

Aus dem Institut für Virologie
Theoretische Medizin und Biowissenschaften
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

**Biochemische Charakterisierung des
humanen RNA binding motif protein 4
und Untersuchung einer möglichen
Interaktion des Proteins mit dem
Epstein-Barr-Virus kodierten
nukleären Antigen 2**

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Theoretischen Medizin
der medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
2009

vorgelegt von Johanna Stieber
geb. am 26.01.1978 in Saarbrücken

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Verzeichnis der Abbildungen	VI
Verzeichnis der Abkürzungen	VIII
1 Zusammenfassung	1
2 Summary	2
3 Einleitung	3
3.1 Das Epstein-Barr-Virus (EBV)	3
3.2 Die EBV-Infektion	5
3.3 EBV-assoziierte Erkrankungen	7
3.3.1 Die infektiöse Mononukleose	7
3.3.2 Nasopharyngealkarzinom	7
3.3.3 Burkitt-Lymphom	8
3.3.4 Hodgkin-Lymphom	10
3.3.5 Immunoblastische B-Zell-Lymphome immundefizienter Patienten	10
3.3.6 T-Zell-Lymphome	11
3.3.7 Orale Haarleukoplakie	12
3.4 Das EBV-Genom	12
3.5 Replikationszyklus des Epstein-Barr-Virus	14
3.5.1 Die lytische Infektion	14
3.5.2 Die latente Infektion	16
3.6 Das Epstein-Barr-Virus codierte Kernantigen2 (EBNA2)	19
3.7 Das RBM4/lark Protein	22
3.8 Ziele der Arbeit	29

4 Material	30
4.1 Chemikalien, Membranen, Filter	30
4.2 Antikörper	31
4.2.1 Primärantikörper	31
4.2.2 Sekundärantikörper	32
4.3 Enzyme	32
4.4 Grössen- und Molekulargewichtsmarker	33
4.4.1 DNA-Molekulargewichtsmarker	33
4.4.2 Protein-Molekulargewichtsmarker	33
4.5 Puffer	34
4.6 Zelllinien	36
4.6.1 Epitheliale Zelllinien	36
4.6.2 B- und T-lymphoide Zelllinien	36
4.7 Bakterienstämme	37
4.8 Kulturmedien	38
4.8.1 Kulturmedien für Säugerzellen	38
4.8.2 Kulturmedien für Bakterien	38
4.9 Expressionsvektoren	39
4.9.1 Effektorplasmide	40
4.10 Oligonukleotide (Primer)	40
4.11 Computersoftware	41
5 Methodik	42
5.1 Bakterienkulturen	42
5.1.1 Aufzucht und Lagerung von Bakterien	42
5.1.2 Herstellung transformationskompetenter Bakterien	42
5.1.3 Transformation kompetenter Bakterien	43
5.2 Kultivierung eukaryotischer Zellen	44
5.2.1 Kultivierung adhärenter Zelllinien	44
5.2.2 Kultivierung von Suspensionszellen	44

5.3	Zellzahlbestimmung	44
5.3.1	Zellzahlbestimmung mit der Neubauer TM -Zählkammer	44
5.3.2	Zellzahlbestimmung mit dem Zellanalysegerät CASY	45
5.4	Transiente Transfektion eukaryotischer Zellen mit FugeneTM	45
5.5	DNA-Techniken	46
5.5.1	Isolierung von Plasmid-DNA	46
5.5.1.1	Isolierung von Plasmid-DNA aus E.coli	46
5.5.1.2	Analytische Plasmid-DNA-Isolierung (Minipräparation)	46
5.5.1.3	Präparative Plasmid-DNA-Isolierung (Midipräparation)	47
5.5.2	Spektrometrische Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren	49
5.5.3	Ethanolpräzipitation von Nukleinsäuren	49
5.6	Enzymatische Modifikation von DNA	50
5.6.1	Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen (Restriktionsverdau)	50
5.6.2	Dephosphorylierung von Vektor-DNA	50
5.6.3	Ligation von DNA-Molekülen	51
5.6.4	Agarosegelelektrophorese doppelsträngiger DNA	52
5.6.4.1	Herstellung von Agarosegelen	52
5.6.4.2	Agarosegelelektrophorese	53
5.6.5	Gene-Clean TM -Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	54
5.6.6	Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	55
5.7	Proteintechniken	57
5.7.1	Herstellung von Proteinextrakten	57
5.7.1.1	Herstellung denaturierter Proteinextrakte	57
5.7.1.2	Herstellung nativer Proteinextrakte	58
5.7.2	Konzentrationsbestimmung von Proteinextrakten	58
5.7.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)	59
5.7.4	Herstellung eines SDS-Polyacrylamidgels	60

5.7.5	Western-Blot	61
5.7.5.1	Proteintransfer	61
5.7.5.2	Immunologischer Nachweis membrangebundener Proteine ..	62
5.8	Co-Immunpräzipitation zweier Proteine	63
5.9	Pulse Chase Experiment	65
5.10	Immunfluoreszenz	66
6	Ergebnisse	67
6.1	Vorbereitungen für diese Arbeit	68
6.1.1	Herstellung von monoklonalen Antikörpern gegen RBM4A	68
6.1.2	Expression von „HA-getagtem“ RBM4A in eukaryotischen Zellen	69
6.1.3	Herstellung von monoklonalen Antikörpern gegen RBM4B	71
6.1.4	Expression von „Flag-getagtem“ RBM4B in eukaryotischen Zellen	71
6.2	Analyse der monoklonalen Antikörper gegen RBM4A und RBM4B	74
6.3	Vergleich der Expressionsmenge von RBM4 in verschiedenen menschlichen und tierischen Zellen und Geweben	78
6.3.1	Expression von RBM4 in den primären Zielzellen von EBV	80
6.3.2	Vergleich der Expressionsmenge von RBM4 in Tumorzellen	82
6.3.3	Expression von RBM4 in tierischem Gewebe	87
6.4	Biochemische Charakterisierung von RBM4	91
6.4.1	Nachweis der Phosphorylierung von RBM4A und B	91
6.4.2	Bestimmung der Halbwertszeit von RBM4A und B	95
6.5	Bestimmung der subzellulären Lokalisation von RBM4 anhand einer indirekten Immunfluoreszenz	97
6.6	Nachweis der Koloalisation von RBM4 und EBNA2 anhand einer indirekten Immunfluoreszenz	98
6.7	Versuch einer Co-Immunpräzipitation zum <i>in vivo</i> Nachweis der Bindung von RBM4 und EBNA2	100

7 Diskussion	103
7.1 Analyse der monoklonalen Antikörper gegen RBM4A und RBM4B	105
7.2 Vergleich der Expressionsmenge von RBM4 in verschiedenen menschlichen und tierischen Zellen und Geweben	106
7.3 Biochemische Charakterisierung von RBM4	111
7.4 Bestimmung der subzellulären Lokalisation von RBM4	113
7.5 Untersuchungen zur Interaktion zwischen RBM4 und EBNA2	114
8 Literaturverzeichnis	117
9 Anhang	131
9.1 Publikationen	131
9.2 Danksagung	132
10 Lebenslauf	133

Verzeichnis der Abbildungen

Abbildung 1: EBV-Virionen (Elektronenmikroskopische Darstellung).....	4
Abbildung 2: Schematische Einteilung des linearisierten EBV-Genoms.....	13
Abbildung 3: Schematische Darstellung des EBV-Episoms.....	18
Abbildung 4: Schematische Abbildung von EBNA2.....	21
Abbildung 5: Schematische Darstellung des humanen und des Drosophila-Lark.....	23
Abbildung 6: Aminosäuresequenz von RBM4A und RBM4B im Vergleich.....	24
Abbildung 7: Schematische Darstellung des Vektors pSG5.....	39
Abbildung 8: Expression des HA-RBM4A-Proteins in COS-1-Zellen.....	70
Abbildung 9: Analyse der FLAG-RBM4B-Klone.....	72
Abbildung 10: Expression des FLAG-RBM4B-Proteins in COS-1-Zellen.....	73
Abbildung 11: Western-Blot Analyse der monoklonalen Antikörper gegen RBM4A und RBM4B.....	76
Abbildung 12: Analyse der Spezifität der monoklonalen Antikörper gegen RBM4A und RBM4B in COS-1-Zellen.....	77
Abbildung 13: Western-Blot Analyse zur Darstellung des endogenen RBM4-Proteins in menschlichem Gewebe.....	79
Abbildung 14: Nachweis des endogenen RBM4A in den primären Zielzellen von EBV.....	81
Abbildung 15: Analyse der endogenen RBM4B-Expression in den primären Zielzellen von EBV.....	82
Abbildung 16: RBM4A-Expressionsmenge in verschiedenen Tumorzellen.....	84
Abbildung 17: Expressionsvergleich von RBM4A und RBM4B in verschiedenen Leberkarzinomzelllinien.....	86
Abbildung 18: Nachweis des endogenen RBM4-Proteins in verschiedenen tierischen Zellen.....	88
Abbildung 19: Nachweis des endogenen RBM4A-Proteins in verschiedenen Geweben eines Kaninchens.....	89

Abbildung 20: Nachweis des endogenen RBM4B-Proteins in verschiedenen Geweben eines Kaninchens.....	91
Abbildung 21: Phosphorylierung des RBM4A-Proteins.....	93
Abbildung 22: Phosphorylierung des RBM4B-Proteins.....	94
Abbildung 23: Bestimmung der Halbwertszeit des RBM4-Proteins.....	96
Abbildung 24: Subzelluläre Lokalisation von RBM4.....	98
Abbildung 25: Darstellung der Kolo­kalisierung von RBM4 und EBNA2 anhand einer indirekten Immunfluoreszenz.....	100
Abbildung 26: Versuch einer Co-Immunpräzipitation von RBM4 und EBNA2.....	102

Verzeichnis der Abkürzungen

A	Ampere
α	anti
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
BL	Burkitt- Lymphom
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
C-	Carboxy-
CIP	calf intestinal phosphatase
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonucleosidtriphosphat
E.coli	Escherichia coli
EBNA	Epstein-Barr Virus nuclear antigen
EBV	Epstein-Barr Virus
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FKS	fötale Kälberserum
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde
H ₂ O(bi)dest	(bi)destilliertes Wasser
HD	Hodgkin's Disease
Ig	Immunglobulin
IM	Infektiöse Mononukleose
kbp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
λ	Wellenlänge [nm]
LB	Luria's Broth

M	molar
m	Milli-
μ	Mikro
mAK	monoklonaler Antikörper
MCS	multiple cloning site
min	Minute
N-	Amino-
NaAc	Natriumacetat
NPC	Nasopharyngealkarzinom
OD	optische Dichte
ORF	offener Leserahmen (open reading frame)
ori	Ursprung der Plasmidreplikation (origin of replication)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Pox	Peroxidase
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
RT	Raumtemperatur
sec	Sekunden
SDS	Natriumdodecylsulfat
SV40	simian virus 40
Tab.	Tabelle
Taq	Thermophilus aquaticus
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
U	Unit (Einheit der Enzymaktivität)
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
V	Volt

w/v	Gewicht pro Volumen
wt	Wildtyp

1 Zusammenfassung

Das Epstein-Barr-Virus (EBV) ist an der Pathogenese verschiedener Tumoren beteiligt. Das virus-kodierte Kernantigen EBNA2 spielt bei der Transformation durch EBV eine entscheidende Rolle. In einer Hefe-Zwei-Hybrid Analyse mit EBNA2 als Fängerprotein wurde das humane RNA binding motif protein 4 (RBM4) als potentiell EBNA2 bindendes Protein identifiziert. RBM4 ist ein essentielles RNA-bindendes Protein, das unter anderem an der Zellzyklusregulation beteiligt ist und als Spleissregulator fungiert. In der vorliegenden Arbeit wurden monoklonale Antikörper gegen die beiden Varianten RBM4A und RBM4B etabliert. Anhand dieser Antikörper konnte nachgewiesen werden, daß RBM4A in den primären Zielzellen des Epstein-Barr-Virus, den B-Lymphozyten, vorhanden ist und damit ein potentieller Interaktionspartner von EBNA2 darstellt, während RBM4B in Lymphozyten nicht vorhanden ist. Bei Untersuchungen zur Expression von RBM4 zeigte sich, daß RBM4A in allen Säugergeweben vorhanden ist. In humanen Proben konnte RBM4B lediglich in der Leber, beim Kaninchen auch in Niere, Jejunum und Ileum nachgewiesen werden. In Leberkarzinomzelllinien ist die RBM4B-Menge deutlich geringer als in normalen Leberzellextrakten, während RBM4A in beiden Zelllinien annähernd gleich ist. Zudem konnte in dieser Arbeit bewiesen werden, daß RBM4A wie RBM4B Phosphoproteine sind und Halbwertszeiten von 2,5 (RBM4A) bzw. 4,5 Stunden (RBM4B) aufweisen. Die subzelluläre Lokalisation des Proteins ist nicht auf den Kern begrenzt, sondern erstreckt sich auch auf das Cytoplasma, was die These, daß es sich bei RBM4 um ein RNA-Shuttleprotein handelt, bestätigt. Weiterhin sollte die Bindung von RBM4A an EBNA2 verifiziert werden. Die Darstellung der Kolo-kalisation der beiden Proteine gelang allerdings lediglich anhand einer indirekten Immunfluoreszenz mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskopes. Die Interaktion der beiden Proteine durch eine Co-Immunpräzipitation konnte nicht bewiesen werden. Folglich bleibt es fraglich, ob die beiden Proteine interagieren. Ein endgültiger Beweis der Interaktion von RBM4 mit EBNA2, sowie die Bestimmung weiterer möglicher Funktionen von RBM4 muss in zukünftigen Studien untersucht werden.

2 Summary

Biochemical analysis of the human RNA binding motif protein 4 (RBM4) and studies of a possible interaction of this protein with the Epstein-Barr-virus encoded nuclear antigen 2 (EBNA2)

The Epstein-Barr-Virus (EBV) efficiently transforms human B-cells in vitro and is involved in the generation of different human tumors. The virus-encoded nuclear antigen 2 (EBNA2) plays an essential role in the transformation of B-lymphocytes. In a yeast-two-hybrid-screen using EBNA2 as a bait, the RNA binding motif protein 4 (RBM4) was identified as a potential EBNA2 binding partner. RBM4 takes part at the regulation of the cell cycle and plays a role in splicing. To analyse the EBNA2-RBM4-interaction, monoclonal antibodies against the two variants A and B of RBM4 were generated. With these antibodies we show that RBM4A exists in primary and EBV-transformed B-lymphocytes while RBM4B was not detectable in those cells. Analysis of the RBM4 expression showed that it is present in all mammal tissues analysed. In human samples RBM4B was found only in the liver, in rabbit tissue as well in kidney, jejunum and ileum. The amount of RBM4B in liver carcinoma cell lines is clearly reduced as compared to normal liver cell extracts, whereas the amount of RBM4A in these cell lines is unchanged. We could demonstrate that both RBM4A and B are phosphoproteins. The half-life was determined to approximately 2,5 hours for RBM4A and 4,5 hours for RBM4B. Both proteins were detectable mainly in the cell nucleus but also, to a lesser extend, in the cytoplasm in line with previous reports that RBM4A shuttles from the nucleus to the cytoplasm. The interaction of EBNA2 and RBM4A could not be verified by co-immunoprecipitation analysis. The functional significance of the yeast-two-hybrid analysis could thus not be established.

3 Einleitung

3.1 Das Epstein-Barr-Virus (EBV)

In den fünfziger Jahren postulierte der englische Chirurg Dennis Burkitt die Beteiligung eines infektiösen Agens an der Genese des später nach ihm benannten Burkitt-Lymphomes (Burkitt, 1958), welches er in den Gelbfieber- und Malariagebieten Zentral- und Ostafrikas primär bei Kindern endemisch vorfand.

Im Jahre 1964 gelang den Forschern Budd Achong, Yvonne Barr und Tony Epstein anhand von Ultradünnschnitten *in vitro* kultivierter Burkitt-Lymphomzellen der elektronenmikroskopische Nachweis des Epstein-Barr-Virus (Epstein, Achong, and Barr, 1964). 1967 wurde erstmals beschrieben, dass EBV in der Lage ist, *in vitro* B-Lymphozyten zu immortalisieren (Henle and Henle, 1967).

Das Virus gehört zu der Familie der γ -*Herpesviridae* aus der Gattung der *Lymphocryptoviridae*. Diese Virusgattung hat ein sehr enges Wirtsspektrum; sie befällt ausschließlich Primaten, wobei EBV sogar ein rein humanes Virus ist. Ein EBV-verwandtes Herpesvirus, welches ebenfalls zur Transformation von B-Lymphozyten befähigt ist, konnte aus spontanen B-Zell-Lymphomen von Neuwelt-Primaten, dem Krallenaffen *Callithrix jacchus* isoliert werden; in Altwelt-Primaten kommt das stark EBV-homologe Herpesvirus papio (HVP) vor.

Das Epstein-Barr-Virus zeigt morphologisch einen typischen herpesviralen Aufbau. Es besitzt ein 172 kbp großes, lineares, doppelsträngiges DNA-Genom (siehe 3.4), welches von einem ikosaedrischen Nukleokapsid von 100-110 nm Durchmesser umschlossen ist. Das Nukleokapsid besteht aus 162 Kapsomeren. Es wird von einer Lipidmembran (envelope) umgeben, die mit vielen, nach außen gerichteten Glykoproteinen durchsetzt ist (Roizman, 1990). Zwischen dem Kapsid und der Hüllmembran befindet sich das Tegument, das zahlreiche Virusproteine enthält (Rickinson and Kieff, 1996). Diese Proteinschicht ist häufig asymmetrisch verteilt und von unterschiedlicher Stärke.

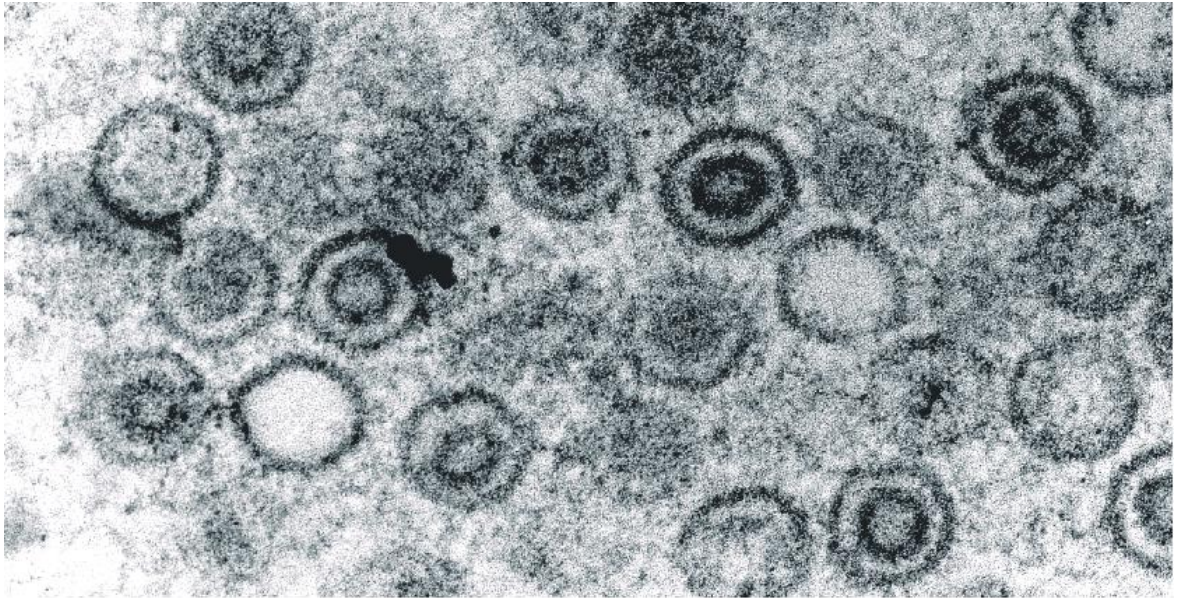


Abb. 1: EBV-Virionen (Elektronenmikroskopische Darstellung)

Negativgefärbte elektronenmikroskopische Darstellung von Epstein-Barr Virionen in Biopsien oraler Haarleukoplakie (Sugiura et al., 1996).

Unterschieden wird zwischen den EBV-Typen 1 und 2, die aufgrund signifikanter Unterschiede in der primären Aminosäuresequenz ihrer Kern-Antigene (Epstein-Barr-Virus nuclear antigens) EBNA2 (47% nicht homolog), EBNA3A (16% nicht homolog), EBNA3B (20% nicht homolog) und EBNA3C (28% nicht homolog) divergente zytotoxische T-Zellantworten hervorrufen (Sample et al., 1990). EBV Typ 1 zeigt *in vitro* eine wesentlich höhere Transformationseffizienz als EBV Typ 2 (Rickinson, Young, and Rowe, 1987). EBV Typ 1 ist vor allem in den westlichen Industrieländern bzw. in Ländern mit höheren Lebensstandards vorherrschend, während man in den Entwicklungsländern Afrikas und in China ein annähernd ausgeglichenes Verhältnis der beiden Typen vorfindet (Zimmer et al., 1986; Rowe and Clarke, 1989; Sixbey et al., 1984).

3.2 Die EBV-Infektion

Das EBV zählt zu den am häufigsten auftretenden Viren des Menschen. Seroepidemiologische Untersuchungen zeigten, dass 95% aller Erwachsenen weltweit seropositiv sind, d.h. sie weisen IgG-Antikörper gegen Hüllmembran- und Kapsidproteine auf (Gerber et al., 1972).

Die Übertragung des Virus erfolgt horizontal durch die Speichelflüssigkeit (Golden et al., 1973), wobei der Zeitpunkt einer Primärinfektion mit EBV stark von den hygienischen Umständen und dem vorherrschenden Lebensstandard abhängig ist. In China, Afrika und anderen Entwicklungsländern erfolgt die Erstinfektion meist in den ersten 3 Lebensjahren und verläuft klinisch inapparent. In Ländern mit höheren Lebensstandards und besseren Hygienebedingungen erfolgt die Primärinfektion häufig später und führt im frühen Erwachsenenalter in 50% der Fälle zum klinischen Bild der Infektiösen Mononukleose bzw. des „Pfeifferschen Drüsenfiebers“ (siehe 3.3.1) (Henle, Henle, and Diehl, 1968).

Durch die Interaktion des Glykoproteinkomplex gp220/350 auf der Virushüllmembran und dem C3d-Komplementrezeptor CD21 (CR2) auf der Oberfläche der Zielzelle erfolgt das Eindringen des Virus in die primäre Zielzelle durch rezeptorvermittelte Endozytose. Das CD21-Antigen wird von unreifen B-Lymphozyten in hoher Dichte präsentiert. Deshalb kommen ruhende B-Lymphozyten des nasopharyngealen, lymphatischen Systems als primäre Zielzellen in Betracht (Niedobitek et al., 1997). Undifferenzierte Epithelzellen des Nasen-Rachenraumes und der Mundhöhle bzw. des Zungenrandes, in denen eine produktive, lytische Vermehrung des Virus erfolgt (Morgan et al., 1979; Sixbey et al., 1984; Greenspan et al., 1985), stellen ebenfalls primäre Zielzellen der Virusinfektion dar und sind somit an der Ausbreitung der Infektion im mukosalen Lymphepithel beteiligt, da diese eine geringe Menge an CD21 exprimieren. Eine einmalige Infektion hat eine lebenslange Persistenz des Virus in ruhenden, CD23-negativen B-Zellen (Memory-B-Zellen) zur Folge (Gratama et al., 1988; Miyashita et al., 1995; Babcock et al., 1998). Das Virus wird lebenslang mit dem Speichel ausgeschieden. Nach der Adsorption an die Wirtszelle erfolgt die Aufnahme der Virionen in zytoplasmatische Vesikel. Durch das Verschmelzen von

Vesikelmembran und Virushülle wird das Viruspartikel aus dem Vesikel entlassen. Nach Auflösung des Nukleokapsids wird die Virus-DNA durch die Kernporen in den Zellkern transportiert und es kommt zu einer Zirkularisierung durch Rekombination der TR-Sequenzen (terminal repeats, TR). In episomaler Form verbleibt das Genom in den meisten Fällen extrachromosomal in der Zelle.

Desweiteren wurde EBV als erstes humanpathogenes Virus kausal mit der Entstehung verschiedener maligner Erkrankungen in Zusammenhang gebracht. Das EBV besitzt onkogenes Potential, da es in der Lage ist, *in vitro* effizient primäre B-Zellen zu immortalisieren, d.h. ein permanentes Zellwachstum zu induzieren und aufrecht zu erhalten. Diese auch als „Lymphoblastoid Cell Lines, LCLs“ bezeichneten Zellen können entweder aus dem Blut EBV-infizierter Personen oder durch *in vitro*-Infektion EBV-negativer, primärer B-Lymphozyten gewonnen werden (Pritchett, Hayward, and Kieff, 1975).

Bis heute ist man bei der Untersuchung des Epstein-Barr-Virus und der mit dem Virus assoziierten Erkrankungen auf die Nutzung dieser etablierten, lymphoblastoiden Zelllinien angewiesen, da bisher alle Versuche, ein funktionierendes Tiermodell zu entwickeln unter anderem wegen des engen Wirtsspektrums der gamma-Herpesviren fehlgeschlagen sind.

3.3 EBV-assoziierte Erkrankungen

3.3.1 Infektiöse Mononukleose

Die Infektiöse Mononukleose (IM, Pfeiffersches Drüsenfieber) ist eine benigne, selbstlimitierende, lymphoproliferative Erkrankung mit klinischen Symptomen wie Fieber, Tonsilitis, Lymphadenitis simplex, sowie Hepato- und Splenomegalie. Diese Symptome spiegeln die Immunantwort des gesunden Menschen auf die infizierten, proliferierenden B-Lymphozyten und die starke Virusproduktion wider. Für die akute Phase der IM ist das Auftreten von bis zu 50% atypischer T-Lymphozyten charakteristisch. Darüber hinaus ist die Zahl der infizierten B-Lymphozyten im Blut der Erkrankten um den Faktor 5×10^3 , gegenüber klinisch gesunden Virusträgern, erhöht.

Die Infektion wird durch Elimination der infizierten B-Zellen durch cytotoxische ($CD8^+$) T-Zellen und natürliche Killerzellen limitiert (Henle, Henle, and Diehl, 1968). Der resultierende Überschuss an mononukleären weißen Blutzellen prägte den Namen der Erkrankung. Nach erfolgter Infektion resultiert eine lebenslange Persistenz des Virus, was ein Charakteristikum für alle Herpesviren darstellt.

3.3.2 Nasopharyngealkarzinom

Das Nasopharyngealkarzinom (NPC) ist ein undifferenzierter, stark metastasierender, maligner Tumor der Epithelzellen des Nasenrachenraumes. Dieses monoklonale Karzinom entwickelt sich als Primärtumor in der Rosenmüllerschen Grube des Nasopharynx. Obwohl der Tumor weltweit vorkommt, tritt er in China und Südostasien mit einer hundertfach erhöhten Inzidenz und einer Häufigkeit von 20-60 Erkrankungen pro 10^5 Personen im Jahr auf (Waterhouse et al., 1996) und ist bei Männern mittleren Alters in dieser geographischen Region die am häufigsten auftretende Tumorerkrankung. Es besteht eine starke Korrelation zwischen der EBV-Infektion und der Entstehung des NPC, da in 100% aller NPC-Fälle EBV-DNA in den Tumorzellen nachweisbar ist (zur Hausen et al., 1970; Nonoyama et al., 1973)

und die Patienten einen hohen IgA-Antikörpertiter gegen das Virus-Kapsidantigen (VCA) aufweisen (Henle and Henle, 1976; Hadar et al., 1986). Jedoch deuten die regional unterschiedlichen Inzidenzen und Häufigkeiten der Erkrankung darauf hin, dass neben EBV weitere Faktoren wie Lebens- und Umweltbedingungen, beispielsweise Nitrosamine in gesalzenem Fisch sowie die Herstellung von Arzneimitteln aus phorbolsterhaltigen Euphorbiaceae, aber auch genetische Prädispositionen bei der Tumorgenese eine Rolle spielen (Buell, 1973; Hirayama and Ito, 1981; Ito et al., 1983).

Die NPC-Inzidenz sinkt bei aus den Endemiegebieten in die USA eingewanderten chinesischen Familien bereits in der ersten Generation ab, gleichzeitig weisen in China lebende Kaukasier im Vergleich zu Mitteleuropäern keine erhöhte Inzidenz auf (Buell, 1973). Aufgrund dieser Gegebenheiten scheint die Tumorgenese ein multifaktorieller Prozess zu sein, und zwar unter Beteiligung exogener Faktoren im Zusammenhang mit einer EBV-Infektion bei entsprechender genetischer Prädisposition.

In 65% aller Fälle lassen sich neben der Expression von EBNA1 auch die mRNA des latenten Membranproteins LMP1 nachweisen (Raab-Traub et al., 1983; Fahraeus et al., 1988; Smith and Griffin, 1992). Somit kann das Expressionsmuster viraler Gene in NPC-Zellen dem Latenztyp II (siehe 3.5.2) zugeordnet werden.

3.3.3 Burkitt-Lymphom

Beim Burkitt-Lymphom (BL) handelt es sich um ein schnellwachsendes, malignes, wenig differenziertes B-Zell-Lymphom monoklonalen Ursprungs. Dieses Lymphom tritt außerhalb Afrikas nur sporadisch auf. In afrikanischen Malariagebieten ist es jedoch, vor allem bei Kindern im Alter von 7-9 Jahren, endemisch verbreitet (ca. 10 Fälle pro 10^5 Personen und Jahr). Zudem gibt es eine dritte, immundefizienz-assoziierte Form des Burkitt-Lymphoms, die im Zusammenhang mit dem Krankheitsbild AIDS beschrieben wurde (Chaganti et al., 1983). Die endemische Form des BL zeigt sich klinisch vor allem in Tumoren des Kiefer- und Gesichtsbereiches sowie des Abdomens, wohingegen bei der sporadischen Form

meist das Knochenmark betroffen ist. Auch in der Assoziation mit dem EBV unterscheiden sich die sporadische und die endemische Form des BL: Afrikanische BL-Patienten zeigen hohe Antikörpertiter gegen EBV-Antigene und in 96% der afrikanischen BL-Biopsien konnte EBV-DNA nachgewiesen werden (Lindahl et al., 1974; Geser et al., 1983), wohingegen dies bei BL-Biopsien sporadischer Burkitt-Lymphome aus Europa nur in 20-60% der Fall war. Diese Daten zeigen, dass eine Korrelation von EBV zur Tumorgenese des Burkitt-Lymphoms zwar gegeben scheint, jedoch auch andere Komponenten daran beteiligt sind.

Alle Formen des Burkitt-Lymphoms weisen eine charakteristische Chromosomentranslokation auf, unabhängig davon, ob sie EBV-positiv oder -negativ sind. Zur Translokation kommt es immer zwischen der Bande q24 des endständigen Teils des langen Arms von Chromosom 8 (Croce and Nowell, 1985) welches das zelluläre Proto-Oncogen *c-myc* trägt und dem langen Arm von Chromosom 2, 14 oder 22 mit dem Immunglobulin-Gen. Hierdurch erhält das Proto-Oncogen den starken Promotor der Immunglobulin-Gene, wodurch es intensiv transkribiert wird (Manolov and Manolova, 1972). Dadurch liegen in den Zellen hohe Konzentrationen des DNA-bindenden, transaktivierenden *c-myc*-Proteins vor (Modrow S., 2003).

EBV-positive Burkitt-Lymphome werden aufgrund ihres Expressionsmusters dem Latenztyp I zugeordnet und exprimieren nur vom Fp-Promotor transkribiertes EBNA1 und die EBER1- und -2-Transkripte (EBV encoded small RNAs) (Rowe et al., 1987), was ihnen ermöglicht, einer EBV-spezifischen zytotoxischen T-Zellabwehr zu entgehen. EBNA1 wird durch eine 237-239 AS lange Wiederholung eines Glyzin-Alanin-Motivs (glycine-alanine repeat) nicht im Proteasom prozessiert und als MHC I-Komplex präsentiert und deshalb nicht als Antigen erkannt. Es gibt aber auch Hinweise auf einen gelegentlichen Übergang zum Expressionsmuster des Latenztyp III, bei dem auch die viralen Proteine EBNA2 und EBNA3C synthetisiert werden (Niedobitek et al., 1997).

3.3.4 Hodgkin-Lymphom

Das Hodgkin-Lymphom (HD, Hodgkin's Disease, Morbus Hodgkin) ist ein weltweit verbreiteter maligner Tumor des lymphatischen Systems unbekannter Ätiologie. In den westlichen Industrienationen stellt die HD eine der häufigsten Lymphomkrankungen dar. Sie tritt bevorzugt in zwei Altersgruppen, und zwar zwischen dem 25. und dem 30. und um das 45. Lebensjahr auf. Charakteristisch für diese Erkrankung ist das Vorkommen großer, aneuploider, maligner Reed-Sternberg-Zellen (RS cells), die etwa 1% der Tumormasse ausmachen (Deacon et al., 1993). Die Rolle, die das Epstein-Barr-Virus bei der Entstehung der Hodgkin's Lymphom spielt, ist noch unklar, jedoch konnte in 60% aller HD-Fälle EBV-DNA in den Tumorzellen nachgewiesen werden (Herbst et al., 1991; Uccini et al., 1990; Deacon et al., 1993; Knecht et al., 1993).

Das Expressionsmuster viraler Gene in HD-Zellen ist dem klassischen Latenztyp II zuzuordnen, da neben EBNA1 (Grässer et al., 1994) in 40-50% der Reed-Sternberg-Zellen auch das latente Membranprotein LMP1 nachgewiesen werden kann (Herbst et al., 1991; Pallesen et al., 1991).

3.3.5 Immunoblastische B-Zell-Lymphome immundefizienter Patienten

Bei immunologisch gesunden, EBV-positiven Virusträgern wird eine unkontrollierte Proliferation latent infizierter, immortalisierter B-Lymphozyten durch eine CD8⁺-T-Zellantwort des Immunsystems kontrolliert und auftretendes infektiöses Virus durch neutralisierende Antikörper eliminiert. Bei immundefizienten Patienten, unabhängig von der Ursache der Immunsuppression (HIV-Immundefizienz, genetisch bedingter Immunsuppression, immunsuppressiver Behandlung bei Organ- oder Gewebetransplantationen - Post-transplant lymphoproliferative disease [PTLD]), können sich im Zuge einer EBV-Primärinfektion oder einer EBV-Reaktivierung durch die verringerte CTL-Antwort polyklonale B-Zell-Lymphome entwickeln, welche als *in vivo*-Äquivalente lymphoblastoider Zelllinien angesehen werden können (Hanto et al., 1981; Kalter and Lopez-Berestein, 1985).

Einen Sonderfall eines polyklonalen B-Zell-Lymphoms stellt das XLPS („X-linked lymphoproliferative syndrome“) dar. Die zu 80% männlichen Patienten tragen eine Mutation im SH2D1A-Gen (SH2-Domäne enthaltendes Gen 1A) an Position q25 des X-Chromosoms (Coffey et al., 1998; Sayos et al., 1998; Sullivan, 1999). Im Zuge einer EBV-Infektion kommt es zu einer massiven Infiltration der Lunge, Leber, Nieren und des Knochenmarks mit CD8⁺- T-Zellen, Makrophagen und EBV-infizierten B-Zellen, was in den meisten Fällen zu Organversagen führt. Circa 30% der Patienten entwickeln zusätzlich polyklonale B-Zell-Lymphome (Purtilo, 1981). Da es sich nicht um einen generalisierten Immundefekt handelt, sind die EBV-negativen Träger der Mutation meist klinisch unauffällig. Eine gestörte Funktion der natürlichen Killerzellen oder der Bildung EBV-spezifischer cytotoxischer T-Zellen könnten der Erkrankung zugrunde liegen.

3.3.6 T-Zell-Lymphome

In einigen T-Zell-Lymphomen (Immunoblastische T-Zell-Lymphome, T/NK large cell granular lymphocyte leukemia) konnte das EBV-Genom und auch die Expression viraler Gene nachgewiesen werden, was auf eine mögliche Korrelation des Epstein-Barr-Virus und der Genese dieser Tumoren schließen lässt (Jones et al., 1988; Kikuta et al., 1988).

T-Lymphozyten exprimieren unter bestimmten Umständen das Oberflächenantigen CD21 und sind somit theoretisch einer EBV-Infektion zugänglich, da CD21 der primäre EBV-Rezeptor ist (siehe 3.2). Diese Lymphom-Zellen exprimieren neben dem NPC-typischen Expressionsmuster (EBNA1 und LMP1) auch geringe Mengen an EBNA2 (Minarovits et al., 1994). Bisher konnte allerdings lediglich die T-Zelllinie MT-2, die den EBV-Rezeptor CD 21 stark an ihrer Oberfläche exprimiert, *in vitro* persistent EBV-infiziert werden (Yoshiyama, Shimizu, and Takada, 1995).

3.3.7 Orale Haarleukoplakie

AIDS-Patienten mit starken immunologischen Störungen entwickeln neben den zuvor beschriebenen EBV-assoziierten B-Zell-Lymphomen für das Krankheitsbild AIDS typische Läsionen am Zungenrand mit warzenähnlicher Morphologie, welche man als orale Leukoplakie (OHL, oral hairy leucoplakia) bezeichnet. In den infizierten Epithelzellen kommt es aufgrund der HIV-Immundefizienz zu einer unkontrollierten EBV-Replikation und Virusproduktion (Greenspan et al., 1985).

3.4 Das EBV-Genom

Das EBV-Genom liegt im Nukleokapsid des Virions als lineare, doppelsträngige DNA vor. Seine Länge beträgt etwa 172 kbp, wobei sie aufgrund von Abweichungen innerhalb der repetitiven Sequenzen etwas variieren kann (Baer et al., 1984). Der GC-Gehalt des Genoms beträgt ca. 60% (Pritchett, Hayward, and Kieff, 1975; Hayward and Kieff, 1977). Im Zellkern infizierter Zellen liegt es dagegen als kovalent geschlossenes Molekül vor und wird episomal repliziert (siehe Abb. 3) (Lindahl et al., 1976), kann aber auch in das Wirtsgenom integriert sein (Henderson et al., 1983). Die Kopienzahl des Virusgenoms ist zelllinienspezifisch und liegt zwischen 2 und 200 pro Wirtszelle.

Die Anordnung der Gene des linearisierten EBV-Genoms (siehe Abb. 2) ist typisch für Lymphokryptoviren. An beiden Enden des linearen EBV-Genoms befinden sich etwa 500 bp lange terminale Sequenzwiederholungen (terminal repeats, TR), die für die Zirkularisierung des Genoms nach der Infektion von entscheidender Bedeutung sind (Kintner and Sugden, 1979). Die TRs umschließen vier interne, 3,1 kbp lange Sequenzwiederholungen (internal repeats, IR 1-4), die das Genom wiederum in fünf singuläre Sequenzbereiche (unique repeats, UR 1-5) untergliedern. An die Bereiche IR2 und IR4 schließen sich zwei je 1 kbp lange Bereiche an, die als rechte (D_R) und linke Duplikation (D_L) bezeichnet werden und überwiegend homolog zueinander sind. Sie dienen als Replikationsursprung (ori_{Lyt}) für die Genomreplikation während des lytischen Zyklus (Hudewentz et al., 1982; Hammerschmidt and Sugden, 1988).

Der Replikationsursprung für die episodale Genomvermehrung während der Latenz (ori_P) befindet sich hingegen in der U1-Region (Yates et al., 1984; Rawlins et al., 1985).

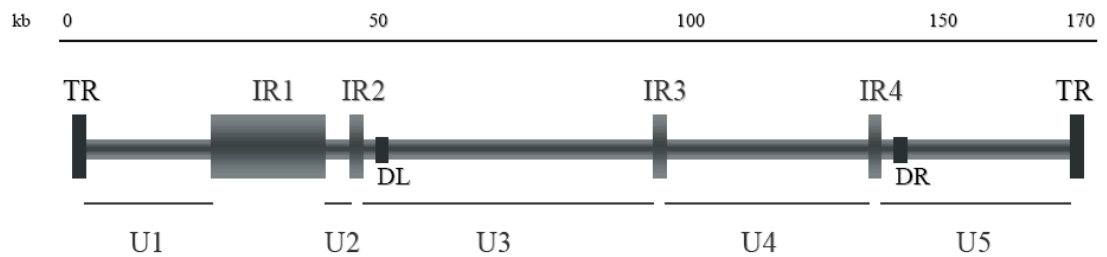


Abb. 2: Schematische Einteilung des linearisierten EBV-Genoms

Dargestellt sind repetitive (internal repeats IR 1-4, terminal repeats TR und duplications DR und DL) und singuläre (unique U 1-5) Sequenzen.

Oben: Längenskala in kbp (modifiziert nach Zimber, 1986).

3.5 Replikationszyklus des Epstein-Barr-Virus

Bei EBV wird zwischen lytischer und latenter Infektion unterschieden. Eine Primärinfektion von B-Lymphozyten durch EBV verläuft zuerst lytisch und führt anschließend zu einer persistierenden, latenten Infektion in ruhenden B-Zellen.

Im latenten Stadium unterliegt das virale Genom als Replikon dem Replikationszyklus der Wirtszelle, das heißt die Replikation und Segregation erfolgt im Zyklus der Wirtszelle (Yates et al., 1984; Rawlins et al., 1985). In diesen Wirtszellen, den sogenannten "Non-Producer-Zellen", werden jedoch keine vollständigen Virionen gebildet. Dies findet in der lytischen Phase statt. Durch verschiedene exogene Stimuli wie beispielsweise 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat (TPA), Butyrat oder durch alpha-Immunglobulinbehandlung kann der Übergang eines gewissen Anteils der latent infizierten Zellen in den lytischen Zustand induziert werden (zur Hausen et al., 1978; Bauer, Hofler, and zur Hausen, 1982; Takada, Komano, and Imai, 1999). Der lytische Zyklus, der nach einer Primärinfektion spontan in den sogenannten „Producer- Zelllinien“ abläuft, ist durch die massive Produktion vollständiger Viruspartikel unter Lyse der Wirtszelle gekennzeichnet. Zudem unterscheiden sich lytischer und latenter Zyklus hinsichtlich der jeweils aktiven Replikationsursprünge ori_{Lyt} und ori_P und des Expressionsmuster der viralen Proteine.

3.5.1 Die lytische Infektion

Nach Einleitung des lytischen Zyklus - unabhängig davon, ob die Induktion spontan oder exogen stimuliert wurde - zeigt die Wirtszelle die für die Herpesvirus-Replikation typischen cytoplasmatischen Veränderungen. Die Synthese von Wirtsmakromolekülen wird unterbunden (Gergely et al., 1971), das zelluläre Chromatin konzentriert sich am Kernrand, während im Kernzentrum die Synthese viraler DNA erfolgt. Die Nucleokapside werden im Cytoplasma zusammengebaut und anschliessend in den Zellkern transportiert, wo die Verpackung der viralen DNA

stattfindet. Die Behüllung erfolgt an der inneren Kernmembran. Nach Absterben der Wirtszelle werden die Viruspartikel freigesetzt.

Auf Proteinebene lässt sich das folgende Expressionsmuster nachweisen: Zunächst erfolgt die Transkription der Immediate Early-Gene BLZF-1 und BRLF-1, sowie die Bildung ihrer Genprodukte, den Proteinen Z und R. Das Z-Protein ist ein Transkriptionsfaktor mit Homologie zu AP1 bzw. der c-fos/c-jun-Familie (Chevallier-Greco et al., 1986; Countryman and Miller, 1985; Farrell, 1995; Takada et al., 1986) und vermittelt den Übergang von der Latenz in die lytische Phase. Die beiden Proteine Z und R transaktivieren die Promotoren der frühen Gene BHLF-1, BHRF-1 und BALF-2, die nun virale Gene aktivieren und das Wirtsgenom stilllegen. Desweiteren bewirken Z und R die Induktion und Expression der späten Antigene gp350, gp200 und m-VCA (Feederle et al., 2000); R meist durch Bindung an Enhancer-Elemente stromaufwärts der Erkennungssequenz des Z-Proteins (Chevallier-Greco et al., 1986). Unabhängig von seiner Transaktivierungsfähigkeit fungiert Z als „origin binding protein“, indem es an regulatorische Sequenzen von ori_{lyt} bindet (Schepers et al., 1993).

Zu den frühen lytischen Genen gehören unter anderem die DNA-Polymerase BALF5, das DNA-Bindungsprotein BALF2, sowie die Enzyme dUTPase BLLF-3, die Ribonukleotidreduktasen BORF-2 und BaRF-1, die Thymidinkinase BXLF-1 und die alkalische Exonuklease BGLF-5 (Kieff, 1996). Nach Abschluss der Virusreplikation beginnt die Expression der späten lytischen Gene, die für die viralen Strukturproteine kodieren. Dazu gehören die Tegumentproteine BNRF-1 (p143), BLLF-1a und -1b (gp 350/220), BXLF-2n (gp 85), BALF-4 (gp15) und das Kapsidprotein BcLF-1 (p150) (Beisel et al., 1985). Für das Eindringen des Virus in die Wirtszelle sind die späten Membranproteine gp 220 und gp 350 von Bedeutung (Tanner et al., 1988). Sie dienen als potentielle Antigene bei der Impfstoffherstellung (Mueller-Lantzsch et al., 1985).

3.5.2 Die latente Infektion

Latenz bedeutet zum einen *in vivo*, dass der Erreger im Wirtsorganismus persistiert, ohne Symptome hervorzurufen, zum anderen *in vitro*, also in der Zellkultur, die Persistenz des viralen Genoms in der Wirtszelle, ohne dass es zur lytischen Replikation kommt.

Die virale Genexpression im latenten Zyklus unterscheidet sich deutlich von der im lytischen Zyklus. Im Verlauf der latenten Infektion werden - im Gegensatz zu lytisch infizierten Zellen, in denen ca. 90% der viralen Gene aktiv sind - nur wenige virale Gene exprimiert. So ist das Auftreten von elf viralen Genprodukten hier typisch: zwei kleine, nicht polyadenylierte RNAs (EBV-encoded small RNA: EBER1 und 2), sechs Kernproteine (EBV-encoded nuclear antigen: EBNA1, -2, -3A, -3B, -3C und EBNA-LP (=Leader-Protein)) und drei Membranproteine (latent membrane protein: LMP1, 2A und 2B). Davon sind jedoch nur EBNA1, 2, 3A, 3C und LMP1 für die Immortalisierung von B-Lymphozyten bzw. Wirtszellen notwendig (Cohen, Picchio, and Mosier, 1992; Kaye, Izumi, and Kieff, 1993; Tomkinson, Robertson, and Kieff, 1993).

Im Zuge der Primärinfektion werden EBNA-LP und EBNA2 als erste virale Genprodukte exprimiert. Beide Proteine stimulieren die Expression der latenten Membranproteine LMP1 und -2A und nachfolgend aller EBNA-Proteine durch Transaktivierung der jeweiligen Promotoren durch EBNA2 und Koaktivierung durch EBNA-LP (Kieff, 1996). Nach der initialen Transformation der B-Lymphozyten zu aktivierten Lymphoblasten dienen die LMP1- und LMP2A-Signalwege als molekulare Mimikry zellulärer Regulationsmechanismen und Überlebenssignale. Durch Repression des viralen, die EBNA-Expression kontrollierenden Cp-Promotors kommt es gleichzeitig zu einer negativen Regulation der stark immunogenen EBNA2 und -3A-C (Radkov et al., 1997) und somit zu einem ruhenden, nicht-immunogenen Status der infizierten Zellen.

Bei Zelllinien, die sich in der Latenzphase befinden, existieren drei verschiedene virale Expressionsmuster, je nach der Expression der latenten Genprodukte. Entsprechend wird von den Latenztypen I, II und III gesprochen.

In Latenztyp I werden neben EBNA1 lediglich die EBER-Transkripte 1 und 2 hergestellt (Rowe et al., 1987). Dieses Expressionsmuster ist in Burkitt-Lymphom-Zellen zu finden und es ist der einzige Latenztyp, der keine zytotoxische T-Zell-Antwort induziert (Trivedi, 1991).

Im Latenztyp II, der charakteristisch für Nasopharyngealkarzinome und Hodgkin-Lymphome ist, kann neben EBNA1 des Weiteren die Expression von LMP 1, 2A und 2B nachgewiesen werden (Raab-Traub, 1983; Fahraeus et al., 1988; Young et al., 1988).

Bei dem Latenztyp III werden alle elf genannten viralen Genprodukte exprimiert. Dieser Expressionstyp wird lediglich *in vitro* bei lymphoblastoiden Zelllinien und bei der akuten infektiösen Mononukleose oder bei immunoblastischen, EBV-assoziierten B-Zell-Lymphomen bei Immundefizienz gefunden (Kieff, 1996).

Zusätzlich wird die Existenz eines weiteren Latenztyps (Typ 0), bei welchem lediglich LMP-2a und die EBER-Transkripte produziert werden, diskutiert (Miyashita et al., 1997).

Neuere immunologische Untersuchungen an Mandelbiopsien EBV-Infizierter stellen eine Ergänzung der klassischen Latenztypeinteilung dar. Sie setzen die Muster der viralen Genexpression mit dem immunologischen Status der infizierten Zellen und deren Lokalisation innerhalb verschiedener Kompartimente des Immunsystems in Beziehung (Thorley-Lawson, 2001).

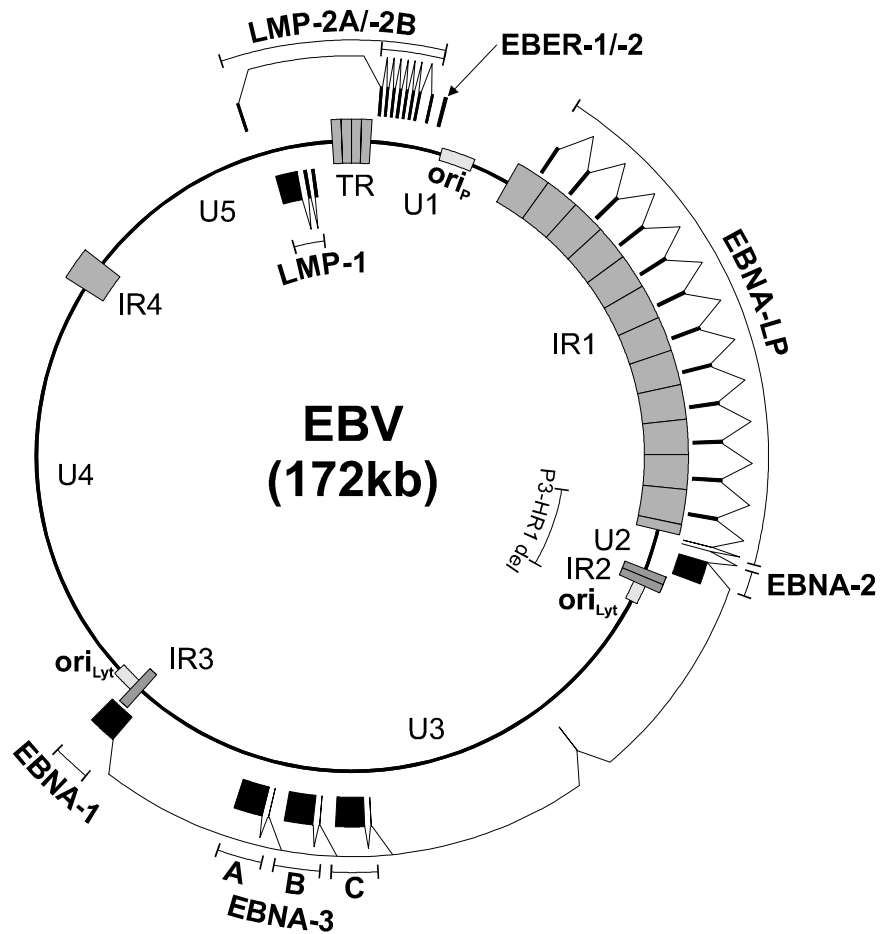


Abb. 3: Schematische Darstellung des EBV-Episoms

Innen: Lage der Deletion in dem EBV-Stamm P3HR-1 sowie Bezeichnung repetitiver und singulärer Genomabschnitte. CTR: terminal repeat region, IR1-4: internal repeat regions 1-4, U1-5: unique regions 1-5, Replikationsursprünge des latenten (ori_p) und des lytischen Zyklus (ori_{Lyt}) sind hellgrau dargestellt.

Außen: Primärtranskripte des latenten Zyklus sowie Lage der einzelnen Exons. (modifiziert nach Kieff, 1996 und Grundhoff et al., 1999b).

3.6 Das Epstein-Barr-Virus codierte Kernantigen 2 (EBNA2)

EBNA2 ist ein nukleäres Phosphoprotein (Petti, Sample, and Kieff, 1990; Grässer et al., 1991) von ca. 85 kDa, welches eine zentrale Rolle bei der Immortalisierung von B-Lymphozyten spielt. EBNA2 wird während einer EBV-Infektion zusammen mit EBNA-LP als erstes virales Gen exprimiert (Rooney et al., 1989). Die Wichtigkeit von EBNA2 für die Etablierung der Latenz und die Transformation wird auch beim EBNA2-deletierten und EBNA-LP partiell-deletierten EBV-Stamm P3HR-1 deutlich, der nicht mehr in der Lage ist, B-Lymphozyten *in vitro* zu immortalisieren (Rabson et al., 1982; Rowe et al., 1985). Der genetische Beweis, dass EBNA2 für die Transformationsaktivität verantwortlich ist, wurde geführt, indem man das P3HR-1 Virus mit einem EBNA2-Expressionsvektor transfizierte. Dieser rekombinierte, EBNA2-positive P3HR-1-Stamm zeigte nun die gleiche Transformationseffizienz wie EBV Typ 1 (Hammerschmidt and Sugden, 1989).

Die beiden EBV-Typen 1 und 2 enthalten zwei unterschiedliche EBNA2-Allele, welche für die Proteine EBNA2A (EBV-Typ 1) und EBNA2B (EBV-Typ 2) kodieren. Diese unterscheiden sich bei einer Homologie der AS-Sequenz von nur 56 % auch in ihrer Länge (EBNA2 A: 487 AS, EBNA2 B: 455 AS), d.h. im Fehlen eines zentralen Elementes. Sie haben im SDS-Gel ein Molekulargewicht von ca. 88 bzw. 75 kDa. Es besteht ein Unterschied in der Transformationseffizienz zwischen EBV Typ 1 und Typ 2, welcher sich wahrscheinlich auf diese zwei allelen Formen von EBNA2 zurückführen lässt. Ansonsten sind die Unterschiede zwischen EBV Typ 1 und Typ 2 bezüglich anderer Gene relativ gering.

EBNA 2 wirkt als Transkriptionsaktivator sowohl zellulärer als auch viraler Gene. Es induziert den Cp-Promotor (Woisetschlaeger et al., 1991; Sung et al., 1991), der die Expression der EBNA-Produkte reguliert und den Promotor der latenten Membranproteine LMP1 und LMP2 enthält (Abbot et al., 1990; Wang et al., 1990; Zimmer Strobl et al., 1994; Laux et al., 1994). Auf zellulärer Ebene verstärkt es die Synthese der B-Zell-Antigene CD23 und CD21 (Wang et al., 1987; Calender et al., 1987; Cordier et al., 1990), der zellulären Protooncogene *c-fgr* (Patel, Leever, and Brickell, 1990) und *c-myc* (Kaiser et al., 1999) sowie des Chemokinrezeptors EBI1/BRL2 (Burgstahler et al., 1995). Allerdings ist EBNA2 nicht selbst in der

Lage, direkt an DNA zu binden. Diese Bindung erfolgt über das Motiv $_{319}\text{PPWWPP}$ (Ling and Hayward, 1995) an den zellulären Transkriptionsrepressor RBP-J κ (Recombination Signal Binding Protein J κ) (Grossman et al., 1994; Henkel et al., 1994; Waltzer et al., 1994; Zimmer Strobl et al., 1994), wobei EBNA2 das zelluläre Protein Notch-IC imitiert.

Die Bindung von EBNA2 an RBP-J κ maskiert dessen Repressionsdomäne (Hsieh and Hayward, 1995) und löst den an RBP-J κ gebundenen Korepressorkomplex, an dem unter anderem HDAC, SMRT, CIR, Sin3A und Skip beteiligt sind (Hsieh et al., 1999). Durch das Aufheben der Repression werden die Transaktivierungsdomänen in die räumliche Nähe des Promotors gebracht (Hsieh et al., 1999).

Deletionen bzw. Punktmutationen in der RBP-J κ - Bindungsstelle von EBNA2 eliminieren die Fähigkeit von EBNA 2, Gene durch RBPJ κ zu transaktivieren und zur B-Zell-Immortalisierung beizutragen (Yalamanchili et al., 1994).

Weitere Untersuchungen zeigten, dass EBNA2 durch eine saure, carboxyterminale Aktivierungsdomäne mit den basalen Transkriptionsfaktoren TFIIB, TAF40 (TATA box binding protein (TBP) associated factor), TFIIF und RPA70, sowie mit dem Koaktivator p100 in Wechselwirkung treten kann (Tong et al., 1995) und dadurch die Transkription benachbarter Gene aktiviert. Zudem gibt es Hinweise auf eine Interaktion von EBNA2 mit dem zellulären p130 (Grässer et al., 1993), dem Histon H1 (Grässer et al., 1993; Tong et al., 1994) und dem carboxyterminalen Abschnitt des humanen DEAD-Box-Proteins DP103 (Grundhoff et al., 1999b).

Ausserhalb der Aktivierungsdomäne von EBNA2 wurde eine Interaktion mit dem Chromatin-Remodelling-Komplex hSWI-SNF gezeigt. Dieser Komplex ist wahrscheinlich dafür verantwortlich, dass die Chromatinstruktur in eine für die Transkription zugängliche Form gebracht wird (Wu, Krumm, and Schubach, 2000).

Eine Reihe RNA-bindender Proteine interagieren möglicherweise ebenfalls mit EBNA2, wie beispielsweise das hnRNP-Protein AUF-1 (CBF2), das hnRNP M2, die schon erwähnte RNA-abhängige RNA-Helikase DP103 (Grundhoff et al., 1999a), sowie das SMN (Survival of Motor Neuron) Protein (Voss et al., 2001; Barth et al., 2003), welches für den Zusammenbau des Spleißosoms notwendig ist.

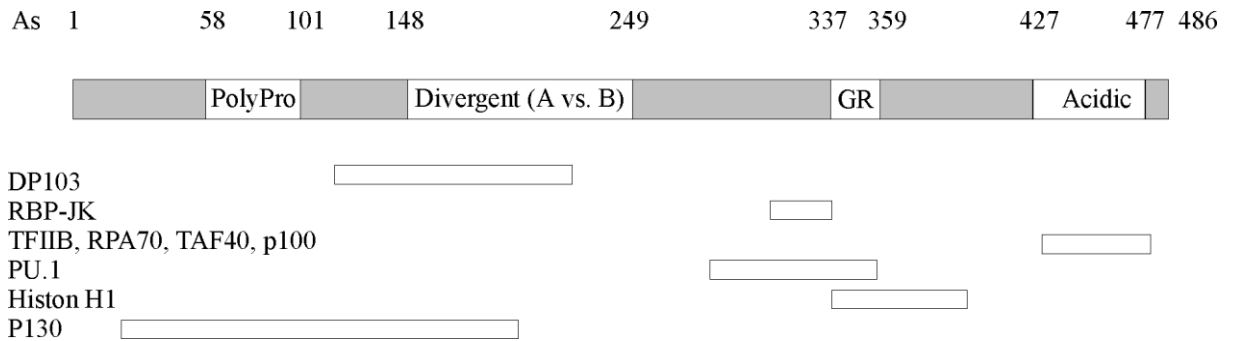


Abb.4: Schematische Abbildung von EBNA2

mit Aminosäuremotiven und Bindungsdomänen (modifiziert nach Middleton, 1991; Yalamanchili, Harada, and Kieff, 1996). Die weißen Bereiche im oberen Balken entsprechen charakteristischen AS-Motiven und Domänen. PolyPro bezeichnet eine stark prolinreiche Sequenz. Divergent (A vs. B) ist der Bereich mit den größten Abweichungen zwischen EBNA2A und -B. GR steht für eine repetitive Abfolge von Glycin-Arginin. Der saure Bereich „Acidic“ entspricht der Transaktivierungsdomäne. Die weißen Balken darunter zeigen die für die Interaktionen mit den entsprechenden Proteinen essentiellen Bereiche.

3.7 Das RBM4/ lark Protein

Das lark Protein/RBM4 ist evolutionär hoch konserviert und findet sich von Drosophila bis hin zum Menschen. Abbildung 5 zeigt eine schematische Darstellung von humanem RBM4 und Drosophila lark. Die hochkonservierte N-terminale Domäne des humanen RBM4 ist zu 69% homolog zur vergleichbaren Domäne in Drosophila lark und sogar zu 49% mit dieser identisch. Aufgrund von Sequenzanalysen der Aminosäuren fand man heraus, daß das RBM4 Protein im N-terminalen Bereich zwei RNA-Recognition Motivs (RRM) besitzt, also zwei RNA-Erkennungssequenzen, die dieses Protein zu einem RNA-bindendem Protein machen und weshalb lark zur RRM-Proteinfamilie gezählt wird. Ein weiteres RNA-bindendes Motiv, ein Retroviraler Typ von Zinkfinger befindet sich C-terminal von den beiden RRM, jedoch auch noch im N-Terminus (Jackson et al., 1997), wobei das Vorkommen dieses Motivs für ein Protein aus der RRM-Familie eher untypisch ist. Der C-Terminus ist im Gegensatz zum N-terminalen Bereich nicht hochkonserviert. Beim Menschen besteht er aus einer Alanin-reichen Domäne (CAD; C-terminal alanine rich domain), bei Drosophila hingegen aus einer Prolin-reichen Region.

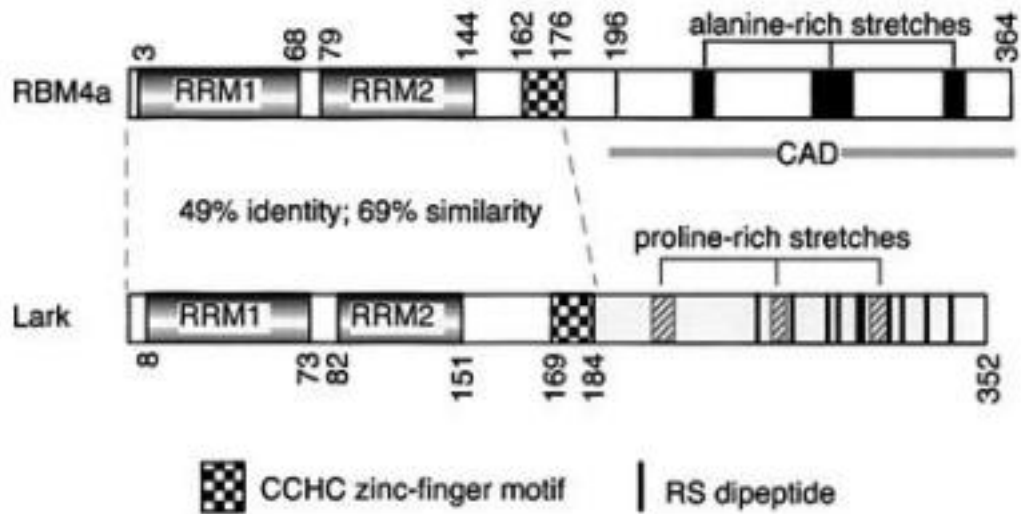


Abb. 5: Schematische Darstellung des humanen und des Drosophila-Lark

(aus Lai, 2003)

Oben: humanes RBM4A mit den beiden RRMs (RNA bindende Motive), dem RTZF (retroviraler Typ von Zinkfinger) und dem CAD (C-terminale alanin-reiche Domäne)

Unten: Drosophila lark mit einer Ähnlichkeit von 69% und einer Identität von 49% zum humanen RBM4, jedoch einer prolinreichen Region im C-Terminus.

Zwei Gene mit hoher Homologie auf Chromosom 11q13.2 codieren für das humane RBM4. Die beiden hlark-Proteine werden auch als RBM4 A/B bezeichnet. Wie in Abbildung 6 zusehen ist, sind ihre Aminosäuresequenzen zu über 90% identisch. Eine Evolution der beiden Gene durch Genduplikation erscheint sehr wahrscheinlich, da die beiden Gene im Bereich der Exons 2 und 3 in ihrer Struktur ähnlich sind. Es konnte bereits gezeigt werden, dass das gesamte RBM4A Gen innerhalb des zweiten Introns von RBM4B liegt. Ausserdem wurden in der 3'UTR (untranslatierte Region) von RBM4B alternative Spleißvorgänge gezeigt, aus denen mindestens 3 Spleißvarianten hervorgehen (Lai et al., 2003).

RBM4a	1	MVKLFIGNLPREATEQEIRSLFEQYGKVLCDIIKKNYGFV
RBM4b	1	MVKLFIGNLPREATEQEIRSLFEQYGKVLCDIIKKNYGFV
RBM4a	41	HIEDKTAEDAIRNLHHYKLHGVNINVEASKNKSSTKL
RBM4b	41	HIEDKTAEDAIRNLHHYKLHGVNINVEASKNKSASTKL
RBM4a	81	HVGNISPTCTNKELRKAFEEYGPVIECDIVKDYAFVHMER
RBM4b	81	HVGNISPTCTNQELRAKFEYGPVIECDIVKDYAFVHMER
RBM4a	121	AEDAVEAIRGLDNTEFQGKRMHVQLSTSRRLRTAPGMGDQS
RBM4b	121	AEDAVEAIRGLDNTEFQGKRMHVQLSTSRRLRTAPGMGDQS
RBM4a	161	GCYRCGKEGHWSKECPIDRSGRVADLTEQYNEQYGAVRTP
RBM4b	161	GCYRCGKEGHWSKECPVDRTGRVADFTEQYNEQYGAVRTP
RBM4a	201	YTMSYGD SLY NNAYGALDAYYKRCRAARSYEAVTAAAA-
RBM4b	201	YTMGYGESMYNDAYGALD-YYKRYRV-RSYEAVAAAAAA
RBM4a	240	SVYNYAEQ TL SQLPQVQNTAMASHLTSTSLDPYDRHLLPT
RBM4b	239	SAYNYAEQ T MSHLPQVQSTTVTSHLNSTSVDPYDRHLLPN
RBM4a	280	SGAAATAAAAAAAAAAAVTAASTSY Y GRDRSPLRRATAPVP
RBM4b	279	SGAAATSAAMAAAAA---TTS-SY Y GRDRSPLRRAAML
RBM4a	320	TVGEGYGYGHESELSQASAAARN S LYDMARYEREQYADRA
RBM4b	315	TVGEGYGYGPESELSQASAATRNSLYDMARYEREQYVDRA
RBM4a	360	RYSAF
RBM4b	355	RYSAF

Abb. 6: Aminosäuresequenz von RBM4A und RBM4B im Vergleich

(nach Lai et al., 2003)

Die Homologie der Proteinsequenzen von RBM4A und RBM4B liegt bei über 90%. Die übereinstimmenden Aminosäuren sind grau unterlegt, Deletionen sind durch Striche gekennzeichnet und Unterschiede in der Aminosäuresequenz sind nicht unterlegt.

Das RBM4-Gen wird im embryonalen Nervensystem exprimiert und ist dort ab der embryonalen Stufe 11 nachweisbar (Newby and Jackson, 1993). Auch die Expression des humanen RBM4-Gen konnte bereits in verschiedenen Geweben nachgewiesen werden, indem man die RBM4 mRNA in Herz, Lunge, Plazenta, Leber, Skelettmuskel, Niere, Pancreas und Gehirn zeigte (Jackson et al., 1997). Zudem gelang der Nachweis des humanen RBM4 Proteins anhand der

zweidimensionalen Gelelektrophorese und im MALDI MS (Matrix-associated laser desorption ionization mass spectroscopy) im Rahmen einer Studie am fetalem Down-Syndrom-Gehirn, wobei eine signifikant erniedrigte Proteinmenge im Gegensatz zu gesunden Vergleichsproben gefunden wurde (Bernert, Fountoulakis, and Lubec, 2002). Dieses Ergebnis konnte allerdings in weiteren Studien nicht bestätigt werden (Gulesserian et al., 2003). Das *Drosophila lark* fungiert als ein molekulares Element bei der Zellzyklusregulation (Clock-Protein), wo es die zeitliche Regulation der Entpuppung der Fliege vermittelt (McNeil et al., 1999; Zhang et al., 2000). Ausserdem wird *Drosophila lark* für die Organisation des Actin-Cytosketts und die Hu-li Tai Shao Lokalisation während der Oogenese benötigt (McNeil, Smith, and Galioto, 2004). Anhand funktioneller *in vivo* Analysen konnte gezeigt werden, dass für eine normale Embryogenese sowohl maternales als auch zygotisches *lark* benötigt wird (Newby and Jackson, 1996). Beim Fehlen der zygotischen Expression kommt es zum Arrest in der Entwicklungsstufe 12, fehlt hingegen die maternale Komponente, resultiert ein früher Entwicklungsarrest (McNeil et al., 1999). Die verschiedenen RNA Bindungsmotive üben wahrscheinlich verschiedene Funktionen zu unterschiedlichen Zeiten aus, da bei ihrer Mutation auch verschiedene Phänotypen in *Drosophila* resultieren. RRM1 und RRM2 sind für die Entwicklungsfähigkeit der Fliege essentiell, wobei dafür die Funktionstüchtigkeit eines der beiden Motive ausreicht. Weiterhin ergab sich bei den Studien, dass die Einzelmutationen von RRM2 oder RTZF das gleiche Spektrum an Phänotypen produziert, nämlich fehlerhaftes Flugverhalten, abnormale Flügel- und Halterenmorphologie, Sterilität bei Weibchen und Flügellosigkeit (McNeil et al., 2001). Da der Schweregrad der Einzelmutationen und der von Doppelmutationen für RRM2 und RTZF sich nicht unterscheiden, wird davon ausgegangen, dass die beiden RNA-Bindungsdomänen *in vivo* zusammenarbeiten um die Funktion von *lark* zu bestimmen. Wie oben bereits erwähnt, zeigte sich bei den bisher durchgeführten *in vivo* Versuche an *Drosophila*, dass es nach einer Mutation der RNA-bindenden Motive zur Ausprägung unterschiedlicher Phänotypen kommt, was darauf hindeutet, dass diese Bindungsmotive funktionell sein müssen, allerdings wurde noch nicht bewiesen, dass sie tatsächlich RNA binden können. Anhand eines in unserer Arbeitsgruppe durchgeführten RNA-Bindungsassay wurde gezeigt, dass RBM4 tatsächlich *in vivo*

RNA bindet. Verwendet wurden verschiedene, mit Hilfe der PCR hergestellte RBM4-Mutanten und zwar der Wildtyp, die RBM4-RRM1-Mutante, bei der RRM1 mutiert wurde, die RBM4- Δ N156-Mutante mit einer Deletion der beiden RRMs und die RBM4- Δ N166-Mutante mit einer zusätzlichen Deletion des RTZF, also des gesamten N-Terminus. Das anhand eines Immunoblot dargestellte Ergebnis zeigte, dass der RBM4-Wildtyp ohne Deletionen oder Mutationen der Bindungsmotive die beste RNA-Bindung besitzt, wohingegen diese Bindung mit zunehmender Mutation oder Deletion abnimmt und die Mutante RBM4- Δ N166 ohne RNA-Bindungsmotiv keine Fähigkeit zur RNA-Bindung mehr besitzt (Spurk und Grässer, nicht veröffentlicht). Neuere Publikationen zeigen, dass es sich bei RBM4 um einen neuen Spleißregulator handelt. Er moduliert alternatives pre-mRNA Splicing, wobei hier RBM4 in der Wahl der Spleißerkennungsstellen und der Exonwahl antagonistisch zu den echten SR-Proteinen (Serin-Arginin-reiche Proteine) wirkt, die neben den snRNPs eine wichtige Rolle beim Spleißen spielen (Lai et al., 2003). SR-Proteine und RBM4 verfolgen jedoch denselben Kernimportweg. Bei beiden wird der Kernimport durch Transportin-SR 2 (TRN-SR2), einem Mitglied der Importin β Familie, ermöglicht. TRN-SR2 erkennt phosphorylierte SR Proteine und transportiert diese in den Kern, wo GTP-gebundenes Ran die transportierten Proteine vom Importin β Molekül dissoziiert. Da bisher für TRN-SR2 noch kein phosphorylierungsunabhängiger Transportmechanismus gezeigt werden konnte, liegt die Vermutung nahe, dass es sich bei RBM4 um ein phosphoryliertes Protein handelt. Neben der Lokalisation als Spleißregulator im Zellkern konnte in *Drosophila* auch eine cytoplasmatische Lokalisation des lark-Proteins in CCAP Neuronen (crustacean cardioactive peptide containing neurons) des ventralen Nervensystems gezeigt werden (Zhang et al., 2000). Diese CCAP Neuronen haben eine Funktion bei der Kontrolle der Entpuppung der adulten Fliege, wobei das lark essentiell für die zeitliche Regulation ist. Während des Puppenstadiums erfahren diese Zellen eine deutliche Abnahme der lark-Menge, die in der Nacht, wenige Stunden vor der Entpuppung, ihren niedrigsten Stand erreicht. Seit den letzten Jahren sind in der Literatur einige Untersuchungen zur Interaktion von RBM4 und anderen Proteinen beschrieben worden. So kann beispielsweise das Wilms tumor protein (WT1) mit dem Spleißprotein RBM4 (Markus and Morris, 2006) interagieren und

seine Fähigkeit, das alternative Spleißen *in vivo* zu modulieren, regulieren (Markus et al., 2006). Die Exonwahl bei der α -Tropomyosin mRNA wird durch die antagonistische Aktion von RBM4 und dem Spleißregulator PTB (Polypyrimidine tract binding protein) reguliert, wobei die beiden Proteine um die Bindung an ein CU-reiches Element konkurrieren. Die skelettmuskelspezifische α -Tropomyosin-mRNA-Menge korreliert zum Teil mit der von RBM4 und kann durch seine Überexpression oder Suppression moduliert werden. Somit beeinflusst RBM4 direkt die Expression von skelettmuskelspezifischem α -Tropomyosin (Lin and Tarn, 2005). Im Mausversuch konnte gezeigt werden, dass RBM4 die posttranskriptionelle Expression eines essentiellen clock-Proteins der Säuger, dem PERIOD 1, aktiviert. Es verursacht einen Anstieg des Per1-Proteinlevels über die Regulation der Translation, indem es über ein cis-Element an die 3'UTR-Region der maus-Per1-mRNA bindet. Änderungen der RBM4-Expression verursachen signifikante Schwankungen in tagesrhythmischen Perioden, wobei eine Überexpression von RBM4 in einer verlängerten Periode resultiert. Durch diesen Versuch konnte die These, dass RBM4 ein neuer posttranskriptioneller Regulator von Clock-Proteinen bei Säugern ist, nochmals untermauert werden (Kojima et al., 2007). Neuere Studien zeigten, dass RBM4A eine Rolle bei der Prozessierung von microRNAs spielt, bzw. dass RBM4A für die micro-RNA-gesteuerte Genregulation benötigt wird (Höck et al., 2007). Diese Untersuchungen bestätigten, dass es sich bei RBM4 um ein multifunktionelles Protein handelt (siehe Markus und Morris, 2008). Tauopathien, wie beispielsweise Alzheimer, sind neurodegenerative Erkrankungen mit Ablagerungen von Tau-Proteinen, welche normalerweise im Zentralnervensystem Mikrotubuli binden und stabilisieren. Tauopathien entstehen durch Spleißmutationen, die das Exon 10 betreffen. Bei Überexpression von RBM4 resultiert ein Anstieg der Exon+10-Isoform. RBM4 aktiviert also die Spleißvorgänge, die das Exon 10 betreffen und induziert so den Einschluss von Exon10 in das Tau-Protein, was das Auftreten von Tauopathien begünstigt. Durch Mutationen in der RNA-bindenden Domäne von RBM4 kann diese Aktivität abgeschaltet werden. Eine Herab-Regulation von RBM4 könnte eventuell von therapeutischer Bedeutung bei Tauopathien sein (Kar et al., 2006). Bei Zellstress kommt es zur Phosphorylierung und zur zytoplasmatischen Akkumulation von RBM4, wodurch seine Funktion

moduliert werden kann. In Abhängigkeit von Stress-Signalen unterdrückt RBM4 einerseits die CAP-abhängige Translation und fördert andererseits die IRES-vermittelte Translation, indem es die Assoziation des Initiationsfaktors eIF4A mit IRES-beihaltenden mRNAs unterstützt (Lin, Hsu, and Tarn, 2007).

3.8 Ziele der Arbeit

RBM4 wurde von Dr. Thomas Dobner (Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universität Regensburg) in einem yeast-two-hybrid Screen, mit EBNA2 als Fängerprotein, fünf mal in verschiedenen Längen gefunden. Dies stellt einen starken Hinweis auf eine Bindung der beiden Proteine dar. Ferner ist es bisher in der Literatur als RNA bindendes Protein beschrieben worden, was die Vermutung einer Bindung zwischen RBM4 und EBNA2 noch verstärkt.

Für eine Reihe RNA bindender Proteine und Proteine des Spleißapparates ist bereits nachgewiesen worden, dass sie als Interaktionspartner von EBNA2 fungieren und dessen vermittelte Transaktivierung beeinflussen können. Hierzu gehören beispielsweise das SMN-Protein (Survival of Motor Neurons Protein), welches für den Zusammenbau des Spleißapparates benötigt wird, das DP103, eine RNA-Helikase (Grundhoff et al., 1999a) oder hnRNP-D1-like (AUF-1 like) das ebenfalls an RNA bindet.

Aufgrund dieser Voraussetzungen war ein Ziel der vorliegenden Arbeit die Verifizierung der Bindung zwischen RBM4 und EBNA2 *in vivo* durch eine Co-Immunpräzipitation der beiden Proteine aus nativen Extrakten eukaryontischer Zellen. Anhand einer Immunfluoreszenz sollte die subzelluläre Lokalisation bestimmt werden. Eine eventuelle Kolo-kalisation der beiden Proteine würde deren mögliche Interaktion untermauern. Zur näheren biochemischen Charakterisierung sollte die Phosphorylierung des Proteins mit Hilfe einer radioaktiven Immunpräzipitation nachgewiesen, sowie die Halbwertszeit von RBM4 bestimmt werden.

Die Herstellung der RBM4-spezifischen, monoklonalen Antikörper wurde am Institut für molekulare Immunologie der GSF München von Frau E. Kremmer durchgeführt. Mit Hilfe dieser Antikörper sollte das Protein endogen in verschiedenen humanen und tierischen Zellen nachgewiesen, und seine Expressionsmenge verglichen werden. Zudem sollte ein RBM4A-, und ein RBM4B-spezifischer monoklonaler Antikörperklon etabliert werden, um auch hier vergleichende Expressionsstudien zu erstellen.

4 Material

4.1 Chemikalien, Membranen, Filter

Acrylamid	Serva (Heidelberg)
Agarose (1%)	Seakem (Rockland, USA)
Amidoschwarz	Sigma (Deisenhofen)
Ammoniumpersulfat (APS)	Serva
Ampicillin (Binotal™)	Bayer (Leverkusen)
Bisacrylamid	Serva
Bovines Serumalbumin (BSA)	New England Biolabs
CASYton™	Schade Systems
Enhanced Chemoluminescence Western Blotting Detection System (ECL™)	Amersham (Freiburg)
Ethidiumbromid	Sigma
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Serva
Fötale Kälberserum (FKS)	Seromed (Berlin)
FuGene™	Roche
Glycerin	Serva
Hyperfilm ECL™	Amersham
Kodak X-Omat AR Röntgenfilm und Polaroid Film Pack Land Type 655	Sigma
Magermilchpulver	Glücksklee (Hamburg)
β-Mercaptopropandiol	Serva
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva
Natriumjodid	Sigma
Nitrocellulosemembran	Schleicher und Schuell (Dassel)
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Serva
Nukleotide (dNTPs)	Boehringer (Mannheim)
Radiochemikalien	ICN-Biochemicals (Meckenheim)
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Serva

Triton X-100	Serva
Zellulosefilter Whatman™	Herolab (Maidstone, USA)

Alle weiteren Chemikalien, die in dieser Arbeit verwendet wurden und hier nicht aufgeführt sind, wurden über die Firmen Merck (Darmstadt) und Roth (Karlsruhe) in analysereiner Form bezogen.

4.2 Antikörper

4.2.1 Primärantikörper

Der monoklonale Antikörper R3 (Ratte, IgG2A) stammt aus der Arbeitsgruppe Grässer (Kremmer et al., 1995). Er ist gegen den C-terminalen Bereich von EBNA2A gerichtet. Zusätzlich wurde der HA-spezifische Antikörper 3F10 (Ratte, IgG2A) der Firma Roche Biochemicals verwendet. Dieser ist gegen ein Epitop des Influenza Virus, Hämagglutinin gerichtet. Den FLAG-spezifische Antikörper M2 bezogen wir von der Firma Sigma. Die RBM4A und B-spezifischen monoklonalen Antikörper (Ratte, IgG 2A) wurden von Frau E. Kremmer (GSF, München) zur Verfügung gestellt. Den monoklonalen Antikörper α - β -Actin (Maus, IgG) bezogen wir von der Firma Sigma.

Als Negativkontrolle wurde in Immunpräzipitationsversuchen der α -Borna-P40 monoklonale Antikörper 5F10 (Sauder et al., 1996) eingesetzt.

Die Antikörper wurden in folgenden Verdünnungen eingesetzt:

α -HA 3F10	1: 100
α -EBNA2 R3	1:10
α -RBM4A/B	1:100
α - β -actin	1:5000
α -FLAG M2	1:500

4.2.2 Sekundärantikörper

- Western Blot:

Die Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper (α -Maus-, α -Ratte- und α -Kaninchen-Pox) wurden in der Regel in einer Verdünnung von 1:2000 eingesetzt. Sie alle wurden von der Firma Sigma bezogen.

- Indirekte Immunfluoreszenz:

Die eingesetzte Verdünnung für diese Antikörper liegt bei 1:100 bzw. wurden sie zunächst 1:1 mit Glycerin verdünnt und anschliessend 1:50 eingesetzt.

Zu ihnen gehören:

Fluorescein-Isothiocyant (FITC)-konjugierte anti-Ratte IgG Antikörper (Sigma),
Fluorescein-Isothiocyant (FITC)-konjugierte anti-Maus IgG Antikörper (Sigma),
Tetramethyl-Rhodamin (TRITC)-konjugierte anti-Ratte IgG Antikörper (Dianova),
Tetramethyl-Rhodamin (TRITC)-konjugierte anti-Maus IgG Antikörper (Dianova).

4.3 Enzyme

Alkalische Phosphatase (calf intestinal phosphatase, CIP)	Boehringer
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs
T7 DNA-Polymerase	Roche
Taq-Polymerase	Pharmacia
RnaseA	Boehringer
Lysozym	Boehringer

4.4 Grössen- und Molekulargewichtsmarker

4.4.1 DNA-Molekulargewichtsmarker

Bei der Agarosegelelektrophorese wurde als Längenstandard zur Größenbestimmung doppelsträngiger, linearer DNA-Moleküle die Kb-Plus Ladder (New England Biolabs) verwendet. Der Marker enthält folgende Fragmentgrößen: 12000, 11000, 10000, 9000, 8000, 7000, 6000, 5000, 4000, 3000, 2000, 1650, 1000, 850, 650, 500, 400, 300, 200, 100 bp.

4.4.2 Protein-Molekulargewichtsmarker

Bei einer SDS-PAGE wurde zur Molekulargewichtsbestimmung von Proteinen der LMW-Marker (Low molecular weight - Marker) der Firma Pharmacia, Freiburg benutzt.

Er enthält die folgenden Proteine, die entsprechend bandieren:

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

Zur Bestimmung des Molekulargewichtes radioaktiv markierter Proteine wurde der Proteinstandard der Firma Amersham mit folgenden ^{14}C -markierten Proteinen verwendet (in absteigender Reihenfolge):

Myosin leichte Kette	200 kDa
Phosphorylase B	92.5 kDa
BSA (Bovines Serum Albumin)	68 kDa
Ovalbumin	47 kDa
Carbonic Anhydrase	30 kDa
Lysozym	20 kDa

4.5 Puffer

PBS-Puffer (für Proteine/ mit Mg²⁺ und Ca²⁺):

NaCl	140 mM
KCl	25 mM
MgCl ₂	0,5 mM
CaCl ₂	1 mM
Na/K-Phosphat (pH 7,5)	10 mM

PBS-Puffer (für Zellen/ ohne MG²⁺ und CA²⁺):

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

2× SDS-Probenpuffer(2x Sample-Buffer):

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

Puffer „K“:

NaCl	100	mM
Tris/HCl (pH 8,0)	100	mM
KCl	5	mM
MgCl ₂	0,5	mM
CaCl ₂	1	mM
NP40	0,5	% (v/v)
PMSF	0,5	mM
Aprotinin	2	µg/ml
Pepstatin A	2	µg/ml
Leupeptin	2	µg/ml

TAE-Puffer (50×):

Tris/HCl (pH 7,5)	2	M
Na-Acetat	0,25	M
EDTA	0,5	M

mit Eisessig auf pH 7,5 eingestellt

TE-Puffer:

Tris HCl (pH 7,5)	10	mM
EDTA (pH 8,0)	1	mM

Weitere Puffer und Lösungen, die hier nicht aufgeführt sind, aber im Rahmen der Doktorarbeit verwendet wurden, befinden sich im Kapitel 5 „Methodik“, da diese Puffer meist nur in einer speziellen Methode Anwendungen fanden.

4.6 Zelllinien

4.6.1 Epitheliale Zelllinien

- HeLA: Zelllinie, die aus einem zervikalen Adenokarzinom einer 31 Jahre alten Patientin etabliert wurde (Scherer et al., 1971).
- Tera-1: Humane Teratokarzinom-Zelllinie mit Fibroblasten-Morphologie (Jewett, 1978)

4.6.2 B- und T-lymphoide Zelllinien

- BL41: EBV-negative Burkitt-Lymphom-Zelllinie (Lenoir, Vuillaume, and Bonnardel, 1985)
- B95-8: EBV-positive lymphoblastoide Zelllinie (LCL) aus *in vitro* EBV-Typ1-immortalisierten B-Zellen eines Krallenaffen.
- NIH 3T3: Zellen eines Mäuseembryos
- MDCK: Nierenzellen eines Cocker Spaniels
- QT6: Fibrosarkomzellen einer Wachtel
- Saos-2: Osteosarkomzellen
- Jurkat: EBV-negative, T-lymphoide Zelllinie, etabliert aus peripherem Blut eines ALL-(Akute Lymphoblastische Leukämie)Patienten.
- MDA-MB-231: humanes Mammakarzinom
- HCT116 wt: p53-positives humanes Colonkarzinom
- HCT116(p53-/-): p53-negatives humanes Colonkarzinom
- Hep-G2: humanes Leberzellkarzinom
- HuH7: humanes Leberzellkarzinom
- Alex-3: humanes Leberzellkarzinom
- H1299: Lungenadenokarzinom
- MCF7: humanes Mamma-Adenokarzinom
- T47D: humanes Mammakarzinom

- SKBR: humanes Mammakarzinom
- SKNSH: peripheres Neuroblastom
- P3HR-1: EBV-positive Joijoye-B-Subzelllinie, infiziert mit einem Typ II-Virus, das aufgrund einer Deletion des gesamten EBNA2 und Teilen des EBNA-LP-Leserahmens nicht mehr transformierend ist.
- Raji-Zellen: Nichttransformierende EBV-Typ1-positive Non-Producer-Burkitt-Lymphom-Zelllinie mit einer Deletion im EBNA3C-Bereich und der BL-typischen t (8; 14) Chromosomentranslokation (Epstein, Achong, and Barr, 1964)
- COS-1-Zellen: Diese Zelllinie entstand durch Transformation der CV-1-Zelllinie, eine etablierte Nierenzelllinie der Grünen Meerkatze, mit einer replikationsdefizienten Mutante des SV40-Virus. Die COS-1-Zelllinie enthält eine einzige integrierte Kopie der kompletten frühen Region der SV40 DNA, exprimiert ein Wildtyp SV40 T-Antigen und unterstützt dadurch die effiziente Replikation von Plasmiden, die den SV40 „origin of replication“ enthalten. (Gluzman, 1981).
- EREB-Zellen: EBV-transformierte B-Lymphozyten

Die Zelllinien bezogen wir von ATCC (American type culture collection), EREB-Zellen erhielten wir von Frau Dr. B. Kempkes, GSF, München.

4.7 Bakterienstämme

Zur Amplifikation von Plasmiden wurden der E.coli Stamm pMOS Blue (pMOSBlue-T Vector-Kit der Firma Amersham) verwendet. Zur IPTG-induzierten, bakteriellen Proteinexpression wurde der E.coli Stamm BL21DE3 verwendet.

4.8 Kulturmedien

4.8.1 Kulturmedium für Säugerzellen

DMEM: Zur Kultivierung adhärenter Monolayer-Zellkulturen wurde "Dulbecco's Modified Eagle Medium" (Bio-Whitacker) verwendet. Dieses Medium wurde jeweils mit 10 % (v/v) fötalem Kälberserum (FKS, Biochrom) und einem "4er Antibiotikum" aus 40 U/ml Penicillin-G40, 10 U/ml Moronal, 10 µg/ml Neomycinsulfat und 50 µg/ml Streptomycinsulfat ergänzt.

RPMI 1640 (für B-Zelllinien): Zur Kultivierung eukaryoter Suspensionszellen wurde RPMI 1640 (Sarstedt), supplementiert mit 10% (v/v) FKS (Biochrom), 1 mM Natriumpyruvat (Sarstedt), 40 U/ml Penicillin-G40, 10 U/ml Moronal, 10µg/ml Neomycinsulfat und 50 µg/ml Streptomycinsulfat, verwendet.

4.8.2 Kulturmedien für Bakterien

Luria broth base (GIBCO): Zur Anzucht von Bakterien in Flüssigkultur wurde 2,5 % (w/v) LB-Medium angesetzt und autoklaviert.

Luria's Agar (GIBCO): Zur Anzucht von Bakterien auf Agarplatten wurden LB-Platten aus 3,75 % (w/v) Luria's Agar verwendet.

Zur Selektion von transformierten Bakterien wurde Ampicillin (0,1 % (w/v)) zugesetzt.

4.9 Expressionsvektoren

pSG5:

Bei diesem Plasmid handelt es sich um einen eukaryontischen Expressionsvektor mit SV40-Promotor, einer anschließenden β -Globin-Intron-Sequenz zur effizienteren Proteinexpression, einem T7-Promotor zur *in vitro*-Transkription/Translation, an die sich die MCS mit dahinter befindlichem Polyadenylierungssignal anschließt. Der Vektor besitzt ein Ampicillin-Resistenzgen (Stratagene).

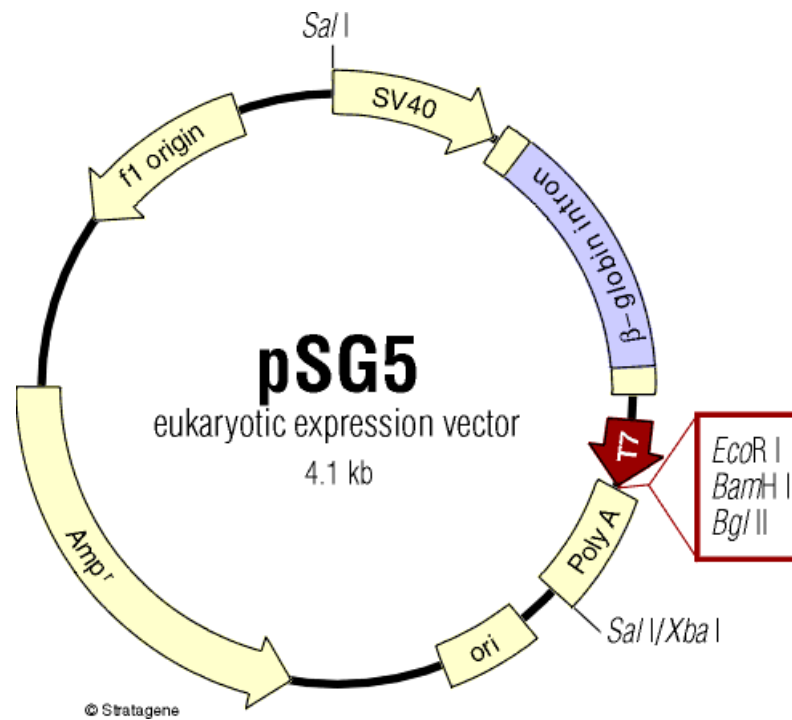


Abb. 7: Schematische Darstellung des Vektors pSG5

4.9.1 Effektorplasmide

pSG5-FLAG-RBM4B: Dieses Plasmid diente im Verlauf der Dissertation zur Expression des RBM4B Proteins in eukaryontischen Zellen. Dieses lässt sich mit dem monoklonalen Antikörper α -FLAG-M2 nachweisen.

pSG5-EBNA2: Dieses Plasmid wird zur eukaryontischen Expression des viralen EBNA2 Proteins verwendet.

4.10 Oligonukleotide (Primer)

Zur PCR-Amplifikation von DNA-Fragmenten wurden die folgenden Primer verwendet. Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen sind unterstrichen.

Primer zur Klonierung von FLAg-getagtem RBM4B in pSG5:

Forward Primer:

GgcggatccccaccATGGACTACAAGGACGACGACGACAAGGTGAAGCTGTTC
ATCGGAAACC

BamHI-Kozak-Start-FLAG-RBM4B

Reverse Primer:

CCGggatccgaattcTTAAAAGGCTGAGTACCGGGCTCG

BamHI-Stop-RBM4B

4.11 Computersoftware

Zur Textverarbeitung diente Microsoft Word. Grafiken wurde mit dem Programm Power Point 2000 und the Gimp erstellt.

Zur Literaturrecherche dienten die PubMed (www4.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed)- und die Medline (www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/medline.html)- Datenbanken.

5 Methodik

5.1 Bakterienkulturen

5.1.1 Aufzucht und Lagerung von Bakterien

Zur Aufzucht für analytische Zwecke werden zunächst Bakteriensuspensionen auf LB-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Einzelne Kolonien dienen anschließend zum Animpfen von 2 ml LB-Suspensionskulturen. Die LB-Suspensionskulturen werden über Nacht bei 37°C aerob auf dem Schüttler inkubiert. Da die in den Bakterien enthaltenen Plasmide ein Resistenzgen gegen Ampicillin enthalten, werden die LB-Agarplatten und LB-Suspensionskulturen zur selektiven Kultivierung mit Ampicillin (0,1 % (w/v)) versetzt.

5.1.2 Herstellung transformationskompetenter Bakterien

Zur Herstellung transformationskompetenter Bakterien werden 30 ml SOB-Medium mit einer Einzelkolonie angeimpft. Diese Vorkultur wird über Nacht bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert. Am nächsten Tag werden 200 ml SOB-Medium mit 8 ml der Vorkultur angeimpft und bei 37°C inkubiert, bis eine OD₆₀₀ von 0,3 erreicht ist. Bei dieser optischen Dichte befindet sich das Wachstum der Bakterien in der exponentiellen Phase. Dann wird die Bakterienkultur in 50 ml aliquotiert, 15 min auf Eis inkubiert und anschließend 5 min bei 2000 rpm und 4°C abzentrifugiert (Heraeus Megafuge 1.0 RF). Das Bakterienpellet wird nun in 16 ml Transformationspuffer 1 resuspendiert und erneut 15 min auf Eis inkubiert. Es folgt ein zweiter Zentrifugationsschritt bei 4°C und 2000 rpm für 5 min (Heraeus Megafuge 1.0 RF). Das Bakterienpellet wird nun in 4 ml Transformationspuffer 2 resuspendiert und zu je 200 µl aliquotiert und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgt anschließend bei -70°C.

Transformationspuffer 1:	RbCl	12 g/l
	MnCl ₂ x 4H ₂ O	9,9 g/l
	K-Acetat	30 ml/l 1M Lösung
	Glycerol	150 ml/l
	pH 5,8 mit 0,2 M Essigsäure einstellen	
Transformationspuffer 2:	MOPS (pH6,8)	20 ml/l 0,5 M Lösung
	RbCl	1,2 g/l
	CaCl ₂ x 2H ₂ O	11 g/l
	Glycerol	150 ml/l
SOB-Medium:	Trypton	20 g/l
	Hefe-Extrakt	5 g/l
	NaCl	0,6 g/l
	KCl	0,5 g/l
	autoklaviert	
Zugabe von 10 ml/l 2 M Mg ²⁺ -Lösung direkt vor Gebrauch		

5.1.3 Transformation kompetenter Bakterien

Unter Transformation versteht man die Aufnahme freier, löslicher DNA durch kompetente Bakterien. Hierbei wird ein 200 µl Aliquot kompetenter Bakterien auf Eis aufgetaut. Etwa 60 µl des Aliquots werden mit 20 ng Plasmid-DNA bzw. mit 250 ng DNA (~ 10 µl) aus einem Ligationsansatz gemischt. Nach 20 min Inkubation auf Eis erfolgt ein Hitzeschock bei 42°C für 90 sec im Wasserbad. Nach 2 min Abkühlung auf Eis wird dem Bakterienansatz 1 ml LB-Medium zugegeben. Diese Vorkultur wird bei 37°C für 30 min inkubiert. Erst dann wird der Ansatz auf LB-Platten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert bzw. entsprechendes LB-Medium damit angeimpft und über Nacht bei 37°C bebrütet. Die Vorkultur soll den durch den Hitzeschock gestressten Bakterien das Erreichen der exponentiellen

Wachstumsphase erleichtern, bevor sie mit den Antibiotika in Kontakt kommen. Damit soll die Bakterienausbeute erhöht werden.

5.2 Kultivierung eukaryotischer Zellen

5.2.1 Kultivierung adhärenter Zelllinien

Adhärente Zelllinien werden in „Dulbecco’s-Modified-Eagle-Medium“ (DMEM Bio-Whitacker) im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert und dreimal wöchentlich (bei einer Zelldichte von ca. 5×10^6 Zellen/ml) durch Trypsinierung subkultiviert. Dazu wird das Medium unter sterilen Bedingungen abpipettiert, der Zellrasen mit Hilfe von Trypsin/EDTA vom Gefässboden abgelöst und anschliessend ein geeignetes Aliquot der Zellsuspension in ein neues Kulturgefäss mit DMEM überführt.

5.2.2 Kultivierung von Suspensionszellen

Die Zellen werden in RPMI 1640-Medium im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ gehalten und dreimal wöchentlich bei Erreichen einer Zelldichte von ca. $5-6 \times 10^6$ Zellen/ml Zellkultur durch Verdünnung in frischem Medium subkultiviert.

5.3 Zellzahlbestimmung

5.3.1 Zellzahlbestimmung mit der NeubauerTM-Zählkammer

Die Zellzahlbestimmung mit der NeubauerTM-Zählkammer erfolgt lichtmikroskopisch. Hierbei wird die Kammer zunächst mit einem kleinen Volumen einer definierten Verdünnung (1:100 in PBS) der zu zählenden Zellkultur beladen und anschliessend werden die Kammerquadranten manuell ausgezählt.

5.3.2 Zellzahlbestimmung mit dem Zellanalysegerät CASY

Zur exakten Bestimmung der Zelldichte und der qualitativen Beurteilung einer Zellpopulation werden 5 µl der zu zählenden Zellkultur in 5 ml einer Elektrolytlösung (CASYton™) gemischt und in einem CASY™-Counter (Schade Systems) analysiert. Das Gerät misst hierbei den elektrischen Widerstand der durch eine Kapillare gesaugten, zellhaltigen Elektrolytlösung. Die Stärke der Widerstandsänderung erlaubt eine Aussage über die Zellgrösse und somit über die Qualität der Zellen und die Häufigkeit der Widerstandsänderungen gibt Aufschluss über die gemessene Zellzahl. Die Auswertung erfolgt über ein Histogramm, welches die Grössenverteilung der analysierten Zellkultur wiedergibt.

5.4 Transiente Transfektion eukaryotischer Zellen mit FuGene™

Bei dieser Methode liegen in den Transfektionsreagenzien Partikel vor, meistens Lipide, die in der Lage sind, Micellen zu bilden. Dadurch kann zugegebene DNA in das Innere der Micellen verpackt werden. Wird diese Mischung anschliessend zu Zellen gegeben, fusionieren die Lipidmicellen mit der Lipiddoppelmembran der Zellen und die im Inneren gebundene DNA wird ins Zellinnere entlassen. Die Transfektionseffizienz bei dieser Methode ist sehr hoch und man benötigt nur sehr geringe Mengen an DNA.

Diese Transfektionsmethode eignet sich speziell für COS-1-Zellen. Wir verwenden das FuGene-Reagenz der Firma Roche. Es werden in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß 100 µl DMEM-Medium ohne Zusätze vorgelegt, 4 µl FuGene™ in die Mitte pipettiert und vorsichtig gemischt. Anschließend wird die DNA (ca. 1-2 µg/10 cm Schale) dazugegeben und erneut leicht gemischt. Die Ansätze werden zur Ausbildung der Micellen 30 min bei 37°C inkubiert und anschließend auf der 10 cm Schale verteilt. Nach 48 Stunden Inkubation bei 37°C und 7 % CO₂ werden die Zellen durch Abschaben geerntet, um sie in Immunpräzipitationsversuchen und bei Immunfluoreszenzen einzusetzen.

5.5 DNA-Techniken

5.5.1 Isolierung von Plasmid-DNA

5.5.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus E.coli

Die in den Bakterien vermehrten Plasmide müssen isoliert, und von der genomischen DNA der Bakterien getrennt werden. Dabei werden je nach benötigter Plasmid-DNA-Menge unterschiedliche Methoden verwendet. Sie beruhen auf den besonderen Eigenschaften der ringförmig geschlossenen, superhelikalen Plasmid-DNA. Ihre beiden DNA-Stränge werden bei der alkalischen Denaturierung im Gegensatz zur genomischen DNA nicht vollständig voneinander getrennt, da ihre Enden kovalent miteinander verbunden und die Stränge in sich gewunden sind. Nach der Wiedereinstellung eines neutralen pH-Wertes kann die Plasmid-DNA daher schneller renaturieren und so abgetrennt und isoliert werden.

5.5.1.2 Analytische Plasmid-DNA-Isolierung (Minipräparation)

Durch die Minipräparation können kleine Mengen an Plasmid-DNA aus einer Bakterienkultur gewonnen und bei Klonierungen schnell analysiert werden. Diese Methode liefert maximal 5 µg an Plasmid-DNA. Einzelkolonien werden in 1,5 ml LB-Medium + Ampicillin angeimpft und nach Inkubation über Nacht (bei 37°C auf dem Schüttler) abzentrifugiert (5 min, 5000 rpm, Heraeus Picofuge). Das Zellsediment wird in 200 µl Stet-Puffer + 1 µl Lysozym resuspendiert und anschließend 30 sec im Wasserbad gekocht. Der Ansatz wird kurz auf Eis gestellt und dann abzentrifugiert (15 min, 13000 rpm bei 4°C, Sigma 202 MK Kühlzentrifuge), um genomische DNA und die denaturierten Proteine zu fällen. Das Pellet wird entfernt und der Überstand wird durch Zugabe von 200 µl Isopropanol vermischt und abzentrifugiert (30 min, 13000 rpm bei 4°). Die pelletierte Plasmid-

DNA wird mit 70% Ethanol gewaschen, erneut abzentrifugiert (15 min, 12000 rpm bei 4°C mit Sigma 202 MK) und ca. 10 Min bei RT getrocknet. Anschließend wird das Pellet in 20 µl TE-Puffer + RNAase aufgenommen.

STET-Puffer:	Saccharose	8	% (w/v)
	Tris-HCl	50	mM
	EDTA	50	mM
	Triton X-100	0,1	% (w/v)
	Lysozym	0,5 mg/ml,	frisch zugegeben

5.5.1.3 Präparative Plasmid-DNA-Isolierung (Midipräparation)

Soll Plasmid-DNA in größeren Mengen und von hohem Reinheitsgrad zur Verfügung stehen, wird diese Methode gewählt. Die Zellen werden einer alkalischen Lyse und einer anschließenden Ionenaustauschchromatographie über Qiagen-Säulen gemäß der Firmenvorschrift (Qiagen, Düsseldorf) unterzogen. 100 ml einer Übernachtskultur werden abzentrifugiert (10 min, 4000 rpm, RT mit Heraeus Megafuge 1,0 R), das Bakterienpellet in 4 ml Puffer S1 resuspendiert. Es werden weitere 4 ml Puffer S2 zugegeben und der Ansatz nach Durchmischen 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. EDTA, SDS und NaOH führen dabei zur Zerstörung der Bakterienzellwände, zur alkalischen Lyse der Zelle und zur Denaturierung der chromosomalen DNA. Die zirkuläre Plasmid-DNA wird bei dieser Behandlung nicht vollständig in ihre Einzelstränge getrennt. Die Zugabe von 4 ml Puffer S3 unter vorsichtigem Schütteln bewirkt eine schnelle Neutralisierung des pH-Wertes, wobei die Plasmid-DNA vollständig renaturiert und gelöst vorliegt, die chromosomale Bakterien-DNA verbleibt in einem unlöslichen SDS-Protein-DNA-Präzipitat und wird 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wird das Gemisch für 25 min bei 6000 rpm abzentrifugiert und auf die Affinitätssäule (AX 100) gegeben oder über einen Rundfilter direkt auf die Säule gegeben, die in der Zwischenzeit mit 2,5 ml N2-Puffer äquilibriert wurde. Die Plasmid-DNA bindet beim Durchlaufen der Säule an

das Säulenmaterial. Die Säule wurde zweimal mit je 5 ml Puffer N3 gewaschen, um zelluläre Proteine und andere Verunreinigungen zu entfernen. Die DNA wird mit 5 ml Puffer N5 eluiert, wobei das Eluat in ein frisches Falcon-Gefäß aufgefangen wird. Zum Präzipitieren der Plasmid-DNA wird das Eluat mit 3,6 ml Isopropanol versetzt und mindestens 30 min bei 6000 rpm und 4°C mit Heraeus Megafuge 1,0 R abzentrifugiert. Das Pellet wird in 70%igem Ethanol gewaschen und anschließend an der Luft getrocknet. Das Pellet wird in 100 µl H₂O_{dest} aufgenommen und die DNA-Konzentration bestimmt.

S1 Puffer: (pH 8,0)	Tris-HCL	50	mM
	EDTA	50	mM
	RNaseA	100	µg/ml
S2 Puffer:	NaOH	200	mM
	SDS	1 %	(w/v)
S3 Puffer: (pH 5,1)	K-Acetat	2,8	mM
N2 Puffer:	Tris-H ₃ PO ₄	100	mM
	Ethanol	15	%
	KCl	500	mM
	Triton X-100	0,15	%
N3 Puffer: (pH6,3)	Tris-H ₃ PO ₄	100	mM
	Ethanol	15	%
	KCl	500	mM
N5 Puffer: (pH8,5)	Tris-H ₃ PO ₄	100	mM
	Ethanol	15	%
	KCl	1000	mM

5.5.2 Spektrometrische Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren

Durch die photometrische Messung der Absorption wird der DNA-Gehalt und Reinheitsgrad von Plasmid-DNA bestimmt. Dazu werden 3,5 µl DNA-Lösung 1:100 mit H₂O_{dest} verdünnt, und die OD₂₆₀ und die OD₂₈₀ an einem Ultrospec 3000 Photometer (Pharmacia) gemessen. Aufgrund des Hyperchromizitätseffekts absorbiert ss-DNA stärker als ds-DNA. Der Quotient OD_{260nm}/OD_{280nm} definiert den Reinheitsgrad der DNA-Lösung. Werte unter 1,65 zeigen Proteinverunreinigungen an, Werte über 1,85 RNA-Verunreinigungen. Als Referenz dient H₂O_{dest}.

5.5.3 Ethanolpräzipitation von Nukleinsäuren

Durch Ethanolpräzipitation lässt sich DNA aus einer wässrigen DNA-Lösung konzentrieren. Ausgenutzt wird dabei, dass Nukleinsäuren in Anwesenheit geeigneter Konzentrationen an monovalenten Kationen in Ethanol unlöslich sind. Der DNA-Lösung wird daher 0,1 Volumen einer 3 M Natriumacetat-Lösung und 2,5 Volumen Ethanol (100%) zugegeben und kurz gemischt. Zur DNA-Fällung wird der Ansatz nun für 30 min auf -70°C gestellt. Anschließend kann durch 10 min Zentrifugation bei 13000 rpm und 4°C (Sigma Kryofuge 202MK) die präzipitierte DNA pelletiert werden. Der Überstand wird verworfen, das Pellet mit gekühltem Ethanol (70 %) gewaschen und nochmals für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wird wieder verworfen und das Pellet 10 min unter Vakuum getrocknet (Speed-Vac Concentrator, Savant) und in einem geeigneten Volumen TE-Puffer resuspendiert.

5.6 Enzymatische Modifikation von DNA

5.6.1 Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen (Restriktionsverdau)

Restriktionsendonukleasen sind bakterielle Enzyme, die in doppelsträngiger DNA bestimmte Erkennungssequenzen (häufig palindromatische) besitzen und die beiden Stränge des DNA-Moleküls innerhalb oder in definiertem Abstand (bis zu 14 bp) spezifisch, durch spalten der Phosphodiesterbindung im DNA-Rückgrat, schneiden. Ein Standardreaktionsansatz enthält etwa 1-5 µg DNA. Es wird das 0,1-fache Volumen des entsprechenden 10× Puffers (nach Angaben des Herstellers gewählt) hinzugefügt. Eine entsprechende Menge an Units der Restriktionsendonuklease (1 Unit ist die Menge an Enzym, die 1 µg DNA bei 37°C innerhalb von 1 h vollständig spaltet) wird zupipettiert. Je nach verwendetem Enzym muss noch das 0,1-fache Volumen an BSA zupipettiert werden. Der Ansatz wird mit H₂O_{bidest} auf 20-40 µl aufgefüllt. Die Inkubationsbedingungen der Reaktionen variieren je nach Enzym zwischen 0,5 und 4 h bei 37°C. Bei einem Doppelverdau wird der Puffer verwendet, der hierfür von der Herstellerfirma empfohlen wird.

5.6.2 Dephosphorylierung von Vektor-DNA

Um zu gewährleisten, dass bei der Ligation nur Vektor- mit Insert-DNA ligieren kann und es zu keiner Rezirkularisierung von Vektor-DNA kommt, wird die linearisierte Vektoren-DNA mit dem Insert vor dem Ligationsschritt mit Hilfe der alkalischen Phosphatase (CIP, calf intestinal phosphatase) dephosphoryliert. Dieses Enzym spaltet vom 5'-Ende der linearisierten DNA die reaktive Phosphatgruppe ab und gewährleistet so, dass nur eine Ligation mit phosphorylierter Insert-DNA stattfinden kann. Ein Standardreaktionsansatz enthält 20 µl der verdauten Vektor-DNA, 1 µl alkalische Phosphatase, 3 µl 10× Reaktionspuffer und wird mit 6 µl H₂O_{bidest} auf 30 µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Der Ansatz wird für 2 h oder über Nacht bei 37°C inkubiert und durch anschließende Agarosegelelektrophorese und

Gene-Clean™-Isolierung aufgereinigt. Die Effizienz der Reaktion wird in der anschließenden Ligation durch einen Vektorkontrollansatz ohne Zugabe von Insert-DNA überprüft.

5.6.3 Ligation von DNA-Molekülen

Die T4-DNA-Ligase lässt sich aus *E.coli*-Bakterien isolieren, die mit dem Bakteriophagen T4 infiziert sind, und gehört zu den DNA-Reparaturenzymen. Mit Hilfe dieses Enzyms können *in vitro* zwei Nukleinsäuremoleküle miteinander verknüpft werden, indem es die Phosphodiesterbindungen zwischen einem 3'-Hydroxyl- und einem 5'-Phosphatende schließt und somit die Bildung einer intakten, rekombinanten ds-DNA ermöglicht. Die Enden der beiden zu ligierenden Nukleinsäuremoleküle müssen dabei kompatibel sein. Die T4-DNA-Ligase benötigt ATP als Kofaktor und Energiequelle. Die Effektivität der Ligation ist abhängig von den eingesetzten Konzentrationen an Vektor- und Insert-DNA. Diese werden daher so gewählt, dass sie im Reaktionsansatz äquimolar vorliegen (je 0,5-1 µg). Nach Zugabe von 2 µl 10× Ligasepuffer und 1 µl T4-DNA-Ligase (1 U/µl) wird der Ligationsansatz auf ein Gesamtvolumen von 20 µl mit H₂O_{bidest} aufgefüllt und 4 h oder über Nacht bei 16°C inkubiert. Die Hälfte der Ligationsansätze (10 µl) wird nach Inkubation direkt zur Transformation kompetenter Bakterien eingesetzt, die andere Hälfte für eventuell notwendige Wiederholungsschritte bei 4°C gelagert.

Ligasepuffer (10×):	ATP	10 mM
	MgCl ₂	50 mM
	DTT	10 mM
	Tris/HCl (pH 7,5)	660 mM

5.6.4 Agarosegelelektrophorese doppelsträngiger DNA

Die Agarosegelelektrophorese ist die meist verwendete Technik um Nukleinsäureketten der Größe nach aufzutrennen. Hierbei macht man es sich zu Nutze, dass DNA bei neutralem pH als Polyanionen vorliegen, da sie an ihren Phosphatgruppen im Zucker-Phosphat-Rückgrat viele negative Ladungen trägt und somit bei Anlegen eines elektrischen Feldes zur Anode wandert. Die Wanderungsgeschwindigkeit von DNA-Fragmenten im elektrischen Feld wird durch die Porengröße der polymeren Gelmatrix bestimmt. Dabei hat die Zusammensetzung der Nukleinsäureketten kaum Auswirkungen auf das Laufverhalten im Gel. Jedoch ist es von Bedeutung, in welcher Konformation die zu trennende DNA vorliegt, also ob sie als kovalent geschlossenes, ringförmiges Molekül (coiled und supercoiled Form), als offenes, ringförmiges oder als lineares Molekül vorliegt. So wandert die supercoiled Form am schnellsten, wohingegen die offene, zirkuläre und die lineare Form ein fast identisches Laufverhalten aufweisen, wobei die lineare Form ein wenig schneller wandert. Als Puffer wird Tris-Acetat-Puffer (TAE) verwendet. Die Anfärbung der DNA-Fragmente erfolgt mit dem Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid. Dieser interkaliert in doppelsträngige DNA, so dass die DNA-Fragmente unter UV-Licht als orange gefärbte Banden erkennbar und dokumentierbar sind.

5.6.4.1 Herstellung von Agarosegelen

Da der Auftrennungsbereich der Gelelektrophorese von der Porengröße, folglich von der Dichte der Gelmatrix, abhängt, bestimmt man den Auftrennungsbereich über die Agarosekonzentration, also die Menge der eingesetzten Agarose. Je höher die Agarosekonzentration ist, desto kleiner ist die Porengröße. Abhängig von der Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente werden Agarosegele mit der jeweils geeigneten Konzentration eingesetzt (zwischen 0,6 % und 2,0 %, meist aber 1,0 %).

Die entsprechende Agarosemenge wird in 450 ml TAE-Puffer (1×) durch Aufkochen im Mikrowellenherd gelöst und nach Abkühlen auf ca. 60°C werden 25 µl Ethidiumbromid (Stammlösung: 10 mg/ml in H₂O) hinzugegeben. Anschließend wird die Agaroselösung in eine zuvor mit 1%iger Agarose abgedichtete Gießvorrichtung gegossen (24,5 × 24,5 × 1 cm). Durch PVC-Kämme, die sich in die Gießvorrichtung einspannen lassen, werden im Gel Taschen ausgespart, die nach der Polymerisation ca. 35 µl Fassungsvermögen haben. Nach vollständiger Polymerisation des Gels werden die Kämme entfernt, das Gel in Klarsichtfolie eingepackt und bis zum Gebrauch bei 4°C aufbewahrt.

Ideale Agarosekonzentrationen für bestimmte DNA-Trennbereiche:

Agarosemenge (%)	DNA-Trennbereich (kbp)
0,3	60 – 5
0,6	20 – 1
0,7	10 – 0,8
0,9	7 – 0,5
1,2	6 – 0,4
1,5	4 – 0,2
2	3 – 0,1

5.6.4.2 Agarosegelelektrophorese

Die DNA-Proben wurden zunächst mit 0,2 Volumen Blaumarker gemischt. Danach wurden die Proben in die Taschen des Gels pipettiert, wobei das im Blaumarker enthaltene Glycerin dafür sorgt, dass die DNA-Probe durch die Erhöhung der Dichte der Probenflüssigkeit auf den Boden der Geltasche absinkt. Die Elektrophorese wurde in einer horizontalen, mit TAE-Puffer (1×) gefüllten Elektrophoresekammer durchgeführt, in die das Agarosegel so hineingelegt wurde, dass es gerade mit Puffer bedeckt war. Die DNA-Proben wurden durch Anlegen eines elektrischen Feldes aufgetrennt (1-2 h; 80-130 V). Parallel dazu wurde eine Markerspur zum

Größenvergleich der Fragmente aufgetragen. Das im Blaumarker enthaltene EDTA inaktiviert als Chelatbildner Enzyme, Bromphenolblau macht die Gel-Lauffront sichtbar. Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurden die präparative Gele, um Schäden an der DNA zu vermeiden, unter langwelligem UV-Licht ($\lambda = 366 \text{ nm}$) ausgewertet, während analytische Gele unter kurzwelligem UV-Licht ($\lambda = 254 \text{ nm}$) durch das Geldokumentationssystem MWG Biotech Gel Print 2000i dokumentiert wurden.

Blaumarker:	Bromphenolblau	0,25	% (w/v)
	Glyzerin	50	% (v/v)
	EDTA	0,05	M

5.6.5 Gene-Clean™-Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Isolierung spezifischer DNA-Fragmente aus Agarosegelen wurde mit Hilfe des Gene-Clean™-Kits (Dianova) nach Vorschrift des Herstellers durchgeführt. Diese Methode erlaubt eine Aufreinigung von DNA-Fragmenten, die größer als 130 bp sind. Das entsprechende DNA-Fragment wurde unter langwelligem UV-Licht ($\lambda = 366 \text{ nm}$) mit Hilfe eines Skalpellens ausgeschnitten und in ein Eppendorfgefäß überführt. Es wurde das 2,5- bis 3-fachen Volumen an 6 M NaI-Lösung zugegeben, welches die Denaturierung der DNA verhindert, und durch eine Inkubation von 10 min bei 55°C wurde das Agarosegelstück aufgelöst. Danach wurden dem Ansatz 7 µl Glasmilch (Gene-Clean™-Kit) zugegeben und dieser zur Bindung der DNA an die Glasmilch 15 min oder, bei kleineren DNA-Fragmenten, über Nacht auf einem Drehrad bei Raumtemperatur inkubiert. Der Ansatz wurde anschließend 1 min bei 13000 rpm abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Glasmilchpellet dreimal mit je 400 µl NEW-WASH-Lösung (Gene-Clean™-Kit) gewaschen und erneut 1 min bei 13000 rpm abzentrifugiert. Um die DNA aus dem Glasmilchpellet zu eluieren, wurde das gewaschene Pellet in 20 µl H₂O resuspendiert, der Ansatz für 5 min bei 55°C inkubiert und anschließend nochmals 1 min bei 13000 rpm abzentrifugiert. Der DNA enthaltende Überstand wurde in ein frisches

Eppendorfgefäß überführt. 3 µl dieses Überstandes wurden zur Überprüfung der Reisolierung auf ein Agarosegel aufgetragen.

5.6.6 Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR ist ein enzymatisches *in vitro* Verfahren zur selektiven Anreicherung von Nukleinsäurefragmenten definierter Länge und Sequenz. Sie wird in automatisierten Thermocyclern durchgeführt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Thermocycler der Marken Gene Amp System 9600 (Perkin Elmer) und Progene (Techne) benutzt. Erster Schritt der Amplifikation ist die Denaturierung (Melting) der ds-DNA-Matrize (Template) durch Erhitzung auf eine Temperatur über dem Schmelzpunkt der Matrize (etwa 94°C). Nach einer folgenden Abkühlung können sich synthetische Oligonukleotide (Primer), die zu jeweils einem der Matrizenstränge komplementäre Bereiche besitzen, an die Matrizenstränge anlagern (Annealing). Die Annealingtemperatur ist vom Schmelzpunkt und letztlich dem GC-Gehalt der verwendeten Primer abhängig; sie liegt meist zwischen 51°C und 65°C. Im letzten Schritt wird sich die Eigenschaft der, aus dem thermophilen Bakterium *Thermophilus aquaticus* stammenden, Taq-Polymerase (Pharmacia) zunutze gemacht, die an die freien 3'OH-Enden der an die Matrize gebundenen Primer weitere Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs) bindet und diese als Synthesestartpunkt der folgenden Auffüllreaktion (Elongation) bei 72°C (dem Temperaturoptimum der Taq-Polymerase) zu einem ds-DNA-Molekül nutzt. Diese Schritte werden 20 bis 40-fach wiederholt (Melting → Annealing → Elongation). Dadurch wird eine starke Anreicherung der durch die Primer definierten Sequenz erzielt.

Bei der Auswahl der Primerpaare wurde berücksichtigt, dass die Primer möglichst ähnliche Schmelztemperaturen besaßen, keine Selbstkomplementarität aufwiesen und keine Sekundärstrukturen ausbilden konnten.

Zur Überprüfung auf eventuelle Kontaminationen wurde zusätzlich eine H₂O-Kontrolle, also ein kompletter Ansatz, aber ohne Matrizen-DNA, gemacht.

Abschließend wurden 20 µl von jedem Ansatz in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt.

Verwendete Reagenzien:

Taq (Thermophilus aquaticus)-Polymerase (Pharmacia): 5 U/µl
 10× Polymerase-Reaktionspuffer (Pharmacia): KCl 500 mM
 Tris/HCl 100 mM
 MgCl₂ 15 mM
 Gelatine 1 mg/ml
 dNTPs (Boehringer Mannheim): dATP, dCTP, dGTP, dTTP je 10 mM

Pipettierschema eines 100 µl Standard-PCR-Ansatzes:

Komponente	Menge / Volumen	Endkonzentration
MgCl ₂	2 µl	2 Mm
dNTPs	je 2 µl	je 200 µM
10×Reaktionspuffer	10 µl	1×
5'-Primer	1 µg	10 ng/µl
3'-Primer	1 µg	10 ng/µl
Matrizen-DANN	0,1 - 1 µg	0,1 - 1 µg
Taq-Polymerase	0,5 µl	2,5 U
H ₂ O _{bidest}	ad 100 µl	

Schema eines verwendeten PCR Standardprogramms:

Reaktionsschritt	Zeit	Temperatur	Anzahl der Zyklen
Vorlauf	5 min.	30°C	1
	2 min.	94°C	
Denaturierung	1 min.	94°C	40
Primeranlagerung	1 min.	51°C	
Primerverlängerung	2 min.	72°C	
Letzte Synthese	10 min.	72°C	1
Kühlen	∞	4°C	1

5.7 Proteintechniken**5.7.1 Herstellung von Proteinextrakten****5.7.1.1 Herstellung denaturierter Proteinextrakte**

Die Zellen werden durch Abschaben oder Abspülen aus den Kultutflaschen geerntet. Anschließend werden sie 10 min bei 1200 rpm abzentrifugiert (Megafuge 1.0 RF, Heraeus) und zweimal mit sterilem, kaltem PBS gewaschen. Das Pellet wird nun in einer definierten Menge 2× SDS-Proben-Puffer (siehe unter 4.5) resuspendiert (10 µl/10⁶ Zellen) und darauffolgend einer Ultraschall-Behandlung (Branson Sonifier 250) von 5×5 sec zur Fragmentierung der chromosomalen DNA unterzogen. Die Proben werden zur Denaturierung für 10 min bei 95°C gekocht und anschließend 10 min bei 13000 rpm und Raumtemperatur (Sigma Kryofuge 202MK) zum Entfernen der Zellreste abzentrifugiert. Der proteinhaltige Überstand wird bis zur Auftrennung in der SDS-Page bei -20°C gelagert.

5.7.1.2 Herstellung nativer Proteinextrakte

Die geernteten Zellen werden zweimal in PBS gewaschen, mit einem entsprechenden Volumen Puffer K versetzt, 20 Minuten auf Eis inkubiert und Zellreste durch Zentrifugation (1300 rpm, 4°C, 10 min) pelletiert. Der Überstand wird entweder frisch in Co-Immunitationsversuchen eingesetzt oder bis zur Verwendung bei -70°C gelagert.

Puffer „K“:	NaCl	100	mM
	Tris/HCl (pH 8,0)	100	mM
	KCl	5	mM
	MgCl ₂	0,5	mM
	CaCl ₂	1	mM
	NP40	0,5	% (v/v)
	PMSF	0,5	mM
	Aprotinin	2	µg/ml
	Pepstatin A	2	µg/ml
	Leupeptin	2	µg/ml

5.7.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinextrakten

Der Proteingehalt von Extrakten wird photometrisch bestimmt. Dazu wurde eine 1:100 Verdünnung in 0,1 M NaOH-Lösung hergestellt und deren Extinktion bei 280 nm bestimmt. Die Proteinkonzentration errechnet sich nach folgender Formel:

$6,4 / E_{280} = x \text{ } \mu\text{l}$, die 30 µg Gesamtprotein enthalten.

Auch diese 2× SDS-Proben-Puffer-Extrakte wurden bei -20°C gelagert.

5.7.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

In einer SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (Maniatis, 1989) werden Proteine nach ihrem Molekulargewicht, ihrer Gestalt und Gesamtladung elektrophoretisch aufgetrennt. Das negativ geladene Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) lagert sich im Verhältnis 1:2 an die hydrophoben Regionen der Proteine an. Dadurch kompensiert es die positiven Eigenladungen, so dass alle Proteine im Gel entsprechend ihres Molekulargewichtes zur Anode wandern. Sowohl durch das Erhitzen in PBS als auch durch das im Probenpuffer enthaltene beta-Mercaptopropandiol werden gleichzeitig die über intra- und intermolekulare Disulfidbrücken zusammengehaltenen Proteinuntereinheiten getrennt, die Proteine also vollständig denaturiert. Die Gelmatrix besteht aus Ketten polymerisierten Acrylamids, die durch N,N'-Methylenbisacrylamid quervernetzt werden. Die Polymerisierungsreaktion wird durch Ammoniumpersulfat (APS) gestartet und durch N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) katalysiert. Die Auftrennungseigenschaften sowie die Porengröße des jeweiligen Gels hängen von der eingesetzten Acrylamid- und Bisacrylamidkonzentration ab. Um eine maximale Auftrennung zu erreichen, wurde die Methode der diskontinuierlichen Gelelektrophorese durchgeführt. Dabei wird das zu analysierende Proteingemisch in einem Gel aufgetrennt, das aus zwei Gelsystemen mit unterschiedlicher Porosität und unterschiedlichem pH-Wert des Puffers besteht. Die Proteine wandern von einem grobporigen Sammelgel (Uppergel), in dem sie konzentriert werden, in ein feinporiges Trenngel (Bottomgel), worin die Auftrennung erfolgt.

Mit Hilfe von Markerproteinen bekannter Molekulargewichte, die parallel zu den zu untersuchenden Proteinen aufgetrennt werden, kann das relative Molekulargewicht der Proteine ermittelt werden.

Die elektrophoretische Auftrennung erfolgt für 2,5 bis 3 Stunden bei konstanter Stromstärke von 25-30 A.

5.7.4 Herstellung eines SDS-Polyacrylamidgels

Zwischen zwei mit Ethanol (70% (v/v)) gereinigte Glasplatten (14,5 x 16,5 cm) werden an drei Seiten je ein Teflon-Abstandhalter eingelegt und die Platten dann mit Klammern aufeinander befestigt. Die Ränder werden mit Agarose (1%) abgedichtet, das Trenngel zwischen die Glasplatten gegossen (bis 3 cm unter den Rand) und mit H_2O_{bidest} überschichtet. Nach der Polymerisation des Trenngels wird das H_2O_{bidest} abgegossen, das Sammelgel aufgegossen und die Geltaschen mit einem Teflonkamm ausgespart. Nach der Polymerisation des Sammelgels wird der Kamm sowie der Abstandhalter an der Unterseite des Trenngels entfernt. Danach wird das Gel senkrecht in eine Elektrophoresekammer eingespannt, beide Pufferkammern mit Laufpuffer gefüllt und die Proteinproben mit Hilfe einer Hamilton-Mikropipette in die Geltaschen pipettiert.

Komponenten für ein 10%-iges Polyacrylamidgel:

Komponente	Trenngel	Sammelgel
Sammel-/Trenngelstock	4,0 ml	1,25 ml
Acrylamid (30%)	5,3 ml	750 μl
Bisacrylamid (2%)	2,12 ml	300 μl
H_2O_{bidest}	4,58 ml	2,7 ml
APS (10%)	140 μl	50 μl
TEMED	14 μl	10 μl

Trenngelstock (pH 8,8): Tris/HCl 1,5 M
(„Bottom gel stock“) SDS 0,4 % (w/v)

Sammelgelstock (pH 6,8): Tris/HCl 0,5 M
(„Upper gel stock“) SDS 0,4 % (w/v)

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

5.7.5 Western-Blot

Der Western-Blot (Immunblot) dient dem spezifischen Nachweis einzelner Proteine. Hierbei werden die zuvor in der SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennten Proteine auf eine Membran (Nitrocellulose) übertragen, wobei das nach der Auftrennung entstandene Proteinmuster immobilisiert auf der Membran erhalten bleibt. Die Proteine binden bei niedriger Ionenstärke aufgrund hydrophober Wechselwirkungen an die Membran. Da sowohl das im Gel entstandene Bandenmuster als auch die Immunreaktivität der Proteine bei der Übertragung erhalten bleibt, können diese durch den Einsatz spezifischer Antikörper immunologisch nachgewiesen werden.

5.7.5.1 Proteintransfer

Vor dem Aufbau des Blots wird die verwendete Nitrocellulose-Membran in PBS äquilibriert. Anschließend werden in einer mit Transferpuffer gefüllten Wanne auf ein PVC-Gitter zwei Schwammtücher, zwei Whatman-Papiere, das Polyacrylamidgel, die Nitrocellulose-Membran, zwei weitere Whatman-Papiere und zwei Schwammtücher aufgelegt, und nach oben durch ein weiteres Gitter luftblasenfrei abgeschlossen. Der Blot wird, in richtiger Orientierung zur Anode hin, in eine mit Transferpuffer gefüllte Kammer (LKB 2005 Transpher Electro Blotting Unit) gestellt. Der Transfer wird 1,5 h bei 330 mA durchgeführt. Danach wird die Nitrocellulose-Membran zur unspezifischen Färbung aller Proteine kurz mit Poinceau STM gefärbt. Die Markerspür wird mit einem Skalpell abgeschnitten, 15 min in Amidoschwarz-Lösung angefärbt und anschließend entfärbt. Die restliche Membran wird für 30 min bei Raumtemperatur in PBS-Milch („Blocking-Puffer“) geblockt, um unspezifische Bindungsmöglichkeiten der Antikörper auf der Membran zu vermeiden.

Transferpuffer:	Tris/HCl	25	mM
	Glycin	192	mM
	Methanol	20	% (v/v)
	SDS	0,05	% (w/v)
Blockingpuffer:	Magermilchpulver	5	% (w/v)
	in PBS-Puffer		
Amidoschwarz-Färbelösung:	Isopropanol	25	% (v/v)
	Essigsäure	10	% (v/v)
	Amidoschwarz	0,1	% (w/v)
Amidoschwarz-Entfärbelösung:	Isopropanol	10	% (v/v)
	Essigsäure	10	% (v/v)

5.7.5.2 Immunologischer Nachweis membrangebundener Proteine

Proteine, die auf einer Membran immobilisiert worden sind, werden von spezifischen Antikörpern erkannt. Durch einen zweiten Antikörper, der an den konstanten Abschnitt des ersten Antikörpers bindet und an eine Enzymaktivität wie z.B. die Meerrettich-Peroxidase gekoppelt ist, kann die Position des Proteins auf der Membran in einer Farbreaktion sichtbar gemacht werden. Die Nitrocellulosemembran wird nach dem Blocken mit dem entsprechenden Primärantikörper in ca. 5 ml PBS-Milch (5% (w/v) Magermilchpulver in PBS) gelegt und auf einem Taumler über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend wird die Membran 3× 15 min in PBS-Puffer gewaschen, um unspezifisch gebundene Antikörper zu entfernen. Danach wird die Membran mit einem entsprechenden, gegen den konstanten Anteil des ersten Antikörpers gerichteten Sekundärantikörper, der mit der Meerrettich-Peroxidase gekoppelt ist, in ca. 5 ml PBS-Milch (5%) gelegt und auf einem Taumler 1 h bei RT inkubiert. Da die spezifisch gegen das zu detektierende Protein gerichteten Erstantikörper aus Mäusen, Ratten oder Kaninchen gewonnen wurden, müssen die Zweitantikörper entsprechend ausgewählt werden

(α -Maus-POX, α -Ratte-POX, α -Kaninchen-POX). Nach weiteren drei Waschschritten von 15 min in PBS-Puffer werden die Antikörper-markierten Proteine durch eine enzymkatalysierte ECLTM-Lichtreaktion (Enhanced Chemoluminescence Western Blot Detection KitTM, Amersham) nach Angaben des Herstellers detektiert.

5.8 Co-Immunpräzipitation zweier Proteine

Die konstanten Abschnitte von Antikörpern besitzen eine hohe Affinität zu Protein-G-Sepharose (PGS). Aus Zellextrakten, die mit einem spezifischen Antikörper inkubiert wurden, lassen sich daher entstandene Immunkomplexe durch Zugabe von Protein-G-Sepharose präzipitieren. Dabei werden nicht nur die direkt an die spezifischen Antikörper gebundenen Proteine präzipitiert, sondern auch ihre gebundenen Interaktionspartner kopräzipitiert (Co-Immunpräzipitation) und damit die Bindung zweier Proteine aneinander nachgewiesen.

Bei dieser Methode werden 20 runde 10 cm Schalen mit konfluent gewachsenen Monolayer-Zellkulturen für einen Ansatz benötigt. In unserem Experiment wurden COS-1-Zellen verwendet. Diese müssen 48 h zuvor ausgesät und mit dem Plasmidklon transfiziert werden (hier EBNA2wt), der als Interaktionspartner des zu präzipitierenden Proteins (hier das endogene RBM4 der COS-1-Zellen) fungiert. Mindestens 12 h vor der Zellernte werden zwei 15 ml-Falkons mit je 200 μ l eines Gemisches aus 50% PGS (Protein-G-Sepharose) in PBS mit Na-Acid befüllt und mit ca. 3 ml Antikörper beladen. Eines der Falkons wird mit einem Antikörper bestückt, der gegen eines der beiden zu präzipitierenden Proteine gerichtet ist (in diesem Fall war dies 6E10, der das RBM4A erkennt); das andere Falcon wird mit einem anderen, irrelevanten Antikörper bestückt, der als Kontrolle dienen soll (hier α -Borna-P40). Die beiden Falkons werden über Nacht auf einem Drehrad bei 4°C inkubiert, wobei die Antikörper an die Protein-G-Sepharose binden. Die nun gut gewachsenen Zellen werden geerntet, indem der Überstand abgesaugt und der Monolayer mit 5 ml PBS ohne Mg²⁺ und ohne Ca²⁺ mit einem Zellschaber abgeschabt wird. Die Zell-PBS-Lösung wird in einem 50 ml Falcon gesammelt und anschliessend 10 min

bei 1200 rpm und 4°C abgefugt. Jetzt wird der Überstand verworfen und die Zellen in 10 ml PBS ohne Mg²⁺ und ohne Ca²⁺ gewaschen und erneut wie oben abzentrifugiert. Das Zellpellet wird nun in 3-5 ml Lysepuffer aufgenommen und 20 min auf Eis inkubiert.

Lysis-Puffer: PBS ohne Mg²⁺ und ohne Ca²⁺
 0,1 % SDS
 0,5 % Triton x – 100
 1 mM EDTA

davon werden 10 ml versetzt mit:

10 µl PMSF
10 µl 1 M DTT

sowie die folgenden Proteaseinhibitoren:

10 µl Aprotinin
10 µl Leupeptin
10 µl Peptostatin
2 µl mg 132

Das nun lysierte Zellpellet wird in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und anschliessend bei 13000 rpm für 20 min abzentrifugiert. Von dem Überstand (Lysat) werden nun 50 µl als Inputkontrolle aufbewahrt und mit 50 µl 2× Samplebuffer versetzt.

Für die erste Immunpräzipitation wird nun die mit α-Borna-P40 abgesättigte PGS bei max. 2000 rpm abzentrifugiert, der Überstand verworfen und die PGS mit 5 ml Lysepuffer pur gewaschen. Nach erneutem Abfugen wird der Lysepuffer wieder entfernt und der komplette Überstand des Zellpellets (das Lysat) auf die mit α-Borna-P40 abgesättigte PGS gegeben (erste Immunpräzipitation zur Kontrolle). Anschliessend wird der Ansatz für 1,5 h auf dem Drehrad bei 4°C inkubiert. Danach wird erneut abzentrifugiert und der Überstand (das Lysat) auf die mit α-RBM4A-6E10 abgesättigte PGS für die zweite und eigentliche Immunpräzipitation gegeben und wiederum für 1,5 h auf dem Drehrad bei 4°C inkubiert. Die nun folgenden

Waschschritte dienen dazu, den Background, der durch andere unspezifisch gebundene Proteine entsteht, zu minimieren. Die beiden Immunpräzipitationen werden in je einem 1,5 ml Reaktionsgefäß fünfmal mit 1 ml Lysepuffer ohne Proteaseinhibitoren mit einer NaCl-Konzentration von 0,5 M gewaschen. Es folgt noch ein weiterer Waschschritt mit Lysepuffer ohne weiteren Zusatz von NaCl. Danach werden die Protein-G-Sepharosen, die die Antikörper sowie nun auch Proteine gebunden haben, mit 80 – 100 µl 2× Samplebuffer versetzt, 5 min gekocht und anschliessend 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Nun werden die Überstände in einer SDS-PAGE eingesetzt und dann einem Western-Blot unterzogen um das Ergebnis darzustellen.

5.9 Pulse Chase Experiment

Die Halbwertszeit eines Proteins kann mit Hilfe des „Pulse-Chase“ Experiments bestimmt werden. Hierbei werden transfizierte Hela-Zellen verwendet, die 3 Tage vor dem Experiment subkultiviert werden. Circa 3×10^6 Zellen, kultiviert auf einer 10 cm Zellkulturschale in MEM (Gibco) werden zweimal mit methionin- und cysteinfreiem Medium (Gibco) gewaschen. Danach werden die Zellen in diesem Medium, welches mit 10% PBS-dialysiertem FKS und 250 µCi/Schale „Translabel“ (ICN) supplementiert wurde, für 2 Stunden radioaktiv markiert. In dieser Markierungsphase wird eine Mischung aus ^{35}S - markiertem L-Methionin und L-Cystein, welche in „Translabel“ (ICN) enthalten ist, in die Proteine eingebaut (Pulse). Nach der Markierung enthalten alle Ansätze vergleichbare Mengen an radioaktiv markiertem Protein. Anschliessend werden die Zellen dreimal mit komplettem Medium, das nichtradioaktives Methionin und Cystein enthält, gewaschen und für unterschiedliche Zeiten inkubiert (Chase). Durch die unterschiedliche Inkubationsdauer werden in den Ansätzen unterschiedliche Mengen an radioaktiv markiertem Protein abgebaut, was Rückschlüsse auf die Halbwertszeit ermöglicht. Die Zellen werden mit kaltem PBS gewaschen, lysiert und mittels Immunpräzipitation und Autoradiographie und dem Phosphoimager (Roche) analysiert.

5.10 Immunfluoreszenz

Die Immunfluoreszenz dient dazu, die subzelluläre Lokalisation von Proteinen visuell darzustellen.

Für dieses Experiment wurden Hela-Zellen verwendet. Sie werden in 6-Loch-Platten auf Deckgläsern ausgesät und mit Hilfe der FuGene™-Methode mit 1-2 µg der entsprechenden Plasmid-DNA transient transfiziert. 48 Stunden nach der Transfektion werden die auf den Deckgläsern bei 37°C und 5% CO₂ gewachsenen Zellen vorsichtig einmal mit PBS gewaschen und 15 min mit 4% Paraformaldehyd/PBS bei RT fixiert. Nach anschließender Permeabilisierung in 0,2% Triton-X-100/PBS (2 min bei -20°C) und dem Blocken unspezifischer Antikörperbindungsstellen mit 2% BSA/PBS für 15 min bei 37°C erfolgt die Inkubation der Zellen für 45 min bei 37°C mit dem in 3µg/ml BSA/PBS verdünnten, spezifischen Primärantikörper (Verdünnungen: anti-RBM4A 6E10, 1:50; anti-HA 3F10, 1:50; anti-EBNA2 R3, 1:10). Nach vier Waschschritten (je 10 min bei RT auf dem Schüttler: 3x in PBS, 1x in 0,03% Triton-X-100/PBS) werden die Zellen 30 min bei 37°C mit dem Sekundärantikörper inkubiert. Nach erneuten drei Waschschritten mit PBS wird der Zellkern durch eine fünfminütige Inkubation bei 37°C mit einer 0,2µg/ml DAPI/Methanol-Lösung gefärbt und anschliessend einmal mit Methanol gewaschen. Um ein Austrocknen der Präparate zu verhindern, werden die zellbewachsenen Deckgläser auf ein mit Elvanol-Lösung (3% (w/v) Elvanol-Polyvinylalkohol, 30 % (v/v) Glyzerin in PBS) betropften Objektträger gebracht, mit Nagellack versiegelt und bis zur Auswertung lichtgeschützt bei 4°C gelagert.

Längere Inkubationsschritte werden in einer feuchten Kammer durchgeführt, um auch hier ein Austrocknen der Präparate zu verhindern.

Immunfluoreszenzen werden in 60facher Vergrößerung mit Hilfe eines Zeiss Axiovert 100 TV Mikroskops und einer Sony 3CCD Kamera ausgewertet und dokumentiert (freundlicherweise zur Benutzung überlassen vom Institut für Medizinische Biochemie, Universitätskliniken Homburg).

6 Ergebnisse

Das Epstein-Barr Virus stellt aufgrund seiner engen Assoziation mit der Genese verschiedener Tumorerkrankungen, wie HD, NPC, BL oder PTLD, und seiner Fähigkeit, B-Zellen zu immortalisieren ein globales Forschungsziel dar.

Das Epstein-Barr-Virus-kodierte nukleäre Antigen 2 (EBNA2) spielt eine essentielle Rolle als Transaktivator der latenten Membranproteine LMP1 und 2 und der nukleären Antigene EBNA1-6 (Laux et al., 1994; Zimmer Strobl, 1994) und damit für die virale Transformation von B-Lymphozyten und die Etablierung einer latenten EBV-Infektion.

EBNA2 bindet an verschiedene RNA-interagierende, zelluläre Proteine, wie zum Beispiel SMN, DP103 und hnRNP-D1-like. Das SMN-Protein (Survival of Motor Neurons Protein) bindet an RNA und ist am Splicing beteiligt. Das hnRNP-D1-like (AUF-1-like) bindet ebenfalls an RNA und ist an der Prozessierung von pre-mRNA beteiligt. Das DP103-Protein (Grundhoff et al., 1999) bindet an miRNA und ist eine RNA-Helicase.

In einem yeast-two-hybrid Screening mit einem verkürzten EBNA2 Klon (AS 81-387) als Fängerprotein wurde von Dr. Thomas Dobner (Institut für medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universität Regensburg) das RBM4-Protein als potentieller EBNA2-Interaktionspartner identifiziert. Dieses etwa 40 kDa große Protein ist ein Vertreter der RNA-Recognition-Motiv-Familie (RRM) und besitzt zwei RRM-Motive sowie einen Retroviralen Typ von Zinkfinger (RTZF). Da es sich bei RBM4 also ebenfalls um ein potentiell RNA-bindendes Protein handelt, lag die Vermutung nahe, dass der yeast-two-hybrid Screen tatsächlich ein neues mit EBNA2 interagierendes Protein identifiziert hatte.

Bisher konnte gezeigt werden, dass es sich bei RBM4 um einen neuen Spleißregulator handelt, der alternatives pre-mRNA-Spleißen moduliert. Er wirkt bei der Wahl der Spleißstellen und Exons antagonistisch zu den echten SR-Proteinen (Lai et al., 2003).

Um die Expression des RBM4A Proteins in B-Lymphozyten und anschließend die Interaktion mit EBNA2 zu analysieren wurden von Frau E. Kremmer von der GSF in München monoklonale Antikörper gegen RBM4A und RBM4B hergestellt.

6.1 Vorbereitungen für diese Arbeit

6.1.1 Herstellung von monoklonalen Antikörpern gegen RBM4A

Sowohl für den spezifischen Nachweis des endogenen RBM4A, beziehungsweise für den Vergleich der Expressionsmenge in verschiedenen Geweben, als auch zur näheren Charakterisierung des Proteins war zunächst das Ziel, monoklonale Antikörper dagegen herzustellen. Die Vorbereitungen wurden von Frau Jasmin Ankara durchgeführt. Hierzu mussten RBM4A-Antigene zur Immunisierung von Ratten und für das Screening der monoklonalen Antikörper im ELISA-Test produziert werden. Da dem größten von Dr. Thomas Dobner zur Verfügung gestellten RBM4A-Klon (pACT-RBM4 II, AS 6-366) die ersten 5 Aminosäuren fehlten wurden diese zunächst mit Hilfe der PCR ergänzt, woraus eine komplette RBM4A-Sequenz resultierte. Dieses RBM4A-PCR-Produkt wurde anschliessend in den pGEM-Vektor ligiert und nachfolgend in den pGEX-4T-1-Vektor kloniert. Der pGEX-Vektor ist ein prokaryontischer Expressionsvektor. Er besitzt ein IPTG-induzierbares GST-Gen, hinter welchem sich eine „Multiple Cloning Site (MCS)“ befindet. Durch die IPTG-Induktion wurde das GST-RBM4A-Fusionsprotein, also das Antigen, in *E.coli* BL21/DE3 in großer Menge hergestellt. Aus ca. einem Drittel der Menge der induzierten Bakterien wurden Lysozymextrakte hergestellt, die zusammen mit einem irrelevanten GST-Fusionsprotein als Antigen bei dem ELISA-Screen der erhaltenen Antikörper-Klone dienten (von Frau E. Kremmer der GSF in München durchgeführt). Zwei Drittel der induzierten Bakterien wurden in SDS-haltigem 2xSample-Buffer lysiert und über eine präparative SDS-Page aufgetrennt. Das GST-RBM4A Antigen wurde dann nach der Comassie-Brilliant-Blue Behandlung ohne Fixierer als Bande auf einer Laufhöhe von 65 kDa identifiziert. Dieses konnte anschliessend isoliert werden und die über

eine „NAP“-Säule aufgereinigte fertige GST-RBM4A Antigenlösung wurde ebenfalls an die GSF nach München versandt, wo sie von Frau E. Kremmer zur Immunisierung von Ratten verwendet werden konnte.

6.1.2 Expression von „HA-getagtem“ RBM4A in eukaryotischen Zellen

Um die RBM4A-spezifischen monoklonalen Antikörper im Immunoblot zu verifizieren und sie in Säugerzellen charakterisieren zu können, war es notwendig, das RBM4A-Gen in einen eukaryotischen Expressionsvektor zu klonieren. Fau Jasmin Ankara verwendete hierzu den pSG5-Vektor. Der vollständige RBM4A-Klon aus der PCR wurde zunächst in den pGEM-Vektor ligiert und anschliessend in den pSG5-Vektor kloniert. In das pSG5-RBM4A-Konstrukt wurde mittels PCR bei der Klonierung noch ein „HA-tag“ integriert, damit das transient exprimierte RBM4A-Protein mit Hilfe HA-spezifischer monoklonaler Antikörper nachgewiesen werden konnte. COS-1-Zellen wurden kultiviert und mit der Fugene Methode mit 2 µg pSG5-HA-RBM4A, transfiziert. Nach 2 Tagen wurden aus diesen Zellen Proteinextrakte hergestellt, die daraufhin einer SDS-PAGE und einem Western-Blot unterzogen wurden.

In Abbildung 8 ist anhand eines Western-Blots die Expression des HA-RBM4A-Proteins in eukaryotischen Zellen (COS-1-Zellen) dargestellt. In der linken Spur sind zur Kontrolle Zellextrakte von nichttransfizierten COS-1-Zellen aufgetragen. Das Protein wurde mit Hilfe des HA-spezifischen monoklonalen Antikörpers 3F10 (Roche) nachgewiesen. In der rechten Spur ist auf Höhe von ca. 40 kDa das HA-RBM4A zu erkennen.

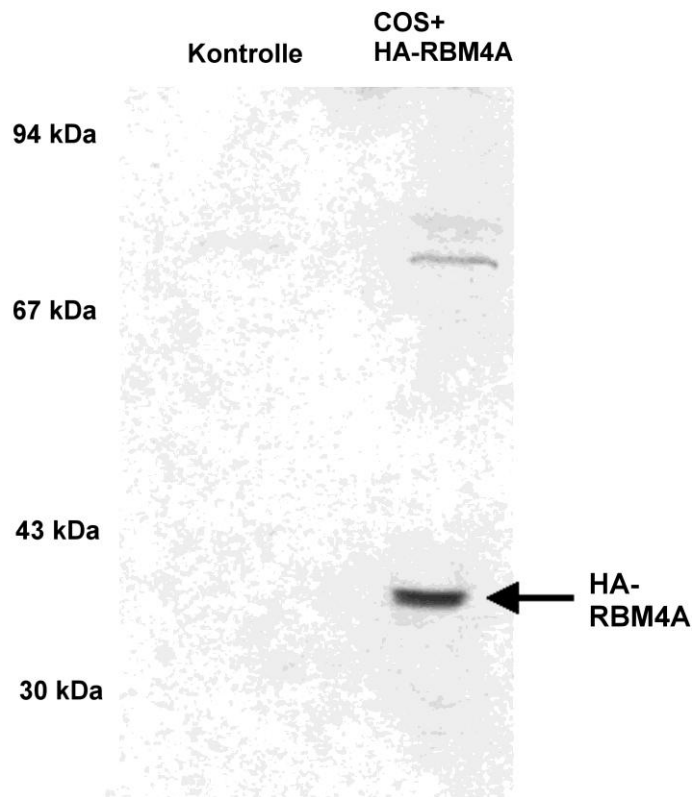


Abb. 8: Expression des HA-RBM4A-Proteins in COS-1-Zellen

Mit HA-RBM4A transfizierte COS-1-Zellen wurden 2 Tage nach der Transfektion lysiert, die Proteine über eine SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran gebロットet. In der linken Spur sind zur Kontrolle Zellextrakte aus untransfizierten COS-1-Zellen aufgetragen. Zum Nachweis wurde der HA spezifische Antikörper 3F10 verwendet. Man erkennt in der rechten Spur das transfizierte HA-RBM4A auf einer Höhe von ca. 40 kDa.

6.1.3 Herstellung von monoklonalen Antikörpern gegen RBM4B

Die Proteine RBM4A und RBM4B sind sehr stark homolog, unterscheiden sich aber deutlich in den Aminosäuren 255 – 269 (vergleiche Abb. 6). Zur Herstellung der monoklonalen Antikörper gegen RBM4B wurde ein synthetisches Peptid (NH₂-QSTTVTSHLNSTSVD(C)-CO₂) von der Firma PSL (Peptide Specialty Laboratory, Heidelberg) hergestellt, welches den Aminosäuren 255-269 von RBM4B entspricht. Dieses Peptid wurde über das C-terminale, nicht RBM4B-spezifische Cystein kovalent an BSA gekoppelt. Mit diesem Peptid-BSA-Konjugat wurden Ratten immunisiert und anschliessend monoklonale Antikörper hergestellt. Die Analyse der Antikörper erfolgte mittels ELISA, in dem die Reaktivität der Antikörper gegen OVA-Peptid-Konjugate (ebenfalls von der Firma PSL) getestet wurde. Es konnten 8 Peptid-spezifische Antikörper identifiziert werden. Eine Western-Blot-Analyse zur Testung der Antikörperklone anhand von COS-1-Zellextrakten ist in Abbildung 11 C gezeigt. Es ist zu erkennen, dass lediglich die Klone 1B2 und 7B2 reagierten. Klon 1B2 wurde stabil etabliert. Eine vergleichende Analyse der RBM4A und RBM4B Antikörper ist in Abbildung 12 gezeigt.

6.1.4 Expression von FLAG-getagtem RBM4B in eukaryotischen Zellen

Entsprechend zu RBM4A-HA wurde in dieser Arbeit RBM4B mit einem „FLAG-tag“ versehen, um es mit dem FLAG-spezifischen Antikörper M2 (Sigma) vergleichend zu detektieren. Hierzu wurde zunächst die RBM4B-cDNA aus dem RBM4B-Plasmid (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Y.-W-Tarn, Taiwan) in einer PCR amplifiziert. Der verwendete Primer codiert für das „FLAG-tag“. Aus der PCR resultierte eine komplette FLAG-RBM4B-Sequenz. Dieses PCR-Produkt wurde zunächst auf seine richtige Grösse von 1100 bp in einem Agarosegel kontrolliert und über die Gene Clean[®]-Methode eluiert. Es folgte ein Restriktionsverdau des PCR-Produkts mit BamHI. Anschliessend konnte das FLAG-RBM4B-Insert in den mit BamHI geschnittenen und mit CIP (calf intestinal Phosphatase) dephosphorylierten, eukaryotischen Expressionsvektor pSG5 ligiert

werden. Der Ligationsansatz wurde zur Vermehrung der Plasmid-DNA in den *E.coli*-Bakterienstamm MOSBlue transformiert und auf LB-Agarplatten mit Ampicillin kultiviert. Als Kontrolle diente ein Ligationsansatz ohne Insert. Nach anschliessender Isolierung der Plasmid-DNA aus den Bakterien erfolgte ein BamHI-Verdau und eine anschliessende Auftrennung über ein Agarosegel, um sicherzustellen, dass ein Insert der richtigen Grösse (1100 bp) vorhanden ist. Ausserdem wurde ein EcoRI-Orientierungsverdau durchgeführt, um zu kontrollieren, ob das Insert in der richtigen Orientierung (5' -> 3' in Leserichtung des Vektors) in das Plasmid eingebaut wurde. Bei richtiger Orientierung muss im Agarosegel ein Signal sowohl auf Höhe von 1100 bp (FLAG-RBM4B), als auch auf Höhe von 4100 bp (Vektor) erscheinen. In Abbildung 9 konnte gezeigt werden, dass 5 Klone (4, 6, 7, 9, 11) ein Insert in der richtigen Orientierung enthalten. Einer der Klone wurde auf Proteinexpression getestet.

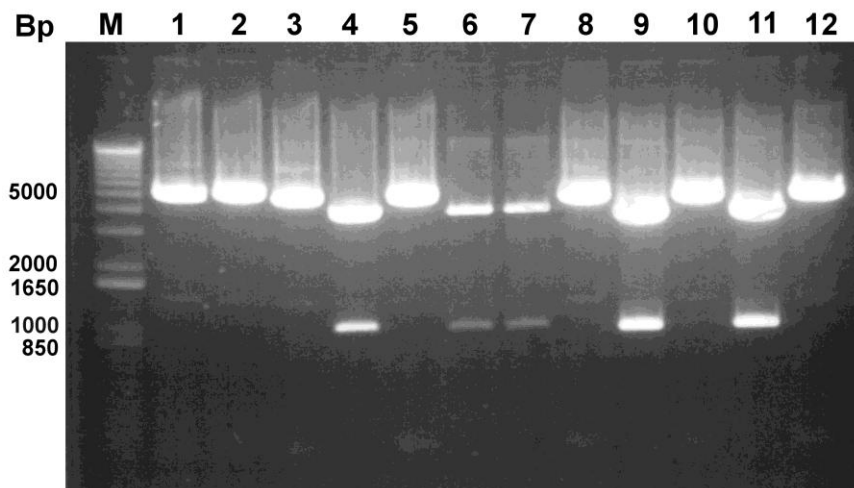


Abb. 9: Analyse der FLAG-RBM4B-Klone

M: Marker; 1-12: pSG5-FLAG-RBM4B-Klone; Beim Verdau mit EcoRI müssen bei richtiger Orientierung des Inserts zwei Banden erscheinen und zwar bei 4100 bp (Grösse des Vektors) und bei 1100 bp (Grösse des FLAG-RBM4B-Inserts). Die Klone 4, 6, 7, 9 und 11 ergaben ein positives Signal. Bei allen anderen Klonen erscheint lediglich eine Bande auf Höhe von 4100 bp, da die Orientierung des Inserts falsch war. Die positiven Klone wurden asserviert.

COS-1-Zellen konnten anschliessend mit FLAG-RBM4B transfiziert werden und das Protein wurde mit Hilfe des FLAG spezifischen Antikörpers M2 detektiert.

In Abbildung 10 ist anhand einer Western-Blot-Analyse die Expression des FLAG-RBM4B-Proteins in COS-1-Zellen dargestellt. Hierbei ist ebenfalls in der linken Spur eine Kontrolle mit nicht transfizierten COS-1-Zellen aufgetragen. Das Protein ist in der rechten Spur auf einer Laufhöhe von ca. 40 kDa zu erkennen.

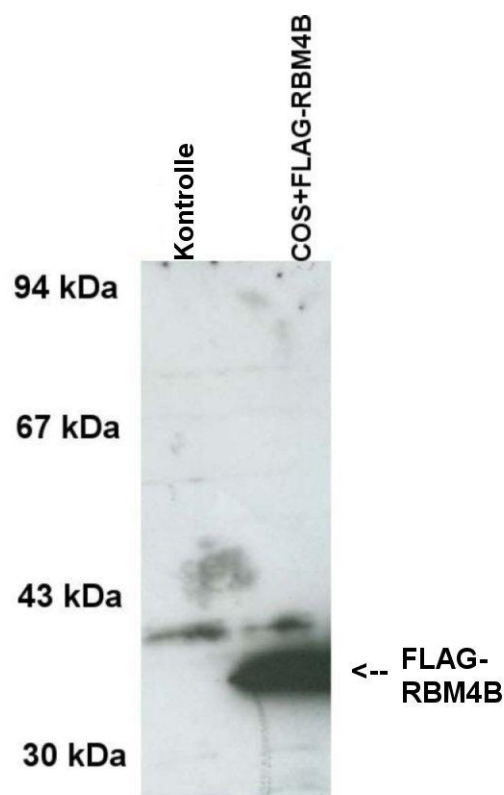


Abb. 10: Expression des FLAG-RBM4B-Proteins in COS-1-Zellen

Mit FLAG-RBM4B transfizierte COS-1-Zellextrakte wurden einer Western-Blot Analyse unterzogen. In der linken Spur sind zur Kontrolle Zellextrakte aus untransfizierten COS-1-Zellen aufgetragen. Man erkennt in der rechten Spur das FLAG-RBM4B auf einer Höhe von ca. 40 kDa, welches mit dem FLAG-spezifischen Antikörper M2 der Firma Sigma detektiert wurde.

6.2 Analyse der monoklonalen Antikörper gegen RBM4A und RBM4B

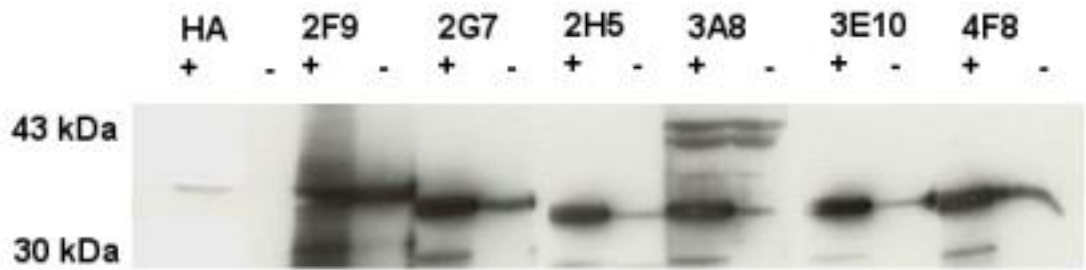
Um alle erhaltenen RBM4A-spezifischen monoklonalen Antikörper vergleichend zu testen, wurden wiederum COS-1-Zellextrakte verwendet. Wie schon im vorherigen Versuch wurde auch hier der eine Teil der COS-1-Zellen vorher mit dem HA-RBM4A-Expressionsplasmid transfiziert, der andere Teil der COS-1-Zellen blieb untransfiziert, um mit den verschiedenen Antikörpern zu testen, ob sowohl das endogene als auch das transient exprimierte RBM4A nachgewiesen werden kann.

Auf dem in Abbildung 11 A und B dargestellten Western-Blot sind jeweils 2 Spuren Zellextrakt für einen zu testenden monoklonalen Antikörper aufgetragen. In der linken Spur sieht man das transient exprimierte HA-RBM4A, in der rechten Spur das endogene RBM4A-Protein. Bei der Entwicklung wurden die Blotstreifen leicht verschoben. Die Höhenunterschiede der Banden stellen also keinen Unterschied in der Proteingröße dar. Alle getesteten monoklonalen Antikörper gaben ein positives Signal sowohl bei dem endogenen, als auch bei dem transient exprimierten HA-RBM4A, was man als Bande auf einer Laufhöhe von ca. 40 kDa sehen kann. Für die weiteren Versuche wurde der monoklonale Antikörper 6E10 stabil etabliert. Die in dem Western-Blot zu sehenden Banden unterhalb von RBM4A sind auf den Abbau des Proteins zurückzuführen.

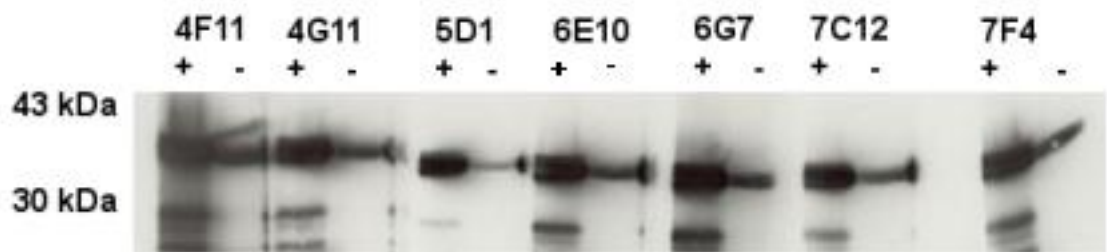
Entsprechend wurden, anhand von FLAG-RBM4B transfizierten COS-1-Zellextrakten, die von Frau E. Kremmer zugesandten RBM4B-Antikörperklone getestet (siehe Abb. 11C). Lediglich zwei Antikörperklone ergaben bei der Testung ein positives Signal, wobei der Klon 1B2 stabil etabliert wurde.

Obwohl RBM4A und RBM4B sehr stark konserviert sind, wurde versucht, einen RBM4A-spezifischen Klon zu etablieren. Dazu wurden die erhaltenen Klone im Western Blot (siehe Abb. 11D) einerseits mit HA-RBM4A und parallel gegen FLAG-RBM4B getestet. Wie aus der Abbildung hervorgeht, reagierte der Klon 6G7 nur mit HA-RBM4A, nicht jedoch mit FLAG-RBM4B. Dieser Klon wurde daraufhin als RBM4A-spezifischer Antikörper stabil etabliert.

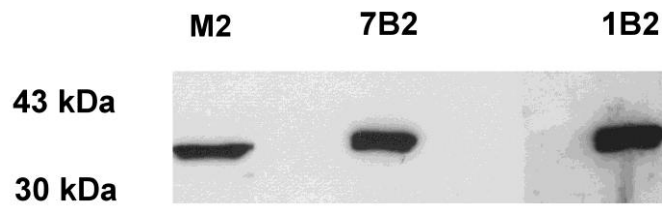
A



B



C



D

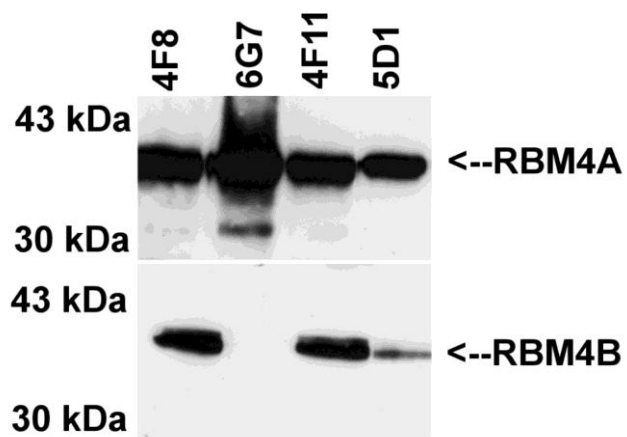


Abb. 11: Western-Blot Analyse der monoklonalen Antikörper gegen RBM4A und RBM4B

HA-RBM4A und FLAG-RBM4B wurden transient in COS-1-Zellen exprimiert und anhand eines Western-Blots analysiert. Hierbei wurden die verschiedenen monoklonalen Antikörperklone, die uns von Frau E. Kremmer zugesandt wurden, ausgetestet. In Abb. 10 A und B wurden jeweils zwei Spuren Zellextrakt für einen zu testenden RBM4A-Antikörperklon aufgetragen. In der linken Spur („+“) erkennt man das transient exprimierte HA-RBM4A, in der rechten („-“) das endogene RBM4A-Protein. Alle zu testenden Antikörperklone erkennen sowohl das überexprimierte HA-RBM4A, als auch das endogene RBM4A, welches auf einer Laufhöhe von ca. 40 kDa erscheint. Abb. 10 C zeigt die beiden Antikörperklone, die das RBM4B erkennen. Zum Grössenvergleich wurde zusätzlich der FLAG-spezifische Antikörper M2 eingesetzt (linke Spur). Um einen RBM4A-spezifischen Antikörperklon zu identifizieren, wurden die erhaltenen Klone im Western Blot (siehe Abb. 10 D) einerseits mit HA-RBM4A und parallel gegen FLAG-RBM4B getestet. Klon 6G7 reagierte nur mit HA-RBM4A, nicht jedoch mit FLAG-RBM4B und konnte daraufhin als RBM4A-spezifischer Antikörper stabil etabliert werden.

In Abbildung 12 wurde vergleichend die Spezifität der monoklonalen Antikörper getestet. Hierbei wurden der RBM4A-spezifische Antikörper 6G7, 6E10 und der RBM4B-spezifische Antikörper 1B2 verwendet. In der linken Kontrollspur wurden jeweils nicht transfizierte COS-1-Zellextrakte aufgetragen, wobei die erscheinende Bande das endogene RBM4A darstellt. In der Mitte wurden RBM4A-transfizierte Zellextrakte und in der rechten Spur RBM4B-transfizierte Zellextrakte aufgetragen. Zum Vergleich der aufgetragenen Proteinmenge wurde der α - β -actin-Antikörper verwendet (Abb.12 A). Der monoklonale Antikörper 6E10 (Abb.12 B) erkennt sowohl RBM4A, als auch RBM4B. Der monoklonale Antikörper 6G7 (Abb.12 C) erkennt lediglich RBM4A. Die schwächere Bande, die auf gleicher Laufhöhe bei RBM4B erscheint zeigt lediglich das endogene RBM4A der COS-1-Zellen, jedoch nicht das transfizierte RBM4B. Der monoklonale Antikörper 1B2 (Abb. 12 D) erkennt spezifisch RBM4B. Hierbei erscheint auch keine Bande in der linken Kontrollspur, da in den COS-1-Zellen kein endogenes RBM4B enthalten ist. Die Banden oberhalb von RBM4 sind auf Kreuzreaktionen des Antikörpers zurückzuführen. Die Banden unterhalb auf den Abbau des Proteins.

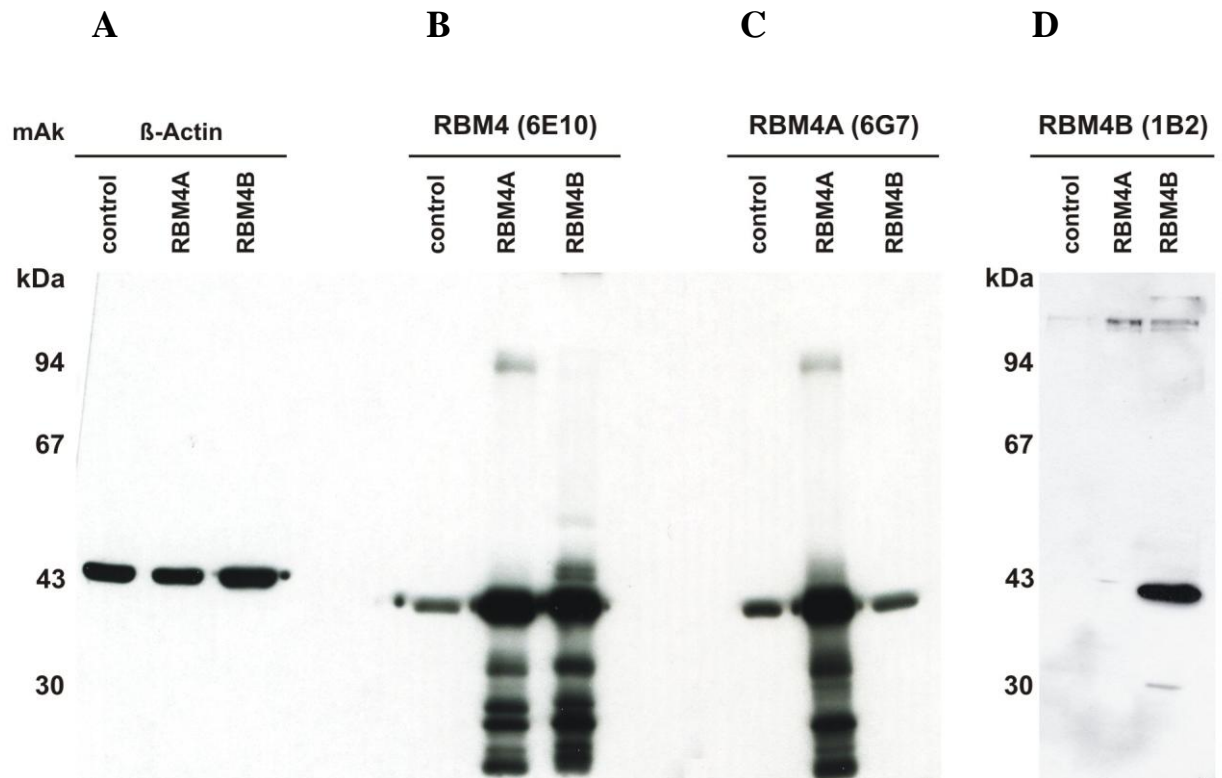


Abb. 12: Analyse der Spezifität der monoklonalen Antikörper gegen RBM4A und RBM4B in COS-1-Zellen

In den Western-Blots A-D sind jeweils drei Spuren aufgetragen: In der linken Kontrollspur wurden nicht transfizierte COS-1-Zellextrakte aufgetragen, in der Mitte sieht man RBM4A-transfizierte Zellextrakte und in der rechten Spur RBM4B-transfizierte Zellextrakte. Im Blot A wurde zum Vergleich der aufgetragenen Proteinmenge der α - β -actin-Antikörper verwendet. Der monoklonale Antikörper 6E10 (Abb. 11B) erkennt sowohl RBM4A, als auch RBM4B, welche auf einer Laufhöhe von ca. 40 kDa zu sehen sind. In der linken Kontrollspur sieht man eine schwächere Bande, die das endogene RBM4A in den COS-1-Zellen darstellt. Der monoklonale Antikörper 6G7, (Abb. 11C), erkennt lediglich RBM4A. Die Bande, die auf gleicher Laufhöhe bei RBM4B erscheint zeigt lediglich das endogene RBM4A, jedoch nicht das transfizierte RBM4B. Der monoklonale Antikörper 1B2 (Abb. 11D) erkennt spezifisch RBM4B. Hierbei erscheint keine Bande in der linken Kontrollspur, da in den COS-1-Zellen kein endogenes RBM4B enthalten ist.

6.3 Vergleich der Expressionsmenge von RBM4 in verschiedenen menschlichen und tierischen Zellen und Geweben

Bereits 1993 konnte gezeigt werden, dass das RBM4-Gen im embryonalen Nervensystem exprimiert wird. Dort ist die RBM4 RNA schon ab der embryonalen Stufe 11 nachweisbar (Newby and Jackson, 1993). Auch die Expression der mRNA des humanen RBM4-Gen konnte in Herz, Lunge, Plazenta, Leber, Skelettmuskel, Pancreas, Niere und Gehirn nachgewiesen werden. Eine detailliertere Analyse zeigte die Expression des RBM4-Gens in sieben verschiedenen Hirnregionen, und zwar im Nucleus amygdalae (Mandelkern), im Nucleus caudatus (Schweifkern), in der Commissura magna cerebri (Balken), im Hippocampus (Ammonshorn), in der Substantia nigra (Soemmering's Ganglion) und im Thalamus opticus (Sehhügel) (Jackson et al., 1997).

Anhand dieser Northern- und Southern-Blot-Experimente konnte man zwar eine Aussage über die RBM4-RNA-Menge treffen, nicht aber über die Proteinmenge. Mit Hilfe der zweidimensionalen Gelelektrophorese und im MALDI MS (Matrix-associated laser desorption ionization mass spectroscopy) gelang erstmals der Nachweis von RBM4 auf Proteinebene. Dabei konnte gezeigt werden, dass in fetalen Down-Syndrom-Gehirnen eine deutlich niedrigere RBM4 Proteinmenge im Vergleich zu Gehirnen von Feten ohne offensichtliche Erkrankung vorkommt (Bernet et al., 2002).

In den folgenden Experimenten war unser Ziel, mit Hilfe der neu generierten RBM4 spezifischen monoklonalen Antikörper in Western-Blot-Analysen die Proteinexpression in verschiedenen Geweben und Zellen zu analysieren.

Zunächst versuchten wir das endogene RBM4A und zum Vergleich RBM4B in menschlichen Geweben nachzuweisen. In Abbildung 13 sind auf einem käuflich erworbenen Western-Blot (BioChain, Hayward, CA, USA) verschiedene menschliche Normalgewebe gesunder Spender dargestellt, wobei die Proteinextrakte zuvor mittels SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran geblottet wurden. Das endogene RBM4A wurde mit dem monoklonalen Antikörper 6G7 detektiert, und mittels ECL[®] sichtbar gemacht. Man erkennt in den unterschiedlichen Gewebetypen auch verschiedene Mengen der

RBM4A-Proteinexpression. So ist die Expression in der Leber am stärksten, wohingegen sie in den anderen Geweben wie Gehirn und Plazenta deutlich schwächer und in den Proben von Skelettmuskel, Herz und Pancreas fast nicht mehr nachweisbar ist. Der gleiche Blot wurde auch für den Nachweis des endogenen RBM4B verwendet, wobei hier das Protein mit dem spezifischen Antikörper 1B2 detektiert wurde. Wie in der Abbildung zu sehen ist, findet sich RBM4B lediglich in dem Zellextrakt der Leber, jedoch nicht in den anderen Gewebeproben.

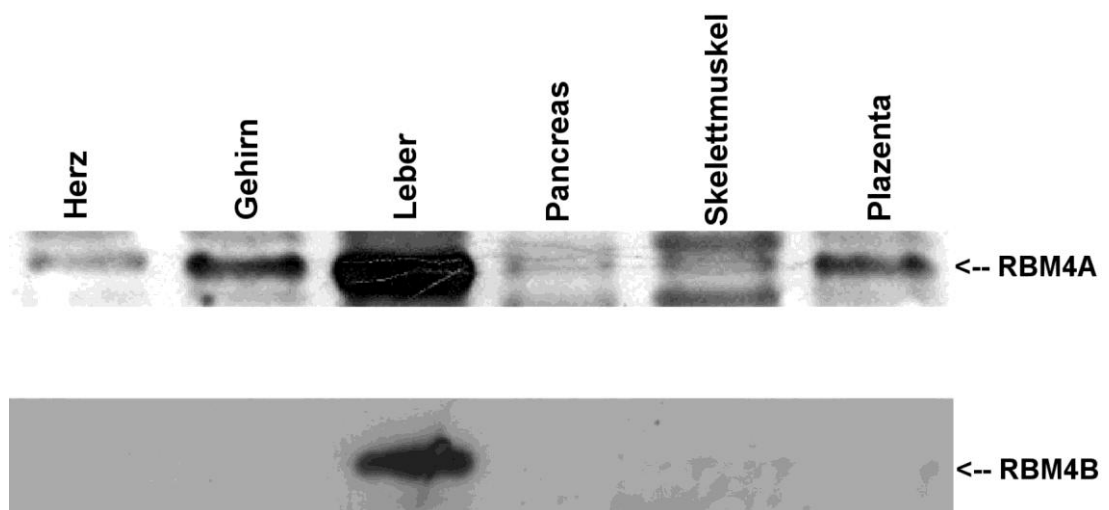


Abb. 13: Western-Blot Analyse zur Darstellung des endogenen RBM4-Proteins in menschlichem Gewebe

Pro Spur sind jeweils 50 μg der Proteinextrakte von verschiedenen menschlichen Normalgeweben wie Herz, Gehirn, Leber, Pancreas, Skelettmuskel und Plazenta aufgetragen worden, die zuvor mit Hilfe eines 10%igen SDS-Gels aufgetrennt, und anhand eines käuflich erworbenen Western-Blots (BioChain, Hayward, CA, USA) dargestellt wurden. Das endogene RBM4A konnte mit dem spezifischen monoklonalen Antikörper 6G7 in allen Geweben detektiert werden, wohingegen das endogene RBM4B, welches mit dem spezifischen monoklonalen Antikörper 1B2 detektiert wurde, lediglich in der Leber zu finden ist.

6.3.1 Expression von RBM4 in den primären Zielzellen von EBV

Die primären Zielzellen des Epstein-Barr-Virus sind B-Lymphozyten. Wenn RBM4 also tatsächlich ein neuer Interaktionspartner von EBNA2 ist, so muss es in B-Lymphozyten exprimiert werden. Daher wurden verschiedene B-Zellen auf das Vorhandensein des endogenen RBM4 untersucht. Um einen möglichen Einfluss der EBV-Infektion auf die RBM4-Expression zu testen, verwendeten wir sowohl EBV-positive, als auch EBV-negative Zellen.

In Abbildung 14 sind verschiedene Proteinextrakte in einer Western-Blot-Analyse dargestellt. Als RBM4A spezifischer monoklonaler Antikörper wurde der 6G7-Klon verwendet, der in allen Zellen das Protein detektiert. Deutlich ist zu erkennen, dass die Expression in den PBMCs wesentlich geringer ist als in allen anderen Zellen. In Fibroblasten und Nabelschnur-Lymphozyten, die mit dem EBV-Stamm B95.8 transformiert wurden (B95-8-CBL) wird RBM4A in etwa gleich stark exprimiert. Am stärksten erscheint die Proteinexpression in EBV-negativen Burkitt-Lymphom-Zellen (BL41) und in EBV-infizierten BL41-Zellen (BL41-B95-8), wobei die RBM4A-Bande des BL41-B95-8-Extraktes das deutlichste Signal ergibt. Da sich allerdings bei diesen beiden Proben auch die β -Actin-Banden nicht eindeutig vergleichen lassen, ist es nicht mit Sicherheit zu sagen, dass die Expression in den EBV-infizierten BL41-Zellen tatsächlich stärker ist, als in den EBV-negativen.

Als Kontrolle zum Vergleich der aufgetragenen Proteinmenge ist das β -Actin mit abgebildet. Es wurde mit dem spezifischen monoklonalen Mausantikörper AC-15 (Sigma) angefärbt.

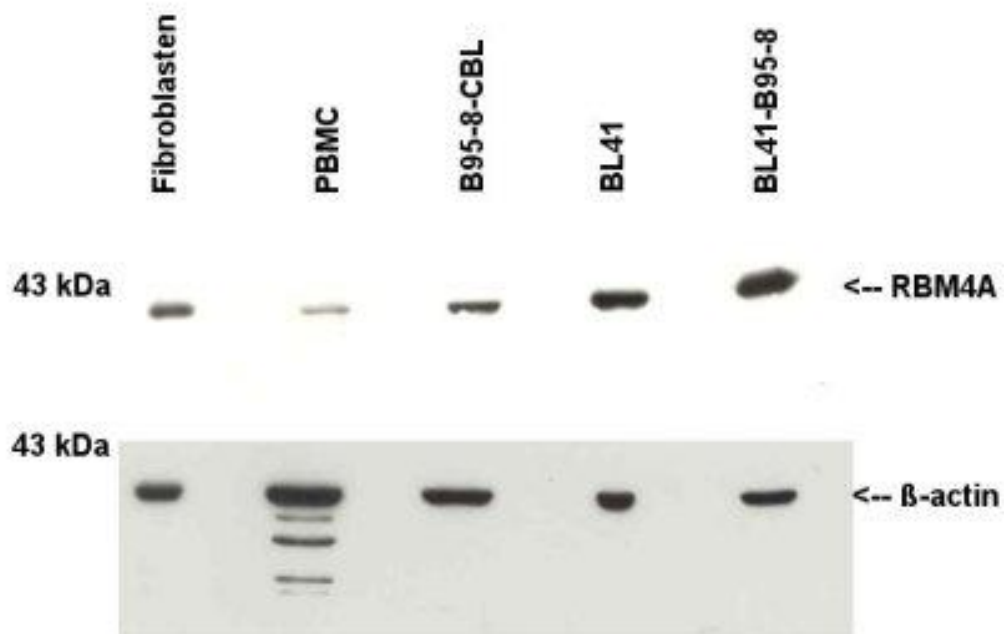


Abb.14: Nachweis des endogenen RBM4A in den primären Zielzellen von EBV

Zellextrakte von Fibroblasten, PBMCs, B95-8-CBL, BL41 und BL 41-B95-8 wurden mittels SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran geblottet. Mit dem RBM4A spezifischen monoklonalen Antikörper 6G7 konnte das endogene Protein angefärbt werden. Als Kontrolle der aufgetragenen Proteinmenge diente endogenes β -Actin, welches mit dem spezifischen monoklonalen Antikörper AC-15 (Sigma) angefärbt wurde.

Um vergleichend zu testen, ob auch endogenes RBM4B in den primären Zielzellen von EBV vorhanden ist, analysierten wir in den gleichen Zellextrakten die Expressionsmenge von RBM4B mit Hilfe des RBM4B spezifischen Antikörpers 1B2. Wie in Abbildung 15 zu sehen ist, wird RBM4B nicht in Lymphozyten exprimiert.



Abb. 15: Analyse der endogenen RBM4B-Expression in den primären Zielzellen von EBV

Verschiedene Zellextrakte wurden einer Western-Blot Analyse unterzogen. Zum Nachweis des endogenen RBM4B wurde der spezifische monoklonale Antikörper 1B2 verwendet. In der rechten Spur ist zum Vergleich ein RBM4B-transfizierter COS-1-Zellextrakt aufgetragen. Hier konnte das RBM4B auf einer Laufhöhe von ca. 40 kDa detektiert werden. In den nicht-transfizierten Zellextrakten wird kein endogenes RBM4B exprimiert.

6.3.2 Vergleich der Expressionsmenge von RBM4 in Tumorzellen

Neben den Experimenten an menschlichem Normalgewebe war es von Interesse, wie sich die Expression des RBM4-Proteins in Tumorzellen darstellt und zudem, ob es je nach Tumorart zu unterschiedlich starker Expression kommt.

In Abbildung 16 sind verschiedene Tumorzelllinien vergleichend in einer Western-Blot-Analyse dargestellt. Das endogene RBM4A wurde mit dem spezifischen monoklonalen Antikörper 6G7 detektiert. In etwa gleiche Mengen der Proteinexpression erscheinen bei den Extrakten der humanen Zervixkarzinom-Zellen (Hela-Zellen), der Teratokarzinom-Zellen (Tera-1) und der Lungenadenokarzinom-Zellen (H1299). Sowohl in den Extrakten des T-Zell-Lymphoms (Jurkat), als auch in denen des Mammakarzinoms (MDA-MB-231) ist die Expression geringer. Das schwächste Signal allerdings ergab der Zellextrakt des Osteosarkoms (SAOS-2). Ein deutliches Signal tritt bei dem Zellextrakt des peripheren Neuroblastoms (SKNSH)

auf. In dieser Spur sieht man eine zusätzliche Bande auf einer Laufhöhe von circa 60 kDA. Die stärkste Proteinexpression kann bei dem EBV-positiven Burkitt-Lymphom (P3HR-1) beobachtet werden, wobei hier auch die Kontrollbande des endogenen β -Actins stärker ist als in den Vergleichsbanden der anderen Zellextrakte, weshalb man nicht sicher behaupten kann, dass RBM4A in den EBV-positiven Burkitt-Lymphom-Zellen tatsächlich am stärksten exprimiert wird.

Einen möglichen Einfluss von p53 auf die Expression von RBM4A konnte getestet werden, indem Zellextrakte eines p53 negativen humanen Colonkarzinoms (HCT 116(p53-/-)) und die eines p53 positiven humanen Colonkarzinoms (HCT 116-wt) verglichen wurden. Das Signal erscheint in der p53-negativen Zelllinie etwas stärker als in der p53-positiven Ausgangslinie.

Das endogene β -Actin, welches in der unteren Spur zu sehen ist, wurde mit dem spezifischen monoklonalen α - β -Actin-Antikörper AC-15 (Sigma) angefärbt. Es dient als Kontrollbande, um nachvollziehen zu können, dass die aufgetragenen Proteinmengen gleich sind.

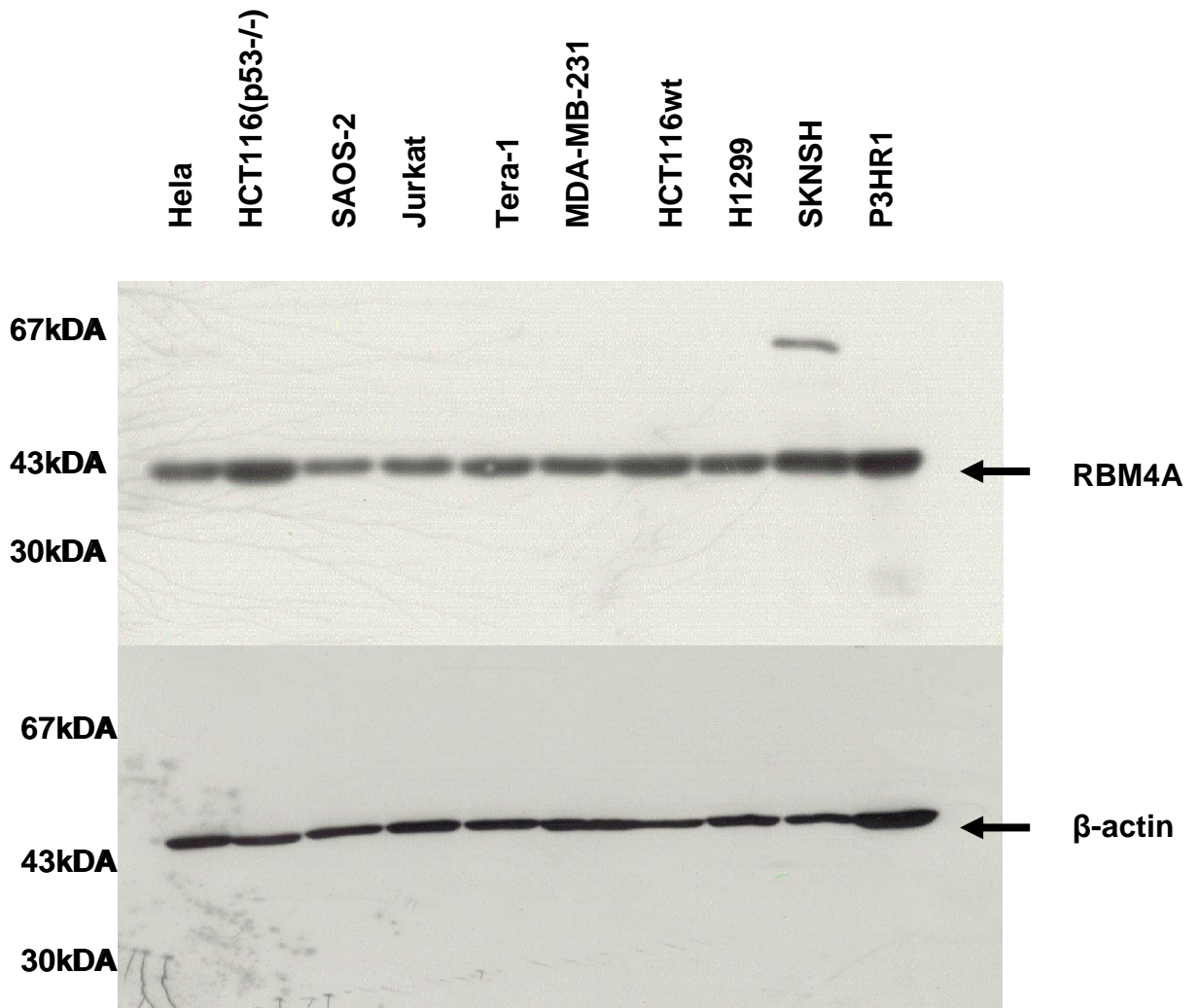


Abb. 16: RBM4A-Expressionsmenge in verschiedenen Tumorzellen

Von verschiedene Tumorzelllinien (Hela (zervikales Adenokarzinom), HCT 116(p53-/-) (p53-negatives humanes Colonkarzinom), Saos-2 (Osteosarkom), Jurkat (T-Zell-Lymphom), Tera-1 (Teratokarzinom), MDA-MB-231 (humanes Mammakarzinom), HCT116wt (p53-positives humanes Colonkarzinom), H1299 (Lungenkarzinom), SKNSH (Neuroblastom) und P3HR1 (EBV-positives B-Zell-Lymphom)) wurden Proteinextrakte hergestellt, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran geblottet. Das endogene RBM4A in den Tumorzellen wurde mit dem spezifischen mAk 6G7 gefärbt und mittels ECL[®] sichtbar gemacht. Zur Kontrolle der aufgetragenen Proteinmenge dient der Nachweis des endogenen β -actins, welches in der unteren Abbildung mit dem spezifischen Ak AC-15 (Sigma) sichtbar gemacht wurde.

Im Vergleich zu RBM4A wurde die Expression von RBM4B in Tumorzellen getestet. Hierbei wurden verschiedene Leberkarzinomzelllinien (Alex-3, Hep-G2 und Huh-7) in einer SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und einer Western-Blot Analyse unterzogen. Nicht transfizierte 293T-Zellen und RBM4B-transfizierte-293T-Zellen wurden als Negativ-, bzw. Positiv-Kontrolle vergleichend dargestellt. Aufgetragene Leberzellextrakte dienten dem Vergleich der Expressionsmenge in Tumorzellen und normalem Lebergewebe. Die aufgetragene Proteinmenge wurde durch das endogene β -actin dargestellt, welches mit dem spezifischen Antikörper AC-15 (Sigma) detektiert werden konnte. Neben dem RBM4A spezifischen monoklonalen Antikörpern 6G7 wurde der RBM4B spezifische Antikörper 1B2 eingesetzt. Wie in Abbildung 17 zu sehen ist, wird RBM4A in allen 3 Tumorzellextrakten etwa gleich stark exprimiert. RBM4B wird, verglichen mit der Expression im Leberzellextrakt, in den Karzinomextrakten nur sehr gering exprimiert. So findet sich in der Alex-3-Zelllinie eine sehr schwache Bande, die das endogene RBM4B darstellt. Bei der Hep-G2-Linie erscheint eine schwache Bande auf einer Laufhöhe von 37 kDa, jedoch nicht auf einer Laufhöhe von 40 kDa. Huh-7-Zellen zeigen keine Expression von RBM4B.

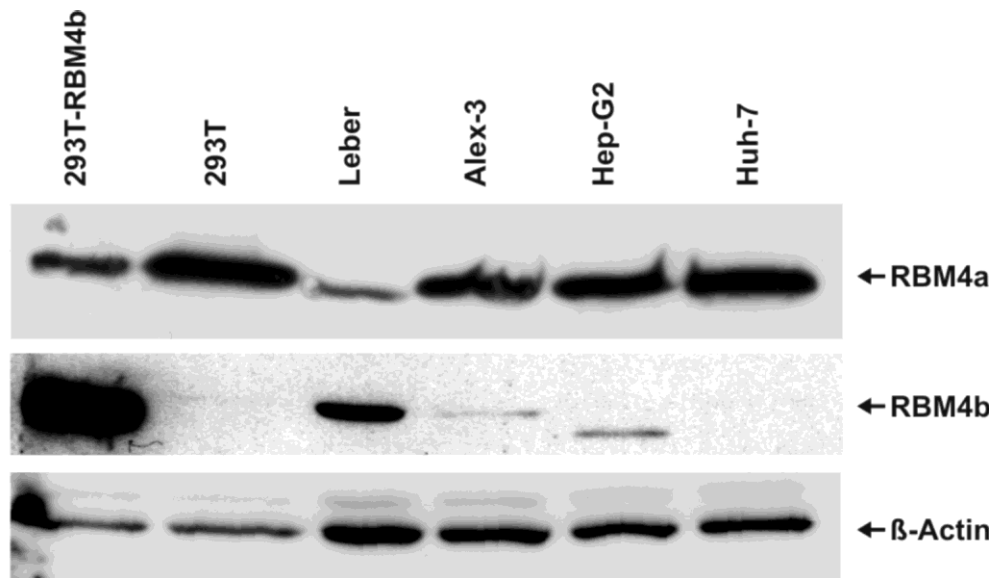


Abb. 17: Expressionsvergleich von RBM4A und RBM4B in verschiedenen Leberkarzinomzelllinien

Extrakte von drei Leberkarzinomzelllinien (Alex-3, Hep-G2, HuH-7) wurden mittels SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und anhand eines Western-Blots dargestellt. Die verwendeten monoklonalen Antikörper waren 6G7, der spezifisch RBM4A erkennt, 1B2, der spezifisch RBM4B erkennt und α - β -actin AC-15, der zum Vergleich der aufgetragenen Proteinmenge das endogene β -actin erkennt. Im Gegensatz zu RBM4A, welches in allen 3 Zellextrakten in gleicher Menge vorhanden ist, wird RBM4B in der Tumorzelllinien Alex-3 nur sehr schwach exprimiert und bei dem Hep-G2-Zellextrakt erscheint eine Bande auf einer Laufhöhe von ca. 37 kDa, jedoch nicht bei 40 kDa. In Huh-7-Zellextrakten wird kein RBM4B exprimiert. Nicht transfizierte 293T-Zellen und RBM4B-transfizierte-293T-Zellen dienten als Negativ-, bzw. Positiv-Kontrolle. Die Leberzellextrakte dienten dem Vergleich der Expressionsmenge in Tumorzellen und normalem Lebergewebe.

6.3.3 Expression von RBM4 in tierischem Gewebe

Wie bereits in Abbildung 11 gezeigt, erkennt der RBM4-spezifische monoklonale Antikörper 6E10 neben dem transient transfizierten auch das endogene RBM4 in COS-1-Zellen. Diese stammen von Nierenzellen der grünen Meerkatze (*Cercopithecus aethiops*), einer Altweltaffenart. Die Vermutung liegt nahe, dass das erkannte RBM4 aus den Primatenzellen dem humanen RBM4 sehr ähnlich ist und sogar weitgehend mit diesem übereinstimmt, da Primaten mit dem Menschen sehr eng verwandt sind.

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, ist RBM4 ein evolutionär hochkonserviertes Protein. Deshalb ist es zudem sehr wahrscheinlich, dass der RBM4 spezifische monoklonale Antikörper 6E10 neben dem COS-1-Zellen-RBM4 auch RBM4-Proteine in anderen tierischen Zellen und Geweben identifizieren kann, selbst wenn sie genetisch weiter entfernt sind.

In Abbildung 18 sind neben Maus- und Hundezellen (A) auch Wachtelzellen (B) in einem Immunoblot dargestellt. Die Proteinextrakte wurden zuvor in einer SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran gebロットet. Da der RBM4 spezifische monoklonale Antikörperklon 4G11 bei der Austestung der Antikörper neben dem 6E10-Antikörper ebenfalls ein gutes Signal ergab, wurde das endogene lark in den Maus- und Hundezellen mit diesem, das RBM4-Protein aus den Wachtelzellen allerdings mit dem Antikörper 6E10 identifiziert und mittels ECL[®] sichtbar gemacht. In Abbildung 18B (Western-Blot-Analyse an Wachtelzellen) erkennt man eine intensive Bande des RBM4-Proteins auf einer Laufhöhe von ca. 40 kDa, was verdeutlicht, dass RBM4 in den Wachtelzellen sehr stark exprimiert wird. In den Mauszellen erkennt man lediglich eine schwache Bande des endogenen RBM4. Allerdings wurde der Wachtelzell-Blot auch mit dem monoklonalen Antikörper 6E10 gefärbt, die anderen beiden Zellextrakte dagegen mit 4G11, was eine mögliche Erklärung für den Unterschied ist. Jedoch ist auch ein deutlicher Unterschied zwischen den beiden Zelllinien zu erkennen, die mit 4G11 gefärbt worden sind, was wiederum eher vermuten lässt, dass in den Zellen der Maus tatsächlich weniger RBM4 exprimiert wird als in den Hundezellen. Die Banden unterhalb von RBM4 in Abbildung 18B entstehen durch den Abbau des Proteins.

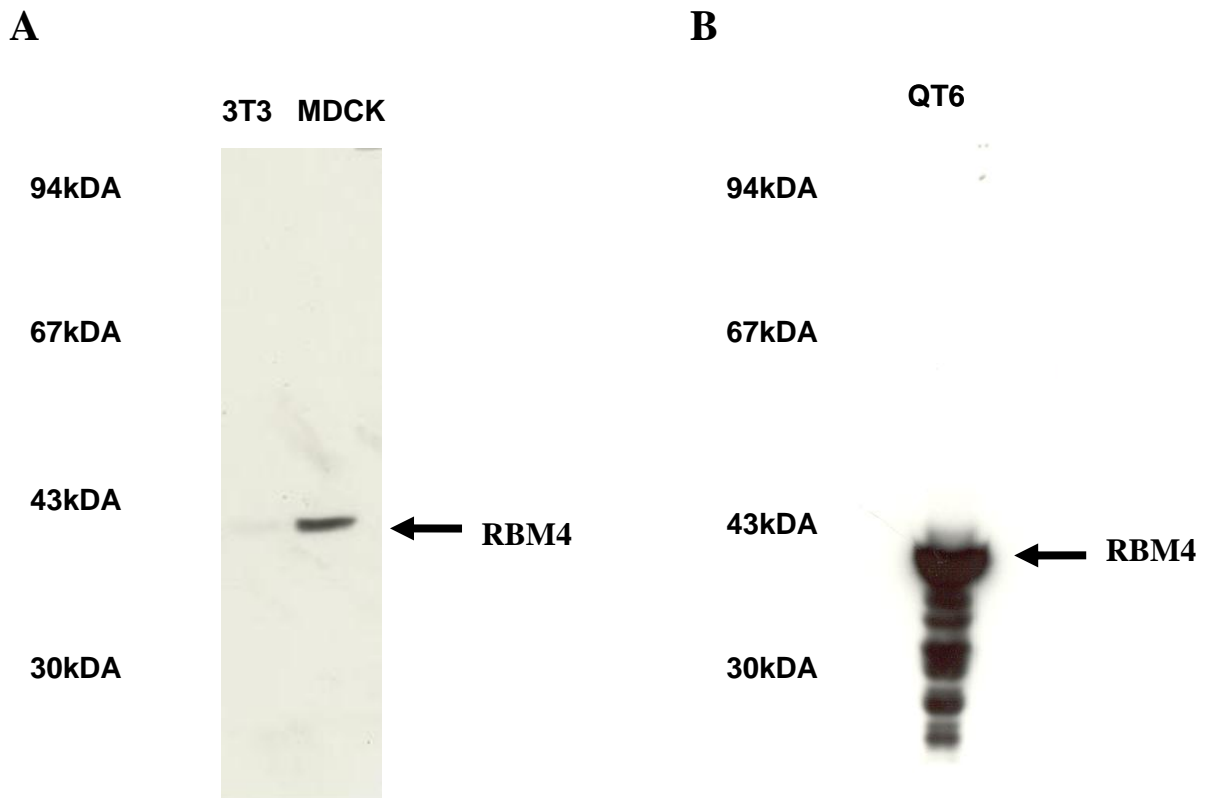


Abb. 18: Nachweis des endogenen RBM4-Proteins in verschiedenen tierischen Zellen

Proteinextrakte von verschiedenen tierischen Zellen (NIH3T3: Zellen eines Mäuseembryos; MDCK: Nierenzellen eines Cocker Spaniels; QT6: Fibrosarkomzellen einer Wachtel) wurden durch eine SDS-PAGE aufgetrennt und anschliessend auf eine Nitrocellulosemembran geblottet. Das endogene RBM4 wurde bei den Maus- und Hundezellen mit dem spezifischen monoklonalen Antikörper 4G11, RBM4 in den Wachtelzellen mit dem spezifischen monoklonalen Antikörper 6E10 detektiert und mit ECL[®] sichtbar gemacht.

In Abbildung 19 sind verschiedene Gewebe eines Kaninchens anhand einer Western-Blot-Analyse auf das Vorhandensein und die Menge des endogenen RBM4A-Proteins getestet worden. Von diesen Geweben wurden zuvor Proteinextrakte hergestellt, von denen jeweils 30 µg in einer SDS-PAGE aufgetrennt und anschliessend auf eine Nitrocellulosemembran geblottet wurden. Der spezifische

monoklonale Antikörper 6E10 erkennt endogenes Kaninchen-RBM4A in allen Geweben, also in Groß- und Kleinhirn, in Lunge, Leber, Herz, Niere, Milz, Magen, Ovarien und Skelettmuskel. Da der kommerziell verfügbare β -Actin-Antikörper zwar das humane, nicht aber das Kaninchen- β -Actin erkennt, wurde die verwendete Proteinmenge photometrisch bestimmt. In allen getesteten Geweben zeigt sich ein deutliches Signal auf der zu erwartenden Höhe von ca. 40 kDa, allerdings ist es in Kleinhirn, Niere und Milz am stärksten ausgeprägt.

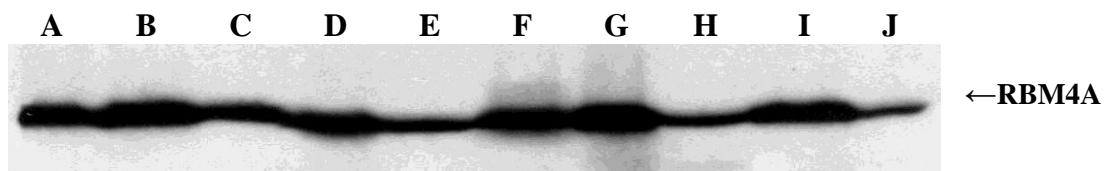
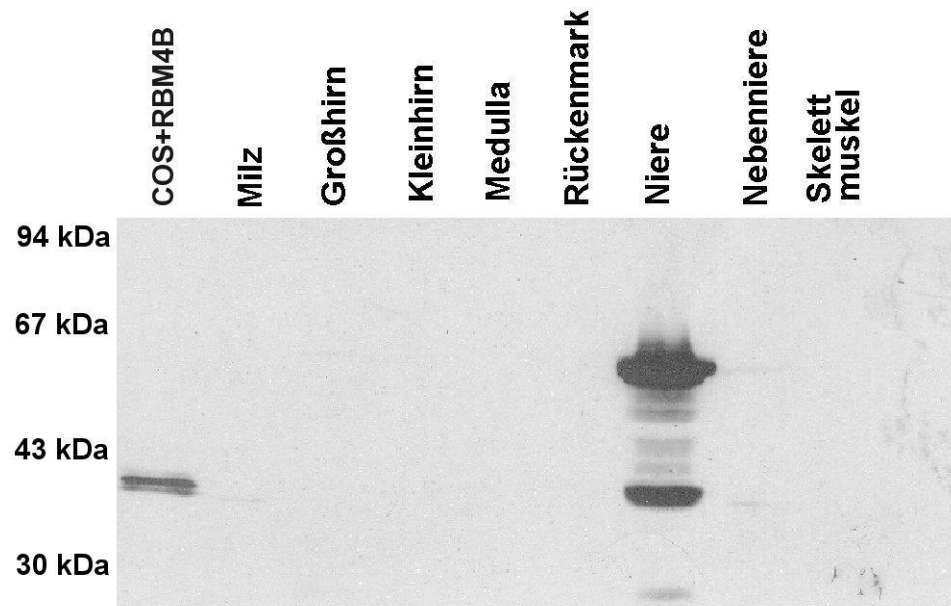


Abb.19: Nachweis des endogenen RBM4A-Proteins in verschiedenen Geweben eines Kaninchens

Von verschiedenen Geweben eines Kaninchens (A: Großhirn, B: Kleinhirn, C: Lunge, D: Leber, E: Herz, F: Niere, G: Milz, H: Magen, I: Ovarien und J: Skelettmuskel) wurden Proteinextrakte hergestellt, mittels SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt, anschließend auf eine Nitrocellulosemembran gebロットet, das endogene RBM4A mit dem spezifischen monoklonalen Antikörper 6E10 detektiert und mit ECL[®] sichtbar gemacht.

Vergleichend wurden in einer Western-Blot Analyse verschiedene Gewebe eines Kaninches mit Hilfe des RBM4B spezifischen monoklonalen Antikörpers 1B2 auf das Vorhandensein und die Menge von RBM4B getestet. In Abbildung 20 A und B kann man erkennen, das RBM4B lediglich in vier verschiedenen Geweben vorhanden ist, nämlich in Niere, Leber, Jejunum und Ileum, wobei die stärkste Expression bei dem Zellextrakt der Niere zu sehen ist. In den Zellextrakten von Niere, Leber, Jejunum, Ileum, Colon und Caecum erscheinen zusätzliche Banden auf einer Laufhöhe von ca. 55 kDa, die auf Kreuzreaktionen des Antikörpers zurückzuführen sind.

A



B

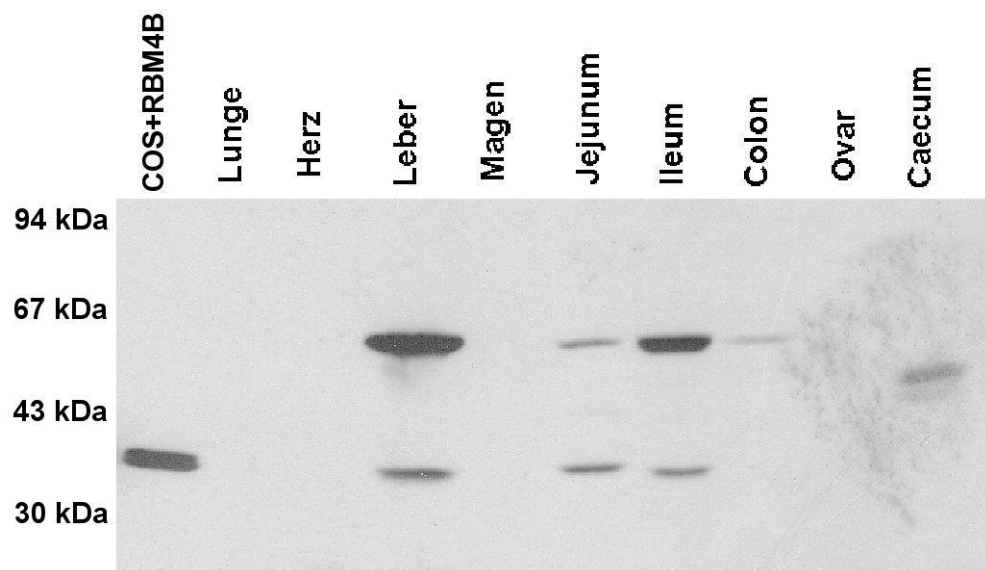


Abb.20: Nachweis des endogenen RBM4B-Proteins in verschiedenen Geweben eines Kaninchens

Aus den angegebenen Geweben eines Kaninchens wurden Zellextrakte hergestellt und anschliessend einer Western-Blot Analyse unterzogen. In der ersten Spur sind zum Vergleich jeweils RBM4B-transfizierte COS-1-Zellextrakte aufgetragen, bei denen das RBM4B auf einer Laufhöhe von ca. 40 kDa erscheint. Der RBM4B-spezifische monoklonale Antikörper 1B2 erkennt das RBM4B lediglich in vier Kaninchen-Geweben und zwar in Niere, Leber, Jejunum und Ileum. Zusätzliche Banden oberhalb von 40 kDa sind wahrscheinlich auf Kreuzreaktionen des Antikörpers zurückzuführen.

6.4 Biochemische Charakterisierung von RBM4

In allen bisher durchgeführten Experimenten über RBM4 waren vor allem funktionelle Analysen von Interesse. Beispielsweise wurde gezeigt, wie das es mit anderen Proteinen interagiert, was seine Funktion in der Zelle ist und in der Fliege *Drosophila*, wie sich Mutationen von *lark* auf den Phänotyp auswirken. Die folgenden Experimente dienten deshalb der näheren Charakterisierung des Proteins, wie der Bestimmung der Halbwertszeit und der Nachweis der Phosphorylierung.

6.4.1 Nachweis der Phosphorylierung von RBM4A und B

In der über RBM4 vorhandenen Literatur wurde bereits beschrieben, dass der Importweg in den Zellkern über ein Protein der Importin-beta-Familie, das Transportin-SR2 (TRN-SR2) vermittelt wird (Lai et al., 2003). Dieses Protein erkennt phosphorylierte SR-Proteine und transportiert sie in den Zellkern. Die Vermutung lag also nahe, dass es sich auch bei RBM4 um ein Phosphoprotein handeln könnte. RBM4 bindet über seine C-terminale-alaninreiche Domäne (CAD) an TRN-SR2, wobei eine mögliche Phosphorylierung dieser Domäne bisher allerdings noch nicht gezeigt werden konnte (Lai et al., 2003). Andererseits wäre es auch möglich, dass es für RBM4 einen phosphorylierungsunabhängigen Importweg

durch TRN-SR2 gibt, wie er auch für andere Proteine der Importin-beta-Familie existiert.

Der Nachweis, dass es sich bei RBM4A um ein Phosphoprotein handelt, wurde an HeLa-Zellen erbracht. Unter Anleitung von Herrn Prof. Grässer wurden ungefähr 10^6 Zellen wurden mit 250 μCi „Translabel“ (ICN, Braunschweig; mit einer Mischung aus ^{35}S -markiertem L-Methionin und L-Cystein) bzw. 0,5 mCi $\text{H}_3\ ^{32}\text{PO}_4$ (Hartmann Analytic, Braunschweig) metabolisch markiert. Anschliessend wurden sie lysiert und mit Hilfe einer Immunpräzipitation analysiert. Als RBM4A spezifischer monoklonaler Antikörper diente 6E10, als Negativkontrolle wurde der monoklonale Antikörper 5F10 eingesetzt, der gegen das Borna Virus codierte p40 Protein gerichtet ist (Sauder et al., 1996). Die Auftrennung der Proteine erfolgte über eine SDS-PAGE und die Auswertung anhand einer Autoradiographie. Als Molekulargewichtsmarker diente ein ^{14}C -Marker der Firma Amersham.

In Abbildung 21 ist der Phosphorylierungsnachweis dargestellt. Man sieht, dass RBM4A sowohl durch ^{35}S (linker Blot), als auch durch ^{32}P (rechter Blot) radioaktiv markiert wurde. In der jeweils rechten Spur ist zu erkennen, dass RBM4A durch den spezifischen monoklonalen Antikörper 6E10 präzipitiert wurde und eine Bande auf einer Laufhöhe von ca. 40 kDa erscheint, wohingegen in der linken Kontrollspur keine Bande auftritt. Die zusätzlich zu sehenden Banden mit einem höheren Molekulargewicht sind lediglich als Background-Proteinbanden zu deuten.

Eine Markierung mit ^{35}S -markiertem Methionin und Cystein diente als Kontrolle der Immunpräzipitation, da diese bei allen Proteinen gelingt. Im Gegensatz dazu ist die ^{32}P -Markierung nur bei Phosphoproteinen möglich. Da in der Abbildung auch hier eine Bande auf der Höhe von RBM4A zu erkennen ist, muss es sich um ein phosphoryliertes Protein handeln. Zudem kann man erkennen, dass auf der Höhe von RBM4A eine Doppelbande erscheint.

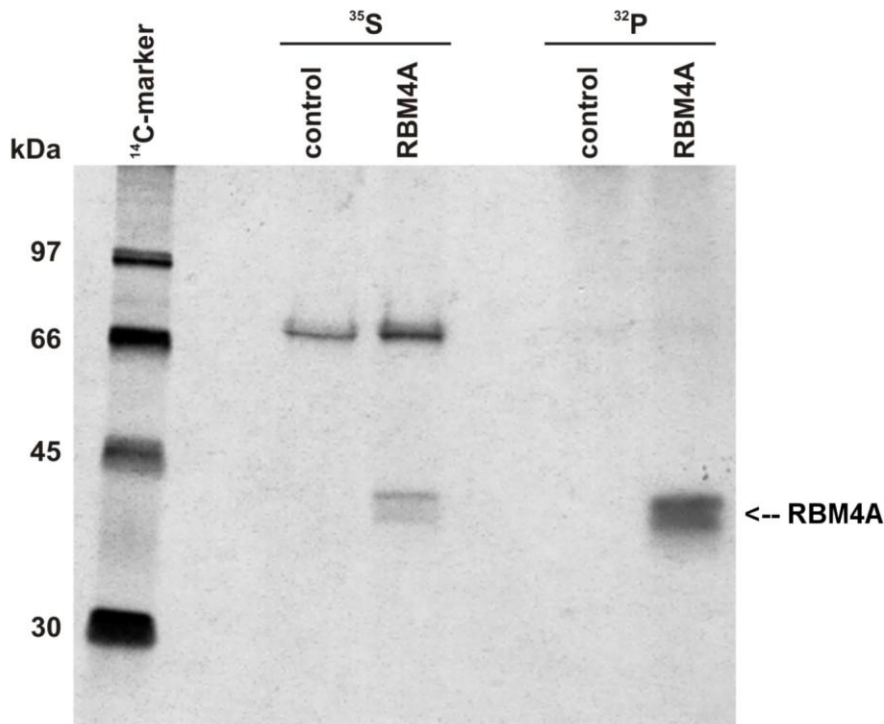


Abb. 21: Phosphorylierung des RBM4A-Proteins

Hela-Zellextrakte wurden metabolisch mit ³⁵S-Methionin bzw. H₃³²PO₄ markiert. Anschliessend wurden sie lysiert und mittels Immunpräzipitation analysiert, wobei zum Einen der irrelevante Borna spezifische Antikörper 5F10 zur Kontrolle (jeweils die linke Spur) und zum Anderen der RBM4A spezifische monoklonale Antikörper 6E10 (jeweils in der rechten Spur) verwendet wurde. Mittels SDS-PAGE wurden die Extrakte aufgetrennt und durch Autoradiographie dargestellt. Als Grössenstandard in der linken Spur verwendeten wir den ¹⁴C-markierten Molekulargewichtsmarker von Amersham.

Um den Beweis zu liefern, dass es sich bei RBM4B ebenfalls um ein phosphoryliertes Protein handelt, wurde, wie in Abbildung 22 zu sehen ist, in einem zweiten Versuch eine, wie oben beschriebene, radioaktive Immunpräzipitation mit FLAG-RBM4B-transfizierten Hela-Zellen durchgeführt, allerdings wurden die Zellextrakte mit H₃³³PO₄ markiert. Als RBM4B spezifischer monoklonaler Antikörper diente hierbei 1B2, zur Negativkontrolle wurde wiederum der gegen das Borna Virus codierte Protein p40 gerichtete Antikörper 5F10 eingesetzt. Die Auftrennung der Proteine erfolgte über eine SDS-PAGE und die Auswertung anhand

einer Autoradiographie. Als Molekulargewichtsmarker diente ein ^{14}C -Marker der Firma Amersham. Neben dem Nachweis der Phosphorylierung konnte hierbei auch gezeigt werden, dass der RBM4B-spezifische Antikörper zur Immunpräzipitation fähig ist.

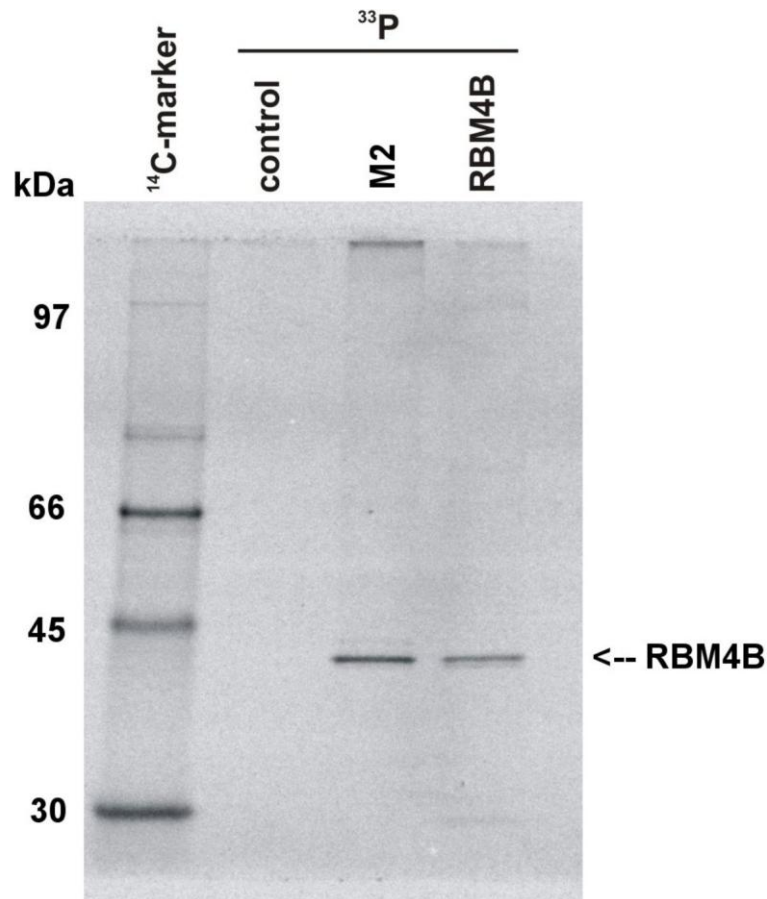


Abb. 22: Phosphorylierung des RBM4B-Proteins

Die mit ^{33}P -markierten Zellextrakte wurden lysiert und mittels Immunpräzipitation analysiert, wobei zum Einen der Borna spezifische Antikörper zur Negativkontrolle (linke Spur) und zum Anderen der RBM4B spezifische monoklonale Antikörper 1B2 (rechte Spur) verwendet wurde. In der Mitte wurde zum Vergleich eine Immunpräzipitation mit dem FLAG spezifischen monoklonalen Antikörper M2 durchgeführt. Mittels SDS-PAGE wurden die Extrakte aufgetrennt und im PhosphoImager[®] (Roche) dargestellt. Man erkennt jeweils eine Bande auf einer Laufhöhe von ca. 40 kDa, welche das phosphorylierte RBM4B darstellt. Als Grössenstandard in der linken Spur verwendeten wir den ^{14}C -markierten Molekulargewichtsmarker von Amersham.

6.4.2 Bestimmung der Halbwertszeit von RBM4A und B

Die Halbwertszeit von RBM4 wurde unter Anleitung von Herrn Prof. Grässer, wie unter 5.9 bereits beschrieben, anhand des „Pulse-Chase-Experiments“ durchgeführt. Hierbei wurden HeLa-Zellen verwendet. Ungefähr 3×10^6 Zellen wurden mit 250 μCi „Translabel“ (ICN) (enthält eine Mischung aus ^{35}S -markiertem L-Methionin und L-Cystein) für 2 Stunden radioaktiv markiert. In dieser Zeit werden die radioaktiven Aminosäuren in die neu synthetisierten Proteine eingebaut werden. Danach werden die Zellen mit nicht radioaktiv markiertem Medium gewaschen und anschliessend für unterschiedliche Zeiten inkubiert, wodurch in den verschiedenen Ansätzen unterschiedliche Mengen an radioaktiv markiertem Protein abgebaut werden, woran sich die Halbwertszeit des Proteins bestimmen lässt. Nach dem Waschen und Lysieren der Zellen wurden sie mit dem RBM4A spezifischen monoklonalen Antikörper 6E10 immunpräzipitiert. Bei der Bestimmung der Halbwertszeit von RBM4B wurden pSG5-FLAG-RBM4B transfizierte HeLa-Zellen verwendet und diese nach selbigen Vorbereitungen mit dem RBM4B spezifischen monoklonalen Antikörper 1B2 präzipitiert. Anschliessend wurden sie in einer SDS-PAGE aufgetrennt und mit Hilfe der Autoradiographie im Phosphoimager[®] (Roche) ausgewertet. Auch die Extrakte zum Zeitpunkt 0 Stunden ($t = 0$) wurden immunpräzipitiert und zum Vergleich benutzt. Eine Kontroll-Immunpräzipitation wurde mit dem α -Borna-Antikörper 5F10 durchgeführt und ist hier jeweils in der ersten Spur (Ko 0h) zu sehen. Als Grössenstandard verwendeten wir den ^{14}C -markierten Molekulargewichtsmarker von Amersham. Abbildung 23 zeigt die Bestimmung der Halbwertszeiten von RBM4A und RBM4B. Man vergleicht die Stärken der RBM4-Proteinbanden zu unterschiedlichen Zeiten nach der Inkubation mit dem 0-Wert, bei dem noch kein Abbau stattgefunden hat. Die Menge an ^{35}S -markiertem Protein wurde hierbei im PhosphoImager[®] (Roche) bestimmt. Wie in der Abbildung zu erkennen ist, liegt die Halbwertszeit des RBM4A Proteins bei ungefähr 2,5 Stunden, die von RBM4B bei ca. 4,5 Stunden.

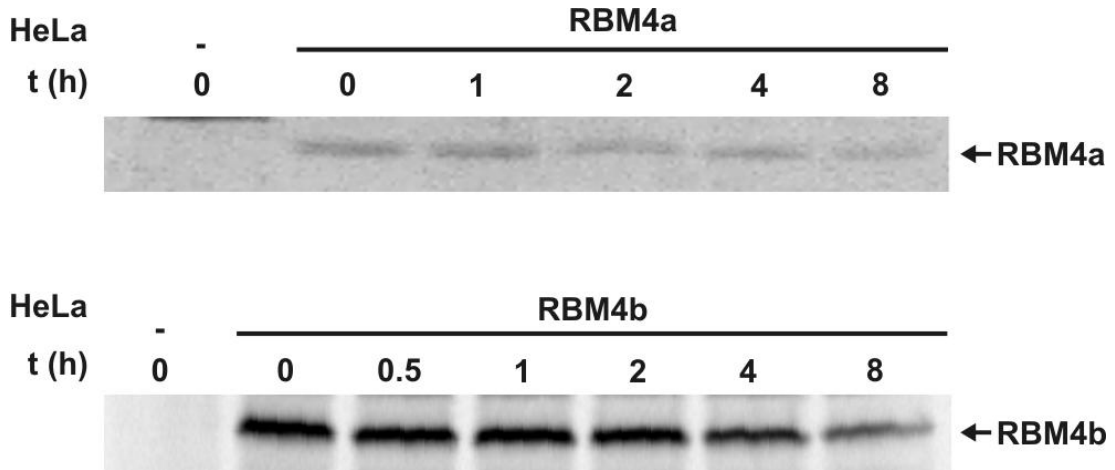


Abb. 23: Bestimmung der Halbwertszeit des RBM4-Proteins

HeLa-Zellen bzw. pSG5-FLAG-RBM4B transfizierte HeLa-Zellen wurden mit „Translabel“ (ICN) (enthält eine Mischung aus ³⁵S-markiertem L-Methionin und L-Cystein) für 2 Stunden radioaktiv markiert und anschliessend für die oben beschriebene Zeit in nicht-radioaktiv markiertem Medium inkubiert. Nach dem Waschen und der Lyse der Zellen wurden sie immunpräzipitiert. Hierbei wurde zum Einen der RBM4A spezifische, monoklonale Antikörper 6E10 und zum Anderen der RBM4B spezifische monoklonale Antikörper 1B2 verwendet. Die Analyse erfolgte mit Hilfe der Autoradiographie und dem PhosphoImager® (Roche). Als Grössenstandard wurde in der linken Spur der ¹⁴C-markierte Molekulargewichtsmarker (Amersham) aufgetragen.

6.5 Bestimmung der subzellulären Lokalisation von RBM4 anhand der indirekten Immunfluoreszenz

RBM4 ist in der Literatur bereits als „shuttle-Protein“ beschrieben worden. Eine deutlich zytoplasmatische Verteilung von RBM4 ist in einer Subpopulation von Nervenzellen, den „crustacean cardioactive peptide“ (CCAP)-enthaltenden Neuronen beschrieben worden (Zhang et al., 2000). Der Kernimport des RBM4-Proteins wird durch die Interaktion seiner CAD (C-terminale alaninreiche Domäne) und Transportin-SR2 vermittelt. Eine cytoplasmatische Lokalisation von RBM4 kann auch durch die Deletion dieses C-terminalen Bereiches erreicht werden. SR-Proteine (Serin/Arginin reiche Proteine) verfolgen den gleichen Importweg und spielen unter anderem auch eine wichtige Rolle bei der Spleisskontrolle (Lai et al., 2003). Typisch für SR Spleißfaktoren ist auch das Auftreten in kleinen fleckenartigen Strukturen im Kern (nuclear speckles), was bei ihnen durch RS Domäne (Arginin/Serin Dipeptid Wiederholungen) zustande kommt. Da diese nuclear speckles auch bei RBM4 beobachtet wurden, ihm diese Motive jedoch fehlen, muss es sich hierbei um eine noch nicht beschriebene Domäne zum Speckle-Targeting handeln, die auch in der CAD lokalisiert ist (Lai et al., 2003).

In Abbildung 24 ist anhand einer indirekten Immunfluoreszenz die subzelluläre Lokalisation von RBM4 erstmals in humanen Zellen (Hela-Zellen) dargestellt, da alle bisherigen Experimente in *Drosophila* durchgeführt wurden. Die Zellen wurden zunächst auf einem Deckglas kultiviert, anschliessend fixiert und mit dem RBM4 spezifischen monoklonalen Antikörper 6E10 und darauffolgend mit einem FITC-konjugierten Kaninchen α -Ratte IgG Antikörper inkubiert. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskopes. Der Zellkern wurde mit DAPI angefärbt. Deutlich erkennt man die Lokalisation des RBM4-Proteins im Kern. Nach längerer Expositionszeit erscheint es jedoch auch im Zytoplasma.

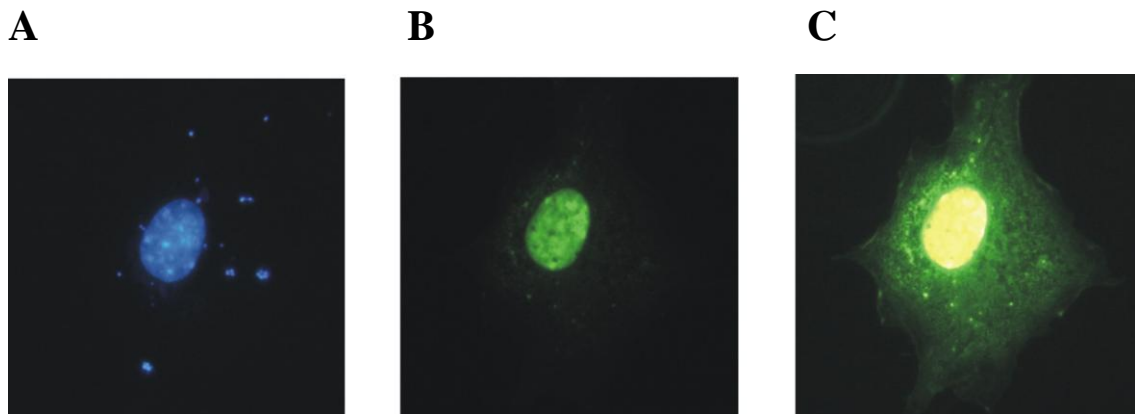


Abb. 24: Subzelluläre Lokalisation von RBM4

HeLa-Zellen wurden fixiert, mit dem RBM4 spezifischen monoklonalen Antikörper 6E10 und anschliessend mit dem FITC-konjugierten Kaninchen α -Ratte IgG Antikörper inkubiert. A: Die Färbung des Kerns erfolgte mit DAPI; B: RBM4 ist im Kern lokalisiert; C: Bei längerer Exposition erkennt man zusätzlich eine kleine Proteinmenge im Cytoplasma.

6.6 Nachweis der Kolo-kalisation von RBM4 und EBNA2 anhand einer indirekten Immunfluoreszenz

Die Hefe-Zwei-Hybrid Analyse von Dr. Thomas Dobner lieferte einen ersten Anhaltspunkt für die Bindung von RBM4 an EBNA2. Allerdings ist es möglich, dass man bei diesem Versuch falsch positive Klone erhält, weshalb die Daten durch verschiedene Experimente verifiziert werden müssen. Folglich sollte neben der Lokalisationsanalyse diese Vermutung durch eine Co-Immunpräzipitation bestätigt, beziehungsweise zunächst eine Kolo-kalisation als weiteren Hinweis auf eine Interaktion der beiden Proteine gezeigt werden.

Eine der Voraussetzungen, dass RBM4 und EBNA2 aneinander binden ist, dass RBM4 in den primären Zielzellen von EBNA2 zu finden ist, was bereits unter 6.3.1 beschrieben wurde. Zum anderen müssen die beiden Proteine zur gleichen Zeit am gleichen Ort innerhalb der Zelle lokalisiert sein. Ein zusätzlicher Hinweis auf die Bindung von RBM4 an EBNA2 gelang ebenfalls anhand der indirekten Immunfluoreszenz und ist in Abbildung 25 dargestellt. Hierbei wurden HeLa-Zellen in 6-Loch-Platten auf Deckgläsern ausgesät und mit pGFP-EBNA2 transfiziert. 48

Stunden nach der Transfektion wurden sie fixiert und permeabilisiert. Das endogene RBM4 wurde mit dem monoklonalen Antikörper 6E10 und anschliessend mit einem TRITC-konjugierten Kaninchen α -Ratte IgG Antikörper inkubiert. Der Kern wurde mit DAPI angefärbt. In Abbildung 25A sieht man den mit Blau angefärbten Kern, in Rot das RBM4 (Abb. 25B), welches mit TRITC gefärbt wurde. Auch hier wird wiederum deutlich, dass es, wie EBNA2, überwiegend im Kern, ausschliesslich der Nucleoli, lokalisiert ist. In Abbildung 25C ist die grüne Färbung des EBNA2-GFP-Fusionsproteins zu erkennen. In Abbildung 25D ist die Überlagerung von GFP-EBNA2 und RBM4 zu sehen, wobei die Mischfarbe gelb die Kolo-kalisation der beiden Proteine darstellt. Dieser Versuch wurde zur Kontrolle ebenfalls von Frau E. Kremmer durchgeführt und mit Hilfe des konfokalen Lasermikroskops ausgewertet. Die Ergebnisse dieser Arbeit konnten dabei nicht bestätigt werden. Analysen zur subzellulären Lokalisation von RBM4 und Studien zur Kolo-kalisation von RBM4 und EBNA2 wurden in Zusammenarbeit mit Herrn A. Spurk durchgeführt.

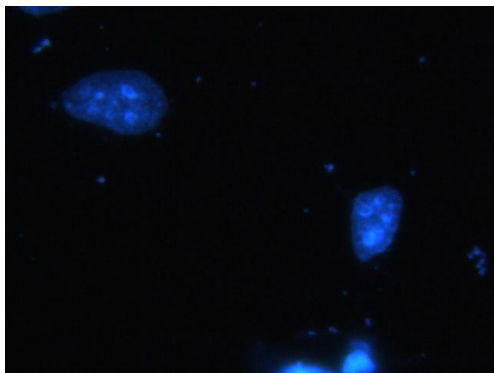
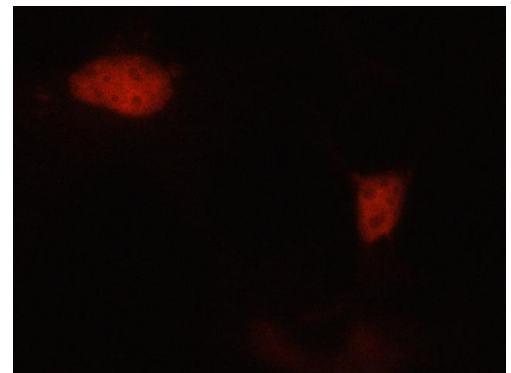
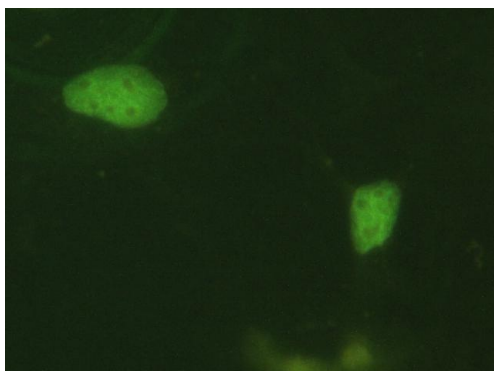
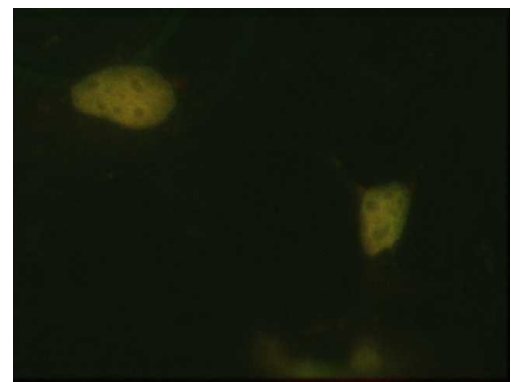
A**B****C****D**

Abb. 25: Darstellung der Kolokalisation von RBM4 und EBNA2 anhand einer indirekten Immunfluoreszenz

Mit pGFP-EBNA2-transfizierte Hela-Zellen wurden auf Deckgläsern kultiviert, fixiert und permeabilisiert. Das endogene RBM4 wurde mit dem monoklonalen Antikörper 6E10 und nachfolgend mit einem TRITC-konjugierten Kaninchen α -Ratte IgG Antikörper inkubiert. A: der Kern wurde mit DAPI gefärbt; B: RBM4 wurde mit TRITC in rot gefärbt; C: GFP-EBNA2 ist grün gefärbt; D: durch die Überlagerung der letzten beiden Abbildungen sieht man die Mischfarbe gelb und damit die mögliche Kolokalisation der beiden Proteine.

6.7 Versuch einer Co-Immunpräzipitation zum *in vivo* Nachweis der Bindung von RBM4 und EBNA2

Auch die anhand einer Immunfluoreszenz dargestellte Kolokalisation von RBM4 und EBNA2 ist zwar ein Hinweis, aber keine endgültige Bestätigung für deren Bindung aneinander. Von unserer Arbeitsgruppe wurde die Interaktion der beiden Proteine bereits *in vitro* anhand einer GST-Affinitätschromatographie gezeigt. Nach dieser *in vitro* Analyse war es ein weiteres Ziel, mit Hilfe einer Co-Immunpräzipitation ebenfalls den Nachweis der Interaktion *in vivo* zu erbringen.

Hierbei wurden COS-1-Zellen mit pSG5-EBNA2-wt transfiziert, kultiviert und anschliessend lysiert. Da in dieser Co-Immunpräzipitation das endogene RBM4-Protein nachgewiesen werden sollte, wurden die Zellen lediglich mit EBNA2-wt transfiziert. Es konnte bereits gezeigt werden, dass der monoklonale Antikörper 6E10 zur Immunpräzipitation von RBM4 in der Lage ist. Deshalb wurde dieser wiederum in der Co-Immunpräzipitation eingesetzt. Die hergestellten Zellextrakte wurden mit dem RBM4-spezifischen monoklonalen Antikörper 6E10 und mit einem irrelevanten Kontrollantikörper (in diesem Fall war es der α -Borna-P40-Antikörper 5F10) präzipitiert. Die Proteine wurden anschliessend mit Hilfe einer SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und einem Western Blot unterzogen. Kopräzipitiertes EBNA2 sollte hierbei mit dem EBNA2-spezifischen monoklonalen Antikörper R3 identifiziert werden.

Abbildung 26 zeigt das Ergebnis der Co-Immunpräzipitation. Die Spur „Input“ (linke Spur) zeigt den Gesamtzellextrakt vor der Präzipitation. Hier ist das EBNA2-Protein

auf der richtigen Laufhöhe bei ca. 85 kDa vorhanden. In der rechten Spur (eigentliche Co-Immunpräzipitation) ist EBNA2 ebenfalls durch den spezifischen monoklonalen Antikörper R3 detektiert worden. Da allerdings auch in der Borna-Immunpräzipitation eine leichte Bande auf gleicher Laufhöhe erscheint, und dies eigentlich die Negativ-Kontrolle ohne Bande sein müsste, kann dieses Experiment nicht eindeutig ausgewertet werden. Da die Bande der EBNA2-Immunpräzipitation deutlich stärker als die der Negativkontrolle erscheint, kann vermutet werden, dass lediglich die Versuchsbedingungen, beziehungsweise die eingesetzten Salzkonzentrationen für das positive Signal bei der Kontrolle verantwortlich sind, wobei die eigentliche Immunpräzipitation gelang. In unserer Arbeitsgruppe wurde dieser Versuch auch mit stringenteren Waschungen wiederholt, allerdings gelang es nicht, hierbei eine Bindung von RBM4 an EBNA2 nachzuweisen. Es existiert also kein endgültiger Beweis, dass die beiden Proteine tatsächlich aneinander binden.

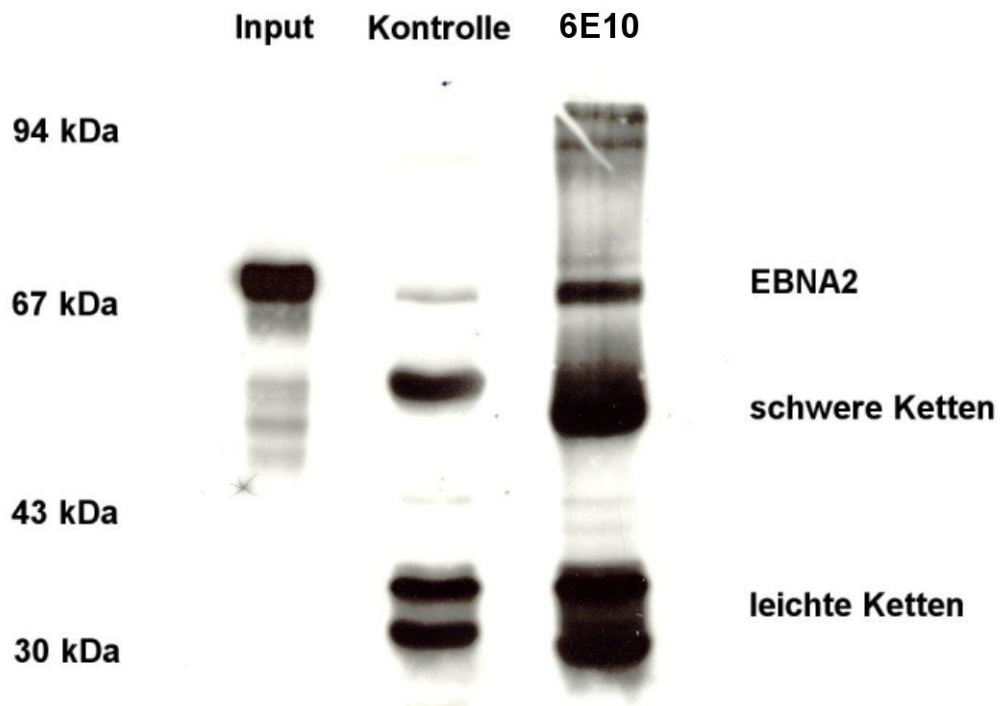


Abb.26: Versuch einer Co-Immünpräzipitation von RBM4 und EBNA2

COS-1-Zellen wurden mit EBNA2-wt transfiziert, kultiviert und anschliessend lysiert. Die Co-Immünpräzipitation erfolgte mit dem RBM4 spezifischen monoklonalen Antikörper 6E10 und zur Negativkontrolle mit dem Borna spezifischen Antikörper 5F10. Eine mögliche Bindung sollte mit dem EBNA2 spezifischen monoklonalen Antikörper R3 detektiert werden. In der linken Spur sieht man als Input-Kontrolle eine Bande auf einer Höhe von ca. 85 kDa, also das EBNA2-Protein. In der rechten Spur kommt ebenfalls ein deutliches Signal in Höhe von EBNA2, das heisst ein positives Signal bei der Co-Immünpräzipitation. Allerdings erscheint auch in der mittleren Spur (Negativkontrolle mit dem Borna-spezifischen Antikörper) eine Bande. Folglich wurde auch hier das EBNA2-Protein präzipitiert, wobei normalerweise in dieser Präzipitation kein Signal erscheinen dürfte. Die schweren und leichten Ketten stammen von dem in der Präzipitation eingesetzten IgG Antikörper.

7 Diskussion

Das Epstein-Barr-Virus ist ein humanpathogenes Virus mit kanzerogenen Eigenschaften. Es ist an der Entstehung verschiedener Tumoren, wie beispielsweise des Hodgkin-Lymphoms, des Nasopharyngealkarzinoms und des Burkitt-Lymphoms beteiligt.

Das Epstein-Barr-Virus-nukleäre Antigen 2 (EBNA2) spielt eine zentrale Rolle bei der viralen Transformation und Immortalisierung von B-Lymphozyten. Es transaktiviert die latenten Membranproteine LMP1 und 2 und die nukleären Antigene EBNA1-6 (Laux, et al., 1994; Zimmer-Strobel, et al., 1994). Man kennt bereits verschiedene RNA-interagierende, zelluläre Proteine, die an EBNA2 binden, wie zum Beispiel SMN, DP103 und hnRNP-D1-like. Das SMN-Protein (Survival of Motor Neurons Protein) bindet an RNA und ist am Zusammenbau des Spleissosoms beteiligt. Das hnRNP-D1-like (AUF-1-like) bindet ebenfalls an RNA und ist an der Prozessierung von prae-mRNA beteiligt. Die RNA-Helicase DP103 (Grundhoff et al., 1999) interagiert mit miRNA.

Dr. Thomas Dobner vom Institut für medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universität Regensburg identifizierte in einem yeast-two-hybrid Screening mit einem verkürzten EBNA2 Klon (AS 81-387) als Fängerprotein fünf Klone unterschiedlicher Länge als RBM4 (hlark). Dieses etwa 40 kDa große Protein gehört zur Gruppe der RNA-Recognition-Motiv-Familie (RRM) und besitzt zwei RRM-Motive sowie einen Retroviralen Typ von Zinkfinger (RTZF). Es handelt sich bei RBM4 um ein RNA-bindendes Protein, weshalb die Vermutung nahe lag, dass der yeast-two-hybrid Screen tatsächlich ein neues mit EBNA2 interagierendes Protein identifiziert hatte, was allerdings in dieser Arbeit nicht eindeutig bestätigt werden konnte.

Bisher konnte gezeigt werden, dass es sich bei RBM4 um einen neuen Spleißregulator handelt, der alternatives pre-mRNA-Spleißen moduliert. Er wirkt bei der Wahl der Spleißstellen und Exons antagonistisch zu den echten SR-Proteinen (Serin-Arginin-reiche Proteine) (Lai et al., 2003). Das *Drosophila* lark fungiert als ein molekulares Element bei der Zellzyklusregulation (Clock-Protein), wo es die zeitliche Regulation der Entpuppung der Fliege vermittelt (Mc Neil et al., 1998;

Zhang et al., 2000). Bei Mutationen der verschiedenen RNA-bindenden Motive ergeben sich unterschiedliche Phänotypen in der Drosophila-Fliege. Die beiden RNA-Bindungsdomänen arbeiten *in vivo* zusammen, um die Funktion von lark zu bestimmen. Das Drosophila lark wird ausserdem für die Organisation des Actin-Cytoskeletts und die Hu-li Tai Shao Lokalisation während der Oogenese benötigt (Mc Neil et al., 2004). Die RBM4-Funktion kann durch verschiedene Proteine moduliert werden, wie beispielsweise durch das Wilms tumor protein (WT1). Es kann mit dem Spleißprotein RBM4 interagieren und seine Fähigkeit, das alternative Spleißen *in vivo* zu modulieren, regulieren (Markus et al., 2006). Die Exonwahl bei der α -Tropomyosin mRNA wird durch die antagonistische Aktion von RBM4 und dem Spleißregulator PTB (Polypyrimidine tract binding protein) reguliert, wobei die beiden Proteine um die Bindung an ein CU-reiches Element konkurrieren. Im Mausversuch konnte gezeigt werden, dass das RBM4-Protein die posttranskriptionelle Expression von PERIOD 1, einem essentiellen clock-Protein der Säuger, aktiviert. Durch diesen Versuch konnte die These, dass es sich bei RBM4 um einen neuen posttranskriptionellen Regulator von Clock-Proteinen bei Säugern handelt, bestätigt werden (Kojima et al., 2007). Neuere Studien zeigten, dass RBM4A eine Rolle bei der Prozessierung von microRNAs spielt (Höck et al., 2008), was wiederum bestätigt, dass es sich bei RBM4 um ein multifunktionelles Protein handelt (siehe Markus und Morris, 2008). Auch durch Zellstress kann die Funktion von RBM4 moduliert werden (Lin, Hsu, and Tarn, 2007).

Mit Hilfe der von Frau Elisabeth Kremmer (GSF, München) hergestellten monoklonalen Antikörper war es erstmals möglich, verschiedene menschliche und tierische Gewebe auf das Vorhandensein von RBM4 zu testen und dessen Expressionsmenge zu vergleichen. Primär sollten EBV-transformierte B-Lymphozyten hinsichtlich der Expression des RBM4-Proteins analysiert werden, da die Anwesenheit des Proteins die Voraussetzung für die Testung auf eine EBNA2-Interaktion darstellt. Ausserdem konnte in dieser Arbeit mit Hilfe der Antikörper das Protein näher biochemisch charakterisiert werden. Auch die Bestimmung der subzellulären Lokalisation und damit ein weiterer Hinweis auf eine mögliche Kolokalisation mit EBNA2 gelang anhand einer indirekten Immunfluoreszenz. Ein

weiteres Ziel dieser Arbeit war es, durch eine Co-Immunpräzipitation diese mögliche Bindung zu bestätigen.

7.1 Analyse der monoklonalen Antikörper gegen RBM4A und RBM4B

Frau Elisabeth Kremmer von der GSF in München konnte, mit Hilfe des GST-RBM4A-Fusionsproteins und des BSA-RBM4B-Konjugates, Ratten zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern immunisieren. Alle 13 RBM4A-Antikörper-Klone, die im ELISA-Test positiv reagierten, wurden von uns im Western-Blot auf ihre Tauglichkeit geprüft. Hierbei wurde der eine Teil der COS-1-Zellen vorher mit dem HA-RBM4A-Expressionsplasmid transfiziert, der andere Teil dagegen blieb nativ (siehe Abb. 11), um mit den verschiedenen Antikörpern zu testen, ob sowohl das endogene als auch das transient exprimierte RBM4A nachgewiesen werden kann. Alle getesteten monoklonalen Antikörper gaben ein positives Signal sowohl bei dem endogenen als auch bei dem transient exprimierten RBM4A. Die Höhenunterschiede der Banden kamen bei der Entwicklung des Western-Blots durch versehentliches Verschieben der Blotstreifen zustande und stellen daher keinen Unterschied in der Proteingröße dar. Zusätzliche Banden oberhalb von RBM4A, wie sie bei den Klonen 2F9 und 3A8 zu sehen sind, entstehen wahrscheinlich durch Kreuzreaktionen des Antikörpers, wohingegen Banden unterhalb von 40 kDa, die bei allen getesteten monoklonalen Antikörpern vorhanden sind, als Degradationsbanden bewertet werden können.

Mit Hilfe des in dieser Arbeit hergestellten FLAG-RBM4B Proteins gelang es weiterhin, die RBM4A-spezifischen Antikörper näher zu differenzieren (siehe Abb. 11 und 12). Wir konnten einen Klon (6G7) identifizieren, der nur RBM4A erkennt. Zudem wurde ein RBM4B-spezifischer Antikörperklon (1B2) etabliert. Dieser Klon entstand nach Immunisierung mit einem BSA-gekoppelten Peptid, welches den Aminosäuren 255-269 von RBM4B entsprach. Der Antikörperklon 1B2 reagierte im Western-Blot nur mit FLAG-RBM4B, nicht jedoch mit HA-RBM4A.

7.2 Vergleich der Expressionsmenge von RBM4 in verschiedenen menschlichen und tierischen Zellen und Geweben

Es konnte bereits 1993 gezeigt werden, dass das RBM4-Gen im embryonalen Nervensystem exprimiert wird und auch die mRNA-Expression des humanen RBM4-Gen kommt in Herz, Lunge, Plazenta, Leber, Skelettmuskel, Pancreas, Niere und Gehirn vor. Eine detailliertere Analyse zeigte die Expression des RBM4-Gens in sieben verschiedenen Hirnregionen, und zwar im Nucleus amygdalae (Mandelkern), im Nucleus caudatus (Schweifkern), in der Commissura magna cerebri (Balken), im Hippocampus (Ammonshorn), in der Substantia nigra (Soemmering's Ganglion) und im Thalamus opticus (Sehhügel) (Jackson et al., 1997).

Anhand dieser Northern- und Southern-Blot-Experimente konnte man zwar eine Aussage über die RNA-Menge treffen, nicht aber über die Proteinmenge. Mit Hilfe der zweidimensionalen Gelelektrophorese und im MALDI MS (Matrix-associated laser desorption ionization mass spectroscopy) gelang erstmals der Nachweis von RBM4 auf Proteinebene. Hierbei fand man im Rahmen einer Studie an fetalen Down-Syndrom-Gehirnen eine deutlich niedrigere RBM4-Proteinmenge im Vergleich zu Gehirnen von Feten ohne offensichtliche Erkrankung (Bernet et al., 2002). Dieses Resultat konnte allerdings in späteren Versuchen nicht mehr bestätigt werden (Gulesserian et al., 2003).

Mit Hilfe der monoklonalen Antikörper konnten wir RBM4 auf Proteinebene genauer analysieren. Da der spezifische monoklonale Antikörper 6E10 neben dem transfizierten, auch das endogene RBM4 der grünen Meerkatze in COS-1-Zellen erkennt, untersuchten wir neben menschlichem auch tierisches Gewebe.

Anhand eines käuflich erworbenen Western-Blots zeigten wir zunächst einen Vergleich der RBM4A und B-Proteinmenge in menschlichem Gewebe (siehe Abb. 13). Da bereits in verschiedenen menschlichen Geweben die Expression des RBM4-Gens nachgewiesen werden konnte, war zu erwarten, dass dies auch auf Proteinebene gelang. In allen getesteten Geweben erhielten wir ein Signal von RBM4A auf der zu erwartenden Höhe von etwa 40 kDa, jedoch wird deutlich, dass je nach Gewebe die Proteinexpression variiert. Am stärksten ist sie in der Leber, wobei in dem Blot mit den Zellextrakten aus Gehirn und Plazenta die Banden ebenfalls sehr deutlich

erscheinen. In den anderen Geweben wie Herz, Skelettmuskel und Pancreas verringert sich die Expression zunehmend. Im Gegensatz zu RBM4A konnte RBM4B durch den spezifischen Antikörper 1B2 nur in der Leber detektiert werden. In allen anderen Geweben zeigte sich keine Proteinexpression. Die Leber gehört zu den stoffwechselaktivsten Organen des Körpers, einschliesslich der Proteinbiosynthese. Da RBM4 bereits als Spleissregulator beschrieben wurde (Lai et al., 2003), könnte dies die starke Proteinmenge in der Leber erklären. Spätere Studien unserer Arbeitsgruppe an menschlichen Zellen zeigten, dass RBM4B neben der Leber auch in Nierenzellen vorhanden ist, wobei das Protein hier deutlich geringer exprimiert wird als in der Leber. Die hohe Expressionsmenge von RBM4A im Gehirn korreliert mit dem bereits in der Literatur beschriebenen Vorhandensein der RBM4-mRNA im Nervengewebe, einschliesslich des Gehirns. Es ist möglich, dass RBM4 eine besondere Funktion im Nervensystem erfüllt. So konnte, wie bereits erwähnt, im Gehirn von Down-Syndrom-Feten eine signifikant erniedrigte RBM4-Menge im Vergleich zu Feten ohne offensichtliche Erkrankung gezeigt werden. Eine weitere Besonderheit ist, dass das *Drosophila-lark* in den CCAP Neuronen des ventralen Nervensystems eine deutlich cytoplasmatische Lokalisation zeigt, was bis dahin in anderen Zellen noch nicht eindeutig beschrieben werden konnte (Zhang et al., 2000). Die CCAP Neuronen haben eine Funktion bei der Kontrolle der Entpuppung der adulten Fliege, wobei das *lark* scheinbar essentiell für die zeitliche Regulation ist. Während des Puppenstadiums kommt es in diesen Zellen zu einer deutlichen Abnahme der *lark*-Menge, die in der Nacht, wenige Stunden vor dem Schlupf ihren niedrigsten Stand erreicht (Zhang et al., 2000). *Lark* hat neben seiner Rolle als Spleissregulator im Zellkern noch andere Aufgaben, die bei der Entwicklungsregulation von Bedeutung sind. Desweiteren wurde ein Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein von RBM4 und der Entstehung von Tauopathien vermutet (Kar et al., 2006). Tauopathien sind neurodegenerative Erkrankungen mit Ablagerungen von Tau-Proteinen. Sie entstehen durch Spleissmutationen, die das Exon 10 betreffen. RBM4 induziert den Einschluss von Exon10 in das Tau-Protein. Bei Überexpression von RBM4 resultiert folglich ein Anstieg der Exon+10-Isoform, wodurch das Auftreten von Tauopathien begünstigt wird.

Eine der Bedingungen, dass RBM4 und EBNA2 aneinander binden und es zwischen ihnen zur Interaktion kommen kann ist, dass RBM4 in den primären Zielzellen des Epstein-Barr-Virus - also in B-Lymphozyten - vorhanden ist, weshalb wir diese Zellen auf eine eventuelle Proteinexpression testeten. Hierbei untersuchten wir auch, ob die Anwesenheit von EBV einen Einfluss auf die Expression von RBM4 hat und verwendeten sowohl EBV-positive, als auch EBV-negative Zellen (siehe Abb. 14). Sowohl in primären B-Zellen, als auch in transformierten B-Zellen konnten wir RBM4A mit dem monoklonalen Antikörper 6G7 nachweisen. Die Expression in primären PBMCs ist wesentlich geringer als in allen anderen, transformierten oder immortalisierten B-Zellen. In Nabelschnur-Lymphozyten, die mit dem EBV-Stamm B95.8 transformiert wurden (B95-8-CBL) und in Fibroblasten, die in diesem Versuch zur Kontrolle verwendet wurden, wird RBM4A in etwa gleich stark exprimiert. Deutlich stärker ist die Expression in EBV-negativen Burkitt-Lymphomzellen (BL41) und in EBV-infizierten BL41-Zellen (BL41-B95-8), wobei die RBM4A-Bande des BL41-B95-8-Extraktes das deutlichste Signal ergibt. Da sich allerdings bei diesen beiden Proben auch die β -Actin-Banden nicht eindeutig vergleichen lassen, ist es nicht mit Sicherheit zu sagen, dass die Expression in den EBV-infizierten BL41-Zellen tatsächlich stärker ist, als in den EBV-negativen. Zudem ist die Proteinexpression bei dem EBV-positiven B95-8-CBL-Extrakt wesentlich geringer als die des EBV-negativen BL41-Extraktes, weshalb ein möglicher Einfluss von EBV auf die Expression von RBM4A nicht sicher belegt werden kann. In Abbildung 15 versuchten wir die Expression von RBM4B in den primären Zielzellen von EBV nachzuweisen, wobei sich in keinem Zellextrakt die Anwesenheit von RBM4B bestätigte. Dadurch, dass RBM4B offensichtlich nicht in diesen Zellen vorhanden ist, kann es als Interaktionspartner von EBNA2 außer Acht gelassen werden.

Wie sich die Expression von RBM4 in tumorös entarteten Zellen zeigt, und ob sich die Expression verändert, wenn es sich bei dem entsprechenden Tumor um eine EBV-positive Neoplasie handelt, konnte in Abbildung 16 gezeigt werden. Das endogene RBM4A wurde mit dem spezifischen monoklonalen Antikörper 6G7 detektiert. In den Zellextrakten eines Osteosarkoms (Saos-2) ist die Menge der RBM4A-Proteinexpression relativ gering. Die Banden der Extrakte des T-Zell-

Lymphoms (Jurkat) und des Mammakarzinoms (MDA-MB 231) erscheinen ein wenig deutlicher und einander gleich. Auch in den Zellextrakten des humanen Zervixkarzinoms (Hela), des Teratokarzinoms (Tera1) und des Lungenadenokarzinom (H1299) wird RBM4 in gleicher Menge exprimiert. Die Bande des peripheren Neuroblastoms (SKNSH) ist deutlich stärker als die vorher aufgeführten, allerdings noch minimal schwächer als die des EBV-positiven Burkitt-Lymphoms (P3HR-1). Jedoch ergibt die Kontrollbande des endogenen β -Actin von P3HR-1 auch ein stärkeres Signal, weshalb nicht sicher behauptet werden kann, dass RBM4 in den EBV-positiven Burkitt-Lymphom-Zellen tatsächlich am stärksten exprimiert wird. In der Spur des peripheren Neuroblastoms (SKNSH) erkennt man eine zusätzliche Bande auf einer Laufrhöhe von circa 60 kDa. Möglicherweise ist RBM4A in diesem Zellextrakt modifiziert und kann daher zusätzlich auf einer anderen Laufrhöhe detektiert werden. Auch denkbar wäre, dass RBM4A an ein anderes Protein gekoppelt ist und aufgrund dessen ein höheres Molekulargewicht besitzt. Dass diese Besonderheit gerade in dem Extrakt von Nervenzellen auftritt, gibt einen weiteren Hinweis darauf, dass RBM4A in diesen Zellen eine besondere Funktion ausübt, was aufgrund bisher durchgeführter Experimente schon vermutet wurde. Einen möglichen Einfluss von p53 auf die Proteinexpression konnte getestet werden, indem Zellextrakte eines p53 negativen humanen Colonkarzinoms (HCT 116(p53-/-)) und die eines p53 positiven humanen Colonkarzinoms (HCT 116-wt) verglichen wurden. p53 ist ein wichtiger Tumorsuppressor und Transkriptionsfaktor in der Zelle. Durch seine Anwesenheit kann eine unkontrollierte Zellproliferation und damit die Entstehung von Krebs unterbunden werden. Interessanterweise ist das Signal der RBM4A-Bande bei der p53-negativen Neoplasie deutlicher als bei der p53-positiven. Folglich scheint RBM4A in Anwesenheit von p53 weniger stark exprimiert zu werden.

Da bereits der Nachweis erbracht wurde, dass RBM4B nicht in den primären Zielzellen von EBV vorhanden ist, war es auch von Interesse, ob sich eine Expression des Proteins in Tumorzellen nachweisen lässt (siehe Abb. 17). Im Gegensatz zu RBM4A, welches in allen hier getesteten Leberkarzinomzellextrakten (Alex-3, Hep-G2 und Huh-7) in etwa gleich starker Menge vorkommt, wird RBM4B unterschiedlich stark exprimiert. Verglichen mit dem normalen Leberzellextrakt, ist

die Expressionsmenge von RBM4B in den Karzinomzellextrakten nur sehr gering. So findet sich in der Alex-3-Zelllinie eine sehr schwache Bande, die das endogene RBM4B darstellt. Bei der Hep-G2-Linie erscheint eine schwache Bande auf einer Laufhöhe von 37 kDa, jedoch nicht auf einer Laufhöhe von 40 kDa. Hierbei könnte es sich um eine mutierte Form von RBM4B handeln. Denkbar wäre eine Spleißvariante, bei der ein Exon fehlt, wodurch der Unterschied im Molekulargewicht entsteht. Huh-7-Zellen zeigen keine Expression von RBM4B.

Zu Beginn zeigten wir in COS-1-Zellen, dass der monoklonale Antikörper 6E10 sowohl das transient transfizierte, als auch das endogene RBM4 erkennt. COS-1-Zellen stammen von Nierenzellen der grünen Meerkatze (*Cercopithecus aethiops*), einer Altweltaffenart. Da es sich bei RBM4 um ein evolutionär hoch konserviertes Protein handelt, ist die Wahrscheinlichkeit sehr hoch, dass der monoklonale Antikörper 6E10 nicht nur das endogene RBM4 der grünen Meerkatze, sondern auch das in anderen tierischen Geweben erkennt. Deshalb untersuchten wir Maus- und Hundezellen, sowie auch Wachtelzellen (siehe Abb. 18). Da der Antikörper-Klon 4G11 bei der Austestung der Antikörper neben 6E10 ebenfalls ein gutes Signal ergab, wurde das endogene RBM4 in den Maus- und Hundezellen mit 4G11, das aus den Wachtelzellen allerdings mit dem Antikörper 6E10 detektiert. In der Western-Blot-Analyse der Wachtelzellen erkennt man eine starke Bande von RBM4 auf einer Laufhöhe von ca. 40 kDa. Die Expression in diesen Vogel-Zellen ist im Vergleich zu allen anderen gezeigten tierischen Zellen sehr stark. Die zusätzlichen Banden unterhalb der 40 kDa sind wahrscheinlich auf den Abbau des Proteins zurückzuführen. In den Mauszellen erscheint lediglich eine schwache Bande des endogenen RBM4 und auch in dem Blot der Hundezellen ist das Signal nicht so stark wie in den Wachtelzellen. Allerdings wurde der Wachtelzell-Blot auch mit dem 6E10-Klon gefärbt, die anderen beiden Zellextrakte dagegen mit 4G11, was eine mögliche Erklärung liefert. Jedoch deutet der Unterschied zwischen den beiden Zelllinien, die mit 4G11 gefärbt worden sind, darauf hin, dass in den Zellen des Mäuseembryos tatsächlich weniger RBM4 exprimiert wird als in den Hundezellen. Möglicherweise bindet der Antikörper bei der Maus an ein Epitop mit hoher Variabilität, weshalb ein weniger deutliches Signal erscheint.

In den Abbildungen 19 und 20 testeten wir verschiedene Gewebe eines Kaninchens auf das Vorhandensein und die Menge von RBM4A und RBM4B. Der monoklonale Antikörper 6E10 erkennt erwartungsgemäß endogenes Kaninchen-larkA (RBM4A) in allen getesteten Geweben, also in Gross- und Kleinhirn, in Lunge, Leber, Herz, Niere, Milz, Magen, Ovarien und Skelettmuskel. In allen Geweben ist die Proteinmenge annähernd gleich, wobei die Expression, wie das auch bei den menschlichen Geweben zu erkennen war, am stärksten in Gehirn und Leber, daneben in Niere und Milz zu sein scheint. Die eingesetzte Proteinmenge wurde photometrisch bestimmt, da der verwendete β -Actin-Antikörper spezifisch nur das humane β -Actin anfärbt. Bei Messungen im Photometer können Ungenauigkeiten nicht gänzlich ausgeschlossen werden, was auch ein Grund für die unterschiedlichen Bandenstärken sein könnte. Durch die Western-Blot Analyse, bei der der spezifisch RBM4B erkennende Antikörper-Klon 1B2 verwendet wurde, konnte gezeigt werden, dass RBM4B lediglich in 4 verschiedenen Geweben vorhanden ist, und zwar in Niere, Leber, Jejunum und Ileum. Das Signal bei dem Zellextrakt der Niere erscheint wesentlich stärker als das der anderen Gewebe. Auch in diesem Blot sind deutliche Banden oberhalb von 40 kDa zu erkennen. Diese könnten auf Kreuzreaktionen des Antikörpers zurückgeführt werden. Allerdings ist es auch möglich, dass RBM4B in diesen Geweben funktionell an andere Proteine gebunden ist und daher zusätzlich auf einer anderen Laufhöhe erscheint.

7.3 Biochemische Charakterisierung von RBM4

Vor einigen Jahren konnte bereits der Kernimportweg von RBM4 gezeigt werden. Man weiß mittlerweile, dass es denselben Mechanismus verfolgt, wie die SR-Proteine. Bei beiden wird der Kernimport durch Transportin-SR 2 (TRN-SR2), einem Mitglied der Importin- β -Familie, ermöglicht (Lai et al., 2003). TRN-SR2 erkennt phosphorylierte SR Proteine und transportiert diese in den Kern, wo GTP-gebundenes Ran die transportierten Proteine vom Importin-beta Molekül dissoziiert. Da bisher noch nicht gezeigt werden konnte, dass für TRN-SR2 auch ein phosphorylierungsunabhängiger Transportmechanismus existiert, ist es sehr

wahrscheinlich, dass es sich bei RBM4 ebenfalls um ein Phosphoprotein handelt. Die Bindung von RBM4 an TRN-SR2 erfolgt über seine C-terminale-alaninreiche Domäne (CAD). Eine mögliche Phosphorylierung dieser Domäne konnte bis jetzt allerdings noch nicht nachgewiesen werden (Lai et al., 2003). Jedoch ist es auch möglich, dass es für RBM4 einen phosphorylierungsunabhängigen Kernimportweg gibt.

Zum Nachweis, dass es sich bei RBM4A um ein Phosphoprotein handelt, wurden HeLa-Zellen mit ^{35}S und ^{32}P metabolisch markiert und immunpräzipitiert (siehe Abb. 21). Wir verwendeten zum einen den RBM4 spezifischen monoklonalen Antikörper 6E10, zum anderen wurde als Negativkontrolle der monoklonale Antikörper 5F10 eingesetzt, der gegen das Borna Virus codierte p40 Protein gerichtet ist. RBM4 konnte durch ^{32}P radioaktiv markiert, und mit dem spezifischen monoklonalen Antikörper nachgewiesen werden. Deutlich zu erkennen ist auch, dass RBM4A als Doppelbande auftritt. Die zusätzliche Bande kommt möglicherweise durch den Proteinabbau zustande. Eine weitere mögliche Erklärung wäre das Vorhandensein von zwei differenten Phosphorylierungsstufen von RBM4 mit unterschiedlichem Laufverhalten, wobei die eine die Bindung an TRN-SR2 und dadurch den Kernimport steuern würde, die andere eventuell andere Aufgaben in der Zelle übernehmen könnte. Eine zusätzliche Funktion von RBM4 wird aufgrund von Mutationsanalysen bereits vermutet (Mc Neil et al., 2001, Lai et al., 2003). Um den Beweis zu liefern, dass es sich auch bei RBM4B um ein Phosphoprotein handelt, führten wir erneut eine radioaktive Immunpräzipitation unter Verwendung des RBM4B spezifischen Antikörpers 1B2 durch (siehe Abb. 22). Zum Grössenvergleich wurden FLAG-RBM4B-transfizierte HeLa-Zellextrakte mit dem FLAG spezifischen Antikörper immunpräzipitiert. In beiden Spuren erkennt man eine deutliche Bande auf der zu erwartenden Laufhöhe von ca. 40 kDa.

Die Halbwertszeit von RBM4A liegt bei etwa 2,5 Stunden, die des RBM4B-Proteins bei ca. 4,5 Stunden. In Abbildung 23 sieht man, dass die Banden von RBM4B im Vergleich zu RBM4A sehr stark erscheinen. In der Western-Blot-Analyse zur Bestimmung der Halbwertszeit von RBM4A wurden nicht transfizierte HeLa-Zellextrakte verwendet, sodass die erscheinenden Banden das endogene RBM4A darstellen. RBM4B jedoch wurde in die HeLa-Zellen hineintransfiziert, was die

stärkeren Banden erklären könnte. Unklar ist ausserdem, ob die Halbwertszeit von RBM4 in natürlichen Zellen der Halbwertszeit unter experimentellen Bedingungen entspricht.

7.4 Bestimmung der subzellulären Lokalisation von RBM4

In zahlreichen Studien wurde RBM4 als RNA-interagierendes Protein beschrieben, welches als Spleissregulator fungiert und im Zellkern lokalisiert ist. Vor einigen Jahren gelang der Nachweis in *Drosophila*, dass *lark* in den CCAP Neuronen (crustacean cardioactive peptide containing neurons) des ventralen Nervensystems auch im Zytoplasma lokalisiert ist (Zhang et al., 2000). Diese CCAP Neuronen sind wichtig für die Kontrolle während der Entpuppung der adulten Fliege, wobei das *lark*-Protein essentiell für die zeitliche Regulation zu sein scheint. Während des Puppenstadiums erfahren diese Zellen eine deutliche Abnahme der *lark*-Menge, die in der Nacht, wenige Stunden vor der Entpuppung, ihren niedrigsten Stand erreicht. Mittlerweile weiß man, dass RBM4 ein „shuttle-Protein“ ist. Der Kernimport des RBM4-Proteins wird durch die Interaktion seiner CAD (C-terminale αalaninreiche Domäne) und Transportin-SR2 vermittelt. SR-Proteine (Serin/Arginin reiche Proteine) verfolgen den gleichen Importweg und spielen unter anderem auch eine wichtige Rolle bei der Spleisskontrolle (Lai et al., 2003). Typisch für SR Spleißfaktoren ist auch das Vorkommen in kleinen fleckenartigen Strukturen im Kern (nuclear speckles), was bei ihnen durch RS Domäne (Arginin/Serin Dipeptid Wiederholungen) zustande kommt (Hedley, Amrein, and Maniatis, 1995). Diese nuclear speckles wurden auch bei RBM4 beobachtet, wobei ihm diese Motive fehlen. Es muss also eine Domäne existieren, die hierfür verantwortlich ist und ebenfalls in der CAD liegt (Lai et al., 2003).

In Abbildung 24 konnten wir mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz die subzelluläre Lokalisation von RBM4 in HeLa-Zellen darstellen. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskopes. Deutlich erkennt man die Lokalisation des Proteins im Zellkern mit Aussparung der Nucleoli, wobei nach längerer Expositionszeit auch im Zytoplasma eine leichte Färbung zu sehen ist. Eine

zytoplasmatische Lokalisation lässt vermuten, dass dem RBM4 neben seiner Rolle als Spleissregulator noch weitere Funktionen zukommen könnten. Beispielsweise könnte es beim RNA-Export aus dem Zellkern eine Rolle spielen. Auch anhand verschiedener Mutationsstudien der RNA-bindenden Motive (Mc Neil et al., 2001) werden weitere Funktionen von RBM4 vermutet. So ist es scheinbar bei der Entwicklung von bestimmten Geweben wichtig und könnte zur zeitlichen Regulation von Entwicklungsabläufen beitragen.

7.5 Untersuchungen zur Interaktion zwischen RBM4 und EBNA2

Dr. Thomas Dobner von der Universität Regensburg konnte in einem yeast-two-hybrid-screen mit EBNA2 als Fängerprotein 5 Klone des RBM4A-Proteins unterschiedlicher Länge identifizieren, was einen ersten Hinweis auf die Bindung dieser beiden Proteine gab. Die Ergebnisse dieses Screenings müssen jedoch immer *in vitro* und - wenn möglich- auch *in vivo* verifiziert werden, da hierbei häufig falsch-positive Ergebnisse auftreten. Der Nachweis, dass RBM4 in den gleichen Zellen vorhanden ist, die auch primäre Zielzellen von EBNA2 sind, wurde in dieser Arbeit erbracht. Allerdings müssen die beiden Proteine auch im selben Zellkompartiment vorhanden sein, um aneinander binden zu können. Durch eine indirekte Immunfluoreszenz waren wir in der Lage, die Kolokalisation von RBM4 und EBNA2 darzustellen und damit einen weiteren Hinweis auf die Interaktion dieser beiden Proteine zu liefern (siehe Abb. 25). Hierbei wurde das RBM4-Protein durch seinen TRITC-gekoppelten Sekundärantikörper rot, das EBNA2 durch seinen GFP-Fusionsanteil grün gefärbt. Bei einer Überlagerung der beiden Bilder kommt es zu der Mischfarbe gelb, was die Kolokalisation der beiden Proteine bestätigt. Auch hier wird wiederum deutlich, dass das RBM4, wie EBNA2, überwiegend im Kern, ausschliesslich der Nucleoli, lokalisiert ist. Auch diese Kolokalisation gab uns wiederum nur ein Hinweis, jedoch noch keine Bestätigung für die Bindung der beiden Proteine aneinander. Zudem wurde dieses Experiment auch von Frau E. Kremmer von der GSF in München zu Kontrolle durchgeführt, wobei die Daten durch ein konfokales Lasermikroskop ausgewertet wurden. Sie konnte die von uns

beschriebene Kolo-kalisation anhand ihrer Ergebnisse nicht bestätigen, daher bleibt fraglich, ob die beiden Proteine wirklich im selben Zellkompartiment liegen.

Deshalb testeten wir anschliessend, ob die Bindung der beiden Proteine *in vivo* anhand einer Co-Immunpräzipitation zu verifizieren sei. Wir versuchten, in COS-1-Zellen, die mit pSG5-EBNA2-wt transfiziert wurden, die Bindung mit dem endogenen RBM4 nachzuweisen. Die Präzipitation erfolgte einerseits mit dem RBM4 spezifischen monoklonalen Antikörper 6E10, andererseits mit einem irrelevanten Kontrollantikörper (hier der α -Borna-Antikörper). Eventuell kopräzipitiertes EBNA2 sollte anschliessend mit dem EBNA2-spezifischen monoklonalen Antikörper R3 gezeigt werden.

Abbildung 26 zeigt das Ergebnis der Co-Immunpräzipitation. Im „Input“ (linke Spur) ist das EBNA2-Protein auf der richtigen Laufhöhe bei ca. 85 kDa zu sehen. In der rechten Spur (eigentliche Co-Immunpräzipitation) ist EBNA2 ebenfalls durch den spezifischen monoklonalen Antikörper R3 detektiert worden. Da allerdings auch in der Kontroll-Immunpräzipitation eine Bande auf gleicher Laufhöhe erscheint, und dies eigentlich die Negativ-Kontrolle ohne Bande sein müsste, kann dieses Experiment nicht eindeutig ausgewertet werden. Da die Bande der EBNA2-Immunpräzipitation deutlich stärker als die der Negativkontrolle erscheint, kann angenommen werden, dass lediglich die Versuchsbedingungen für das positive Signal bei der Kontrolle verantwortlich sind, wobei die eigentliche Immunpräzipitation gelang. Wahrscheinlich bindet das EBNA-Protein nicht nur an seinen spezifischen Antikörper, sondern auch sehr leicht an die Protein-G-Sepharose. Zudem weiss man beispielsweise auch von DP103, dass eine Co-Immunpräzipitation kaum nachweisbar ist, dieses Protein allerdings mit Sicherheit als Interaktionspartner von EBNA2 angesprochen werden kann. Da allerdings auch bei späteren Versuchen mit stringenteren Waschungen keine Co-Immunpräzipitation gelang, ist es weiterhin fraglich, ob die beiden Proteine tatsächlich aneinander binden. Um ein eindeutiges Ergebnis und damit einen tatsächlichen Beweis der Interaktion der beiden Proteine zu erhalten, könnte in späteren Experimenten nocheinmal versucht werden, die Salzkonzentration beim Waschen der Protein-G-Sepharose zu verändern, beziehungsweise sie so zu erhöhen, dass eine Bindung von EBNA2 an die Protein-G-

Sepharose ausgeschlossen wird, gleichzeitig aber ein positives Signal erscheint, also die möglicherweise sehr labile Bindung von RBM4 und EBNA2 nicht zerstört wird.

8 Literaturverzeichnis

- Abbot, S. D., Rowe, M., Cadwallader, K., Ricksten, A., Gordon, J., Wang, F., Rymo, L., and Rickinson, A. B. (1990). Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 induces expression of the virus-encoded latent membrane protein. *J Virol* **64**(5), 2126-34.
- Babcock, G. J., Decker, L. L., Volk, M., and Thorley-Lawson, D. A. (1998). EBV persistence in memory B cells in vivo. *Immunity* **9**(3), 395-404.
- Baer, R., Bankier, A. T., Biggin, M. D., Deininger, P. L., Farrell, P. J., Gibson, T. J., Hatfull, G., Hudson, G. S., Satchwell, S. C., Seguin, C., and et al. (1984). DNA sequence and expression of the B95-8 Epstein-Barr virus genome. *Nature* **310**(5974), 207-11.
- Barth, S., Liss, M., Voss, M. D., Dobner, T., Fischer, U., Meister, G., and Grässer, F. A. (2003). Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 binds via its methylated arginine-glycine repeat to the survival motor neuron protein. *J Virol* **77**(8), 5008-13.
- Bauer, G., Hofler, P., and Zur Hausen, H. (1982). Epstein-Barr virus induction by a serum factor. I. Induction and cooperation with additional inducers. *Virology* **121**(1), 184-94.
- Beisel, C., Tanner, J., Matsuo, T., Thorley-Lawson, D., Kezdy, F., and Kieff, E. (1985). Two major outer envelope glycoproteins of Epstein-Barr virus are encoded by the same gene. *J Virol* **54**(3), 665-74.
- Bernert, G., Fountoulakis, M., and Lubec, G. (2002). Manifold decreased protein levels of matrin 3, reduced motor protein HMP and hIark in fetal Down's syndrome brain. *Proteomics* **2**(12), 1752-7.
- Brousset, P., Knecht, H., Rubin, B., Drouet, E., Chittal, S., Meggetto, F., Saati, T. A., Bachmann, E., Denoyel, G., Sergeant, A., et al. (1993). Demonstration of Epstein-Barr virus replication in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease. *Blood* **82**(3), 872-6.
- Buell, P. (1973). Race and place in the etiology of nasopharyngeal cancer: a study based on California death certificates. *Int J Cancer* **11**(2), 268-72.
- Burgstahler, R., Kempkes, B., Steube, K., and Lipp, M. (1995). Expression of the chemokine receptor BLR2/EBI1 is specifically transactivated by Epstein-Barr virus nuclear antigen 2. *Biochem Biophys Res Commun* **215**(2), 737-43.
- Burkitt, D. (1958). A sarcoma involving the jaws in African children. *Br J Surg* **46**(197), 218-23.

- Calender, A., Billaud, M., Aubry, J. P., Banchereau, J., Vuillaume, M., and Lenoir, G. M. (1987). Epstein-Barr virus (EBV) induces expression of B-cell activation markers on in vitro infection of EBV-negative B-lymphoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**(22), 8060-4.
- Chaganti, R. S., Jhanwar, S. C., Koziner, B., Arlin, Z., Mertelsmann, R., and Clarkson, B. D. (1983). Specific translocations characterize Burkitt's-like lymphoma of homosexual men with the acquired immunodeficiency syndrome. *Blood* **61**(6), 1265-8.
- Chevallier-Greco, A., Manet, E., Chavrier, P., Mosnier, C., Daillie, J., and Sergeant, A. (1986). Both Epstein-Barr virus (EBV)-encoded trans-acting factors, EB1 and EB2, are required to activate transcription from an EBV early promoter. *Embo J* **5**(12), 3243-9.
- Coffey, A. J., Brooksbank, R. A., Brandau, O., Oohashi, T., Howell, G. R., Bye, J. M., Cahn, A. P., Durham, J., Heath, P., Wray, P., Pavitt, R., Wilkinson, J., Leversha, M., Huckle, E., Shaw-Smith, C. J., Dunham, A., Rhodes, S., Schuster, V., Porta, G., Yin, L., Serafini, P., Sylla, B., Zollo, M., Franco, B., Bolino, A., Seri, M., Lanyi, A., Davis, J. R., Webster, D., Harris, A., Lenoir, G., de St Basile, G., Jones, A., Behloradsky, B. H., Achatz, H., Murken, J., Fassler, R., Sumegi, J., Romeo, G., Vaudin, M., Ross, M. T., Meindl, A., and Bentley, D. R. (1998). Host response to EBV infection in X-linked lymphoproliferative disease results from mutations in an SH2-domain encoding gene. *Nat Genet* **20**(2), 129-35.
- Cohen, J. I., Picchio, G. R., and Mosier, D. E. (1992). Epstein-Barr virus nuclear protein 2 is a critical determinant for tumor growth in SCID mice and for transformation in vitro. *J Virol* **66**(12), 7555-9.
- Cordier, M., Calender, A., Billaud, M., Zimmer, U., Rousselet, G., Pavlish, O., Banchereau, J., Tursz, T., Bornkamm, G., and Lenoir, G. M. (1990). Stable transfection of Epstein-Barr virus (EBV) nuclear antigen 2 in lymphoma cells containing the EBV P3HR1 genome induces expression of B-cell activation molecules CD21 and CD23. *J Virol* **64**(3), 1002-13.
- Countryman, J., and Miller, G. (1985). Activation of expression of latent Epstein-Barr herpesvirus after gene transfer with a small cloned subfragment of heterogeneous viral DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**(12), 4085-9.
- Croce, C. M., and Nowell, P. C. (1985). Molecular basis of human B cell neoplasia. *Blood* **65**(1), 1-7.
- Deacon, E. M., Pallesen, G., Niedobitek, G., Crocker, J., Brooks, L., Rickinson, A. B., and Young, L. S. (1993). Epstein-Barr virus and Hodgkin's disease: transcriptional analysis of virus latency in the malignant cells. *J Exp Med* **177**(2), 339-49.

- Epstein, M. A., Achong, B. G., and Barr, Y. M. (1964). Virus Particles in Cultured Lymphoblasts from Burkitt's Lymphoma. *Lancet* **15**, 702-3.
- Fahraeus, R., Fu, H. L., Ernberg, I., Finke, J., Rowe, M., Klein, G., Falk, K., Nilsson, E., Yadav, M., Busson, P., and et al. (1988). Expression of Epstein-Barr virus-encoded proteins in nasopharyngeal carcinoma. *Int J Cancer* **42**(3), 329-38.
- Farrell, P. J. (1995). Epstein-Barr virus immortalizing genes. *Trends Microbiol* **3**(3), 105-9.
- Feederle, R., Kost, M., Baumann, M., Janz, A., Drouet, E., Hammerschmidt, W., and Delecluse, H. J. (2000). The Epstein-Barr virus lytic program is controlled by the co-operative functions of two transactivators. *Embo J* **19**(12), 3080-9.
- Gerber, P., Lucas, S., Nonoyama, M., Perlin, E., and Goldstein, L. I. (1972). Oral excretion of Epstein-Barr virus by healthy subjects and patients with infectious mononucleosis. *Lancet* **2**(7785), 988-9.
- Gergely, L., Klein, G., and Ernberg, I. (1971). Host cell macromolecular synthesis in cells containing EBV-induced early antigens, studied by combined immunofluorescence and radioautography. *Virology* **45**(1), 22-9.
- Geser, A., Lenoir, G. M., Anvret, M., Bornkamm, G., Klein, G., Williams, E. H., Wright, D. H., and De-The, G. (1983). Epstein-Barr virus markers in a series of Burkitt's lymphomas from the West Nile District, Uganda. *Eur J Cancer Clin Oncol* **19**(10), 1393-404.
- Gluzman, Y. (1981). SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell* **23**(1), 175-82.
- Golden, H. D., Chang, R. S., Prescott, W., Simpson, E., and Cooper, T. Y. (1973). Leukocyte-transforming agent: prolonged excretion by patients with mononucleosis and excretion by normal individuals. *J Infect Dis* **127**(4), 471-3.
- Grässer, F. A., Haiss, P., Gottel, S., and Mueller Lantsch, N. (1991). Biochemical characterization of Epstein-Barr virus nuclear antigen 2A. *J Virol* **65**(7), 3779-88.
- Grässer, F. A., Murray, P. G., Kremmer, E., Klein, K., Remberger, K., Feiden, W., Reynolds, G., Niedobitek, G., Young, L. S., and Mueller Lantsch, N. (1994). Monoclonal antibodies directed against the Epstein-Barr virus-encoded nuclear antigen 1 (EBNA1): immunohistologic detection of EBNA1 in the malignant cells of Hodgkin's disease. *Blood* **84**(11), 3792-8.

- Grässer, F. A., Sauder, C., Haiss, P., Hille, A., König, S., Götte, S., Kremmer, E., Leinenbach, H. P., Zeppezauer, M., and Müller-Lantzsch, N. (1993). Immunological detection of proteins associated with the Epstein-Barr virus nuclear antigen 2A. *Virology* **195**, 550-560 .
- Gratama, J. W., Oosterveer, M. A., Zwaan, F. E., Lepoutre, J., Klein, G., and Ernberg, I. (1988). Eradication of Epstein-Barr virus by allogeneic bone marrow transplantation: implications for sites of viral latency. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**(22), 8693-6.
- Greenspan, J. S., Greenspan, D., Lennette, E. T., Abrams, D. I., Conant, M. A., Petersen, V., and Freese, U. K. (1985). Replication of Epstein-Barr virus within the epithelial cells of oral "hairy" leukoplakia, an AIDS-associated lesion. *N Engl J Med* **313**(25), 1564-71.
- Grossman, S. R., Johannsen, E., Tong, X., Yalamanchili, R., and Kieff, E. (1994). The Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 transactivator is directed to response elements by the J kappa recombination signal binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(16), 7568-72.
- Grundhoff, A. T., Kremmer, E., Tureci, O., Glieden, A., Gindorf, C., Atz, J., Mueller Lantzsch, N., Schubach, W. H., and Grasser, F. A. (1999a). Characterization of DP103, a novel DEAD box protein that binds to the Epstein-Barr virus nuclear proteins EBNA2 and EBNA3C. *J Biol Chem* **274**(27), 19136-44.
- Grundhoff, A. T., Kremmer, E., Tureci, O., Glieden, A., Gindorf, C., Atz, J., Mueller-Lantzsch, N., Schubach, W. H., and Grasser, F. A. (1999b). Characterization of DP103, a novel DEAD box protein that binds to the Epstein-Barr virus nuclear proteins EBNA2 and EBNA3C. *J Biol Chem* **274**(27), 19136-44.
- Gulesserian, T., Engidawork, E., Fountoulakis, M., and Lubec, G. (2003). Decreased brain levels of Lupus La protein and increased U5 small ribonucleoprotein-specific 40 kDa protein in fetal Down syndrome. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* **49**(5), 733-8.
- Hadar, T., Rahima, M., Kahan, E., Sidi, J., Rakowsky, E., Sarov, B., and Sarov, I. (1986). Significance of specific Epstein-Barr virus IgA and elevated IgG antibodies to viral capsid antigens in nasopharyngeal carcinoma patients. *J Med Virol* **20**(4), 329-39.
- Hammerschmidt, W., and Sugden, B. (1988). Identification and characterization of oriLyt, a lytic origin of DNA replication of Epstein-Barr virus. *Cell* **55**(3), 427-33.
- Hammerschmidt, W., and Sugden, B. (1989). Genetic analysis of immortalizing functions of Epstein-Barr virus in human B lymphocytes. *Nature* **340**(6232), 393-7.

- Hanto, D. W., Sakamoto, K., Purtilo, D. T., Simmons, R. L., and Najarian, J. S. (1981). The Epstein-Barr virus in the pathogenesis of posttransplant lymphoproliferative disorders. Clinical, pathologic, and virologic correlation. *Surgery* **90**(2), 204-13.
- Hayward, S. D., and Kieff, E. (1977). DNA of Epstein-Barr virus. II. Comparison of the molecular weights of restriction endonuclease fragments of the DNA of Epstein-Barr virus strains and identification of end fragments of the B95-8 strain. *J Virol* **23**(2), 421-9.
- Hedley, M. L., Amrein, H., and Maniatis, T. (1995). An amino acid sequence motif sufficient for subnuclear localization of an arginine/serine-rich splicing factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(25), 11524-8.
- Henderson, A., Ripley, S., Heller, M., and Kieff, E. (1983). Chromosome site for Epstein-Barr virus DNA in a Burkitt tumor cell line and in lymphocytes growth-transformed in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**(7), 1987-91.
- Henkel, T., Ling, P. D., Hayward, S. D., and Peterson, M. G. (1994). Mediation of Epstein-Barr virus EBNA2 transactivation by recombination signal-binding protein J kappa. *Science* **265**(5168), 92-5.
- Henle, G., and Henle, W. (1967). Immunofluorescence, interference, and complement fixation technics in the detection of the herpes-type virus in Burkitt tumor cell lines. *Cancer Res* **27**(12), 2442-6.
- Henle, G., and Henle, W. (1976). Epstein-Barr virus-specific IgA serum antibodies as an outstanding feature of nasopharyngeal carcinoma. *Int J Cancer* **17**(1), 1-7.
- Henle, G., Henle, W., and Diehl, V. (1968). Relation of Burkitt's tumor-associated herpes-type virus to infectious mononucleosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **59**(1), 94-101.
- Herbst, H., Dallenbach, F., Hummel, M., Niedobitek, G., Pileri, S., Muller-Lantzsch, N., and Stein, H. (1991). Epstein-Barr virus latent membrane protein expression in Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(11), 4766-70.
- Hirayama, T., and Ito, Y. (1981). A new view of the etiology of nasopharyngeal carcinoma. *Prev Med* **10**(5), 614-22.
- Höck, J., Weinmann, L., Ender, C., Rüdell, S., Kremmer, E., Raabe, M., Urlaub, H., Meister, G. (2007). Proteomic and functional analysis of Argonaute-containing mRNA-protein complexes in human cells. *Embo Rep* **8**(11), 1052-60.

- Hsieh, J. J., and Hayward, S. D. (1995). Masking of the CBF1/RBPJ kappa transcriptional repression domain by Epstein-Barr virus EBNA2. *Science* **268**(5210), 560-3.
- Hsieh, J. J., Zhou, S., Chen, L., Young, D. B., and Hayward, S. D. (1999). CIR, a corepressor linking the DNA binding factor CBF1 to the histone deacetylase complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(1), 23-8.
- Hudewentz, J., Delius, H., Freese, U. K., Zimber, U., and Bornkamm, G. W. (1982). Two distant regions of the Epstein-Barr virus genome with sequence homologies have the same orientation and involve small tandem repeats. *Embo J* **1**(1), 21-6.
- Ito, Y., Yanase, S., Tokuda, H., Kishishita, M., Ohigashi, H., Hirota, M., and Koshimizu, K. (1983). Epstein-Barr virus activation by tung oil, extracts of *Aleurites fordii* and its diterpene ester 12-O-hexadecanoyl-16-hydroxyphorbol-13-acetate. *Cancer Lett* **18**(1), 87-95.
- Jackson, F. R., Banfi, S., Guffanti, A., and Rossi, E. (1997). A novel zinc finger-containing RNA-binding protein conserved from fruitflies to humans. *Genomics* **41**(3), 444-52.
- Jones, J. F., Shurin, S., Abramowsky, C., Tubbs, R. R., Sciotto, C. G., Wahl, R., Sands, J., Gottman, D., Katz, B. Z., and Sklar, J. (1988). T-cell lymphomas containing Epstein-Barr viral DNA in patients with chronic Epstein-Barr virus infections. *N Engl J Med* **318**(12), 733-41.
- Kaiser, C., Laux, G., Eick, D., Jochner, N., Bornkamm, G. W., and Kempkes, B. (1999). The proto-oncogene c-myc is a direct target gene of Epstein-Barr virus nuclear antigen 2. *J Virol* **73**(5), 4481-4.
- Kalter, S., and Lopez-Berestein, G. (1985). Acquired immune deficiency syndrome in a patient with prior sarcoidosis: case report with monocyte function studies. *Tex Med* **81**(9), 44-6.
- Kar, A., Havlioglu, N., Tarn, W. Y., and Wu, J. Y. (2006). RBM4 interacts with an intronic element and stimulates tau exon 10 inclusion. *J Biol Chem* **281**(34), 24479-88.
- Kaye, K. M., Izumi, K. M., and Kieff, E. (1993). Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 is essential for B-lymphocyte growth transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(19), 9150-4.
- Kieff, E. (1996). Epstein-Barr Virus and its replication. In Fields, B., Knipe, D. and Howley, P. (eds.), *Fields Virology*, Philadelphia, Lippincott-Raven.

- Kikuta, H., Taguchi, Y., Tomizawa, K., Kojima, K., Kawamura, N., Ishizaka, A., Sakiyama, Y., Matsumoto, S., Imai, S., Kinoshita, T., and et al. (1988). Epstein-Barr virus genome-positive T lymphocytes in a boy with chronic active EBV infection associated with Kawasaki-like disease. *Nature* **333**(6172), 455-7.
- Kintner, C. R., and Sugden, B. (1979). The structure of the termini of the DNA of Epstein-Barr virus. *Cell* **17**(3), 661-71.
- Knecht, H., Bachmann, E., Brousset, P., Sandvej, K., Nadal, D., Bachmann, F., Odermatt, B.F., Delsol, G. and Pallesen, G. (1993). Deletions within the LMP1 oncogene of Epstein-Barr virus are clustered in Hodgkin's disease and identical to those observed in nasopharyngeal carcinoma. *Blood* **82**(10), 2937-42.
- Knecht, H., Bachmann, E., Joske, D. J., Sahli, R., Emery Goodman, A., Casanova, J. L., Zilic, M., Bachmann, F., Odermatt, B. F. (1993). Molecular analysis of the LMP (latent membrane protein) oncogene in Hodgkin's disease. *Leukemia* **7**(4), 580-5.
- Kojima, S., Matsumoto, K., Hirose, M., Shimada, M., Nagano, M., Shigeyoshi, Y., Hoshino, S., Ui-Tei, K., Saigo, K., Green, C. B., Sakaki, Y., and Tei, H. (2007). LARK activates posttranscriptional expression of an essential mammalian clock protein, PERIOD1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(6), 1859-64.
- Kremmer, E., Kranz, B., Hille, A., Klein, K., Eulitz, M., Hoffmann-Fezer, G., Feiden, W., Herrmann, K., Delecluse, H.-J., Delsol, G., Bornkamm, G. W., Mueller-Lantzsch, N., and Grässer, F. A. (1995). Rat monoclonal antibodies differentiating between the Epstein-Barr virus nuclear antigens 2A (EBNA2A) and 2B (EBNA2B). *Virology* **208**, 336-42.
- Lai, M. C., Kuo, H. W., Chang, W. C., and Tarn, W. Y. (2003). A novel splicing regulator shares a nuclear import pathway with SR proteins. *Embo J* **22**(6), 1359-69.
- Laux, G., Dugrillon, F., Eckert, C., Adam, B., Zimmer Strobl, U., and Bornkamm, G. W. (1994). Identification and characterization of an Epstein-Barr virus nuclear antigen 2-responsive cis element in the bidirectional promoter region of latent membrane protein and terminal protein 2 genes. *J Virol* **68**(11), 6947-58.
- Lenoir, G. M., Vuillaume, M., and Bonnardel, C. (1985). The use of lymphomatous and lymphoblastoid cell lines in the study of Burkitt's lymphoma. *IARC Sci Publ*(60), 309-18.

- Lin, J. C., Hsu, M., and Tarn, W. Y. (2007). Cell stress modulates the function of splicing regulatory protein RBM4 in translation control. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(7), 2235-40.
- Lin, J. C., and Tarn, W. Y. (2005). Exon selection in alpha-tropomyosin mRNA is regulated by the antagonistic action of RBM4 and PTB. *Mol Cell Biol* **25**(22), 10111-21.
- Lindahl, T., Adams, A., Bjursell, G., Bornkamm, G. W., Kaschka-Dierich, C., and Jehn, U. (1976). Covalently closed circular duplex DNA of Epstein-Barr virus in a human lymphoid cell line. *J Mol Biol* **102**(3), 511-30.
- Lindahl, T., Klein, G., Reedman, B. M., Johansson, B., and Singh, S. (1974). Relationship between Epstein-Barr virus (EBV) DNA and the EBV-determined nuclear antigen (EBNA) in Burkitt lymphoma biopsies and other lymphoproliferative malignancies. *Int J Cancer* **13**(6), 764-72.
- Ling, P. D., and Hayward, S. D. (1995). Contribution of conserved amino acids in mediating the interaction between EBNA2 and CBF1/RBPJk. *J Virol* **69**(3), 1944-50.
- Maniatis, T., Sambrook J. and Fritsch E.F. (1989). "*Molecular Cloning*, a laboratory manual 2nd ed." Cold Spring Harbor, Laboratory Press 1-3.
- Manolov, G., and Manolova, Y. (1972). Marker band in one chromosome 14 from Burkitt lymphomas. *Nature* **237**(5349), 33-4.
- Markus, M. A., Heinrich, B., Raitskin, O., Adams, D. J., Mangs, H., Goy, C., Ladomery, M., Sperling, R., Stamm, S., and Morris, B. J. (2006). WT1 interacts with the splicing protein RBM4 and regulates its ability to modulate alternative splicing in vivo. *Exp Cell Res* **312**(17), 3379-88.
- Markus, M. A., and Morris, B. J. (2006). Lark is the splicing factor RBM4 and exhibits unique subnuclear localization properties. *DNA Cell Biol* **25**(8), 457-64.
- Markus, M. A., and Morris, B. J. (2009). RBM4: A multifunctional RNA-binding protein. *Int J Biochem Cell* **41**(4), 740-3.
- McNeil, G. P., Schroeder, A. J., Roberts, M. A., and Jackson, F. R. (2001). Genetic analysis of functional domains within the Drosophila LARK RNA-binding protein. *Genetics* **159**(1), 229-40.
- McNeil, G. P., Smith, F., and Galioto, R. (2004). The Drosophila RNA-binding protein Lark is required for the organization of the actin cytoskeleton and Huli tai shao localization during oogenesis. *Genesis* **40**(2), 90-100.

- McNeil, G. P., Zhang, X., Roberts, M., and Jackson, F. R. (1999). Maternal function of a retroviral-type zinc-finger protein is essential for *Drosophila* development. *Dev Genet* **25**(4), 387-96.
- Minarovits, J., Hu, L. F., Imai, S., Harabuchi, Y., Kataura, A., Minarovits-Kormuta, S., Osato, T., and Klein, G. (1994). Clonality, expression and methylation patterns of the Epstein-Barr virus genomes in lethal midline granulomas classified as peripheral angiocentric T cell lymphomas. *J Gen Virol* **75** (Pt 1), 77-84.
- Miyashita, E. M., Yang, B., Babcock, G. J., and Thorley-Lawson, D. A. (1997). Identification of the site of Epstein-Barr virus persistence in vivo as a resting B cell. *J Virol* **71**(7), 4882-91.
- Miyashita, E. M., Yang, B., Lam, K. M., Crawford, D. H., and Thorley-Lawson, D. A. (1995). A novel form of Epstein-Barr virus latency in normal B cells in vivo. *Cell* **80**(4), 593-601.
- Modrow, S., Falke, D., Truyen, U. (2003). Molekulare Virologie. *Spektrum Verlag, HD*
- Morgan, D. G., Niederman, J. C., Miller, G., Smith, H. W., and Dowaliby, J. M. (1979). Site of Epstein-Barr virus replication in the oropharynx. *Lancet* **2**(8153), 1154-7.
- Mueller-Lantzsch, N., Lenoir, G. M., Sauter, M., Takaki, K., Bechet, J. M., Kuklik-Roos, C., Wunderlich, D., and Bornkamm, G. W. (1985). Identification of the coding region for a second Epstein-Barr virus nuclear antigen (EBNA 2) by transfection of cloned DNA fragments. *Embo J* **4**(7), 1805-11.
- Newby, L. M., and Jackson, F. R. (1993). A new biological rhythm mutant of *Drosophila melanogaster* that identifies a gene with an essential embryonic function. *Genetics* **135**(4), 1077-90.
- Newby, L. M., and Jackson, F. R. (1996). Regulation of a specific circadian clock output pathway by lark, a putative RNA-binding protein with repressor activity. *J Neurobiol* **31**(1), 117-28.
- Niedobitek, G., Agathangelou, A., Herbst, H., Whitehead, L., Wright, D. H., and Young, L. S. (1997). Epstein-Barr virus (EBV) infection in infectious mononucleosis: virus latency, replication and phenotype of EBV-infected cells. *J Pathol* **182**(2), 151-9.
- Nonoyama, M., Huang, C. H., Pagano, J. S., Klein, G., and Singh, S. (1973). DNA of Epstein-Barr virus detected in tissue of Burkitt's lymphoma and nasopharyngeal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **70**(11), 3265-8.

- Pallesen, G., Hamilton-Dutoit, S. J., Rowe, M., and Young, L. S. (1991). Expression of Epstein-Barr virus latent gene products in tumour cells of Hodgkin's disease. *Lancet* **337**(8737), 320-2.
- Patel, M., Leever, S. J., and Brickell, P. M. (1990). Regulation of c-fgr proto-oncogene expression in Epstein-Barr virus infected B-cell lines. *Int J Cancer* **45**(2), 342-6.
- Petti, L., Sample, C., and Kieff, E. (1990). Subnuclear localization and phosphorylation of Epstein-Barr virus latent infection nuclear proteins. *Virology* **176**(2), 563-74.
- Pritchett, R. F., Hayward, S. D., and Kieff, E. D. (1975). DNA of Epstein-Barr virus. I. Comparative studies of the DNA of Epstein-Barr virus from HR-1 and B95-8 cells: size, structure, and relatedness. *J Virol* **15**(3), 556-9.
- Purtilo, D. T. (1981). Immunopathology of the X-linked lymphoproliferative syndrome. *Haematol Blood Transfus* **26**, 207-14.
- Raab-Traub, N., Hood, R., Yang, C. S., Henry, B., 2nd, and Pagano, J. S. (1983). Epstein-Barr virus transcription in nasopharyngeal carcinoma. *J Virol* **48**(3), 580-90.
- Rabson, M., Gradoville, L., Heston, L., and Miller, G. (1982). Non-immortalizing P3J-HR-1 Epstein-Barr virus: a deletion mutant of its transforming parent, Jijoye. *J Virol* **44**(3), 834-44.
- Radkov, S. A., Bain, M., Farrell, P. J., West, M., Rowe, M., and Allday, M. J. (1997). Epstein-Barr virus EBNA3C represses Cp, the major promoter for EBNA expression, but has no effect on the promoter of the cell gene CD21. *J Virol* **71**(11), 8552-62.
- Rawlins, D. R., Milman, G., Hayward, S. D., and Hayward, G. S. (1985). Sequence-specific DNA binding of the Epstein-Barr virus nuclear antigen (EBNA-1) to clustered sites in the plasmid maintenance region. *Cell* **42**(3), 859-68.
- Rickinson, A. B., and Kieff, E. (1996). Epstein-Barr Virus. In Fields, B. N., Knipe, D. M. and Howley, P. M., (eds.), *Virology*. Vol. 2, pp. 2397-2446. 2 vols. Lippincott-Raven, Philadelphia.
- Rickinson, A. B., Young, L. S., and Rowe, M. (1987). Influence of the Epstein-Barr virus nuclear antigen EBNA 2 on the growth phenotype of virus-transformed B cells. *J Virol* **61**(5), 1310-7.
- Roizman, B. (1990). Whither herpesviruses? *Adv Exp Med Biol* **278**, 285-91.

- Rooney, C., Howe, J. G., Speck, S. H., and Miller, G. (1989). Influence of Burkitt's lymphoma and primary B cells on latent gene expression by the nonimmortalizing P3J-HR-1 strain of Epstein-Barr virus. *J Virol* **63**(4), 1531-9.
- Rowe, D., Heston, L., Metlay, J., and Miller, G. (1985). Identification and expression of a nuclear antigen from the genomic region of the Jijoye strain of Epstein-Barr virus that is missing in its nonimmortalizing deletion mutant, P3HR-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**(21), 7429-33.
- Rowe, D. T., and Clarke, J. R. (1989). The type-specific epitopes of the Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 are near the carboxy terminus of the protein. *J Gen Virol* **70** (Pt 5), 1217-29.
- Rowe, M., Evans, H. S., Young, L. S., Hennessy, K., Kieff, E., and Rickinson, A. B. (1987). Monoclonal antibodies to the latent membrane protein of Epstein-Barr virus reveal heterogeneity of the protein and inducible expression in virus-transformed cells. *J Gen Virol* **68**(Pt 6), 1575-86.
- Sample, J., Young, L., Martin, B., Chatman, T., Kieff, E., and Rickinson, A. (1990). Epstein-Barr virus types 1 and 2 differ in their EBNA-3A, EBNA-3B, and EBNA-3C genes. *J Virol* **64**(9), 4084-92.
- Sauder, C., Muller, A., Cubitt, B., Mayer, J., Steinmetz, J., Trabert, W., Ziegler, B., Wanke, K., Mueller-Lantzsch, N., de la Torre, J. C., and Grasser, F. A. (1996). Detection of Borna disease virus (BDV) antibodies and BDV RNA in psychiatric patients: evidence for high sequence conservation of human blood-derived BDV RNA. *J Virol* **70**(11), 7713-24.
- Sayos, J., Wu, C., Morra, M., Wang, N., Zhang, X., Allen, D., van Schaik, S., Notarangelo, L., Geha, R., Roncarolo, M. G., Oettgen, H., De Vries, J. E., Aversa, G., and Terhorst, C. (1998). The X-linked lymphoproliferative-disease gene product SAP regulates signals induced through the co-receptor SLAM. *Nature* **395**(6701), 462-9.
- Schepers, A., Pich, D., Mankertz, J., and Hammerschmidt, W. (1993). cis-acting elements in the lytic origin of DNA replication of Epstein-Barr virus. *J Virol* **67**(7), 4237-45.
- Scherer, E., Teske, H. J., Kuwert, E., and Gronemann, A. (1971). [Cytomorphologic studies on the modification by oxygen of the irradiation effect on tissue cultured tumor cells (HeLa cells)]. *Strahlentherapie* **141**(5), 591-8.
- Sixbey, J. W., Nedrud, J. G., Raab-Traub, N., Hanes, R. A., and Pagano, J. S. (1984). Epstein-Barr virus replication in oropharyngeal epithelial cells. *N Engl J Med* **310**(19), 1225-30.

- Smith, P. R., and Griffin, B. E. (1992). Transcription of the Epstein-Barr virus gene EBNA-1 from different promoters in nasopharyngeal carcinoma and B-lymphoblastoid cells. *J Virol* **66**(2), 706-14.
- Sugiura, M., Imai, S., Tokunaga, M., Koizumi, S., Uchizawa, M., Okamoto, K., and Osato, T. (1996). Transcriptional analysis of Epstein-Barr virus gene expression in EBV-positive gastric carcinoma: unique viral latency in the tumour cells. *Br J Cancer* **74**(4), 625-31.
- Sullivan, J. L. (1999). The abnormal gene in X-linked lymphoproliferative syndrome. *Curr Opin Immunol* **11**(4), 431-4.
- Sung, N. S., Kenney, S., Gutsch, D., and Pagano, J. S. (1991). EBNA-2 transactivates a lymphoid-specific enhancer in the BamHI C promoter of Epstein-Barr virus. *J Virol* **65**(5), 2164-9.
- Takada, K., Komano, J., and Imai, S. (1999). [The role of Epstein-Barr virus in oncogenesis]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso* **44**(16), 2565-74.
- Takada, K., Shimizu, N., Sakuma, S., and Ono, Y. (1986). trans activation of the latent Epstein-Barr virus (EBV) genome after transfection of the EBV DNA fragment. *J Virol* **57**(3), 1016-22.
- Tanner, J., Whang, Y., Sample, J., Sears, A., and Kieff, E. (1988). Soluble gp350/220 and deletion mutant glycoproteins block Epstein-Barr virus adsorption to lymphocytes. *J Virol* **62**(12), 4452-64.
- Thorley-Lawson, D. A. (2001). Epstein-Barr virus: exploiting the immune system. *Nat Rev Immunol* **1**(1), 75-82.
- Tomkinson, B., Robertson, E., and Kieff, E. (1993). Epstein-Barr virus nuclear proteins EBNA-3A and EBNA-3C are essential for B-lymphocyte growth transformation. *J Virol* **67**(4), 2014-25.
- Tong, X., Wang, F., Thut, C. J., and Kieff, E. (1995). The Epstein-Barr virus nuclear protein 2 acidic domain can interact with TFIIB, TAF40, and RPA70 but not with TATA-binding protein. *J Virol* **69**(1), 585-8.
- Tong, X., Yalamanchili, R., Harada, S., and Kieff, E. (1994). The EBNA-2 arginine-glycine domain is critical but not essential for B-lymphocyte growth transformation; the rest of region 3 lacks essential interactive domains. *J Virol* **68**(10), 6188-97.
- Trivedi, P., Masucci, M. G., Winberg, G. and Klein, G. (1991). The Epstein-Barr-virus-encoded membrane protein LMP but not the nuclear antigen EBNA-1 induces rejection of transfected murine mammary carcinoma cells. *Int J Cancer* **48**(5), 794-800.

- Uccini, S., Monardo, F., Stoppacciaro, A., Gradilone, A., Agliano, A. M., Faggioni, A., Manzari, V., Vago, L., Costanzi, G., Ruco, L. P., and et al. (1990). High frequency of Epstein-Barr virus genome detection in Hodgkin's disease of HIV-positive patients. *Int J Cancer* **46**(4), 581-5.
- Voss, M. D., Hille, A., Barth, S., Spurk, A., Hennrich, F., Holzer, D., Mueller-Lantzsch, N., Kremmer, E., and Grässer, F. A. (2001). Functional cooperation of Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 and the survival motor neuron protein in transactivation of the viral LMP1 promoter. *J. Virol.* **75**(23), 11781-90.
- Waltzer, L., Logeat, F., Brou, C., Israel, A., Sergeant, A., and Manet, E. (1994). The human J kappa recombination signal sequence binding protein (RBP-J kappa) targets the Epstein-Barr virus EBNA2 protein to its DNA responsive elements. *EMBO J* **13**(23), 5633-8.
- Wang, F., Gregory, C. D., Rowe, M., Rickinson, A. B., Wang, D., Birkenbach, M., Kikutani, H., Kishimoto, T., and Kieff, E. (1987). Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 specifically induces expression of the B-cell activation antigen CD23. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**(10), 3452-6.
- Wang, F., Tsang, S. F., Kurilla, M. G., Cohen, J. I., and Kieff, E. (1990). Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 transactivates latent membrane protein LMP1. *J Virol* **64**(7), 3407-16.
- Waterhouse, D., Carman, W. J., Schottenfeld, D., Gridley, G., and McLean, S. (1996). Cancer incidence in the rural community of Tecumseh, Michigan: a pattern of increased lymphopietic neoplasms. *Cancer* **77**(4), 763-70.
- Woisetschlaeger, M., Jin, X. W., Yandava, C. N., Furmanski, L. A., Strominger, J. L., and Speck, S. H. (1991). Role for the Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 in viral promoter switching during initial stages of infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(9), 3942-6.
- Wu, D. Y., Krumm, A., and Schubach, W. H. (2000). Promotor-specific targeting of human SWi-SNF complex by Epstein-Barr virus nuclear protein 2. *J. Virol.* **74**(19), 8893-8903.
- Yalamanchili, R., Harada, S., and Kieff, E. (1996). The N-terminal half of EBNA2, except for seven prolines, is not essential for primary B-lymphocyte growth transformation. *J Virol* **70**(4), 2468-73.
- Yalamanchili, R., Tong, X., Grossman, S., Johannsen, E., Mosialos, G., and Kieff, E. (1994). Genetic and biochemical evidence that EBNA 2 interaction with a 63-kDa cellular GTG-binding protein is essential for B lymphocyte growth transformation by EBV. *Virology* **204**(2), 634-41.

- Yates, J., Warren, N., Reisman, D., and Sugden, B. (1984). A cis-acting element from the Epstein-Barr viral genome that permits stable replication of recombinant plasmids in latently infected cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**(12), 3806-10.
- Yoshiyama, H., Shimizu, N., and Takada, K. (1995). Persistent Epstein-Barr virus infection in a human T-cell line: unique program of latent virus expression. *Embo J* **14**(15), 3706-11.
- Young, L. S., Dawson, C. W., Clark, D., Rupani, H., Busson, P., Tursz, T., Johnson, A., and Rickinson, A. B. (1988). Epstein-Barr virus gene expression in nasopharyngeal carcinoma. *J Gen Virol* **69** (Pt 5), 1051-65.
- Zhang, X., McNeil, G. P., Hilderbrand-Chae, M. J., Franklin, T. M., Schroeder, A. J., and Jackson, F. R. (2000). Circadian regulation of the lark RNA-binding protein within identifiable neurosecretory cells. *J Neurobiol* **45**(1), 14-29.
- Zimber Strobl, U., Strobl, L. J., Meitinger, C., Hinrichs, R., Sakai, T., Furukawa, T., Honjo, T., and Bornkamm, G. W. (1994). Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 exerts its transactivating function through interaction with recombination signal binding protein RBP-J kappa, the homologue of Drosophila Suppressor of Hairless. *EMBO J* **13**(20), 4973-82.
- Zimber, U., Adldinger, H. K., Lenoir, G. M., Vuillaume, M., Knebel Doeberitz, M. V., Laux, G., Desgranges, C., Wittmann, P., Freese, U. K., Schneider, U., and et al. (1986). Geographical prevalence of two types of Epstein-Barr virus. *Virology* **154**(1), 56-66.
- zur Hausen, H., O'Neill, F. J., Freese, U. K., and Hecker, E. (1978). Persisting oncogenic herpesvirus induced by the tumour promotor TPA. *Nature* **272**(5651), 373-5.
- zur Hausen, H., Schulte-Holthausen, H., Klein, G., Henle, W., Henle, G., Clifford, P., and Santesson, L. (1970). EBV DNA in biopsies of Burkitt tumours and anaplastic carcinomas of the nasopharynx. *Nature* **228**(5276), 1056-8.

9 Anhang

Die Experimente zur Anfertigung der vorliegenden Arbeit wurden am Institut für Virologie des Universitätsklinikums des Saarlandes in Homburg/Saar durchgeführt.

9.1 Publikationen

Einige Ergebnisse dieser Arbeit und anderer bearbeiteter Projekte wurden in folgender Publikation veröffentlicht:

Pfuhl, T., Mamiani, A., Dürr, M., Welter, S., Stieber, J., Ankara, J., Liss, M., Dobner, T., Schmitt, A., Falkai, P., Kremmer, E., Jung, V., Barth, S., Grässer, F.A. (2008), The LARK/RBM4a protein is highly expressed in cerebellum as compared to cerebrum, *Neurosci Lett.* 444 (1) 11-5

9.2 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. F.A. Grässer für die Überlassung des Themas sowie sein Vertrauen, seine stete Diskussionsbereitschaft und die gute Betreuung.

Herrn Prof. Dr. M. Montenarh möchte ich für seine Bereitschaft zur Übernahme des Zweitgutachtens dieser Arbeit danken.

Herrn Prof. Dr. N. Müller-Lantzsch danke ich für die freundliche Aufnahme in seinen Arbeitskreis und die Unterstützung während meiner Arbeit.

Frau Prof. Dr. Elisabeth Kremmer vom Institut für molekulare Immunologie der GSF München danke ich für die Übernahme der Herstellung der monoklonalen Antikörper.

Herrn Dr. Thomas Dobner vom Institut für medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universität Regensburg danke ich für das Überlassen seiner RBM4-Klone für meine Arbeit.

Besonders möchte ich mich bei Herrn Dr. Thorsten Pfuhl, bei Herrn Dipl. Biologe Alfredo Mamiani und bei Frau Dr. Stefanie Barth für ihre stete Diskussions- und Hilfsbereitschaft, Motivation und die Vermittlung vieler Arbeitsmethoden und biologischer Sichtweisen bedanken.

Mein weiterer Dank gilt Frau Ruth Nord für ihre Hilfsbereitschaft bei Problemen mit verschiedenen Arbeitsmethoden.

Bei den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Grässer bedanke ich mich für die gute Zusammenarbeit und für das angenehme Arbeitsklima.

10 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Johanna Stieber
Anschrift: Dr. Kirbs-Strasse 3
66271 Kleinblittersdorf
E-Mail: JohannaStieber@gmail.com
Geburtsdatum und -ort: 26.01.1978, Saarbrücken
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung:

1984 – 1988 Grundschole Rilchingen-Hanweiler
1988 – 1992 Marienschule Saarbrücken
1992 – 1995 Scheffel-Gymnasium Lahr
1995 – 1998 Integriertes Berufliches Gymnasium Lahr
Abschluss: Abitur

Studium:

10/1998 – 01/2004 Justus-Liebig-Universität Giessen
Studienfach: **Veterinärmedizin**

Beruflicher Werdegang:

seit September 2008 Tierarztpraxis für Kleintiere, Susanne Welsch
Bübingen
Januar 2008 – August 2008 Small animal surgery, Companion Care Harlow,
Essex, England

November 2007 – Dezember 2007	Small animal surgery, Best Friends Group Romford, Essex, England
Oktober 2005 - Oktober 2007	Wissenschaftliche Mitarbeit am Institut für Virologie Universitätsklinikum des Saarlandes
Mai 2005 – Oktober 2005	Tierarztpraxis für Kleintiere Susanne Welsch
Juli 2004 - April 2005	Tierärztliche Klinik für Kleintiere Dr. Elke Grotheus

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit unter Anleitung von Prof. Dr. F. A. Grässer und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe.

Homburg, November 2009

Johanna Stieber