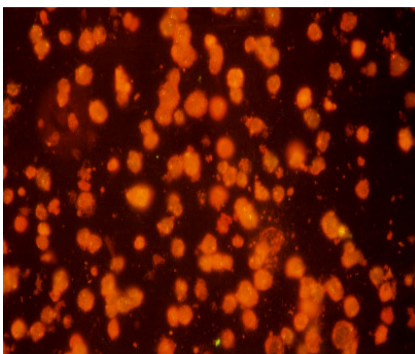
Die Expression von Early Antigen ist in Abbildung 3.16 sowohl für pcDNA-ERK3*antisense* als auch für pcDNA3.1-E-transfizierte B95-8-Zellen (Kontrolle) dargestellt. Als Negativkontrolle dienten BJAB-Zellen. Bei den grün/gelb-fluoreszierenden Zellen handelt es sich um Early Antigen exprimierende Zellen. Der Anteil EA-exprimierender Zellen ist in pcDNA-ERK3*antisense* transfizierten Zellen deutlich höher als in den Kontrollzellen (Abbildung 3.16). Die EA-positiven Zellen wurden jeweils ausgezählt und in das Verhältnis zur Gesamtzahl gesetzt.



A: pcDNA-ERK3*antisense*
transfizierte B95-8-Zellen



B: Kontrolle: pcDNA3.1-E
transfizierte B95-8-Zellen



C: Negativkontrolle: BJAB-
Zellen

Abb 3.16: Nachweis der EA-Expression mittels indirekter Immunfluoreszenz A) in pcDNA-ERK3*antisense* und B) in pcDNA3.1-E transfizierten B95-8-Zellen, C) Negativkontrolle

Für die Transfektion wurden zunächst je 4 bzw. 8 µg Plasmid-DNA verwendet. Abbildung 3.17 zeigt die quantitative Auswertung der EA-Expression. Die EA-Expression ist in ERK3 (p97)-überexprimierenden Zellen für 4 µg um das 2 fache ($p < 0,005$) und für 8 µg um das 2,75 fache ($p < 0,0005$) gegenüber den Kontrollzellen signifikant erhöht. Die Ergebnisse zeigen, dass eine ERK3 (p97)-Überexpression in B95-8-Zellen zu einer vermehrten Expression des *delayed early* Gens *Early Antigen (EA-D)* führt. Da sich die EA-Expression für die verwendeten Plasmid-DNA-Mengen nicht wesentlich unterscheidet, wurden in darauf folgenden Versuchen nur noch mit 4 µg Plasmid-DNA pro Transfektion gearbeitet.

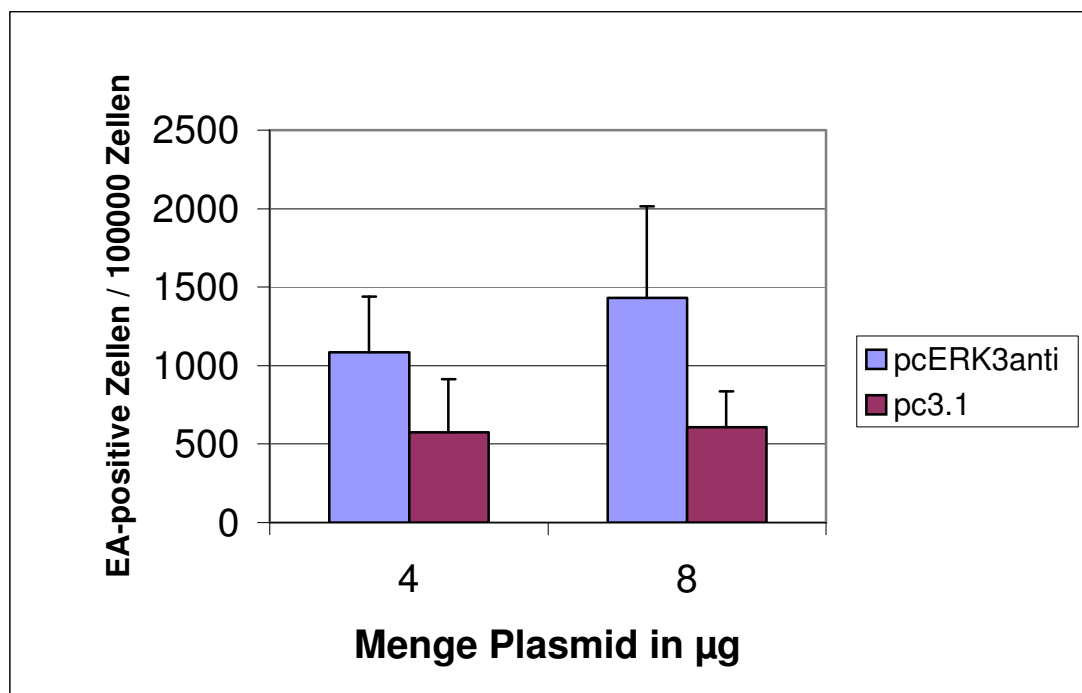


Abb. 3.17: EA-Expression 24 Stunden nach Transfektion in pcDNA-ERK3*antisense* und pcDNA3.1-E transfizierten B95-8-Zellen. 4 µg $p < 0,005$; 8 µg $p < 0,0005$; n (4 µg, 8 µg: 13)

Die durch ERK3 (p97)-Überexpression getriggerte BRLF1 und *EA-D*-Überexpression zeigt, dass ERK3 (p97) zu einer Induktion des lytischen Zyklus führt.

3.3 Untersuchung der Signaltransduktionswege bei der ERK3 (p97)-getriggerten Reaktivierung des EBV

Die unter 3.2 beschriebenen Ergebnisse haben deutlich gemacht, dass ERK3 (p97) auf die Reaktivierung des lytischen Zyklus des EBV wirkt. Nun galt es nachzuweisen, an welcher Stelle ERK3 (p97) in die Signaltransduktionswege, die zur Reaktivierung des EBV führen, eingreift. In vorangehenden Arbeiten wurden die Gene SAH, PKB und 14-3-3 ζ /PLA2, deren Expression ebenso wie die der ERK3 (p97) nach LM1-Behandlung von Raji-Zellen verändert war, auf ihre Funktion bezüglich LM1-getriggelter Reaktivierung des lytischen Zyklus und Zelldifferenzierung untersucht. Es wurden für alle 3 Gene Expressionsvektoren, pcDNA-AHCY, pcDNA-PLA2 und pcDNA-RAC, etabliert. Transfektion von Raji-Zellen mit diesen Expressionsvektoren hatte die Überexpression dieser Gene auf Transkriptebene zur Folge. Die Überexpression dieser Gene führte zur Reaktivierung des lytischen EBV-Zyklus in Raji-Zellen. Damit erhob sich die Frage, ob die ERK3 (p97)-getriggerte Induktion des lytischen EBV-Zyklus im Zusammenhang mit der Aktivierung der Gene SAH, 14-3-3 ζ /PLA2 oder PKB steht.

3.3.1 Expression von 14-3-3 ζ /PLA2 in ERK3 (p97)-überexprimierenden Zellen auf Proteinebene

Zunächst wurde untersucht, ob eine ERK3 (p97)-Überexpression die 14-3-3 ζ /PLA2-Expression auf Proteinebene verändert. PLA2 ist Mitglied der Familie der 14-3-3-Proteine. Es wurden Proteine aus pcDNA-ERK3*antisense*-transfizierten, pcDNA3.1-E transfizierten und nicht transfizierten B95-8-Zellen isoliert und ein Western Blot (2.2.14.7) durchgeführt. Zur Detektion von 14-3-3 ζ /PLA2 im Immunblot (2.2.14.7.4) wurde ein Antikörper gegen 2 Mitglieder der 14-3-3-Proteinfamilie, 14-3-3 β und ζ verwendet. Im Immunblot wurde eine 30 kDa Bande erwartet.

In Abbildung 3.27 ist der Immunblot dargestellt. Man erkennt deutlich, dass die Banden für ERK3 (p97)-überexprimierende Zellen, Kontrollzellen und nicht-transfizierte Zellen bei gleicher Proteinkonzentration gleich intensiv sind. Da in allen Ansätzen gleiche Proteinmengen aufgetragen wurden, scheint die Menge an PLA2 in allen Proben gleich zu sein, also unabhängig von der ERK3 (p97)-Expression. Auf der Basis einer Immunfärbung allein lassen sich jedoch mögliche Unterschiede der Menge PLA2 zwischen den Proben nicht ausschließen.

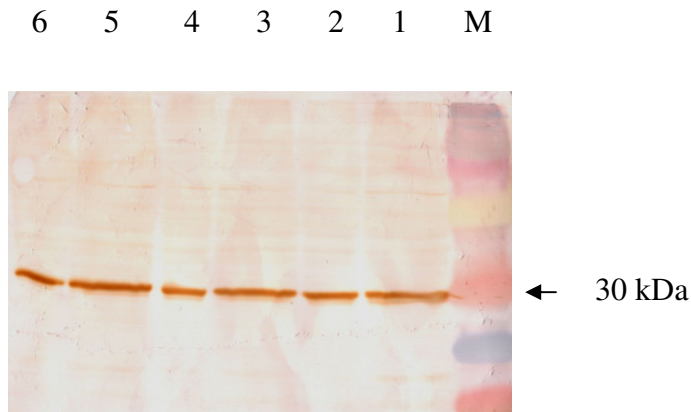


Abb. 3.18: Immunblot: Nachweis der Expression von 14-3-3 β und ζ in transfizierten B95-8-Zellen.

M: Rainbowmarker
1-2: pcDNA-ERK3 $antisense$ transfizierte B95-8- Zellen
3-4: pcDNA3.1-E transfizierte B95-8-Zellen
5-6: nicht transfizierte B95-8-Zellen

3.3.2 Expression von ERK3 (p97) in SAH, PKB und 14-3-3 ζ /PLA2-überexprimierenden Zellen

Man vermutet, dass ERKs spät innerhalb von Signaltransduktionskaskaden aktiviert werden. Dafür spricht auch das in 3.4.1 beschriebene Ergebnis, welches zeigte, dass die Überexpression von ERK3 (p97) keinen Effekt auf die Expression von 14-3-3 ζ /PLA2 auf Proteinebene hat. Daher wurde untersucht, ob in PKB-, 14-3-3 ζ /PLA2- und SAH-überexprimierenden B95-8-Zellen die Transkription von ERK3 (p97) erhöht ist. Dazu wurden Glycerinstabs von *E. coli* Top10 Klonen, die die Expressionsvektoren für PKB und SAH enthielten vermehrt und durch Maxi-Präparation (2.2.2) die Plasmid-DNA isoliert. Bei dem Expressionsvektor für PKB handelt es sich um einen Fusionsvektor aus pcUni/PKB5 und pcDNA3.1-E. Der PKB-Expressionsvektor wird als pcDNA-RAC bezeichnet. Bei dem Expressionsvektor für SAH handelt es sich um einen Fusionsvektor aus pUni/V5-His-Topo-AHCY und pcDNA3.1-E. Der SAH-Expressionsvektor wird pcDNA-AHCY genannt. Der Expressionsvektor für 14-3-3 ζ /PLA2 war der Fusionsvektor pcDNA3.1/V5-His-TOPO[®] und das 14-3-3 ζ /PLA2-Vektorkonstrukt wird als pcDNA-PLA2 bezeichnet.

Zum Überprüfen der Plasmide wurde je eine Spaltung der DNA mit Restriktionsendonukleasen (2.2.9) durchgeführt, deren Auftrennung in der Agarosegel-Elektrophorese (2.2.12) in den Abbildungen 3.21, 3.22 und 3.23 dargestellt ist. Der SAH-Expressionsvektor wurde mit den Restriktionsenzymen *BamHI* und *Xho I* geschnitten. Befindet sich das SAH-Insert in *sense*-Orientierung, sind Fragmente der Größe 575 bp und 3098 bp zu erwarten, bei *antisense*-Orientierung Fragmente der Größe 869 bp und 2804 bp. In Abbildung 3.21 erkennt man ein kleineres Fragment zwischen 500 und 600 bp; das spricht für eine *sense*-Orientierung des SAH-Gens.

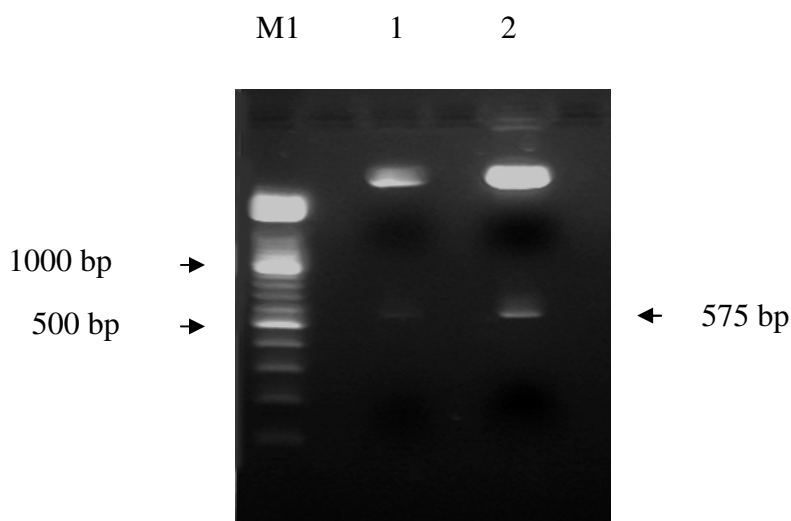


Abb. 3.19: Agarose-Gelelektrophorese: Trennung von Produkten nach Spaltung von pcDNA-AHCY mit *BamHI* und *XhoI*

M: 100 bp Marker
1,2: pcDNA-AHCY nach Spaltung mit <i>BamHI</i> und <i>Xho I</i>

Für den PKB-Expressionsvektor wurden die Restriktionsenzyme *Hind III* und *Xho I* verwendet. Im Vergleich mit dem 1-kb-Längenmarker erkennt man ein kleines Fragment von 1440 bp, das dem geschnittenen PKB-Gen entspricht sowie 2 größere Fragmente, die bei Spaltung des Vektors zustande kommen (Abbildung 3.22).

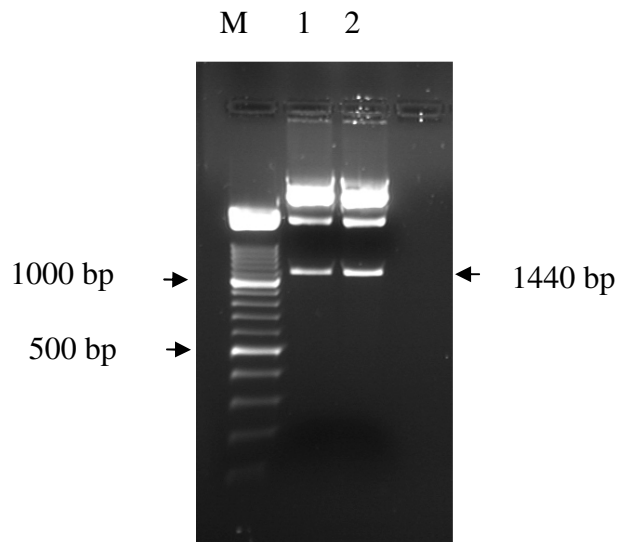


Abb. 3.20: Agarose-Gelelektrophorese: Trennung von Produkten nach Spaltung von pcDNA-RAC mit *Hind III* und *Xho I*

M: 100 bp Marker
1,2: pcDNA-RAC nach Spaltung mit <i>Hind III</i> und <i>Xho I</i>

Der 14-3-3 ζ /PLA2-Expressionsvektor wurde mit *Hind III* geschnitten und zur Analyse in der Agarosegel-Elektrophorese (2.2.12) getrennt. Das 14-3-3 ζ /PLA2-Insert kann sowohl in *sense*- als auch in *antisense*-Orientierung im Vektor vorliegen. Bei *sense*-Orientierung erwartet man Fragmente der Größe 577 bp und 5683 bp, bei *antisense*-Orientierung Fragmente der Größe 327 bp und 5933 bp.

In Abbildung 3.21 erkennt man ein Fragment zwischen 500 und 600 bp, was auf eine *sense*-Orientierung des 14-3-3 ζ /PLA2-Gens im Vektor schließen lässt.

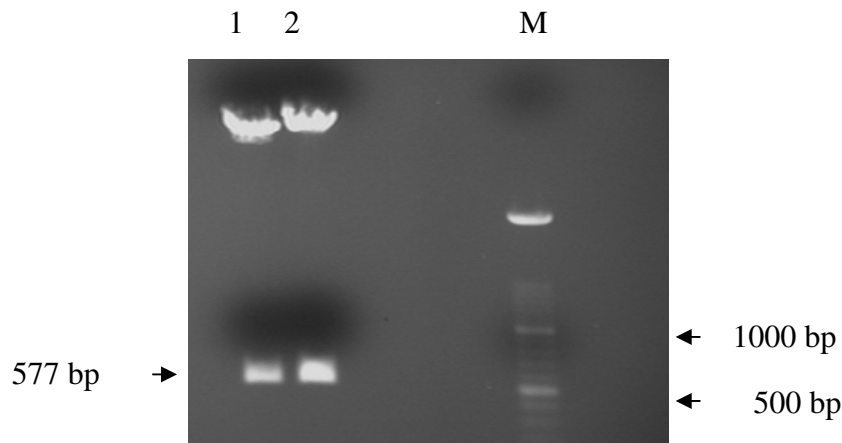


Abb. 3.21: Agarose-Gelelektrophorese: Trennung von Produkten nach Spaltung von pcDNA-PLA2

M: 100 bp Marker
1,2: pcDNA-PLA2 nach Spaltung mit Hind III

Die Ergebnisse der Spaltungen mit Restriktionsenzymen zeigen, dass alle 3 Expressionsvektoren erfolgreich isoliert und identifiziert werden konnten.

In Vorarbeiten wurde gezeigt, dass eine Transfektion von Raji- oder B95-8-Zellen mit den Expressionsvektoren für PKB, SAH und 14-3-3 ζ /PLA2 zu einer Überexpression dieser Gene führte. Mit den Expressionsvektoren, die pcDNA-AHCY, pcDNA-PLA2 und pcDNA-RAC wurden nun B95-8-Zellen transfiziert (2.2.13.2). Danach wurde 4, 8 und 24 Stunden nach Transfektion RNA isoliert (2.2.6) und in cDNA umgeschrieben (2.2.8). Die cDNA wurde in eine ERK3 (p97)-spezifische PCR mit dem LightCycler eingesetzt (2.2.10.2). Zur Normierung der Werte wurde wie unter 3.1.3 beschrieben mit denselben cDNA-Populationen eine GAPDH-spezifische PCR (2.2.10.2; Primer: 2.1.5.1) durchgeführt. Der Überexpressionsfaktor wurde gemäß der unter 3.1.3 erläuterten Formel berechnet.

Die folgenden Abbildungen (3.22, 3.23) zeigen Überexpressionsfaktoren von ERK3 4, 8 und 24 Stunden nach Transfektion von B95-8-Zellen mit pcDNA-PLA2, pcDNA-RAC oder pcDNA-AHCY.

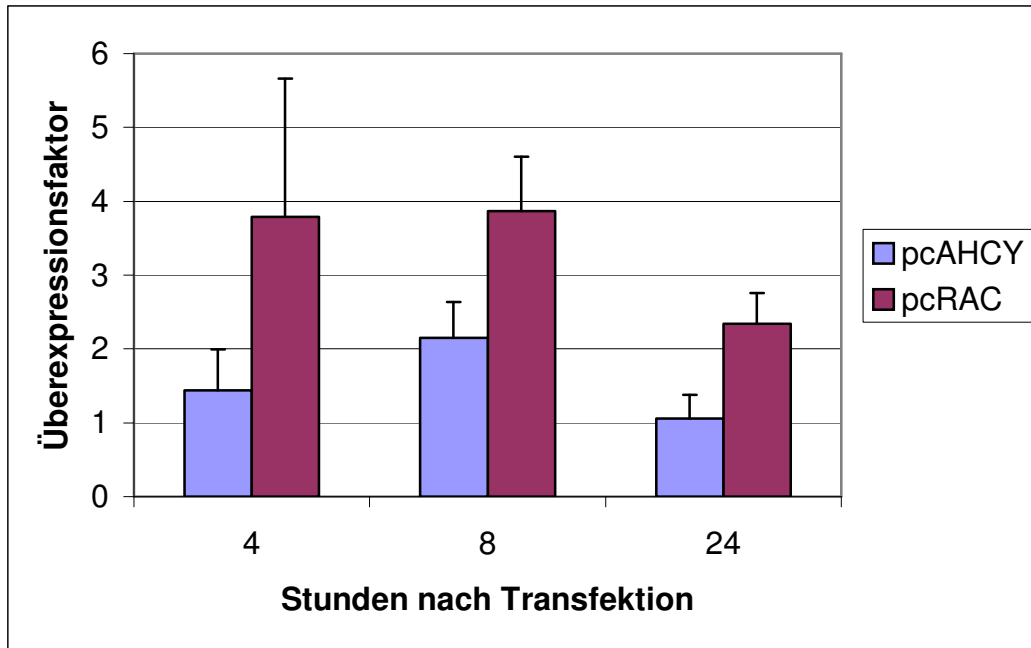


Abb. 3.22: ERK3 (p97)-Expression nach SAH- und PKB-Überexpression 4,8 und 24 Stunden nach Transfektion mit pcDNA-AHCY und pcDNA-RAC.
 Je 4 µg pcDNA; pcDNA-AHCY, 4h: n = 8; pcDNA-AHCY, 8h: n=8, p<0,001; pcDNA-AHCY 24h, n=8; pcDNA-RAC, 4h: n = 4, p<0,001; pcDNA-RAC 8h: n=4, p<0,001; pcDNA-RAC 24h: n=4, p<0,005

Es wurden für die Transfektion pro Transfektionsansatz 4 µg Plasmid-DNA verwendet. Für SAH-überexprimierende Zellen zeigte sich eine signifikante Erhöhung der ERK3 (p97)-Expression um den Faktor 2 8 Stunden nach Transfektion (p < 0,001).

Nach Überexpression von PKB lässt sich eine signifikante Steigerung der ERK3-Expression um den Faktor 4 nach 4 und nach 8 Stunden erkennen (p < 0,001), die 24 Stunden nach Transfektion auf den Faktor 2 abfällt (p < 0,005).

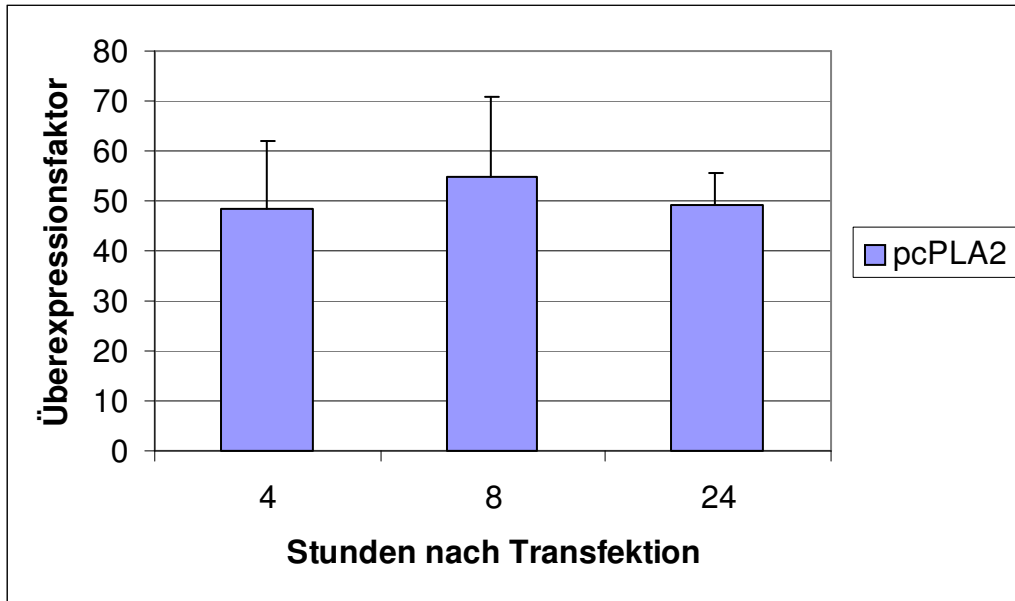


Abb. 3.23: ERK3 (p97) -Expression 4, 8 und 24 Stunden nach Transfektion mit pcDNA-PLA2
 Je 4 µg pcDNA, n = je 8; p je < 0,001

Die 14-3-3ζ/PLA2-Überexpression (Abb.3.23) zeigte eine signifikante Steigerung der ERK3 (p97)-Expression um den Faktor 48 nach 4 Stunden ($p < 0,001$), um den Faktor 55 nach 8 Stunden ($p < 0,001$) und Faktor 49 nach 24 Stunden ($p < 0,001$).

Die Ergebnisse zeigen, dass die Überexpression der Proteine SAH, PKB und 14-3-3ζ/PLA2 im untersuchten Zeitraum von 4 bis 24 Stunden zu einer ERK3 (p97)-Überexpression in B95-8-Zellen auf Transkriptebene führt.

Dies lässt darauf schließen, dass ERK3 (p97) über 14-3-3ζ/PLA2-, PKB- und SAH-abhängige Signaltransduktionswege reguliert werden kann.

3.4 Untersuchungen von Zellwachstum und Zelldifferenzierung in B95-8-Zellen nach Transfektion mit pcDNA-ERK3*antisense* und pcDNA3.1-E

Es war früher gezeigt worden, dass die Behandlung von Raji-Zellen mit dem Gangliosid LM1 neben einer Reaktivierung des lytischen Zyklus des EBV zu einer Wachstumshemmung und

Differenzierung der Zelle führt. Es sollte nun untersucht werden, ob ERK3 (p97) an dieser LM1-getriggerten Wachstumshemmung und Zelldifferenzierung beteiligt ist.

3.4.1 Modulation der DNA-Syntheserate in ERK3 (p97)-transfizierten Zellen

Zunächst wurde die Veränderung der DNA-Syntheserate 1, 2, 4 und 8 Tage nach Transfektion (2.2.13.2) mit pcDNA-ERK3*antisense* und pcDNA3.1-E überprüft. Hierzu wurde ein Zellproliferationstest (2.2.14.2) durchgeführt.

Die Abbildung 3.18 zeigt, dass die DNA-Syntheserate in B95-8 Zellen nach Transfektion mit pcDNA-ERK3*antisense* im Vergleich zu mit pcDNA3.1-E transfizierten B95-8- Zellen über den ganzen beobachteten Zeitraum nicht signifikant erhöht oder erniedrigt ist.

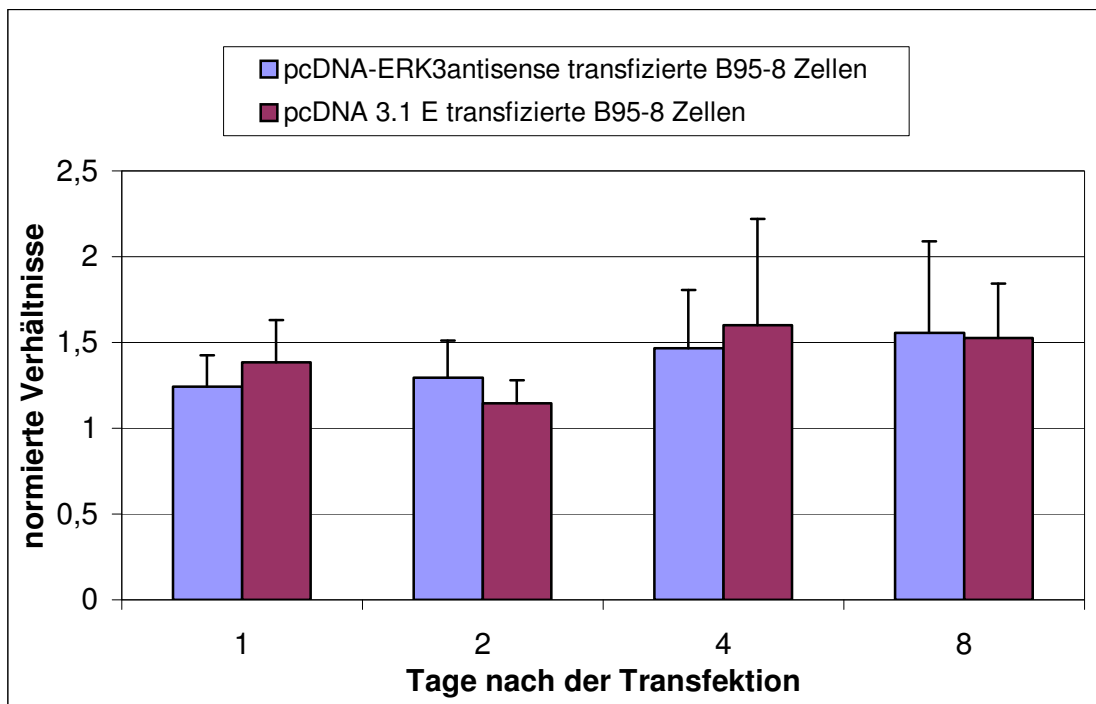


Abb. 3.24: DNA-Syntheserate nach Transfektion von B95-8-Zellen mit pcDNA-ERK3*antisense* (4 µg DNA) und pcDNA3.1 E (4 µg DNA) (n=3)

Parallel zum DNA-Proliferationstest wurde am Tag der Transfektion sowie 1, 2, 4 und 8 Tage danach eine Zellzählung (2.2.1.4) vorgenommen (Abbildung 3.19). Bei unbehandelten B95-8-Zellen kann man von einer Zellteilung alle 18-24 Stunden ausgehen.

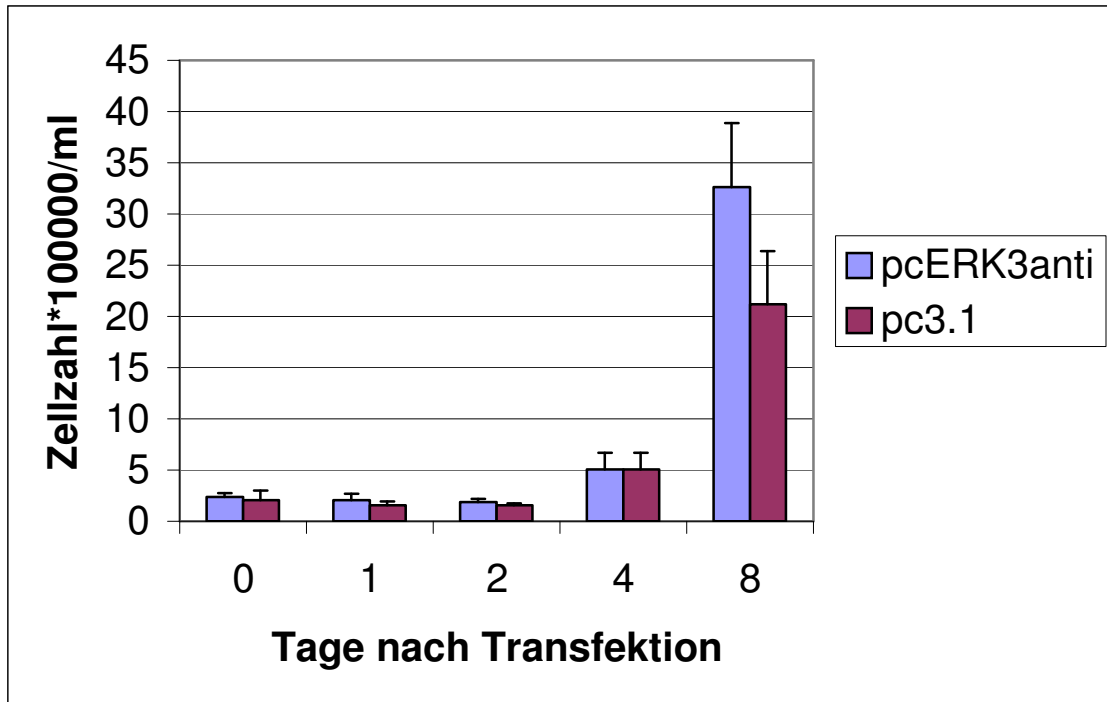


Abb. 3.25: Zellteilung nach Transfektion von B95-8 Zellen mit pcDNA-ERK3antisense (4 µg DNA) und pcDNA3.1 E (4 µg DNA) (n = 3)

Dabei konnte für mit pcDNA-ERK3*antisense* und pcDNA3.1-E transfizierten B95-8-Zellen ein sehr ähnliches Teilungsverhalten beobachtet werden. Bei beiden Zellpopulationen sinkt die Zellzahl einen Tag nach Transfektion. Bis zum 4. Tag hat sich die Zellzahl für beide Populationen verdoppelt um sich dann bis zum 8. Tag nach Transfektion ungefähr zu verzehnfachen. Die Ergebnisse zeigen, dass ERK3 (p97) in B95-8-Zellen keinen Einfluss auf das Teilungsverhalten der Zellen hat.

3.4.2 Modulation der Oberflächenantigene in ERK3 (p97)-transfizierten Zellen

Um zu überprüfen, ob die ERK3 (p97)-Überexpression einen Effekt auf die Expression bestimmter Zelloberflächenantigene in B95-8-Zellen hat, wurde 24 Stunden nach Transfektion (2.2.13.2) eine FACS Scan-Analyse (2.2.14.3) durchgeführt.

Bei den getesteten Zelloberflächenantigenen, CD44, CD11a, CD23, CD54, CD30, CD19, CD58, CD40, handelt es sich um Oberflächenmarker, die bei Infektion von B-Lymphozyten mit EBV verstärkt exprimiert werden. Nach LM1-Behandlung wird ihre Expression moduliert.

Die Expression der Oberflächenantigene wurde jeweils zwischen mit pcDNA-ERK3*antisense* und pcDNA3.1-E transfizierten B95-8-Zellen verglichen. Es ließ sich jedoch für keinen der untersuchten Oberflächenmarker ein Unterschied in der Expression nach ERK3 (p97)-Überexpression beobachten. In Abbildung 3.20 sind beispielhaft vier Diagramme zur Auswertung der FACS Scan-Analyse aufgeführt. Die grüne Kurve zeigt die Darstellung der ERK3 (p97)-überexprimierenden Zellen und die violette Kurve repräsentiert die der Kontrollzellen. Die übereinanderliegenden Kurven unterscheiden sich lediglich in ihrer Höhe was auf unterschiedliche Zellmengen in den zu messenden Proben zurückzuführen ist. Auch diese Ergebnisse zeigen, dass ERK3 (p97) keinen Einfluss auf Zelldifferenzierung in B95-8-Zellen hat.

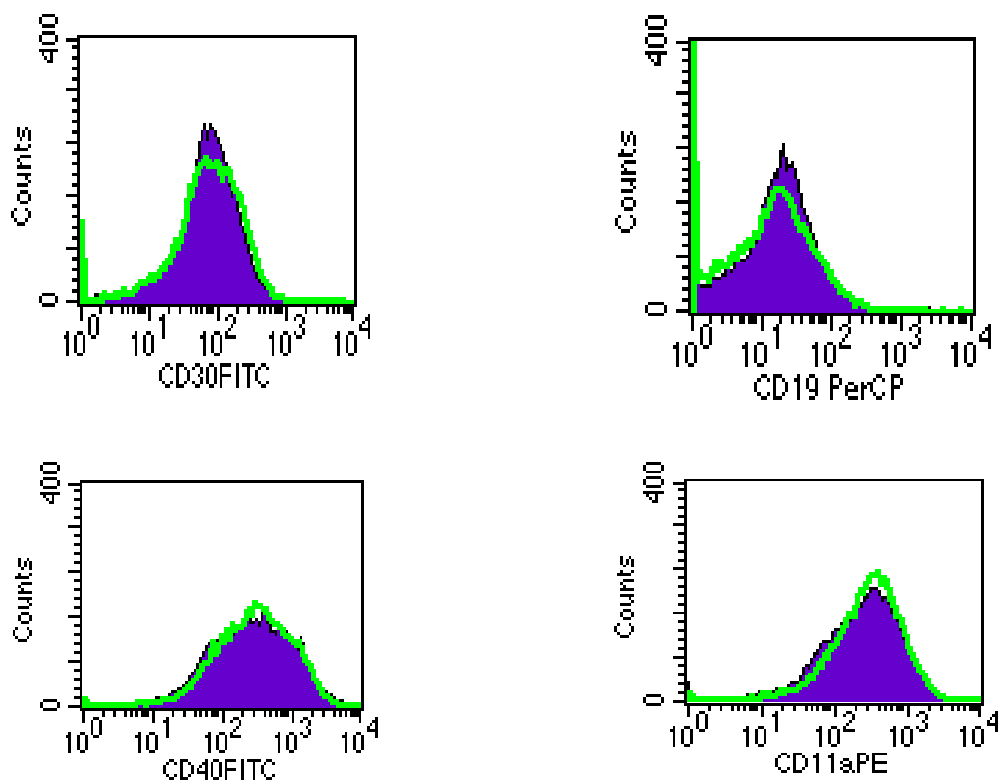


Abb. 3.26: FACS Scan-Analysen-Diagramme zur Untersuchung der Oberflächenantigene CD30, CD11a, CD19, CD40

4. Diskussion

Das Epstein-Barr Virus (EBV) ist ein γ -Herpesvirus. Die Infektion mit dem Virus kann zum klinischen Bild der infektiösen Mononukleose (Pfeiffer'sches Drüsenfieber) führen. Das EBV ist mit der Entstehung verschiedener Tumoren wie dem Burkitt-Lymphom (Klein *et al.*, 1968) und dem Nasopharynxkarzinom (zur Hausen, 1970) und Hodgkin-Lymphomen assoziiert.

Frühere Untersuchungen haben gezeigt, dass eine Behandlung von Zellen der Burkitt Lymphom-Zelllinie Raji mit dem Gangliosid IV³NeuAc-nLcOse₄Cer (LM1) sowohl zu einer Wachstumsinhibition und Differenzierung der Raji Zellen, als auch zu einer Reaktivierung des lytischen Zyklus führt (Schaade *et al.*, 1999). *Differential-display-RT-PCR-Analyse und suppression-subtractive-hybridisation-PCR (SSH-PCR)* weisen auf eine Modifikation der Expression von 35 Genen hin (Schaade *et al.*, 2000; Kleines *et al.*, 2000).

Bei einem dieser Gene handelte es sich um das Gen, das für die MAP-Kinase ERK3 (p97), (extrazellulär regulierte Kinase 3), kodiert. ERK3 (p97) ist eine Serin-Kinase mit einem Molekulargewicht von 97 kDa, deren Gen auf Chromosom 15q21 lokalisiert ist.

In dieser Arbeit soll die Rolle von ERK3 (p97) bei der LM1-getriggerten Wachstumshemmung, Zelldifferenzierung und Reaktivierung des Epstein-Barr Virus in der EBV-positiven Schimpansenzelllinie B95-8 untersucht werden.

4.1 Die extrazellulär regulierte Kinase 3 (ERK3)

Die Proteinkinase ERK3 ist eine extrazellulär regulierte Kinase und gehört zur Familie der mitogen-aktivierten-Proteinkinasen (MAP-Kinasen). MAP-Kinasen sind Serin/Threonin-Proteinkinasen. Sie sind in Protein-Kinase-Kaskaden eingebunden und an der Übertragung extrazellulärer Signale in den Zellkern mitbeteiligt, wo sie durch Phosphorylierung und Aktivierung von Transkriptionsfaktoren Einfluss auf die Regulation der Genexpression nehmen (Pearson *et al.*, 2001; Davis *et al.*, 1995). Die Protein-Kinase-Kaskade besteht aus mindestens 3 hintereinander geschalteten Kinasen: der MAP Kinase Kinase Kinase, der MEK (MAP Kinase Kinase) und schließlich den Effektor-MAP Kinasen (Meloche *et al.*, 1996). Ihre Aktivierung erfolgt durch extrazelluläre Stimuli wie z.B. verschiedene Wachstumsfaktoren, Tumornekrose-Faktor (TNF) und Stress und ist assoziiert mit Apoptose, Embryogenese sowie Proliferation und Differenzierung der Zelle (Pearson *et al.*, 2001).

ERK3 wurde 1991 erstmals bei der Ratte entdeckt und als ein Protein der Größe 62,6 kDa charakterisiert, das überwiegend in Hirn- und Muskelzellen exprimiert wird (Boulton *et al.*, 1991). Das katalytische Zentrum von ERK3 ist zu 50 % homolog zu dem der ERKs 1 und 2, was die Verwandtschaft mit diesen bereits gut charakterisierten ERKs bestätigte. Darüber hinaus unterscheidet sich ERK3 in einigen Merkmalen von denen bekannter MAP-Kinasen. ERK3 ist im Gegensatz zu anderen MAP-Kinasen eine primär kernständige Kinase (Boulton *et al.*, 1991). Sie wird *in vivo* nicht wie andere MAP-Kinasen über Tyrosin, sondern über Serin¹⁸⁹ phosphoryliert. Über Serin¹⁸⁹ wurde auch eine schwache Autophosphorylierung durch ERK3 beobachtet (Cheng *et al.*, 1995). ERK3 phosphoryliert keines der Substrate anderer MAP-Kinasen, was auf eine sehr spezifische regulatorische Funktion in der Zelle hinweist (Cheng *et al.*, 1995; Cheng *et al.*, 1996). Als ERK3-regulierende Kinasen werden eine MEK-Kinase (MAP-Kinase-Kinase) und eine ERK3-Kinase diskutiert (Robbins *et al.*, 1993; Cheng *et al.*, 1996). Im Hippocampus der Ratte wurde eine spezifische Bindung von ERK3 an B-Raf beobachtet (Kim & Yang, 1996).

1994 wurde von Zhu *et al.* das humane Homolog von ERK3 charakterisiert. Es handelt sich um ein aus 721 Aminosäuren bestehendes Protein von 97 kDa. Die 500 Aminosäuren am N-terminalen Ende sind zu 98,4 % homolog zu denen vom ERK3 der Ratte. Das C-terminale Ende ist dagegen um zusätzliche 178 Aminosäuren verlängert. Das humane ERK3 wird als ERK3 (p97) bezeichnet. Die Subdomäne VIII von ERK3 Ratte und ERK3 (p97) enthält im Gegensatz zu anderen ERKs die Aminosäuresequenz SPR statt APE. Die Funktion dieser Sequenz ist jedoch nicht bekannt. Das ERK3-Gen ist auf Chromosom 15q21 lokalisiert, einer Region, die mit akuten, nicht lymphoblastischen Leukämien und kongenitalen Anämien assoziiert ist. Auch ERK3 (p97) wird verstärkt in Skelettmuskulatur und Gehirn exprimiert. Eine Stimulierung von humanen Fibroblasten mit Phorbolestern und Serum zeigte eine Kinaseaktivität von ERK3, wobei Histon H1 als Substrat umgesetzt wurde (Zhu *et al.*, 1994).

Die Existenz eines ERK3 der Maus wurde von Turgeon *et al.* 2000 nachgewiesen. Es handelt sich um ein 100 kDa großes Protein, das zu 94 % homolog ist zur ERK3 (p97). Es wird im weiteren Verlauf als ERK3 (p100) bezeichnet. Auch ERK3 (p100) wird überwiegend in Hirnzellen exprimiert und zeigt eine erhöhte Expression während der Embryogenese.

Bei Untersuchungen proliferierender Zellen aller 3 Spezies konnte gezeigt werden, dass ERK3 ein wenig stabiles Protein mit einer Halbwertszeit von 30 Minuten ist (Coulombe *et al.*, 2003). Der schnelle ERK3-Abbau kommt durch Ubiquitin-abhängige Proteolyse in Proteasomen zustande. Damit unterscheidet sich die Regulation der ERK3-Aktivität und Stabilität von anderen MAP-Kinasen, die über MAP-Kinase-Phosphatasen (MKPs) inaktiviert werden

(Pearson *et al.*, 2001). Für den Ubiquitin-abhängigen Proteasomabbau in ERK3 werden die Regionen NDR1 und 2 am N-terminalen Ende der Kinasedomäne verantwortlich gemacht. ERK3 (Ratte) wird während Differenzierungsvorgängen von teratocarcinomen P19-Zellen in neuronale und Muskelzellen vermehrt exprimiert (Boulton *et al.*, 1991). Während der Differenzierung von P12 (Phäochromozytom-Zelllinie der Ratte) und C2C12 (Myoblasten der Maus) Zellen wird eine Stabilisierung von ERK3 durch Verlängerung der Halbwertszeit und somit Akkumulation der Kinase beobachtet (Coulombe *et al.*, 2003). In NIH3T3-Zellen (Fibroblasten der Maus) verhindert die stabilisierte ERK3 (p100)-Form den S-Phasen-Eintritt der Zellen. ERK3 scheint bei Ratte und Maus einen positiven Einfluss auf die Zelldifferenzierung zu haben (Coulombe *et al.*, 2003). Untersuchungen der ERK3-Lokalisation aller 3 Spezies haben ergeben, dass ERK3 nicht wie ursprünglich postuliert nur im Zellkern, sondern sekundär auch im Zytoplasma vorhanden ist. In NIH3T3-Zellen konnte ein CRM1-abhängiger ERK3-Transport vom Kern in das Zytoplasma beobachtet werden, der im Zusammenhang mit dem ERK3-getriggerten Zell-Zyklus-Arrest in NIH3T3-Zellen zu stehen scheint (Julien *et al.*, 2003).

Zusätzlich zu ERK3 (p97) ist ein weiteres humanes ERK3-Homolog von 63 kDa Größe bekannt (Gonzalez *et al.*, 1992). ERK3 (p63) ist auf Chromosom 18q12-21 lokalisiert, einer Region, die mit manischer Depression assoziiert ist, und wird vor allem in Gehirn, Herz und Lunge exprimiert. (Li Li *et al.*, 1994; Gonzalez *et al.*, 1992).

Die ERK3-Homologe der 3 Spezies Ratte, Maus und Mensch sowie die über sie bekannten Funktionen bei Differenzierung bestimmter Zelllinien sind in Abbildung 4.1 dargestellt.

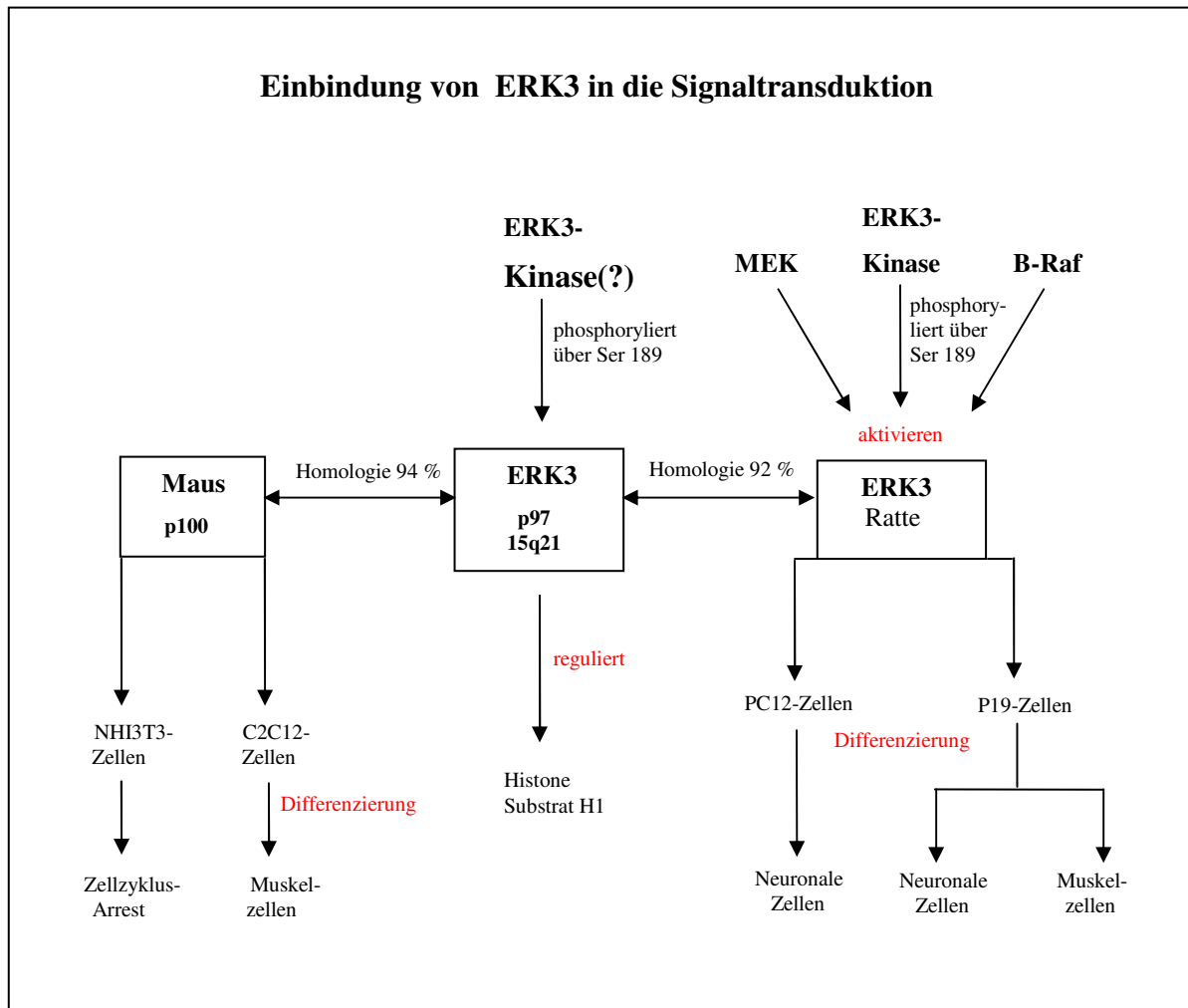


Abb. 4.1: ERK3-Homologe von Ratte (p63), Maus (p100) und Mensch p(97) und ihre bekannten Funktionen.

4.2 Wirkung der Transfektion von B95-8-Zellen mit pcDNA-*ERK3antisense*

Zur Untersuchung der Effekte einer ERK3 (p97)-Über- oder Unterexpression in Raji-Zellen wurde ein ERK3 (p97)-Expressionsvektor etabliert. Der Expressionsvektor wurde als pcDNA-*ERK3antisense* bezeichnet. Nach Transfektion von Zellen der Burkitt-Lymphom-Linie Raji mit pcDNA-*ERK3antisense* wurde eine Überexpression von ERK3 (p97) auf Transkript- und Proteinebene beobachtet (Flosdorff, persönliche Mitteilung).

Um zu überprüfen, ob diese Beobachtung in der EBV-positiven Schimpansenzelllinie B95-8 bestätigt werden kann, wurde nach Transfektion von B95-8-Zellen mit pcDNA-ERK3*antisense* eine für ERK3 (p97)-spezifische *real time* PCR durchgeführt (3.1.3). Hierbei stellte sich heraus, dass ERK3 (p97) durchaus amplifiziert worden war, dass aber dieses endogene Schimpansen-ERK3 (p97) nicht durch Hybridisierungssonden für humanes ERK3 (p97) detektiert werden konnte (Abb. 3.5). Dies bedeutet, dass sich die Gensequenz humaner und Schimpansen-ERK3 (p97) im Bereich der Bindungsstelle für die Hybridisierungssonden unterscheidet. Nach Konstruktion von Schimpansen-ERK3 (p97) spezifischen Hybridisierungssonden ließ sich die ERK3-Expression quantifizieren und es zeigte sich, dass die Transfektion mit pcDNA-ERK3*antisense* zu einer Überexpression von ERK3 (p97) um den Faktor 2,3 nach 4 Stunden und um den Faktor 2,5 nach 8 Stunden führte. Der Überexpressionsfaktor reduzierte sich nach 24 Stunden auf 1,85 (Abb. 3.10). Der in Raji-Zellen beobachtete Effekt einer pcDNA-ERK3*antisense* getriggerten ERK3 (p97)-Überexpression ließ sich somit auch für ERK3 (p97) in B95-8-Zellen bestätigen.

Der Nachweis einer ERK3 (p97)-Überexpression auf Proteinebene mittels Western Blot Analyse ließ sich trotz wiederholter Ansätze nicht erbringen (3.1.4; Abb. 3.11). Dies kann mehrere Gründe haben.

- 1) Untersuchungen der ERK3-Proteinexpression in mehreren Zelllinien der Spezies Maus, Ratte und Mensch haben gezeigt, dass es sich bei ERK3 um ein sehr instabiles Protein mit einer Halbwertszeit von 30 Minuten handelt (Coulombe *et al.*, 2003). Die für die Proteinextraktion gewählten Zeitpunkte (4 und 24 Stunden nach Transfektion) stimmten evtl. nicht mit dem Zeitpunkt vermehrter ERK3-Proteinsynthese überein.
- 2) Mehrere Untersuchungen zur ERK3-Funktion haben ergeben, dass ERK3 zumindest bei den Spezies Maus und Ratte während Zelldifferenzierungsprozessen vermehrt exprimiert wird (Coulombe *et al.* 2003; Julien *et al.*, 2003; Boulton *et al.*, 1991), so dass die ERK3-Expression in normal proliferierenden Schimpansenzellen zu gering für die Western Blot-Analyse sein könnte.
- 3) Die Ergebnisse bei der ERK3-Sequenzierung im Rahmen der Etablierung einer Schimpansen-ERK3 (p97)-spezifischen PCR haben gezeigt, dass sich die Gensequenz humaner und Schimpansen-ERK3 (p97) unterscheidet, was zu Unterschieden in der Aminosäuresequenz des ERK3 (p97)-Proteins führt. Kommerziell erhältliche ERK3-Antikörper stehen zur Zeit nur für die Spezies Maus, Ratte und Mensch zur Verfügung, so dass man davon ausgehen kann, dass die kommerziellen Antikörper nicht spezifisch für Schimpansen-ERK3 (p97) sind.

4.3 Effekte der ERK3 (p97)-Überexpression in B95-8-Zellen

Die Folgen der ERK3 (p97)-Überexpression in B95-8-Zellen wurden hinsichtlich folgender Aspekte untersucht.

4.3.1 Expression von ERK3 (p63)

ERK3 (p63) ist eine der beiden Isoformen von ERK3 des Menschen. Das Protein ist zu 74 % homolog zu ERK3 (p97), wird auf Chromosom 18q12-21 kodiert (Li Li, 1994) und wird vor allem in Herz, Hirn und Lunge exprimiert (Gonzalez, 1992). Hier sollte untersucht werden, ob auf Grund der engen Verwandtschaft zwischen ERK3 (p97) und ERK3 (p63) Zusammenhänge bezüglich gemeinsamer Signaltransduktionswege bzw. gegenseitiger regulierender Effekte bestehen. In diesem Zusammenhang wurde untersucht, ob eine ERK3 (p97)-Überexpression in B95-8-Zellen regulierend auf die ERK3 (p63)-Expression auf Proteinebene wirkt, und eine Western Blot Analyse durchgeführt (3.1.4; Abb. 3.12). Die ERK3 (p63)-Proteinexpression konnte jedoch trotz mehrerer Versuchswiederholungen mittels Western Blot Analyse nicht nachgewiesen werden. Da es auch hier gilt, den Nachweis von Schimpansen-ERK3 (p63), dessen Existenz nicht bewiesen ist, zu erbringen, muss davon ausgegangen werden, dass ERK3 (p63) entweder gar nicht von Schimpansenzellen exprimiert wird, oder aber dass der Proteinnachweis aus den für Schimpansen-ERK3 (p97) geschilderten Gründen fehlschlug (4.2,1-3)).

4.3.2 Reaktivierung des lytischen EBV-Zyklus

4.3.2.1 Expression der *immediate early* Gene BZLF1 und BRLF1:

Die Reaktivierung des EBV aus der Latenzphase ist abhängig von der Aktivierung der „*immediate-early*“ Gene BZLF1, BRLF1 und BRLF4 (Modrow & Falke, 2002). Nach Induktion der *immediate-early* Gene erfolgt die Expression der *delayed early* Gene und Strukturproteine wie z.B. gp350 und gp220. Die Genprodukte von BZLF1 und BRLF1, Zta und Rta, können sich über ihre vorgeschalteten Promotoren, Zp und Rp, autoaktivieren und sich gegenseitig aktivieren (Ragoczy *et al.*, 2001). Für die volle Virusreplikation werden beide Transaktivatoren benötigt (Feederle *et al.*, 2000). Die Möglichkeit zur Aktivierung der Transaktivatoren

sowie ihre Potenz, den lytischen Zyklus zu induzieren, ist jedoch sehr stark abhängig von der vom EBV transformierten Zelllinie (Ragoczy & Miller, 1999; Gradoville *et al.*, 2002).

Das BZLF1-Gen kodiert für Zta (ZEBRA), ein sequenzspezifisches DNA-Bindungsprotein, und Homolog der zellulären AP-1 Transkriptionsfaktoren, zu denen man unter anderem die Kinasen c-Jun und c-Fos zählt. Zta transaktiviert viele virale und zelluläre Promotoren über AP1- und CREB-Bindungsstellen sowie ZREs (*Zta-responsive-elements*) (Quinlivan *et al.*, 1993; Baumann *et al.*, 1998). Zta bindet außerdem an den Replikationsursprung des EBV, *ori-lyt*, und initiiert darüber die lytische Genomreplikation (Scheepers *et al.*, 1993). BZLF1 kann über 2 Promotoren, Zp und Rp, aktiviert werden. Der Zp-Promotor exprimiert nur BZLF1. Über den Rp-Promotor werden sowohl BZLF1 als auch BRLF1 als bicistronische RNA exprimiert (Manet *et al.*, 1989; Speck *et al.*, 1997). Das von BRLF1 kodierte Protein Rta ist ebenfalls ein Transkriptionsfaktor, der zusammen mit Zta mehrere frühe virale Gene transaktiviert. Die Rta-getriggerte Aktivierung bestimmter viraler Promotoren verläuft entweder über eine direkte Bindung von Rta an GC-reiche Motive (DR/DL, BMLF1, BMHRF1) oder über einen indirekten Mechanismus via Phosphatidylinositol-3 Kinase oder Stress-MAP Kinase Aktivierung (BZLF1, BMRF1) (Gruffat *et al.*, 1994; Darr *et al.*, 2001).

Um zu überprüfen, ob ERK3 (p97) Einfluss auf die Reaktivierung des EBV-lytischen Zyklus in B95-8-Zellen hat, wurde die Expression der *immediate early* Gene BZLF1 und BRLF1 auf Transkriptebeine nach Überexpression von ERK3 (p97) untersucht (Abb. 3.15). Dabei zeigte sich, dass 4, 8 und 24 Stunden nach Transfektion von B95-8-Zellen mit pcDNA-ERK3*antisense* unter Verwendung von 4 µg Plasmid-DNA ein Anstieg der BZLF1-Expression ausblieb. Nach Transfektion mit 8 µg Plasmid-DNA war ein leichter Anstieg der BZLF1 um den Faktor 1,4 8 Stunden und um den Faktor 1,7 24 Stunden nach Transfektion zu verzeichnen. Die Ergebnisse waren jedoch nicht signifikant. Die BRLF1-Expression zeigte dagegen einen signifikanten Anstieg 4 und 24 Stunden nach Transfektion mit 4 µg Plasmid-DNA um den Faktor 4 ($p < 0,001$) und 2,5 ($p < 0,005$). Da eine erhöhte BRLF1-Expression 8 Stunden nach Transfektion ausbleibt, muss auf einen biphasischen Verlauf der Transkription geschlossen werden. Die Ergebnisse zeigen, dass eine ERK3 (p97)-Überexpression zu einer BRLF1-getriggerten Reaktivierung des lytischen EBV-Zyklus führt.

4.3.2.2 Expression des delayed early Gens Early Antigen (EA-D)

Ein weiterer Indikator des lytischen Zyklus ist das Genprodukt des *delayed early* Gens BMRF1, das *Early Antigen diffuse component* (EA-D) (Kiehl & Dorsky, 1991). Es ist eines

der ersten Antigene, das zu Beginn des lytischen Zyklus aktiviert wird (Epstein *et al.*, 1979). Die Expression von BMRF1 wird von den *immediate early* Genen BZLF1 und BRLF1 induziert (Quinlivan *et al.*, 1993). Das *Early Antigen* spielt zusammen mit BZLF1 eine wichtige Rolle bei der viralen DNA-Replikation (Zhang *et al.*, 1996). Es ist eine wesentliche Komponente des EBV-DNA-Polymerase Komplexes, wobei es essentiell ist für die Aktivität der viralen DNA-Polymerase. Darüber hinaus interagiert es mit BZLF1 und den zellulären Transkriptionsfaktoren Sp1 und ZBP-89 bei der Aktivierung des Replikationsursprungs Ori-Lyt (Gershburg *et al.*, 2002). EA-D wird während der lytischen EBV-Reaktivierung von der EBV-Protein Kinase BGLF4 hyperphosphoryliert und aktiviert. Der EA-D Phosphorylierungsstatus ist dabei wichtig für die virale Replikation (Gershburg *et al.*, 2002).

Nachdem bereits eine Überexpression des *immediate early* Gens BRLF1 nach ERK3 (p97)-Überexpression in B95-8-Zellen gezeigt werden konnte, galt es nun zu zeigen, ob nach dieser Induktion weitere Prozesse der EBV-Aktivierung in B95-8-Zellen eingeleitet würden. Zum EA-D Nachweis wurde ein Immunfluoreszenztest mit spezifischen EA-D Antikörpern durchgeführt. Die EA-D Expression von pcDNA-ERK3*antisense* transfizierten B95-8-Zellen und Kontrollzellen wurde verglichen. Dabei zeigte sich 24 Stunden nach Transfektion eine signifikante EA-D-Überexpression um den Faktor 2 nach Transfektion mit 4 µg pcDNA-ERK3*antisense* ($p < 0,005$) und um den Faktor 2,75 nach Transfektion mit 8 µg Plasmid-DNA ($p < 0,0005$) gegenüber den Kontrollzellen (Abb. 3.17). Die Ergebnisse zeigen, dass eine ERK3 (p97)-Überexpression die Aktivierung des *immediate early* Gens BRLF1 und von EA-D im gleichen untersuchten Zeitraum (24 Stunden) zur Folge hat. Ungewöhnlich ist, dass in diesem Zeitraum keine BZLF1-Induktion beobachtet werden konnte, da eine EA-D-Aktivierung eigentlich die Aktivierung beider *immediate early* Gene, BZLF1 und BRLF1, voraussetzt (Quinlivan *et al.*, 1993). Dies bedeutet, dass es einen BZLF1-unabhängigen Weg zur EA-D-Aktivierung geben muss. ERK3 (p97)-Überexpression führt sowohl in Raji-Zellen (Flosdorff, persönliche Mitteilung) als auch in B95-8-Zellen zur Reaktivierung des EBV-lytischen Zyklus. Die ERK3 (p97)-getriggerte EBV-Reaktivierung scheint nicht von der EBV-infizierten Zelle abhängig zu sein.

4.3.3 Untersuchungen zu Wachstumshemmung und Zelldifferenzierung

Die LM1-Behandlung von Raji-Zellen führt neben der Reaktivierung des lytischen EBV-Zyklus auch zu einer Wachstumshemmung und Differenzierung der Zelle mit einhergehender verminderter Expression der Oberflächenantigene CD21 (EBV-Rezeptor CR2) und HLA-DR.

Der Einfluss von ERK3 (p97) auf die LM1-getriggerte Wachstumshemmung und Zelldifferenzierung in Raji-Zellen ist in vorhergehenden Arbeiten bereits untersucht worden (Flosdorff, persönliche Mitteilung). In dieser Arbeit sollte durch Untersuchung der DNA-Syntheserate und Zellproliferation sowie Durchflusszytometrie nach Transfektion von B95-8-Zellen mit pcDNA-ERK3*antisense* gezeigt werden, ob eine ERK3 (p97)-Überexpression einen Einfluss auf Wachstum und Zelldifferenzierung in B95-8-Zellen hat.

Zur Untersuchung der DNA-Syntheserate wurde 1, 2, 4 und 8 Tage nach Transfektion von B95-8-Zellen mit pcDNA-ERK3*antisense* und pcDNA3.1-E ein BrdU-Test durchgeführt. Über den untersuchten Zeitraum konnte jedoch kein Unterschied der DNA-Syntheserate zwischen ERK3 (p97)-überexprimierenden und mit pcDNA3.-E transfizierten B95-8-Zellen beobachtet werden. Parallel zum BrdU-Test wurde nach Transfektion von B95-8-Zellen mit pcDNA-ERK3*antisense* und pcDNA3.1-E am Tag der Transfektion sowie 1, 2, 4 und 8 Tage danach eine Zellzahlbestimmung vorgenommen. Das Wachstumsverhalten von ERK3 (p97)-überexprimierenden und pcDNA3.1-E transfizierten B95-8-Zellen verhält sich dabei sehr ähnlich. Einen Tag nach Transfektion sinkt die Zellzahl zunächst ab, was auf den durch die Transfektion ausgelösten vorübergehenden Zellstress zurückzuführen ist. Danach verdoppelt sich bei beiden Zellpopulationen das Wachstum zunächst bis zum 4. Tag, um sich bis zum 8. Tag nach Transfektion ungefähr zu verzehnfachen. Die Untersuchungen zu DNA-Syntheserate und Zellzahlbestimmung zeigen also, dass eine ERK3 (p97)-Überexpression keine Änderung des Wachstumsverhaltens in B95-8-Zellen hervorruft.

Die Zell-Oberflächenantigene sind Schalt-, Kommunikations- und Interaktionspunkte für Differenzierung und Reifung der Zelle, Zell-Zell-Interaktion, Antigen-Bindung und Kontrolle der Immunantwort (Barclay *et al.*, 1997). Die LM1-induzierte Wachstumshemmung und Zelldifferenzierung von Raji-Zellen ging unter anderem mit einer verminderten Expression der Oberflächenantigene CD 21 (EBV-Rezeptor CR2) und HLA-DR einher (Schaade *et al.*, 1999).

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob eine ERK3 (p97)-Überexpression in B95-8-Zellen die Expression ausgewählter Oberflächenantigene von B95-8-Zellen moduliert. Dazu wurde nach Transfektion von B95-8-Zellen mit pcDNA-ERK3*antisense* und pcDNA3.1-E eine Durchflusszytometrie durchgeführt, wobei die Expression der Oberflächenantigene CD11a, CD19, CD23, CD30, CD40, CD44, CD54 und CD58 untersucht wurde. Dabei konnte in vorhergehenden Arbeiten bereits eine Modulation der Oberflächenantigene CD19, CD23, CD40,

CD44 und CD58 nach Überexpression der Gene AHCY und PLA2, die ebenso wie ERK3 (p97) zu den Genen gehören, deren Expression nach LM1-Behandlung modifiziert wurde, in Raji-Zellen beobachtet werden (Maret, 2003; Maas, 2002).

Um eine Aussage zur Expression derselben Oberflächenantigene von B95-8-Zellen machen zu können, muss geklärt sein, ob B95-8-Zellen diese Oberflächenantigene in gleicher oder ähnlicher Weise exprimieren wie Raji-Zellen.

Bekannt ist, dass B95-8-Zellen die Oberflächenantigene CD21, CD23, CD11a, CD54 und CD58 exprimieren (Cordier *et al.*, 1990; Billaud *et al.*, 1990). Somit kann die geschilderte Untersuchung mit den Schimpansenzellen durchgeführt werden. In dieser Arbeit konnte kein Unterschied im Expressionsmuster der untersuchten Oberflächenantigene zwischen ERK3 (p97)-überexprimierenden und pcDNA3.1-E transfizierten B95-8-Zellen beobachtet werden. Dies lässt darauf schließen, dass ERK3 (p97) keinen direkten Einfluss auf Zelldifferenzierungsvorgänge in B95-8-Zellen hat.

4.4 Untersuchungen der Signaltransduktionswege bei der ERK3 (p97)- getriggerten Reaktivierung des EBV

Die unter 4.2 diskutierten Ergebnisse zeigen, dass eine ERK3 (p97)-Überexpression die Reaktivierung des EBV-lytischen Zyklus zur Folge hat. Es stellt sich die Frage, ob die ERK3 (p97)-getriggerte EBV-Reaktivierung im Zusammenhang mit den Signaltransduktionswegen bereits auf EBV-Reaktivierung untersuchter Gene steht. In vorangehenden Arbeiten wurde eine EBV-Reaktivierung durch Überexpression der Gene SAH, PKB und 14-3-3 ζ /PLA2 in Raji-Zellen festgestellt. Es handelt sich dabei um Gene, deren Expression ebenso wie die der ERK3 (p97) nach LM1-Behandlung von Raji-Zellen modifiziert worden war. Für alle 3 Gene wurden Expressionsvektoren etabliert: pcDNA-AHCY, pcDNA-PLA2 und pcDNA-RAC. Transfektion von Raji-Zellen mit diesen Expressionsvektoren führte zur Überexpression dieser Gene auf Transkriptebene.

4.4.1 Die Gene SAH, PKB und 14-3-3 ζ /PLA2

S-Adenosylhomocystein Hydrolase (SAH)

Die zelluläre S-Adenosylhomocystein Hydrolase (SAH) hat eine wichtige Funktion bei Transmethylierungsreaktionen. Sie ist in eukaryotischen Zellen das einzige Enzym, das die

reversible Hydrolyse von S-Adenosylhomocystein (AdoHcy) zu Adenosin und Homocystein katalysiert (Yin *et al.*, 2000). S-Adenosylhomocystein (AdoHcy) ist das Produkt aller Adenosylmethionin-abhängigen Transmethylierungsreaktionen und wirkt gleichzeitig als Inhibitor und Regulator dieser Reaktionen (Turner *et al.*, 2000). Die SAH hat somit über die Kontrolle des intrazellulären AdoHcy-Spiegels Einfluss auf alle S-Adenosylmethionin-abhängigen Methylierungsreaktionen. Dieses Enzyms ist von hohem pharmazeutischen Interesse, da seine Blockade durch z.B. Nukleoside oder durch das SAH-Substrat AdoHcy Auswirkungen auf die Methylierung von Phospholipiden, RNA, DNA, Proteinen und anderen kleinen Molekülen hat (Chiang *et al.*, 1996). SAH-Inhibitoren haben sowohl antivirale, anti-parasitäre, antiarthritische als auch immunsuppressive Effekte. Darüber hinaus führt die Inhibition der SAH zur Hemmung der Replikation verschiedener Viren (z.B. CMV, Ebola, Rabiesvirus, RSV) (Bray *et al.*, 2000; Snoeck *et al.*, 1993).

Phospholipase A2 (PLA2)

Zu den Phospholipasen A2 gehören Enzyme, die Acyl-Bindungen an der sn-2-Position von Phospholipiden spalten können. Dabei entstehen Lysophospholipide und freie Fettsäuren. In Mammalia-Zellen findet man an der sn-2-Position von Phospholipiden Arachidonsäure. Arachidonsäure ist ein Vorläufer der Eicosanoide, welche unter anderem physiologische und pathophysiologische Effekte auf die Niere und andere Organe haben (Bonventre, 1992). Phospholipasen stehen im Zusammenhang mit Verdauung, Entzündungsreaktionen sowie inter- und intrazellulären Signaltransduktionsprozessen (Bonventre, 1992).

Die hier untersuchte PLA2 gehört zur Familie der 14-3-3-Proteine, einer Familie aus Adapter und *Scaffolding*-Proteinen, die mit mehr als 60 Proteinen interagieren und in allen eukaryotischen Zellen vorkommen. Es sind 7 Isoformen der 14-3-3-Proteine bekannt mit Molekulargewichten von 28 bis 33 kDa. Die Proteine bilden sowohl Homo- als auch Heterodimere und interagieren mit Phosphoserin-Bindungsdomänen (Powell *et al.*, 2002). Die 14-3-3-Proteine binden eine Vielzahl verschiedener Signalproteine wie Kinasen, Phosphatasen und Transmembranrezeptoren. Sie spielen damit eine große Rolle bei verschiedensten regulatorischen Prozessen wie Signaltransduktion, Apoptose und Zellzykluskontrolle (Fu *et al.*, 2000).

Proteinkinase B (PKB)

Die Proteinkinase B gehört zur AGC-Familie der Serin/Threonin-Proteinkinasen und wird wegen ihrer Verwandtschaft zu den Proteinkinasen A und C auch *RAC (related to A and C kinases)* genannt. Die PKB ist das humane Homolog des v-akt Onkogen des transformieren-

den AKT8-Retrovirus und wird zur Abgrenzung vom viralen Onkogen auch als c (*cellular*)-akt bezeichnet.

In Mammalia-Genomen sind 3 PKB-Isoformen bekannt: PKB α , PKB β und PKB γ . Bei PKB handelt es sich um ein Multi-Domänen-Protein. N-terminal befindet sich eine Pleckstrin-Homologie (PH)-Domäne. Die zentrale katalytische Domäne ähnelt derjenigen der PKA und PKC. Das C-terminale Ende zeigt starke Ähnlichkeit mit dem der PKC und enthält ein hydrophobes Motiv (HM) (Coffer *et al.*, 1998; Scheid *et al.*, 2003).

Die PKB ist in den PI3-Signaltransduktionsweg eingeschaltet. Dabei kommt es nach Bindung z.B. eines Wachstumsfaktors an einen Zellmembranrezeptor über eine Ras-Aktivierung zur Aktivierung der Phosphatidylinositolkinase 3 (PI3-Kinase). Die aktivierte PI3-Kinase phosphoryliert Phosphatidylinositole (PtdIns). Dabei entstehen unter anderem PtdIns(3,4)P₂ und PtdIns(3,4,5)P₃, welche die PH-Domäne der PKB binden. Diese Bindung hat die Translokation der PKB an die Zellmembran zur Folge, wo die Aktivierung der PKB erfolgt. PKB wird über zwei Aminosäurereste, Thr 308 in der katalytischen Domäne und Ser 473 in der HM-Domäne des C-terminalen Endes phosphoryliert und aktiviert (Powell *et al.*, 2002). Dabei erfolgt zuerst die Phosphorylierung über Ser 473 durch *integrin-linked kinase* (ILK), welche dann die Phosphorylierung und Aktivierung von Thr 308 über die Proteinkinase PDK1 ermöglicht (Scheid *et al.*, 2003; Persad *et al.*, 2001). Darüber hinaus wird eine PDK1-abhängige Autophosphorylierung der PKB an Ser 473 diskutiert (Persad *et al.*, 2001).

Die PKB-Aktivität wird von zwei Phosphatasen, PTEN und SHIP, reguliert. PTEN dephosphoryliert PtdIns(3,4)P₂ und PtdIns(3,4,5)P₃ und verhindert dadurch die PKB-Aktivierung. Die Phosphatase SHIP katalysiert die Dephosphorylierung von PtdIns(3,4,5)P₃ zu PtdIns(3,4)P₂ und vermindert dadurch deutlich die PKB-Aktivität (Scheid *et al.*, 2003).

Die Proteinkinase B kontrolliert verschiedene intrazelluläre Prozesse wie z.B. Hemmung der Apoptose und Zell-Zyklus-Progression. Außerdem hat ihre Aktivierung Effekte auf den Zellmetabolismus. Durch Phosphorylierung des pro-apoptischen Faktors BAD und Caspase-9-Aktivierung inhibiert PKB die Apoptose (Itoh *et al.*, 2002). Die PKB ist außerdem in vielen Tumorzellen überexprimiert. Diese Tatsache und die Kenntnis ihrer antiapoptischen Eigenschaften zeigen, dass die PKB eine wichtige Funktion bei Transformationsprozessen hat (Coffer *et al.*, 1998). So konnte in humanen kolorektalen Karzinomzellen eine verstärkte PKB-Phosphorylierung nachgewiesen werden, welche zu verstärktem Tumorwachstum und Blockade der Apoptose führte (Itoh *et al.*, 2002). Darüber hinaus ist die PKB in Insulin-getriggerte Proteinbiosynthese, Glykolyse und Glykogensynthese involviert (Coffer *et al.*, 1998). Über

Phosphorylierung des 4E-Bindungsproteins (4E-BP1) und Aktivierung des eIF-4E (*eukaryotic initiation factor-4E*) induziert PKB die mRNA-Translation. Im Glukosemetabolismus induziert PKB die Translokation der Glukosetransporter GLUT 1 und 4 zur Zellmembran. Über Phosphorylierung der 6-Phosphofruktose 2-Kinase (PFK2) stimuliert die PKB die Insulin-getriggerte Glykolyse. Nach Insulinstimulation phosphoryliert und inaktiviert die PKB die Glykogen-Synthase-Kinase 3 (GSK3) und induziert dadurch die Glykogensynthese (Kandel *et al.*, 1999; Coffey *et al.*, 1998).

4.4.2 ERK3 (p97)-Überexpression und PLA2-Proteinexpression

Zunächst sollte untersucht werden, ob eine ERK3-Überexpression die PLA2-Expression auf Proteinebene verändert. Die in vorangehenden Arbeiten untersuchte 14-3-3 ζ /PLA2 gehört zur Familie der 14-3-3 Proteine. Es wurden Proteine aus pcDNA-ERK3*antisense*, pcDNA-3.1 und nicht transfizierten B95-8-Zellen 24 Stunden nach Transfektion isoliert und in einen Western Blot eingesetzt. Zur Detektion der 14-3-3 ζ /PLA2 wurde ein Antikörper gegen 2 Mitglieder der 14-3-3-Proteinfamilie, 14-3-3 β und ζ verwendet. Der Antikörper wies ein 30 kDa Protein nach. Die Intensität der Banden war für alle isolierten Proteine gleich stark, was darauf schließen lässt, dass ERK3 (p97) keinen regulierenden Einfluss auf die 14-3-3 β , ζ Proteine hat.

Der Einfluss einer ERK3 (p97)-Überexpression auf die Expression der Gene SAH und PKB auf Proteinebene konnte nicht untersucht werden, da für den Nachweis dieser Proteine zur Zeit keine geeigneten kommerziell erhältlichen Antikörper zur Verfügung stehen.

4.4.3 Einfluss der Gene SAH, PKB und 14-3-3 ζ /PLA2 auf die ERK3 (p97)-Expression auf Transkriptebene

Nachdem eine ERK3-getriggerte Veränderung der 14-3-3 ζ /PLA2, SAH und PKB-Expression auf Proteinebene nicht nachgewiesen bzw. untersucht werden konnte, sollte nun untersucht werden, ob eine Überexpression von 14-3-3 ζ /PLA2, SAH oder PKB auf Transkriptebene einen Einfluss auf die ERK3 (p97)-Expression auf Transkriptebene hat. Dazu wurden B95-8-Zellen in parallelen Ansätzen mit den Expressionsvektoren pcDNA-PLA2, pcDNA-AHCY, pcDNA-RAC und pcDNA-3.1 transfiziert. Nach 4, 8 und 24 Stunden wurde RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und eine Schimpansen-ERK3 (p97)-spezifische quantitative *real time*

PCR durchgeführt. Acht Stunden nach Transfektion zeigte sich in SAH-überexprimierenden Zellen eine signifikante ERK3 (p97)-Überexpression um den Faktor 2 ($p < 0,001$) (Abb. 3.22). Die ERK3 (p97)-Überexpression in PKB-überexprimierenden Zellen war um den Faktor 4 sowohl 4 als auch 8 Stunden nach Transfektion signifikant erhöht ($p < 0,001$), um dann auf den Faktor 2 nach 24 Stunden ($p < 0,005$) abzufallen (Abb. 3.22). Nach 14-3-3 ζ /PLA2-Überexpression zeigte sich dagegen eine signifikante ERK3 (p97)-Überexpression um den Faktor 50 ($p < 0,001$) über den ganzen untersuchten Zeitraum (Abb. 3.23). Diese Ergebnisse zeigen, dass die Überexpression aller 3 Gene eine ERK3 (p97)-Überexpression auf Transkript-Ebene zur Folge hat, so dass man davon ausgehen kann, dass ERK3 (p97) durch 14-3-3 ζ /PLA2-, SAH- und PKB-getriggerte Signaltransduktionswege positiv reguliert wird.

Dabei kommt besonders 14-3-3 ζ /PLA2 mit einer ERK3 (p97)-Induktion um den Faktor 50 eine große Bedeutung zu. Über die Beteiligung der 3 Gene an zellulären Signaltransduktionswegen ist bereits einiges bekannt. Hinweise für eine direkte Interaktion zwischen 14-3-3 ζ /PLA2, SAH oder PKB und ERKs gibt es jedoch nicht. Man weiß aber, dass ein Zusammenhang zwischen 14-3-3 ζ /PLA2 und dem MAP-Kinase-Signalweg besteht. 14-3-3 Proteine binden als Heterodimer Raf. Die Serin/Threonin-Proteinkinase Raf spielt eine Rolle bei Regulation von Wachstum, Differenzierung und Apoptose eukaryotischer Zellen. Sie wird durch Bindung eines Liganden (z.B. Wachstumsfaktor) an Rezeptor-Tyrosinkinasen über die GTP-Bindungsproteine der Ras-Familie aktiviert und aktiviert über die Aktivierung der Kinasen MEK 1 und 2 die MAP-Kinasen ERK1 und 2. Von Raf existieren 3 Isoformen: Raf-1, A-Raf und B-Raf. Raf existiert als Multiprotein-Komplex aus Raf-1 oder B-Raf und *heat shock protein 90* (*hsp 90*), p50 und einiger 14-3-3 Proteine (Pearson *et al.*, 2001). Die Bindung von 14-3-3 Proteinen an Raf-1 hält Raf-1 in einem inaktiven aber prinzipiell aktivierungskompetenten Zustand (Qui *et al.*, 2000).

Der Zusammenhang der Gene SAH, 14-3-3 ζ /PLA2 und PKB mit bekannten Signaltransduktionswegen hinsichtlich der durch sie getriggerten EBV-Aktivierung ist in vorangehenden Arbeiten bereits untersucht und diskutiert worden (Maret, 2003; Maas, 2002; Metz, 2002; Werth, persönliche Mitteilung). Über eine Beteiligung von ERK3 (p97) an einem bekannten zellulären Signalweg ist dagegen nichts bekannt, man kennt weder ERK3 (p97)-Substrat noch regulierende Kinase. Hier sollen mögliche Gemeinsamkeiten dieser 4 Gene bei der EBV-Reaktivierung diskutiert werden.

Wie unter 4.2 dargestellt, erfolgt die ERK3 (p97)-getriggerte EBV-Reaktivierung über Induktion des *immediate early* Gens BRLF1. Eine ERK3 (p97)-getriggerte BZLF1-Induktion kann

te dagegen nicht nachgewiesen werden. Darüber hinaus ließ sich eine durch ERK3 (p97)-Überexpression induzierte EA-D Überexpression nachweisen, was zeigt, dass die durch ERK3 (p97)-getriggerte EBV-Reaktivierung sich nicht auf Aktivierung eines *immediate early* Gens beschränkt, sondern weitere Aktivierungsschritte auslöst.

Der Einfluss der Gene SAH, 14-3-3 ζ /PLA2 und PKB auf die EBV-Reaktivierung wurde in vorhergehenden Arbeiten in Raji- und für SAH auch in B95-8-Zellen untersucht. Die Überexpression aller 3 Gene führt über BZLF1-Induktion zur Reaktivierung des lytischen Zyklus. Für alle 3 Gene wurden mögliche Signalwege, die zur EBV-Reaktivierung führen könnten, diskutiert.

Von SAH ausgehend werden 2 unabhängige Wege diskutiert, die beide zur Induktion des *immediate early* Gens BZLF1 führen könnten (Maas, 2002). Ein Weg verläuft über SAH-getriggerte PKC-Aktivierung und induziert BZLF1 über den Zp-Promotor. Der andere Weg ist PKC-unabhängig und verläuft über SAH-getriggerte 14-3-3 ζ /PLA2-Aktivierung. Über diesen Weg wird BZLF1 via den Rp-Promotor aktiviert. Diese Beobachtungen wurden in SAH-überexprimierenden Raji-Zellen gemacht. Darüber hinaus konnte in Raji-Zellen eine Beteiligung der 14-3-3 ζ /PLA2 an der Spontanreaktivierung des EBV festgestellt werden (Maas, 2002). Um zu überprüfen, ob es sich bei diesen Beobachtungen um zellspezifische Phänomene handelt oder ob sich diese Aktivierungsschemata auch auf andere Zell-Linien übertragen ließen, wurden SAH-überexprimierende B95-8-Zellen mit Inhibitoren für PKC bzw. 14-3-3 ζ /PLA2 behandelt und ihre Auswirkung auf die SAH-getriggerte EBV-Reaktivierung via BZLF1 und EA-D mittels Northern Blot und Immunfluoreszenztest untersucht (Werth, persönliche Mitteilung). Nicht transfizierte B95-8-Zellen wurden nach Behandlung mit PLA2-Inhibitoren hinsichtlich ihrer EA-D-Expression im Immunfluoreszenztest untersucht, um zu zeigen, ob 14-3-3 ζ /PLA2 auch in B95-8-Zellen in die Spontanreaktivierung des EBV involviert ist. Die bei Raji-Zellen erzielten Beobachtungen ließen sich in B95-8-Zellen nicht reproduzieren. Die mit Inhibitoren behandelten B95-8-Zellen zeigten im Gegensatz zu Raji-Zellen im Immunfluoreszenztest eine gesteigerte unspezifische Fluoreszenz, von welcher fluoreszierende EA-D-exprimierende Zellen nicht unterschieden werden konnten. Auch konnte kein Unterschied in der BZLF1-Expression im Northern Blot festgestellt werden, da die verwendeten DIG-markierten Sonden nicht sensitiv genug für den Nachweis von BZLF1-cDNA sind. Die PKB-getriggerte EBV-Reaktivierung in Raji-Zellen verläuft PKC-unabhängig über Induktion von BZLF1 via seinen Rp-Promotor (Metz, 2002). Auch für PKB konnte eine Beteiligung an der Spontanreaktivierung des EBV in Raji-Zellen nachgewiesen

werden. Diese Beobachtungen wurde jedoch nur in Raji-Zellen gemacht, so dass auch hier nicht geklärt ist, ob es sich um zellspezifische Phänomene oder allgemeingültige Mechanismen der EBV-Reaktivierung handelt.

Die in Raji-Zellen erzielten Beobachtungen aller 3 Gene, SAH, 14-3-3 ζ /PLA2 und PKB, bezüglich der BZLF1-Induktion via den Rp-Promotor und die in dieser Arbeit gezeigte Induktion von ERK3 (p97) durch Überexpression dieser Gene in B95-8-Zellen sowie die ERK3 (p97)-getriggerte BRLF1-Induktion, die über den Rp-Promotor verläuft, lassen einen Zusammenhang zwischen Induktion des Rp-Promotors dieser Gene und der ERK3 (p97)-getriggerten BRLF1-Induktion vermuten. Zwar wurde in Raji-Zellen die BRLF1-Expression nach Überexpression von SAH, 14-3-3 ζ /PLA2 und PKB nicht untersucht. BRLF1 wird in Raji-Zellen durchaus exprimiert und fungiert als Transaktivator verschiedener viraler Gene. Es kann jedoch nicht den Zp- oder Rp-Promotor aktivieren und damit nicht die BZLF1 oder seine eigene Expression induzieren (Ragoczy & Miller, 1999). Die BRLF1-Expression in Raji-Zellen gilt zwar als Indikator des lytischen Zyklus, seine Expression alleine reicht in Raji-Zellen jedoch nicht aus, die Latenzphase komplett zu durchbrechen. Aus diesem Grund wurde die BRLF1-Expression in Raji-Zellen nicht weiter untersucht. Es ist jedoch bekannt, dass über den Rp-Promotor sowohl BZLF1 und BRLF1 als bicistronische mRNA als auch nur BRLF1 exprimiert werden können (Manet *et al.*, 1989). Die Induktion des Rp-Promotors durch einen von SAH ausgehenden 14-3-3 ζ /PLA2-abhängigen Signalweg sowie einen von PKB ausgehenden Signalweg dürfte über Induktion von ERK3 (p97) verlaufen. Eine durch SAH-getriggerte 14-3-3 ζ /PLA2-Überexpression in Raji-Zellen wurde ebenfalls erst 1 Tag nach Transfektion untersucht. Es ist fraglich, inwieweit Rückschlüsse aus den Ergebnissen von Raji-Zellen auf die Ergebnissen von B95-8-Zellen mit anderen Versuchsbedingungen zu ziehen sind.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse über die SAH und 14-3-3 ζ /PLA2-getriggerten ERK3 (p97)-Induktion unterscheiden sich erheblich voneinander. Während eine AHCY-getriggerte ERK3 (p97)-Induktion nur 8 Stunden nach Transfektion um den Faktor 2 festzustellen war, zeigt sich 4, 8 und 24 Stunden nach PLA2-Überexpression eine ERK3 (p97)-Induktion um den Faktor 50. Diese massive 14-3-3 ζ /PLA2-getriggerte ERK3 (p97)-Expression ist nach SAH-Überexpression nicht ansatzweise so ausgeprägt. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass ein PLA2-abhängiger AHCY-Signalweg via ERK3 (p97) zur Induktion des EBV-lytischen Zyklus in B95-8-Zellen entweder nicht existiert oder eine wesentlich geringere Rolle spielt. Darüber hinaus könnte es zusätzliche 14-3-3 ζ /PLA2- und SAH-getriggerte

Signalwege, die über ERK3 (p97)-Induktion zur EBV-Reaktivierung führen, geben, die aber untereinander nicht im Zusammenhang stehen.

Eine Interaktion zwischen der PKB und der 14-3-3-Proteinfamilie wird diskutiert. Powell *et al.* konnten zeigen, dass die PKB mit einem Mitglied der 14-3-3-Proteinfamilie, 14-3-3 ζ , interagiert und an Ser 58 phosphoryliert (Powell *et al.*, 2002). Die hier untersuchte PKB ist Mitglied der 14-3-3-Familie. Ein Zusammenhang zwischen PKB und 14-3-3-getriggelter EBV-Reaktivierung ist noch nicht untersucht worden. Da die Überexpression beider Gene eine ERK3 (p97)-Induktion über den gesamten untersuchten Zeitraum (4, 8 und 24 Stunden) zur Folge hat, könnte ein Zusammenhang bei der ERK3 (p97)-Induktion durch PKB und 14-3-3 vermutet werden. Das Ausmaß der 14-3-3 ζ /PLA2 getriggerten ERK3 (p97)-Induktion (Faktor 50) unterscheidet sich jedoch auch im Vergleich mit der PKB-getriggerten (Faktor 4) erheblich, so dass es zusätzlich zu einem 14-3-3-abhängigen PKB-Signalweg andere PKB-Signaltransduktionswege geben muss, die zu einer ERK3 (p97)-Induktion um den Faktor 50 führen.

Zusammenfassend kann vermutet werden, dass 14-3-3 ζ /PLA2 eine entscheidende Rolle bei der ERK3 (p97)-Induktion spielt. Die Vergleiche mit AHCY- und PKB-getriggelter ERK3 (p97)-Induktion, die teilweise über 14-3-3 ζ /PLA2 Aktivierung verlaufen könnten, zeigen, dass die ERK3 (p97)-Induktion wahrscheinlich über mehrere Signaltransduktionswege erfolgt, bei dem 14-3-3 ζ /PLA2 eine wichtige Funktion einnimmt. Die ERK3 (p97)-Induktion über diese verschiedenen Signaltransduktionswege könnte dann unter anderem auch über BRLF1-Aktivierung via den Rp-Promotor zur EBV-Reaktivierung führen.

In Abbildung 4.2 sind schematisch die Ergebnisse der Untersuchungen über ERK3 (p97) in B95-8-Zellen eingefügt in die Befunde von Flosdorff über die Wirkung der ERK3 (p97)-Überexpression in Raji-Zellen.

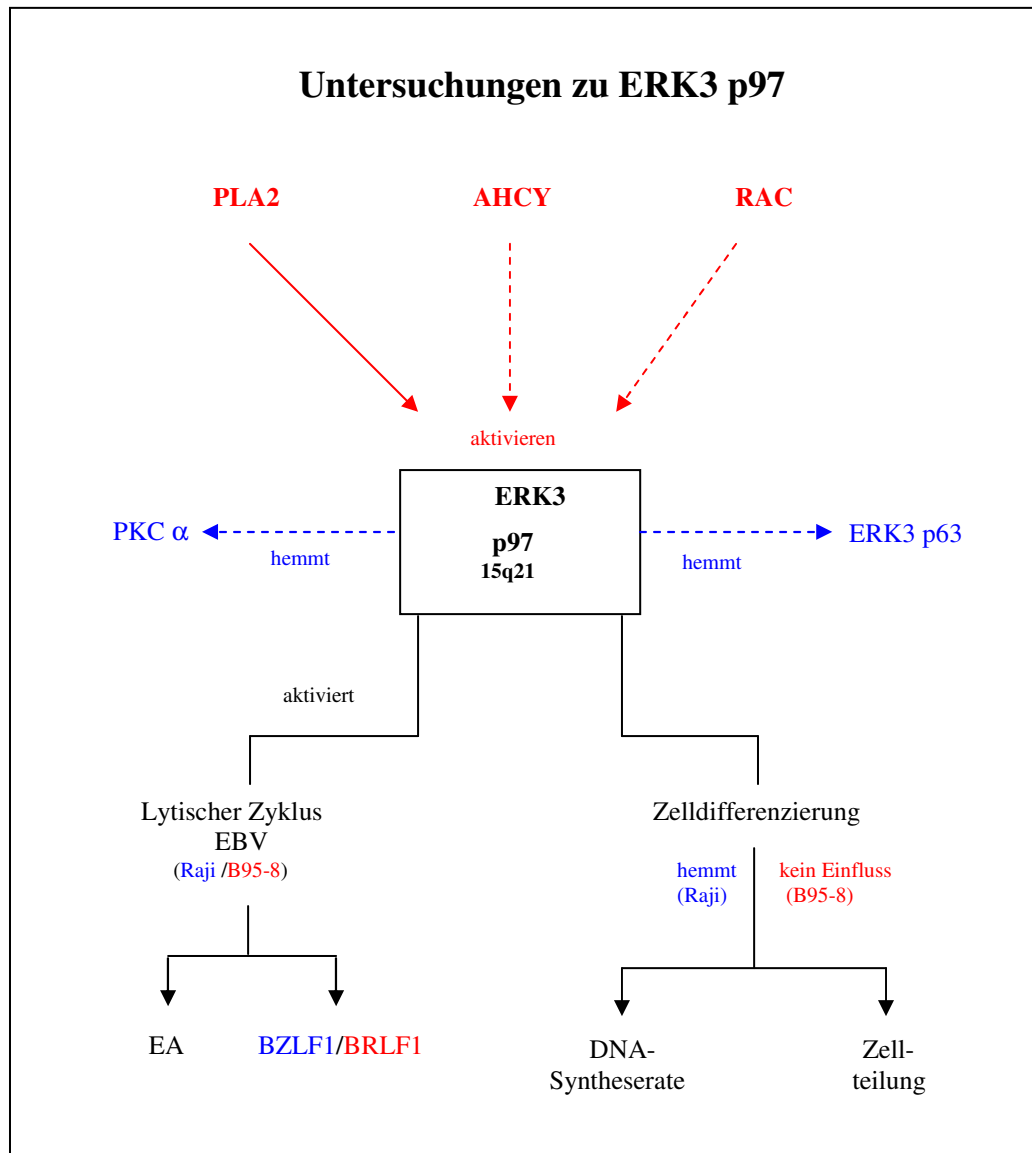


Abb. 4.2: Untersuchungen zur ERK3 (p97) in **Raji-** (Flosdorff) und **B95-8**-Zellen.

4.5 Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit haben gezeigt, dass ERK3 (p97) den lytischen Zyklus des Epstein-Barr Virus der Schimpansenzelllinie B95-8 aktiviert. ERK3 (p97) scheint Teil eines Signaltransduktionsweges zu sein, über den 14-3-3ζ/PLA2, PKB und SAH Einfluss auf die Virusaktivität nehmen.

Wenn es in nachfolgenden Arbeiten gelingt, in primären, EBV-assoziierten Tumorzellen die vorliegenden Befunde zu bestätigen, wäre es möglich, durch gezielte Steigerung der Expression von ERK3 (p97) den lytischen Zyklus des Virus in den Tumorzellen in Gang zu setzen. Das würde zu einer virusinduzierten Zerstörung der Tumorzellen führen.

5. Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit war es, die Auswirkung der Transfektion von EBV-positiven B95-8-Zellen mit pcDNA-ERK3*antisense* zu untersuchen. Im Mittelpunkt einer verstärkten ERK3 (p97)-Expression in B95-8-Zellen stand die Induktion des lytischen EBV-Zyklus und das Teilungsverhalten der Wirtszellen. Die Transfektion von B95-8-Zellen mit dem Expressionsvektor pcDNA-ERK3*antisense* führte zu folgenden Ergebnissen:

- Nach Transfektion von B95-8-Zellen mit pcDNA-ERK3*antisense* kam es zur Überexpression von ERK3 (p97) auf Transkriptebene.
- Das Schimpansen-ERK3 (p97)-Gen wies gegenüber dem humanen ERK3 (p97)-Gen Nukleotid- austausche im Bereich der Bindungsstellen der Hybridisierungs sonden, die in der ERK3 (p97)-spezifischen *real time* PCR verwendet werden, auf.
- Der immunologische Nachweis des Schimpansen-ERK3 (p97)-Genprodukt mit kommerziellen Antikörpern gegen humanes ERK3 (p97) gelang nicht.
- Eine Überexpression des *immediate early* Gens BRLF1 wurde nach ERK3 (p97)-Überexpression nachgewiesen. Die BZLF1-Expression nach ERK3 (p97)-Überexpression war nicht verändert.
- Eine gesteigerte Expression des Genprodukts des *delayed early* Gens BMRF1, Early-Antigen (EA-D), 24 Stunden nach ERK3 (p97)-Überexpression wurde mittels Immunfluoreszenz nachgewiesen.
- Die DNA-Syntheserate war 1, 2, 4 und 8 Tage nach Transfektion von B95-8-Zellen mit pcDNA-ERK3*antisense* nicht verändert.
- Die ERK3 (p97)-Überexpression hatte keinen Einfluss auf die Teilungsrate der B95-8-Zellen.
- Das Expressionsmuster der Oberflächenantigene CD44, CD11a, CD23, CD54, CD30, CD19, CD58, CD40 auf B95-8-Zellen war nach ERK3 (p97)-Überexpression nicht verändert.
- Die Expression von 14-3-3 ζ /Phospholipase A2 (PLA2) wurde durch die ERK3 (p97)-Überexpression in B95-8-Zellen nicht beeinflusst.
- Die Überexpression der Gene, die für 14-3-3 ζ /PLA2, PKB und SAH kodieren, führte zu einer starken Überexpression von ERK3 (p97) in B95-8-Zellen. Besonders ausgeprägt war dies nach 14-3-3 ζ /PLA2-Überexpression mit einer Induktion von ERK3 (p97) um den Faktor 50.

Die Überexpression von ERK3 (p97) in B95-8-Zellen führte zu einer Reaktivierung des EBV. Im Gegensatz zu der bekannten Reaktivierung über BZLF1 in Raji-Zellen verläuft die ERK3 (p97) abhängige Virusreaktivierung in B95-8-Zellen über das *immediate early* Gen BRLF1. Die gezielte Induktion von ERK3 (p97) zur Aktivierung des lytischen Zyklus in EBV-Genom positiven Tumoren könnte therapeutisch genutzt werden, um eine Selbstzerstörung der Tumorzellen zu initiieren.

6. Literaturverzeichnis

- Baer R et al.** (1984). DNA sequence and expression of the B95-8 Epstein-Barr virus genome. *Nature* 310: 207-211
- Barclay AN, Brown MH, Law SKA, McKnight AJ, Tomlinson MG and van der Merwe PA** (1997). The Leucocyte Antigen FactsBook. 2nd edn. *Academic Press*.
- Baumann M, Mischak H, Dammeier S, Kolch W, Gires O, Pich D, Zeidler R, Delecluse HJ, Hammerschmidt W** (1998). Activation of the Epstein-Barr Virus Transcription Factor BZLF1 by 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetate-Induced Phosphorylation. *Journal of Virology* 72 No.10: 8105-8114
- Billaud M, Rousset F, Calender A, Cordier M, Aubry JP, Laisse V, Lenoir GM** (1990). Low expression of lymphocyte function-associated antigen (LFA)-1 and LFA-3 adhesion molecules is a common trait in Burkitt's lymphoma associated with and not associated with Epstein-Barr Virus. *Blood* 75 No.9: 1827-1833
- Bonventre JV** (1992). Phospholipase A₂ and Signal Transduction. *J. Am. Soc. Nephrol.* 3 No.2: 128-150
- Boulton TG** (1991). ERKs: A Family of Protein-Serin/Threonine Kinases that are activated an tyrosine phosphorylated in response to Insulin and NGF. *Cell* 65, 663-675
- Bray M, Driscoll J & Huggins JW** (2000). Treatment of lethal Ebola virus infection in mice with a single dose of an S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase inhibitor. *Antiviral Research* 45 No.2: 135-147
- Brown HJ, Song MJ, Deng H, Wu T, Cheng G, Sun R** (2003). NF-κB Inhibits Gamma-herpesvirus Lytic Replication. *Journal of Virology* 77 No.15: 8532-8540
- Cheng M, Boulton TG, and Cobb MH** (1995). ERK3 Is a Constitutively Nuclear Protein Kinase. *Journal of Biological Chemistry* 271, 8951-8958

Cheng M, Zhen E, Robinson MJ, Ebert D, Goldsmith E and Cobb M (1996). Characterization of a Protein Kinase that Phosphorylates Serine 189 of the Mitogen-activated Protein Kinase Homolog of ERK3. *Journal of Biological Chemistry* 271 No.20: 12057-12062

Chiang PK, Gordon RK, Tal J, Zeng GC, Doctor BP, Pardhasaradhi K, McCann PP (1996). S-Adenosylmethionine and methylation. *FASEB, Review article* 471-478

Chung Y, Lee YW, Yen S and Chi K (2000). A novel approach for nasopharyngeal carcinoma treatment uses phenylbutyrate as a protein kinase C modulator: implications for radiosensitization and EBV-targeted therapy. *Clinical Cancer Research* Vol. 6: 1452-1458

Coffer PJ, Jin J and Woodgett JR (1998). Protein kinase B (c-Akt): a multifunctional mediator of phosphatidylinositol 3-kinase activation. *J Biochem* 335: 1-13

Cordier M, Calender A, Billaud M, Zimmer U, Rousselet G, Pavlish O, Banchereau J, Tursz T, Bornkamm G, Lenoir GM (1990). Stable transfection of Epstein-Barr virus (EBV) nuclear antigen 2 in lymphoma cells containing the EBV P3HR1 genome induces expression of B-cell activation molecules CD21 and CD23. *Journal of Virology* 64 No.3: 1002-1013

Coulombe P, Rodier G, Pelletier S, Pellerin J, Meloche S (2003). Rapid Turnover of Extracellular Signal-Regulated Kinase 3 by the Ubiquitin-Proteasome Pathway Defines a Novel Paradigm of Mitogen-Activated Protein Kinase Regulation during Cellular Differentiation. *Molecular and Cellular Biology* 23 No13: 4542-4558

Daibata M, Speck SH, Mulder C, Sairenji T (1993). Regulation of the BZLF1 Promotor of Epstein-Barr Virus by Second Messengers in Anti-Immunoglobulin-Treated B-Cells. *Virology* 198: 446-454

Darr C D, Mauser A and Kenney S (2001). Epstein-Barr Virus Immediate-Early Protein BRLF1 Induces the Lytic Form of Viral Replication through a Mechanism Involving Phosphatidylinositol-3 Kinase Activation. *Journal of Virology* 75 No.13: 6135-6142

Davis RG (1995). Transcriptional Regulation by MAP Kinases. *Molecular Reproduction and Development* 42: 459-467

El-Guindy AS, Heston L, Endo Y, Cho M and Miller G (2002). Disruption of Epstein-Barr virus latency in the absence of phosphorylation of ZEBRA by protein kinase C. *Journal of Virology* Vol.76, No.22: 11199-11208

Epstein MA & Achong BG (1964). Virus Particles In Cultured Lymphoblasts From Burkitts Lymphoma.. *The Lancet* 252: 702-703

Epstein MA & Achong BG (1979). *The Epstein-Barr Virus*. Berlin: Springer Verlag

Fahmi H, Cochet C, Hmama Z, Opolon P, Joab I (2000). Transforming growth factor beta 1 stimulates expression of the Epstein-Barr virus BZLF1 immediate-early gene product ZEBRA by an indirect mechanism which requires the MAPK pathway. *Journal of Virology* 74 No.13: 5810-5818

Feederle R, Kost M, Baumann M, Janz A, Drouet E, Hammerschmidt W and Delecluse HJ (2000). The Epstein-Barr virus lytic program is controlled by the co-operative functions of two transactivators. *The EMBO Journal* Vol.19, No.12: 3080-3089

Fu H, Subramanian RR and Masters SC (2000). 14-3-3 proteins: Structure, function and regulation. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 40, 617-647

Gershburg E and Pagano JS (2002). Phosphorylation of the Epstein-Barr Virus (EBV) DNA Polymerase Processivity Factor EA-D by the EBV-Encoded Protein Kinase and Effects of the L-Riboside Benzimidazole 1263W94. *Journal of Virology* 76 No.3: 998-1003

Gonzalez FA, Raden DL, Rigby MR and Davis RJ (1992). Heterogenous expression of four MAP kinase isoforms in human tissues. *FEBS* 304 No2,3: 170-178

Gradoville L, Kwa D, El-Guindy A, Miller G (2002). Protein Kinase C-Independent Activation of the Epstein-Barr Virus Lytic Cycle. *Journal of Virology* 76 No.11: 5612-5626

Gruffat H & Sergeant A (1994). Characterization of the DNA-binding site repertoire for the Epstein-Barr virus transcription factor R. *Nucleic Acid Research* 22 No.7: 1172-1178

Henle W und Henle G (1968). Effect of arginine-deficient media on the herpes-type virus associated with cultured Burkitt tumor cells. *Journal of Virology* 2: 182-191

Henle G, Henle W, Klein G (1971). Demonstration of two distinct components in the early antigen complex of Epstein-Barr virus infected cells. *J.Canc.* 8: 272-282

Itoh N, Semba S, Ito M, Takeda H, Kawata S, Yamakawa M (2002). Phosphorylation of Akt/PKB is required for suppression of cancer cell apoptosis and tumor progression in human colorectal carcinoma. *American Cancer Society* 94 No. 12: 3127-3134

Julien C, Coulombe P, Meloche S (2003). Nuclear Export of ERK3 by a CRM1-dependent Mechanism Regulates Its Inhibitory Action on Cell Cycle Progression. *Journal of Biological Chemistry* 278 No. 43: 42615-42624

Kandel ES and Hay N (1999). The Regulation and Activities of the Multifunctional Serine/Threonine Kinase Akt/PKB. *Experimental Cell Research* 253: 210-229

Kiehl A & Dorsky DI (1991). Cooperation of EBV DNA Polymerase and EA-D (BMRF1) *in vitro* and Colocalization in Nuclei of Infected Cells. *Virology* 184: 330-340

Kim SH and Yang YC (1996). A Specific Association of ERK3 with B-Raf in Rat Hippocampus. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 229: 577-581

Klein G, Pearson G, Henle G, Henle W, Diehl V and Niederman JC (1968). Relation between Epstein-Barr viral and membrane immunofluorescence in Burkitt tumor cells. II. Comparison of cells and sera from patients with Burkitt's lymphoma and infectious mononucleosis. *J Exp Med* 128 No.5: 1021-1030

Klein G (1995). EBV-B cell interactions: immortalization, rescue from apoptosis, tumorigenicity. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* 43: 97-105

Kleines M, Gärtner A, Ritter K, Schaade L (2000). Early steps in termination of the immortalization state in Burkitt lymphoma: induction of genes involved in signal transduction, transcription, and trafficking by the ganglioside IV³Neu-Ac-nLcOse₄Cer. *Biochemica et Biophysica ACTA* 1492: 139-144

Li L, Mark Wusk M, Gonzalez FA & Davis RJ (1994). Genomic loci of human mitogen-activated protein kinases. *Oncogene* 9: 647-649

Liang CL, Chen JL, Hsu YPP, Ou JT, Chang YS (2002). Epstein-Barr Virus BZLF1 Gene Is Activated by Transforming Growth Factor- β through Cooperativity of Smads and c-Jun/c-Fos Proteins. *Journal of Biological Chemistry* 277 No.26: 23345-23357

Liebowitz D and Kieff E (1993). Epstein-Barr virus. *The Human Herpesviruses* Roizman R, Whitley RJ, Lopez C Raven Press

Maas D (2002). Untersuchungen zu Signaltransduktionsmechanismen bei der s-Adenosylhomocystein Hydrolase getriggerten Reaktivierung des Epstein-Barr Virus. *Diplomarbeit am Institut für Medizinische Mikrobiologie Fachbereich Virologie der RWTH Aachen.*

Manet E, Gruffat H, Trescol-Biemont MC, Moreno N, Chambard P, Giot JF and Sergeant A (1989). Epstein-Barr virus bicistronic mRNAs generated by facultative splicing code for two transcriptional trans-activators. *Embo Journal* 8 No.6: 1819-1926

Maret C (2003). Überexpression von s-Adenosylhomocystein Hydrolase in Epstein-Barr Virus positiven Burkitt Lymphomzellen. *Doktorarbeit am Institut für Medizinische Mikrobiologie Fachbereich Virologie der RWTH Aachen.*

Meloche S, Beatty BG, Pellerin J (1996). Primary structure, expression and chromosomal locus of a human homolog of rat ERK3. *Oncogene* 13: 1575-1579

Metz S (2002). Untersuchungen zu Signaltransduktionsmechanismen bei der Proteinkinase B getriggerten Reaktivierung des Epstein-Barr Virus. *Diplomarbeit am Institut der Medizinischen Mikrobiologie Fachbereich Virologie der RWTH Aachen.*

Modrow S, Falke D & Truyen U (2003). Molekulare Virologie 2. Auflage *Spektrum Akademischer Verlag*

Pearson G, Robinson F, Gibson TB, Xu B, Karandikar M, Berman K and Cobb M (2001). Mitogen Activated Protein (MAP) Kinase Pahtways: Regulation and Physiological Functions. *Endocrine Reviews* 22 No2

Persad S, Atwell S, Gray V, Mawji N, Deng JT, Leung D, Yan J, Sanghera J, Walsh MP, Dedhar S (2001). Regulation of protein kinase B/Akt-serine 473 phosphorylation by integrin-linked kinase: critical roles for kinase activity and amino acids arginine 211 and serine 343. *Journal of Biological Chemistry* 276 No.29: 27462-27469

Powell DW, Rane MJ, Chen Q, Singh S and McLeish KR (2002). Identification of 14-3-3 ζ as a Protein Kinase B/Akt Substrate. *Journal of Biological Chemistry* 277 No.24: 21639-21642

Qui W, Zhuang S, von Lintig FC, Boss GR and Pilz RB (2000). Cell Type-specific Regulation of B-Raf Kinase by cAMP and 14-3-3 Proteins. *Journal of Biological Chemistry* 275 No.41: 31921-31929

Quinlivan EB, Holley-Guthrie EA, Norris M, Gutsch D, Bachenheimer SL, Kenney S (1993). Direct BRLF1 binding is required for kooperative BZLF1/BRLF1 activation of the Epstein-Barr viurs early promotor, BMRF1. *Nucleic Acids Research* 21 No.8: 1999-2007

Ragoczy T, Heston L and Miller G (1998). The Epstein-Barr Virus Rta Protein Activates Lytic Cycle Genes and Can Disrupt Latency Latency in B Lymphocytes. *Journal of Virology* 72 No.10: 7978-7984

Ragoczy T, Miller G (1999). Role of the Epstein-Barr Virus Rta Protein in Activation of Distinct Classes of Viral Lytic Cycle Genes. *Journal of Virology* 73 No12: 9858-9866

Ragoczy T and Miller G (2001). Autostimulation of the Epstein-Barr virus BRLF1 promotor is mediated through consensus Sp1 und Sp3 binding sites. *Journal of Virology* 75 No.11: 5240-5251

Ritter K, Kühl RJ, Semrau F, Eiffert H, Kratzin HD & Thomssen R (1994). Manganese superoxide dismutase as a target of autoantibodies in acute Epstein-Barr virus infection. *Journal of experimental Medicine* 180 No. 5: 1995-1998

Robbins DJ, (1993). Regulation and Properties of extracellular signal-regulated Protein Kinases 1,2 and 3. *Journal of the American Society of Nephrology* 4: 1104-1110

Schaade L, Kleines M, Krone B, Hausding M, Walter R, Ritter K (2000). Enhanced transcription of the s-adenosylhomocysteine hydrolase gene precedes Epstein-Barr virus lytic gene activation in ganglioside-stimulated lymphoma cells. *Med Microbiol Immunol* 189: 13-18

Schaade L, Kleines M, Walter R, Thomssen R, Ritter K (1999). A membrane-located glycosphingolipid of monocyte/granulocyte lineage cells induces growth arrest and triggers the lytic viral cycle in Epstein-Barr virus genome-positive Burkitt lymphoma lines. *Med Microbiol Immunol* 188: 23-29

Scheepers A, Pich D, Mankertz J and Hammerschmidt W (1993). Activation of oriLyt, the lytic origin of DNA replication of Epstein-Barr virus, by BZLF1. *Journal of Virology* 67: 4237-4245

Scheid MP & Woodgett JR (2003). Unravelling the activation mechanisms of protein kinase B/Akt. *FEBS Letters* 546: 108-112

Shimizu N & Takada K (1993). Analysis of the BZLF1 promoter of Epstein-Barr Virus: Identification of an anti-immunoglobulin response sequence. *Journal of Virology* 67: 3240-3245

Snoeck R, Andrei G, Neyts J, Schols D, Cools M, Balzarini J and De Clercq E (1993). Inhibitory activity of s-adenosylhomocystein hydrolase inhibitors against human cytomegalievirus replication. *Antiviral Research* 21: 197-216

Speck SH, Chatila T and Flemington E (1997). Reactivation of Epstein-Barr virus: regulation and function of the BZLF1 gene. *Trends in Microbiology* 5 No.10: 399-405

Turgeon B, Lang BF, Meloche S (2002). The Protein Kinase ERK3 ist Encoded by a Single Functional Gene: Genomic Analysis of the ERK3 Gene Familiy. *Genomics* 80 No6: 673-680

Turner MA, Yang X, Yin D, Kuczera K, Borchardt RT, Howell PL (2000). Structure and Function of S-Adenosylhomocysteine Hydrolase. *Cell Biochemistry and Biophysics* 33: 101-125

Yin D, Yang X, Hu Y, Kuczera K, Schowen RL, Borchardt RT and Squier TC (2000). Substrat binding stabilizes S-adenosylhomocysteine Hydrolase in a Closed Conformation. *Biochemistry* 39: 9811-9818

Zhang Q, Hong Y, Dorsky D, Holley-Guthrie E, Zalani S, Elshiekh NA, Kiehl A, Le T and Kenney S (1996). Functional and physical interactions between the Epsten-Barr virus (EBV) proteins BZLF1 and BMRF1: Effects on EBV transcription and lytic replication. *Journal of Virology* Vol.70, No.8: 5131-5142

Zheng ZC, Cao GJ, McCartin P, Du Y, Molnar A, Sarkar S (1992). The cytoplasmic translational inhibitory RNA of chick embryonic muscle: cloning and sequence of a subspecies which is antisense RNA. *Symp Soc Exp Biol.* 46: 363-371

Zhu AX, Zhao Y, Moller DE and Flier JS (1994). Cloning and Characterization of p97^{mapk}, a Novel Human Homolog of ERK3. *Journal of Molecular and Cellular Biology* 14 No12: 8202-8211

Zimmermann J, Lamerant N, Grossenbacher R, and Fürst P (2000). Proteasome- and p38-dependent Regulation of ERK3 Expression. *Journal of Biological Chemistry* 276 No14: 10759-10766

zur Hausen H, Schulte-Holthausen H, Klein G, Henle W, Henle G, Clifford P, and Santesson L (1970). EBV DNA in biopsies of Burkitt tumors and anaplastic carcinomas of the nasopharynx.. *Nature (Lond.)* 228: 1056-1058

zur Hausen H, O'Neill FJ, Freese UK (1978). Persisting oncogenic herpesvirus induced by the tumour promotor TPA. *Macmillan Journals*

A Anhang

Abkürzungsverzeichnis

A. bidest.	Aqua bidestilled
A. dest.	Aqua distilled
Abb.	Abbildung
AHCY	s-Adenosylhomocystein-Hydrolase
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
bp	Basenpaare
BrdU	5-Bromo-2'-Desoxyuridin
BSA	<i>bovine serum albumine</i> = Rinderserumalbumin
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>copy desoxyribonucleic acid</i>
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> = Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTPs	Desoxynukleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
EA	<i>Early Antigen</i>
EA-D	<i>Early Antigen diffuse component</i>
EBV	Epstein-Barr Virus
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ERK3	Extrazellulär-regulierte-Kinase 3
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorter</i>
FKS	Fetales Kälber Serum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
IFT	Immunfluoreszenztest
kb	Kilo-Basenpaar
kDa	Kilo-Dalton
LB-Medium	Luria Bertani-Medium
LC Red 640	LightCycler Red 640

LM1	VI ³ NeuAc-nLcOse ₄ Cer
MAPK	Mitogen-aktivierte-Protein-Kinase
MEK	Mitogen-aktivierte-Protein-Kinase-Kinase
min	Minute
mRNA	<i>messenger RNA</i>
n	Stichprobengröße
NF-kappaB	<i>nuclear factor kappa B</i>
ori	<i>origin of replication</i>
OT	Objektträger
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PI3-K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PKB	Proteinkinase B
PKC	Proteinkinase C
PLA2	Phospholipase A2
RNA	<i>ribonucleic acid</i> = Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	<i>rotations per minute</i>
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
SDS	<i>Sodiumdodecylsulfate</i>
s	Sekunde
Ser	Serin
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TPA	12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetat
U	unit
üN	über Nacht

Abbildungsverzeichnis

2.1 pcDNA3.1-E	7
2.2 Schematische Abbildung der Komponenten in der Transferkassette für den Western Blot	35
3.1 Agarose-Gelelektrophorese eines Restriktionsverdau von pcDNA-ERK3 <i>antisense</i> mit <i>HindIII</i> und <i>Xho I</i>	39
3.2 Agarose-Gelelektrophorese von Amplifikaten nach PCR zum Nachweis des Ampicillin-Resistenzgens nach Transfektion von B95-8-Zellen mit pcDNA-ERK3 <i>antisense</i> und pcDNA3.1-E	40
3.3 Agarose-Gelelektrophorese der Amplifikate einer ERK3 (p97)-PCR auf dem LightCycler, die sich durch Schmelzkurvenanalyse durch die LightCycler Software zunächst nicht darstellen ließen	41
3.4 Chromatogramm der Sequenzreaktion des ERK3 (p97) spezifischen PCR-Produkts	41
3.5 Homologievergleich der ERK3 (p97)-Sequenz humaner und B95-8-Zellen	42
3.6 Schmelzpunktanalyse der ERK3 (p97)-Amplifikate	43
3.7 Schmelzpunktanalyse der GAPDH-Amplifikate	44
3.8 Lineare Regression, ermittelt aus der Standard-Verdünnungsreihe einer GAPDH-spezifischen PCR auf dem LightCycler	44
3.9 Anstieg der Fluoreszenz während einer GAPDH-spezifischen PCR auf dem LightCycler; eine Verdünnungsreihe ist mitgeführt; Kurven: blau, türkis-gestrichelt, schwarz, gelb, grün	45
3.10 ERK3 (p97)-Überexpression in pcDNA-ERK3 <i>antisense</i> transfizierten B95-8-Zellen 4, 8 und 24 Stunden nach Transfektion	46
3.11 Immunblot: Nachweis des ERK3 (p97)-Proteins durch den Antikörper C-19	47
3.12 Immunblot: Nachweis des ERK3 (p97)-Proteins durch den Antikörper I-15	48
3.13 Schmelzpunktanalyse einer BZLF1-spezifischen PCR.	50
3.14 Agarose-Gelelektrophorese von Amplifikaten einer BRLF1-PCR auf dem LightCycler, die sich durch Schmelzpunktanalyse nicht darstellen ließen	50
3.15 BZLF1- und BRLF1-Überexpression in pcDNA-ERK3 <i>antisense</i> transfizierten B95-8-Zellen 4,8 und 24 Stunden nach Transfektion	51
3.16 Nachweis der EA-Expression mittels indirekter Immunfluoreszenz A) in pcDNA-ERK3 <i>antisense</i> und B) in pcDNA3.1-E transfizierten B95-8-Zellen	

C) Negativkontrolle	52
3.17 EA-Expression 24 Stunden nach Transfektion in pcDNA-ERK3 <i>antisense</i> und pcDNA3.1-E transfizierten B95-8-Zellen	53
3.18 Immunblot: Nachweis der Expression von 14-3-3 β und ζ in transfizierten B95-8-Zellen	55
3.19 Agarose-Gelelektrophorese: Trennung von Produkten nach Spaltung von pcDNA-AHCY mit <i>BamHI</i> und <i>Xho I</i>	56
3.20 Agarose-Gelelektrophorese: Trennung von Produkten nach Spaltung von pcDNA-RAC mit <i>Hind III</i> und <i>Xho I</i>	57
3.21 Agarose-Gelelektrophorese: Trennung von Produkten nach Spaltung von pcDNA-PLA2	58
3.22 ERK3 (p97) -Expression nach SAH- und PKB-Überexpression 4,8 und 24 Stunden nach Transfektion mit pcDNA-AHCY und pcDNA-RAC.	59
3.23 ERK3 (p97)-Expression 4, 8 und 24 Stunden nach Transfektion mit pcDNA-PLA2	60
3.24 DNA-Syntheserate nach Transfektion von B95-8 Zellen mit pcDNA-ERK3 <i>antisense</i>	61
3.25 Zellteilung nach Transfektion von B95-8 Zellen mit pcDNA-ERK3 <i>antisense</i>	62
3.26 FACS Scan-Analysen-Diagramme zur Untersuchung der Oberflächenantigene CD30, CD11a, CD19, CD40	63
4.1 ERK3-Homologe von Ratte (p63), Maus (p100) und Mensch p(97) und ihrer bisher bekannten Funktionen	67
4.2 Untersuchungen zur ERK3 (p97) in Raji- und B95-8-Zellen.	81

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. K. Ritter für die Ermöglichung dieser Arbeit und die außerordentlich guten Arbeitsbedingungen..

Herrn Dr. Michael Kleines danke ich für die gute Betreuung und die sorgfältige Korrektur meiner Arbeit.

Außerdem danke ich Michele Peters und Kirsten Schellenberg für die geduldige Hilfe beim praktischen Teil meiner Arbeit und die Durchsicht der Textfassung.

Weiterhin bedanke ich mich bei allen Diplomanten und Doktoranden, vor allem Silke Granemann und Georg Werth, für ihre Hilfsbereitschaft und die gute Zusammenarbeit.

Ute Schmidt und mein Bruder Christian standen mir bei EDV-Problemen mit Rat und Tat zur Seite, dafür danke ich ihnen herzlich.

Der größte Dank gebührt meinen Eltern, die mir dieses Studium ermöglicht haben und mich bei meiner Entscheidung für diese Doktorarbeit immer unterstützt haben.

Lebenslauf

Name: Anne Caroline Kaufmann

Geburtsdatum: 03.09.1978

Geburtsort: Düsseldorf

Schulbildung:

1985 - 1989	Gemeinschaftsgrundschule am Brückentor, Langenfeld (Rhld.)
1989 - 1998	Konrad-Adenauer-Gymnasium, Langenfeld, (Rhld.)
03/1996 - 06/1996	Thomas Peacocke Community College, Rye (GB)
1998	Allgemeine Hochschulreife

Studium:

10/1998 – 11/2005:	Studium der Humanmedizin an der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen
10/2001 – 03/2002:	Studium an der Universität Maastricht
09/2000:	Ärztliche Vorprüfung
08/2001:	1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
09/2004:	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
11/2005:	3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung