

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

**Die Methylierung der Glycin- Arginin- Repetition des  
Epstein- Barr- Virus- kodierten nukleären Antigens 2  
(EBNA2) und assoziierte Proteine**

**Dissertation  
zur Erlangung des Grades  
des Doktors der Naturwissenschaften  
der Medizinischen Fakultät**

**der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES  
2011**

vorgelegt von  
Henrik Groß  
geb. am 13.09.1984 in Saarbrücken

„Der Ursprung der Wissenschaft liegt im Wissen,  
dass wir nichts wissen.“

*Fernando Pessoa*

## Verzeichnis der Abkürzungen

A	Ampere
$\alpha$	anti
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
AP	activating protein
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
BL	Burkitt- Lymphom
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
C-	Carboxy-
CIP	calf intestinal phosphatase
CTAR	C-terminale Aktivierungsregion
Da	Dalton
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonucleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
E.coli	Escherichia coli
EBER	EBV encoded RNA
EBNA	Epstein-Barr Virus nuclear antigen
EBV	Epstein-Barr Virus
ECL	Enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FKS	fötale Kälberserum
h	Stunde
H <sub>2</sub> O(bi)dest	(bi)destilliertes Wasser
HD	Hodgkin Lymphom
hnRNP	Heterogenes nukleäres Ribonukleoprotein
I- $\kappa$ B	Inhibitor von NF $\kappa$ B
IL	Interleukin
IM	infektiöse Mononukleose
IPTG	Isopropylthiogalactosid
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
KLH	

KSHV	Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus
$\lambda$	Wellenlänge [nm]
LB	Luria's Broth
LCL	lymphoblastoide Zelllinie
LMP	Latentes Membranprotein
M	molar
m	Milli-
$\mu$	Mikro
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MCS	Multiple Cloning Site
min	Minute
miR	microRNA
miRNA	microRNA
mut	Mutante
N-	Amino-
NaAc	Natriumacetat
NF $\kappa$ B	Nukleärer Faktor $\kappa$ B
NPC	Nasopharyngealkarzinom
OD	optische Dichte
OVA	Ovalbumin
ori	Ursprung der Plasmidreplikation (origin of replication)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PI3K	Phosphatidyl-inositol-3-kinase
Pox	Peroxidase
pre-miR	precursor microRNA
pri-miR	primary microRNA
PTLD	Post-Transplantations proliferative Erkrankung
RBP $\kappa$	recombination signal binding protein $\kappa$
RISC	RNA induced silencing complex
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
RT	Raumtemperatur
sec	Sekunden
SDS	Natriumdodecylsulfat
SV40	simian virus 40
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat- Ethylendiamintetraacetat
Taq	Thermus aquaticus

TE	Tris- Ethylendiamintetraacetat
TF	Transkriptionsfaktor
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TRAF	Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor assoziierte Faktoren
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
U	Unit (Einheit der Enzymaktivität)
UTR	untranslated region
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen (volume per volume)
V	Volt
w/v	Gewicht pro Volumen (weight per volume)
wt	Wildtyp

---

**Inhaltsverzeichnis:**

Verzeichnis der Abkürzungen.....	3
<b>1. Zusammenfassung.....</b>	<b>1</b>
<b>2. Summary .....</b>	<b>2</b>
<b>3. Einleitung .....</b>	<b>3</b>
3.1. Das Epstein-Barr-Virus (EBV) .....	3
3.2. Der Aufbau des Epstein- Barr- Virus .....	4
3.3. Die EBV-Infektion .....	5
3.4. Das Epstein-Barr-Virus kodierte nukleäre Antigen 2 (EBNA2).....	7
3.5. Protein- Methylierung.....	10
3.6. Protein- Methylierung und Viren.....	11
3.7. Arginin- Methylierung .....	12
3.7.1. Protein- Arginin- Methyltransferasen (PRMTs).....	12
3.7.1.1. Die Methylierungsreaktion.....	13
3.7.2. Citrullin (Deiminierung von Arginin) .....	14
3.8. Die Arginin- Glycin (RG-) Repetition von EBNA2.....	15
3.9. Humane Endogene Retroviren.....	16
3.9.1. Das HERV-K 101 kodierte NP9- Protein .....	17
3.10. Das heterogene nukleäre Ribonukleoprotein K (hnRNP-K).....	18
3.11. Ausgangspunkt und Ziele der Arbeit .....	20
<b>4. Material.....</b>	<b>24</b>
4.1. Geräte 24	
4.2. Chemikalien, Membranen, Filter .....	24
4.3. Puffer und Lösungen .....	26
4.4. Protein-Molekulargewichtsmarker.....	31
4.5. Antikörper .....	31
4.5.1. Primärantikörper .....	31
4.5.2. Sekundärantikörper.....	32
4.6. Zelllinien .....	33
4.7. Bakterienstämme.....	34
4.8. Rekombinante Bakuloviren .....	34
4.9. Enzyme .....	34
4.10. Proteinextrakte .....	34
4.10.1. PRMT5/WD45:.....	34
4.11. Peptide.....	34
4.12. Vektoren und Effektorstrukture .....	35

---

4.12.1.	pSG5:.....	35
4.12.2.	pGex4T1:.....	35
4.12.3.	pSG5 EBNA2 wt:.....	35
4.12.4.	pSG5- EBNA2 –LE.....	35
4.12.5.	pSG5- EBNA2- $\Delta$ 121- 215.....	35
4.12.6.	pSG5- EBNA2 $\Delta$ RG.....	35
4.12.7.	pSG5-EBNA2 $\Delta$ Nco.....	36
4.12.8.	pSG5- EBNA2 $\Delta$ 202-328.....	36
4.12.9.	pSG5- EBNA2 $\Delta$ 341-472.....	36
4.12.10.	pSG5- CBF1:.....	36
4.12.11.	pSG5-NP9:.....	36
4.12.12.	pEGFP- EBNA2:.....	36
4.12.13.	pEGFP- SMN:.....	36
4.12.14.	dsRed-NP9.....	36
4.12.15.	pIVEX2.3- MCS EBNA2.....	37
4.12.16.	pGEX4T1-EBNA2-aa300-400.....	37
4.12.17.	pET28b-His-PRMT1:.....	37
4.12.18.	pET28a+ His-PRMT1-His-hnRNP-K-His-PRMT1.....	37
<b>4.13.</b>	<b>Computersoftware.....</b>	<b>37</b>
<b>4.14.</b>	<b>Kulturmedien für Säugerzellen.....</b>	<b>38</b>
<b>4.15.</b>	<b>Synthetische Oligonukleotide.....</b>	<b>38</b>
<b>5.</b>	<b>Methoden.....</b>	<b>40</b>
<b>5.1.</b>	<b>Methoden eukaryotischer Zellkultur.....</b>	<b>40</b>
5.1.1.	Kultur von B-Zellen in Suspension.....	40
5.1.2.	Kultur von Monolayerzellen.....	40
5.1.3.	Transiente Transfektion eukaryotischer Zellen mit Nanofectin™.....	41
5.1.4.	Radioaktive Markierung eukaryotischer Zellen.....	41
<b>5.2.</b>	<b>Methoden der Bakterienkultur.....</b>	<b>41</b>
5.2.1.	Kultivierung von <i>E. Coli</i> .....	41
5.2.2.	Herstellung kompetenter Bakterien nach der RbCl- Methode.....	42
5.2.3.	Transformation kompetenter Baktierien.....	43
<b>5.3.</b>	<b>DNA- Techniken.....</b>	<b>43</b>
5.3.1.	Agarosegelelektrophorese von DNA- Fragmenten.....	43
5.3.2.	Polymerase- Kettenreaktion (PCR).....	44
5.3.3.	Reverse Transkriptase- PCR (RT- PCR).....	44
5.3.4.	Annealing einzelsträngiger Oligonukleotide.....	44
5.3.5.	Radioaktive Markierung von DNA- Fragmenten mit Klenowfragment.....	45
<b>5.4.</b>	<b>Proteintechniken.....</b>	<b>45</b>
5.4.1.	Herstellung von Gesamtzellextrakten.....	45

5.4.2.	Herstellung nativer Gesamtzellextrakte .....	46
5.4.3.	Herstellung von Kernextrakten .....	46
5.4.4.	Konzentrationsbestimmung von Proteinextrakten .....	47
5.4.5.	SDS- Polyacrylamid- Gelelektrophorese (SDS- Page).....	47
5.4.6.	Herstellung eines SDS- Polyacrylamidgels .....	48
5.4.7.	Coomassie- Färbung .....	49
5.4.8.	Western Blot (Immunoblot).....	50
5.4.8.1.	Proteintransfer .....	50
5.4.9.	Immunologischer Nachweis von membrangebundenen Proteinen .....	51
5.4.10.	Dot Blot Assay .....	51
5.4.11.	Immunfluoreszenzen.....	52
5.4.11.1.	Auswertung von Kolokalisationen.....	52
5.4.12.	(Co-) Immunpräzipitation von Proteinen .....	53
5.4.13.	Rekombinante Genexpression in Bakterien .....	53
5.4.13.1.	GST- Affinitätschromatographie („GST- PullDown“).....	54
5.4.14.	<i>In vitro</i> Translation von Proteinen .....	55
5.4.14.1.	TNT® Coupled Reticulocyte Lysate System .....	55
5.4.14.2.	<i>E.Coli</i> Rapid Translation System 500 (RTS 500) .....	55
5.4.15.	<i>In vitro</i> Methylierung von Proteinen .....	56
5.4.15.1.	Aufbereitung der Proteine.....	56
5.4.15.2.	Methylierungsansatz.....	56
5.4.16.	Methylierung von Proteinen mittels Reticulocytenlysat .....	56
<b>5.5.</b>	<b>Untersuchung von Protein- DNA- Wechselwirkungen .....</b>	<b>57</b>
5.5.1.	Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA/Gelshift).....	57
<b>6.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>59</b>
<b>6.1.</b>	<b>Die Arginin- Glycin (RG-) Repetition von EBNA2.....</b>	<b>60</b>
6.1.1.	Charakterisierung der methylierungsspezifischen Antikörper .....	60
6.1.2.	Charakterisierung der EBNA2 RG- Repetition .....	64
6.1.3.	<i>In vitro</i> Charakterisierung der EBNA2- RG Repetition.....	69
6.1.4.	Effekte der Methylierung der EBNA2- RG- Repetition.....	73
6.1.5.	Verteilung der verschieden methylierten EBNA2- Spezies an EBNA2 kontrollierten Promotoren mittels ChIP Assay.....	76
<b>6.2.</b>	<b>Die Interaktion von EBNA2 und Np9 .....</b>	<b>80</b>
<b>6.3.</b>	<b>Die Interaktion von EBNA2 und hnRNP-K .....</b>	<b>88</b>
<b>7.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>96</b>
<b>7.1.</b>	<b>Die EBNA2 RG- Repetition .....</b>	<b>97</b>
7.1.1.	Die Charakterisierung der methylierungsspezifischen Antikörper .....	97
7.1.2.	Charakterisierung der EBNA2- RG- Repetition .....	99

---

7.1.3.	<i>In vitro</i> Charakterisierung der EBNA2- RG Repetition.....	100
7.1.4.	Inhibition der Methylierung reduziert die Menge an LMP1 .....	102
7.1.5.	Inhibition der Methylierung hat keinen Einfluss auf die Induktion des lytischen Zyklus .....	103
7.1.6.	Hauptsächlich aDMA- EBNA2 bindet an Promotoren <i>in vivo</i> .....	103
<b>7.2.</b>	<b>Die Interaktion von EBNA2 und NP9 .....</b>	<b>106</b>
7.2.1.	Die Expression der NP9 mRNA ist in EBV- transformierten Zellen induziert.....	106
7.2.2.	NP9 ist in EBV- positiven B- Zellen exprimiert .....	106
7.2.3.	NP9 beeinflusst die Transaktivierung durch EBNA2 .....	107
7.2.4.	NP9 bindet an EBNA2 <i>in vivo</i> .....	108
7.2.5.	Die EBNA2- RG Repetition ist ein wichtiger Teil der Binderegion für NP9 .....	109
7.2.6.	EBNA2 und NP9 kolokalisieren im Nukleus .....	110
7.2.7.	NP9 reduziert die DNA- bindenden Eigenschaften von EBNA2.....	111
<b>7.3.</b>	<b>Die Interaktion von EBNA2 und hnRNP- K .....</b>	<b>112</b>
7.3.1.	Der EBNA2- RG spezifische aDMA 6F12 Antikörper präzipitiert hnRNP- K .....	113
7.3.2.	hnRNP- K ist in EBV- positiven B- Zellen exprimiert .....	114
7.3.3.	hnRNP- K bindet an EBNA2 <i>in vivo</i> .....	114
7.3.4.	hnRNP- K bindet an NMA-, sDMA- und aDMA- modifiziertes EBNA2 <i>in vitro</i> .....	115
7.3.5.	hnRNP- K bindet an NP9 <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> .....	116
<b>7.4.</b>	<b>Ausblick.....</b>	<b>117</b>
<b>8.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>118</b>
<b>9.</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>124</b>
9.1.	Abkürzungen der Aminosäuren.....	124
9.2.	Sequenzen.....	125
9.2.1.	Nukleotidsequenzen .....	125
9.2.1.1.	Nukleotidsequenz von EBNA2 .....	125
9.2.1.2.	Nukleotidsequenz von HERV-K (HML-2.HOM) NP9.....	126
9.2.1.3.	Nukleotidsequenz von hnRNP- K.....	126
9.2.2.	Peptidsequenzen .....	127
9.2.2.1.	Aminosäuresequenz von EBNA2 .....	127
9.2.2.1.	Aminosäuresequenz von NP9.....	128
9.2.2.1.	Aminosäuresequenz von hnRNP- K.....	128
9.3.	Publikationen .....	129
9.4.	Danksagung .....	130
9.5.	Lebenslauf.....	131

## Verzeichnis der Abbildungen

Abbildung 1: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines EBV- Virions (Young and Rickinson 2004).....	4
Abbildung 2: Schematische Darstellung des EBNA2- Proteins.....	7
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Interaktion von EBNA2, RBPJK und der DNA.....	9
Abbildung 4: Genfamilie der Protein- Arginin- Methyltransferasen.....	12
Abbildung 5.1: Schematische Darstellung der Methylierung von Argininresten durch PRMTs .	13
Abbildung 6: Schematische Darstellung von HERV-K 101 .....	17
Abbildung 7: Schematische Darstellung des NP9- Proteins .....	18
Abbildung 8: Schematische Darstellung des hnRNP-K- Proteins.....	19
Abbildung 9: : Analyse der Zusammensetzung von EBNA2- haltigen DNA- bindenden Komplexen mit Hilfe von Kernextrakten EBV- positiver Raji- Zellen (Gross 2008) .....	22
Abbildung 10: Dotblot zur Bestimmung der Kreuzreaktivität der methylierungsspezifischen Antikörper.....	62
Abbildung 11: Inhibition des methylierungsspezifischen sDMA 13B10 Antikörpers mit freien Peptiden - Immunpräzipitation .....	63
Abbildung 12: Inhibition des methylierungsspezifischen aDMA 6F12 Antikörpers mit freien Peptiden - Western Blot .....	64
Abbildung 13: Detektion der verschieden methylierten EBNA2 Spezies in B95.8- Zellen.....	65
Abbildung 14: Feststellung der Spezifität der methylierungsspezifischen Antikörper mit Hilfe der EBNA2 $\Delta$ RG Mutante (Alfredo Mamiani) .....	66
Abbildung 15: Einfluss des Methylierungsinhibitors AdOx auf die verschieden methylierten EBNA2 Spezies <i>in vivo</i> .....	67
Abbildung 16: Bestimmung des Phosphorylierungszustandes der unterschiedlich methylierten EBNA2- Spezies .....	68
Abbildung 17: Nachweis der Induktion des GST- EBNA2 aa300-400 Fusionsproteins .....	70
Abbildung 18: <i>in vitro</i> Methylierung des GST- EBNA2 aa300- 400 Fusionsproteins.....	71
Abbildung 19: Charakterisierung der Spezifität der verwendeten PRMTs in der <i>in vitro</i> Methylierung .....	72
Abbildung 20: Effekt der Inhibition der Methylierung der EBNA2- RG -Repetition auf die Expression des EBNA2 responsiven LMP1- Proteins.....	73
Abbildung 21: Effekt der Inhibition der Methylierung der EBNA2 RG- Repetition auf die Induktion des lytischen Zyklus von EBV.....	74
Abbildung 22: Effekt der Induktion des lytischen Zyklus auf die Methylierung der EBNA2 RG- Repetition .....	75
Abbildung 23: Immunpräzipitation aus Mutu III Zellen.....	77
Abbildung 24: Schema der verwendeten Promotoren und Primersets der ChIP Analyse.....	77
Abbildung 25: Graphische Darstellung der Ergebnisse des ChIP- Assays: C- Promotor (Cp) ...	78

Abbildung 26: Graphische Darstellung der Ergebnisse des ChIP- Assays: LMP1- Promotor (LMP1p) .....	78
Abbildung 27: Graphische Darstellung der Ergebnisse des ChIP- Assays: LMP2a- Promotor (Tp/LMP2ap) .....	79
Abbildung 28: Expression der NP9 mRNA nach Transformation durch EBV .....	80
Abbildung 29: Expression von NP9 in B- Zelllinien .....	81
Abbildung 30: Einfluss von NP9 auf EBNA2/ Notch aktivierte Promotoren .....	82
Abbildung 31: Co- Immunpräzipitation von NP9 und EBNA2 .....	83
Abbildung 32: GST- PullDown Assays mit GST- NP9 und Mutanten von EBNA2.....	84
Abbildung 33: Lokalisierung von NP9 und EBNA2 im Nukleus mittels Fluoreszenzmikroskopie .....	85
Abbildung 34: Verlauf der Fluoreszenzintensitäten von EBNA2 und NP9.....	86
Abbildung 35: NP9 inhibiert die Formation von EBNA2- haltigen DNA- bindenden Komplexen .....	87
Abbildung 36: Immunpräzipitation aus EBV- positiven Raji- Zellen mittels des methylierungsspezifischen aDMA 6F12 Antikörpers (Christine Hennard).....	88
Abbildung 37: Präzipitation von <i>in vitro</i> in Bakterien synthetisiertem hnRNP-K mit Hilfe des monoklonalen $\alpha$ -aDMA – Antikörpers .....	89
Abbildung 38: Expression von hnRNP-K in B-Zelllinien.....	90
Abbildung 39: Co- Immunpräzipitation von EBNA2 und hnRNP-K aus Raji- Zellen.....	91
Abbildung 40: Immunpräzipitation von hnRNP-K aus EBV negativen BL- 41 mit dem aDMA- spezifischen Antikörper 6F12.....	92
Abbildung 41: Pull- Down Assay mit <i>in vitro</i> methylierten GST- EBNA2 (aa300-400) Fusionsproteinen und hnRNP- K.....	93
Abbildung 42: Pull Down Assay mit GST- NP9 Fusionsprotein und hnRNP-K.....	94
Abbildung 43: Co- Immunpräzipitation von GST- NP9 und hnRNP- K aus transfizierten HEK 293T Zellen .....	95
Abbildung 44: Zusammenfassung der Pulldown Assays.....	110

## Verzeichnis der Tabellen

Tabelle 1: Expressionsprofile der verschiedenen EBV- Latenztypen .....	6
Tabelle 2: Die unterschiedlich methylierten Formen der RG- Repetition von EBNA2: .....	15
Tabelle 3: Liste der verwendeten Primärantikörper mit entsprechendem Epitop und Verdünnung im Western Blot .....	31
Tabelle 4: Liste der verwendeten Isotypkontrollen für Immunpräzipitationen .....	32
Tabelle 5: Komponenten und Mengen für ein 10%-iges Polyacrylamidgel.....	49
Tabelle 6: Ergebnisse des ELISA- Screenings der methylierungsspezifischen Antikörper (Elisabeth Kremmer, München) .....	61

## 1. Zusammenfassung

Das Epstein- Barr- Virus- (EBV-) kodierte Kernantigen 2 (EBNA2) ist absolut essentiell für die Transformation von B- Zellen durch EBV *in vitro*. EBNA2 aktiviert zelluläre (z.B. CD23) und virale Gene (z.B. LMP1) und besitzt eine Arginin- Glycin (RG-) Repetition an Position 339- 354 seiner Aminosäuresequenz. Es ist bekannt, dass EBNA2 mit Hilfe seiner symmetrisch dimethylierten (sDMA) RG- Repetition an das Survival of motorneurons Protein (SMN) bindet (Barth et al. 2003). In Kooperation mit Frau Dr. Elisabeth Kremmer (Helmholz Zentrum, München) wurden monoklonale Antikörper gegen die verschiedenen methylierten bzw. modifizierten Spezies der EBNA2 RG- Repetition (asymmetrisch dimethyliert (aDMA), symmetrisch dimethyliert (sDMA), citrulinisiert (Citrulin) und unmethyliert (NMA)) synthetisiert. Mit Hilfe dieser Antikörper konnte gezeigt werden, dass EBNA2 *in vivo* nur als aDMA und sDMA- modifiziertes Protein vorkommt; ein Nachweis von Citrullin- modifiziertem oder unmethyliertem EBNA2 gelang nicht. An den EBNA2- transaktivierten Promotoren ist hauptsächlich die aDMA- Variante zu finden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte das durch das humane endogene Retrovirus HERV- K 101 kodierte NP9 Protein, dessen mRNA nach Transformation durch EBV und in anderen Tumoren stark hochreguliert ist (Armbruster et al. 2002), als Interaktionspartner von aDMA- modifiziertem EBNA2 identifiziert werden. Beide Proteine kolokalisieren im Nukleus mit Ausnahme der Nucleoli. NP9 selbst hat einen negativen Einfluss auf die EBNA2- vermittelte Transaktivierung der viralen C- und LMP2a- Promotoren und verringert die Bildung von EBNA2- haltigen DNA- bindenden Komplexen *in vitro*. Der virale LMP1- Promotor ist nicht betroffen. Als ein weiterer Interaktionspartner von EBNA2 konnte das heterogene nukleäre Ribonukleoprotein K (hnRNP- K) als Bindungspartner von EBNA2 identifiziert werden. hnRNP- K konnte mit Hilfe des aDMA- EBNA2- spezifischen Antikörpers aus EBV- positiven und negativen Zellen präzipitiert werden. Außerdem war der aDMA- spezifische Antikörper in der Lage in Bakterien synthetisiertes und asymmetrisch dimethyliertes hnRNP- K zu präzipitieren, was auf eine strukturelle Ähnlichkeit beider Proteine hindeutet, da beide außerdem mit NP9 denselben Bindungspartner besitzen. EBNA2 stellt sozusagen eine Art virales Pendant zu hnRNP- K dar.

---

## 2. Summary

The Epstein- Barr- Virus nuclear antigen 2 (EBNA2) is an essential protein for EBV-mediated transformation of B- cells *in vitro*. EBNA2 transactivates many cellular (e.g. CD23) and viral genes (e.g. LMP1) and it features an Arginine- Glycine (RG- ) repeat element at position 339- 354 of its amino acid sequence. EBNA2 binds via its symmetrically dimethylated (sDMA) RG- repeat region to the survival of motorneurons protein (SMN) (Barth et al. 2003).

Monoclonal antibodies directed against the differentially methylated forms of EBNA2 (sDMA and asymmetrically dimethylated (aDMA)) and other modified forms of the EBNA2- RG- repeat region (unmethylated, citrullinated) were generated in cooperation with Dr. Elisabeth Kremmer (HelmholtzZentrum, Munich). With these antibodies only the aDMA- and sDMA- modified but not the unmethylated or citrullinated forms of EBNA2 were detectable *in vivo*. The aDMA- modified form was predominantly found at EBNA2 transactivated promoters *in vivo* and *in vitro*.

The NP9 protein, encoded by the human endogenous retrovirus HERV- K 101, was identified as a new interacting partner of aDMA- EBNA2. The mRNA of this protein is induced in EBV transformed cells and other malignant neoplasms. Both proteins colocalize in the nucleus excluding the nucleoli. NP9 negatively effects EBNA2 mediated transactivation of the viral C- and LMP2a promoters and inhibits the formation of EBNA2- containing DNA- binding complexes *in vitro*. The viral LMP1 promoter is unaffected by NP9 indicating a promoter- specific effect.

The heterogenous nuclear ribonucleoprotein K (hnRNP- K) was identified as another interaction partner of EBNA2. hnRNP- K could be co- precipitated with EBNA2 but could also be precipitated by the aDMA- specific monoclonal antibody from EBV- negative cells. The aDMA- specific antibody was also capable of precipitating bacterially expressed hnRNP- K that was asymmetrically dimethylated. This leads to the conclusion that hnRNP- K and EBNA2 interact and also share some sort of structural similarities which makes EBNA2 the viral pendant of hnRNP- K. EBNA2 and hnRNP- K also share the same interactionpartner NP9.

---

## 3. Einleitung

### 3.1. Das Epstein-Barr-Virus (EBV)

Ende der fünfziger Jahre wurde von dem englischen Chirurgen Dennis Burkitt erstmals ein Lymphom beschrieben, das bei Kindern endemisch in Malaria- und Gelbfiebergebieten in Zentral- und Ostafrika auftritt. Durch die geografische Begrenzung dieser speziellen Tumorerkrankung postulierte Burkitt ein infektiöses Agens als Verursacher dieser Erkrankung (Burkitt 1958). Der Arbeitsgruppe von Tony Epstein gelang es 1964 in *in vitro* kultivierten Burkitt- Lymphomzellen das Epstein- Barr- Virus elektronenmikroskopisch nachzuweisen (Epstein, Achong et al. 1964).

Das Epstein- Barr- Virus gehört zur Familie der  $\gamma$ -Herpesviridae und der Gattung der Lymphocryptoviridae. Die Viren der Gattung Lymphocryptoviridae sind durch ein enges Wirtsspektrum gekennzeichnet und wurden bisher nur in Altweltaffen detektiert (Frank et al. 1976). Vor knapp 10 Jahren wurde jedoch ein EBV- verwandtes Virus entdeckt, welches in der Lage ist, in Neuweltaffen eine Transformation von B- Zellen zu induzieren (Cho et al. 2001). EBV selbst infiziert nur den Menschen und verursacht gelegentlich die Infektiöse Mononukleose (Pfeiffer'sches Drüsenfieber). Nach der Erstinfektion persistiert das Virus lebenslang asymptomatisch in Gedächtnis- B- Zellen (Latenz). Die Fähigkeit von EBV B-Zellen zu immortalisieren, was erstmals 1967 *in vitro* beschrieben wurde (Henle, Diehl et al. 1967), kommt bei einem immunkompetenten Individuum nicht zum Tragen. Es können sich jedoch durch regionale Faktoren und Immunsuppression (Posttransplantationstherapie, HIV- Infektion) neoplastische Erkrankungen entwickeln, deren Entstehung eng mit der Transformationseigenschaft von EBV einhergeht.

Das Virus kann in fast allen Fällen von undifferenzierten Nasopharygialkarzinomen (NPC) und nasalen NK/T- Zell Lymphomen, in 95% der endemisch auftretenden Burkitt- Lymphome (BL), in einigen Fällen von Hodgkin – Lymphomen (HD), in ca. 15% der diffuse large B- Cell Lymphome (DLBCL) und in 10% der Magenkarzinomfälle (GC) detektiert werden. EBV ist außerdem mit unterschiedlicher Häufigkeit in den unter Immunsuppression nach Transplantation auftretenden Posttransplantationslymphomen (PTLD) nachweisbar (zur Hausen et al. 1970; Henle and Henle 1974; Delecluse et al. 2007).

### 3.2. Der Aufbau des Epstein- Barr- Virus



**Abbildung 1: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines EBV- Virions (Young and Rickinson 2004)**

Das Epstein- Barr- Virus besitzt einen typischen herpesviralen Aufbau. Es besteht aus einem 172 kbp großen, linearen, doppelsträngigen DNA- Genom, das von einem ikosaedrischen Nucleokapsid, welches aus 162 Kapsomeren besteht, umgeben ist. Das Nucleokapsid des Virus wird von einer Lipidmembran umschlossen, die mit zahlreichen Glykoproteinen durchsetzt ist. Zwischen dem Kapsid und der Hüllmembran befindet sich das Tegument, das eine Vielzahl an Virusproteinen enthält (Dolyniuk, Wolff et al. 1976; Johannsen, Luftig et al. 2004). Es existieren zwei Typen von EBV, 1 und 2, die aufgrund von erheblichen Variationen in der Aminosäuresequenz ihrer Kern-Antigene (Epstein-Barr Virus nukleäre Antigene) unterschiedliche zytotoxische T- Zellantworten hervorrufen (Sample, Young et al. 1990). EBV Typ 1 hat eine höhere in vitro- Transformationseffizienz als EBV Typ 2 (Rickinson, Young et al. 1987). Beide Typen von EBV sind in Afrika gleichmäßig verteilt, wohingegen in den westlichen Industrieländern hauptsächlich EBV Typ 1 vorkommt (Zimmer, Adldinger et al. 1986).

---

### 3.3. Die EBV-Infektion

Die Infektion mit EBV im Kindesalter erfolgt meist asymptomatisch, wohingegen eine Erstinfektion im Jugend- bzw. Erwachsenenalter oft mit dem Auftreten einer infektiösen Mononukleose (Pfeiffersches Drüsenfieber) einhergeht. Das Epstein- Barr Virus gelangt über die Epithelzellen des Nasen- Rachenraums zu Zellen des B- Zell Kompartiments und infiziert diese. Menschen, die über ein gesundes Immunsystem verfügen, sind normalerweise in der Lage EBV- infizierte B- Zellen zu eliminieren, um so lymphoproliferativen Erkrankungen entgegenzuwirken. Hinsichtlich der Infektion von Gedächtnis- B- Zellen und der darauffolgenden Persistenz des Virus werden zwei Modelle diskutiert.

Ein Modell ist, dass EBV zuerst naive B- Zellen infiziert und sich deren folgende Differenzierung zu Gedächtnis- B- Zellen zunutze macht. Das Virus imitiert hierbei den normalerweise durch Antigene induzierten Vorgang der B- Zell Differenzierung durch Expression latenter Virusgene, wodurch zunächst eine Aktivierung und Proliferation der B- Zellen (Latenztyp 3) und anschließend eine somatische Hypermutation der Immunglobuline in den Keimzentren veranlasst wird (Latenztyp 1/2) (Young and Rickinson 2004).

Eine weitere Variante der Infektion durch EBV besteht darin, dass das Virus direkt eine Infektion von Gedächtnis – B - Zellen durchführen kann. Somit wäre keine Infektion über naive Vorläuferzellen nötig. Ist die Infektion der Gedächtnis- B- Zellen erfolgt, zirkulieren diese in der Peripherie und werden vom Immunsystem nicht erkannt, da die virale Genexpression in dieser latenten Phase des viralen Lebenszyklus supprimiert ist. Es kommt bei der Teilung der infizierten Gedächtniszellen nur zur Expression des Epstein- Barr- Nukleären Antigens 1 (EBNA1), um eine Weitergabe des EBV- Genoms an beide Tochterzellen zu ermöglichen. Bei Differenzierung der Gedächtnis- B- Zellen zu Plasmazellen und deren Wanderung zu den Epithelzellen des Ösopharynx wird es dem Virus ermöglicht zu reaktivieren und sich über den Speichel zu verbreiten. Bei diesem Vorgang scheint die Differenzierung der B- Zellen in Plasmazellen, genauso wie akuter Stress der Zellen eine entscheidende Rolle zu spielen (Laichalk and Thorley-Lawson 2005).

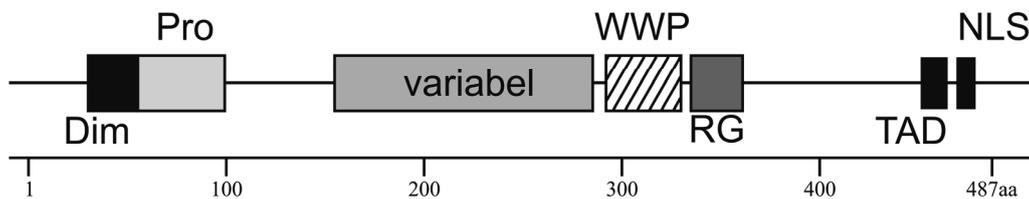
Die 11 von EBV kodierten latenten Gene werden während der Differenzierungsschritte der B- Zellen unterschiedlich exprimiert. Anhand dieser Expressionsmuster ist es möglich EBV- assoziierte Tumore einem Differenzierungsstadium der B- Zellen zuzuordnen, aus welchem sie entstanden sind.

In nachfolgender Tabelle ist die Unterscheidung von Latenztyp 0,I, II, III mit den jeweils für das entsprechende Latenzstadium assoziierten Tumoren gezeigt.

**Tabelle 1: Expressionsprofile der verschiedenen EBV- Latenztypen**

Latenz-Typ	Expressions-Profil	typisch für	Beschrieben in
Typ 0	-	Kein Tumor	(Miyashita et al. 1995)
Typ I	EBER1+2, EBNA1	BL (fraglich)	(Rowe et al. 1987)
Typ II	BARF1, EBNA1, LMP1,2A+2B	BL,NPC, HD, NK- T- Zell Lymphome	(Xue et al. 2002; Rickinson and Kieff 2007)
Typ III	BARF1, BHRF1, EBER1+2, EBNAs (1,2,3A,3B,3C, LP), LMPs, EBV miRNA's	IM, PTLD, LCLs	(Rickinson and Kieff 2007)

### 3.4. Das Epstein-Barr-Virus kodierte nukleäre Antigen 2 (EBNA2)



**Abbildung 2: Schematische Darstellung des EBNA2- Proteins**

*EBNA2 beinhaltet eine Dimerisierungsdomäne („Dim“) einen Poly- Prolin Stretch („Pro“), einen zwischen EBV Typ 1 und 2 variierenden Abschnitt („variabel“), ein Trp- Trp- Pro- Motiv („WWP“) zur Bindung an RBP-Jk, eine Arginin- Glycin Repetition („RG“), eine Transaktivierungsdomäne („TAD“) und ein nukleäres Lokalisierungssignal („NLS“) (modifiziert nach (Zimmer-Strobl and Strobl 2001))*

EBNA2 spielt eine essentielle Rolle bei der Immortalisierung von B-Lymphozyten (Hammerschmidt and Sugden 1989). Das nukleäre Phosphoprotein ist 487AS groß (Grässer et al. 1992) und seine mRNA ist das erste Transkript, das nach erfolgter Infektion mit EBV nachweisbar ist. Bei Betrachtung der unterschiedlichen Transformationseffizienz der beiden EBV Stämme vom Typ 1 und 2, die im Bezug auf EBNA2 nur eine Homologie von 56% aufweisen, sich sonst jedoch nur minimal unterscheiden, wird die Schlüsselrolle von EBNA2 bei Transformation deutlich. Beide Varianten unterscheiden sich auch in der Länge (EBNA2 Typ 1: 487AS, EBNA2 Typ 2: 455AS), was durch das Fehlen eines zentralen Elements verursacht wird. Aus der Verschiedenheit im EBNA2- Gen resultiert vermutlich teilweise auch die verringerte *in vitro*- Transformationseffizienz des EBV Typ 2 Virus (Lucchesi et al. 2008). Auch bei Betrachtung der EBNA2- deletierten EBV Mutante P3HR1, die nicht mehr in der Lage ist B- Zellen zu transformieren (Sixbey, Shirley et al. 1991) wird der Einfluss von EBNA2 auf die Transformation durch EBV deutlich.

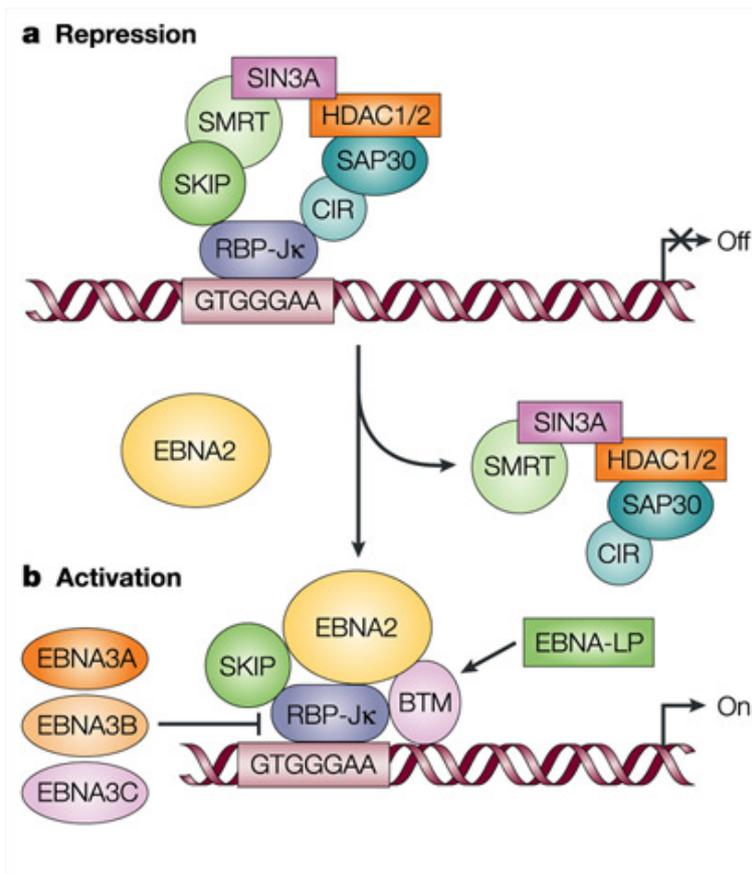
EBNA2 agiert in der infizierten Zelle als Transaktivator einer Vielzahl zellulärer (z.B. CD23) und viraler Gene (z.B. LMP1, LMP2A). Das Protein besitzt an der Stelle 59-95 seiner Aminosäuresequenz eine Region, die ausschließlich Proline beinhaltet (Poly- Prolin- Stretch; Abbildung 2, „Pro“). Dieses Motiv hat im Gegensatz zum Rest der N- terminalen Region von EBNA2 (Aminosäuren 2- 230) einen Einfluss auf die EBNA2 vermittelte Transaktivierung (Yalamanchili et al. 1996). So konnte gezeigt werden, dass bei Deletion dieser Region die Transaktivierung der viralen LMP1- und

---

LMP2a- Gene im Vergleich zum Wildtypprotein 7- fach erhöht ist (Gordadze et al. 2002). Im Gegensatz hierzu zeigt ein Virus, welches diese Mutante des EBNA2- Proteins enthält, eine schlechtere Transformationseffizienz in B- Zellen (Yalamanchili et al. 1996). Dieser Effekt scheint jedoch nicht auf einer direkten Beeinflussung der Aktivität von EBNA2 zu beruhen, sondern eine geringere Anzahl von EBV- Genomen in den infizierten Zelllinien als Grundlage zu haben. Die infizierten Zellen scheinen auf diese Weise der erhöhten Expression des toxischen LMP1- Proteins entgegenzuwirken (Gordadze et al. 2002).

Da EBNA2 nicht in der Lage ist direkt mit DNA zu interagieren, bindet es mit Hilfe eines TrpTrpPro („WWP“- Motiv) an die zellulären Transkriptionsfaktoren Pu-1 und RBPJk (Rekombiantionssignal-Bindeprotein-Jk) (Sjoblom et al. 1995). Durch Mutation dieser Region verliert EBNA2 seine Transaktivierungs- und Transformationsfähigkeit (Cohen, Wang et al. 1991; Laux, Adam et al. 1994).

In nachfolgender Abbildung (Abbildung 1) ist die Interaktion von EBNA2 mit RBPJk schematisch dargestellt. RBPJk bindet an die DNA- Konsensussequenz 5'GTGGGAAA-3' und formt einen Repressionskomplex an der DNA. In der nicht infizierten Zelle wird dieser Repressionskomplex durch den intrazellulären Teil von Notch (Notch- IC) aufgelöst. Notch ist ein Transmembranprotein, dessen intrazellulärer Teil durch Binden seines Liganden Delta an den extrazellulären Rezeptor abgespalten wird und in den Kern transloziert und dort verschiedene Transkriptionsprozesse steuert, u.a. via Interaktion mit RBP- Jk. Notch- IC enthält wie EBNA2 ein TrpTrpPro- („WWP“) Motiv und gehört somit zu einer kleinen Gruppe von Proteinen, die dieses Motiv enthalten (Andre and Springael 1994; Chan et al. 1996; Rotin 1998). Bindet EBNA2 anstatt Notch- IC an RBPJk, wird die Bindung des Repressorkomplexes auch aufgehoben und die Transkription kann nicht mehr unterdrückt werden (Henkel, Ling et al. 1994; Waltzer, Logeat et al. 1994). Aufgrund dieser strukturellen und funktionellen Homologie kann Notch als zelluläres Pendant von EBNA2 bezeichnet werden.



**Abbildung 3:** Schematische Darstellung der Interaktion von EBNA2, RBPJk und der DNA

In der nicht infizierten Zelle liegt RBP-Jκ an die DNA gebunden vor und verursacht mit den gebundenen Co- Faktoren eine Repression der nachgeschalteten Gene. Bindet EBNA2 an RBP-Jκ, werden bis auf das Protein SKIP alle CO- Faktoren verdrängt und unter Zuhilfenahme anderer viraler Genprodukte wird die Repression aufgehoben (Young and Rickinson 2004).

EBNA2 kann neben RBPJk auch an andere zelluläre Proteine wie Transkriptionsfaktoren (Bornkamm and Hammerschmidt 2001; Muromoto, Ikeda et al. 2009), am RNA- Metabolismus beteiligte Proteine wie z.B. DP103/Gemin3 (Grundhoff, Kremmer et al. 1999) oder an das Survival of motor neuron (SMN) Protein binden (Barth, Liss et al. 2003). Die weitere Beteiligung von EBNA2 an zellulären Regulationsmechanismen wird durch das Vorkommen von EBNA2 in hochmolekularen Komplexen verschiedener Zusammensetzung angedeutet (Grasser, Haiss et al. 1991; Tsui and Schubach 1994; Wu, Krumm et al. 2000).

---

### 3.5. Protein- Methylierung

Die Methylierung von Proteinen ist eine posttranslational erfolgende Modifikation. Sie beeinflusst Wechselwirkungen von Proteinen untereinander (Gary and Clarke 1998), die Signaltransduktion in der Zelle, Proliferation und Zellschicksal, transkriptionelle Prozesse und RNA- splicing (Stallcup, Kim et al. 2003; Azzouz, Pillai et al. 2005; Lee, Teyssier et al. 2005). Sowohl Arginin-, Lysin-, Histidin-, Prolin- als auch Carboxylreste von Aminosäuren werden in der Zelle posttranslational mit Methylgruppen versehen (Paik et al. 2007) und stellt im Gegensatz zu anderen posttranslationalen Modifikationen eine recht stabile aber nicht irreversible Modifikation letzterer dar (Paik and Kim 1967). Die Reversibilität konnte durch Entdeckung einer Lysin- spezifischen Demethylase (Kubicek and Jenuwein 2004; Shi, Lan et al. 2004) gezeigt werden. Auch ein für die Demethylierung von Argininresten zuständiges Enzym (Jmjd6) konnte mittlerweile identifiziert werden (Chang, Chen et al. 2007); seine Aktivität scheint sich jedoch auf die Demethylierung von Argininresten an den Histonen H3R2 und H4R3 zu beschränken.

Im Gegensatz zur Methylierung von Argininen, die neben Histonen auch an RNA-Bindeproteinen nachgewiesen wurde, findet die Methylierung an Lysinresten bevorzugt an amino- und carboxyterminalen Stellen von Histonen statt (Smith and Denu 2008). Die Methylierung von Histonen kann wie auch die Acetylierung zu verschiedenen Interaktionen von DNA und Chromatin - assoziierten Proteinen führen, was sich in unterschiedlichen biologischen Wirkungen niederschlägt (Rice and Allis 2001).

---

### 3.6. Protein- Methylierung und Viren

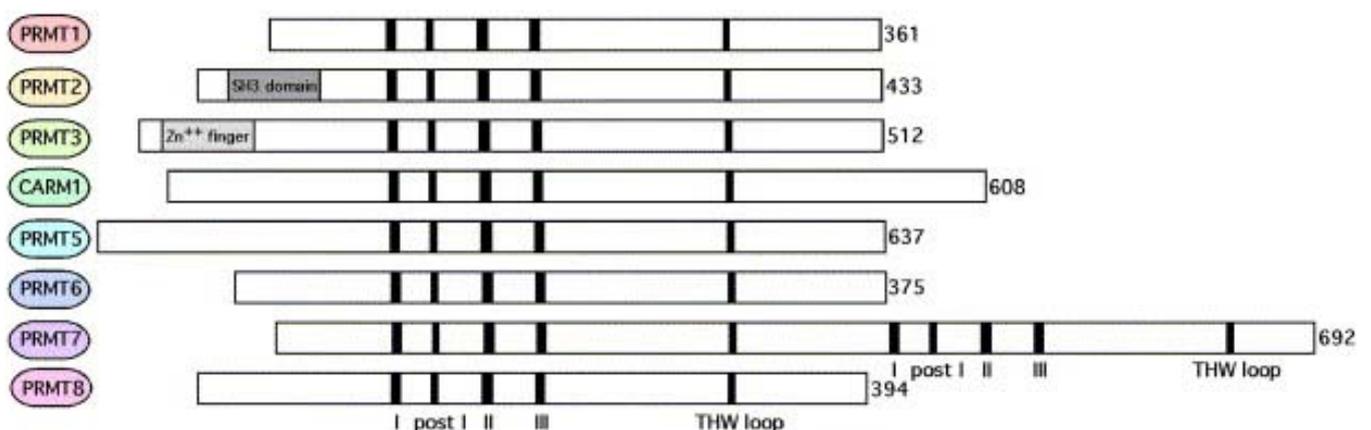
Die Methylierung von Argininresten spielt auch eine wichtige Rolle im Lebenszyklus von Viren. So ist die Arginin- Methylierung ein wichtiger Faktor bei der erfolgreichen Replikation von Adenoviren (Kzhyshkowska, Kremmer et al. 2004; Iacovides, O'Shea et al. 2007; Koyuncu and Dobner 2009) und auch in der Familie der Retroviren spielt die Methylierung bzw. die Aktivität von Methyltransferasen eine wichtige Rolle. So wirkt sich die Inhibierung der Methyltransferaseaktivität negativ auf die Proliferation von mit dem Humanen T-Zell Leukämie Virus 1 (HTLV-1) transformierten Lymphocyten aus, die durch Zellzyklusarrest mit nachfolgender Apoptose gestoppt wird (Dasgupta, Jung et al. 2008). Auch das Humane Immundefizienzvirus 1 (HIV- 1) ist von der Aktivität von Methyltransferasen abhängig. So ist die Infektion mit HIV- 1 nur bei voller Aktivität der Methyltransferasen erfolgreich (Willemsen, Hitchen et al. 2006) und trägt außerdem zur Stabilität viraler Proteine bei (Sivakumaran, van der Horst et al. 2009). In der Familie der Herpesviren finden sich auch Beispiele für die essentielle Rolle der Methyltransferasen. So ist eine Methylierung des HSV-1 (Herpes- Simplex Virus 1) kodierten Proteins ICP27 für die Replikation des Virus unerlässlich (Souki, Gershon et al. 2009; Yu, Shin et al. 2010). Auch der Replikationszyklus des Epstein- Barr- Virus wird durch die Methylierung von Proteinen in erheblichem Maße beeinflusst. So konnte gezeigt werden, dass das EBV- kodierte nukleäre Antigen 1 (EBNA1) nur bei voller Aktivität der Protein-Arginin- Methyl- Transferasen (PRMTs) vollständig funktionsfähig ist (Shire, Kapoor et al. 2006).

### 3.7. Arginin- Methylierung

#### 3.7.1. Protein- Arginin- Methyltransferasen (PRMTs)

Vor rund 45 Jahren wurde die Methylierung von Argininen erstmals beschrieben (Paik and Kim 1967). Von der ersten Beschreibung dieses Vorganges anhand von Proteinfractionen aus Kalbsthymus sind bis zum heutigen Tag eine Vielzahl an verschiedenen Protein- Arginin- Methyltransferasen (PRMTs) in unterschiedlichen eukaryotischen Organismen wie Hefen, Insekten und auch in Säugetieren identifiziert worden (Gary and Clarke 1998; McBride and Silver 2001; Boulanger, Miranda et al. 2004; Miranda, Sayegh et al. 2006).

Die acht bisher in Säugetieren identifizierten PRMT- Gene (siehe Abbildung 4) besitzen untereinander teilweise größere Homologien. Sie kodieren für die Arginin- Methyltransferasen PRMT1, PRMT2, PRMT3, CARM1/PRMT4, PRMT5/JBP1, PRMT6, PRMT7 und PRMT8 (Abramovich, Yakobson et al. 1997; Katsanis, Yaspo et al. 1997; Tang, Gary et al. 1998; Chen, Ma et al. 1999; Pollack, Kotenko et al. 1999; Frankel, Yadav et al. 2002; Miranda, Miranda et al. 2004; Lee, Sayegh et al. 2005; Lee, Cook et al. 2005).



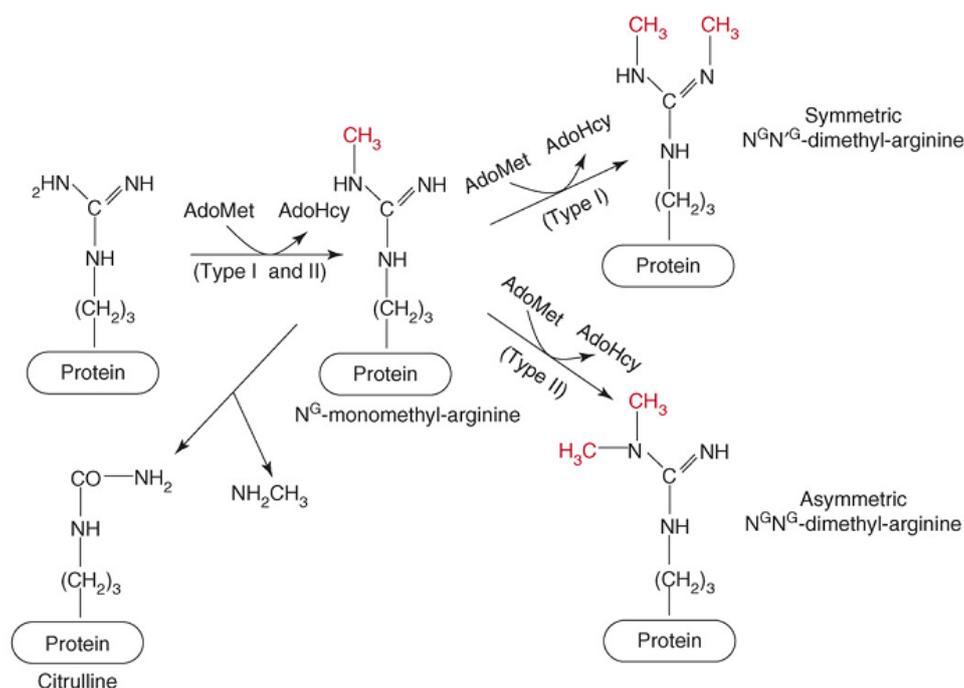
**Abbildung 4: Genfamilie der Protein- Arginin- Methyltransferasen**

Schematische Darstellung der acht bisher in Säugetieren identifizierten PRMTs. Trotz etwaiger Größenunterschiede, enthalten alle PRMTs gleiche Motive (I, post I, II, III) sowie die hochkonservierte THW- Schleife. PRMT2 und PRMT3 besitzen außerdem eine aminoterminal SH3- bzw. eine Zinkfingerdomäne (Gross 2008) (Abb. modifiziert nach (Bedford and Richard 2005)).

### 3.7.1.1. Die Methylierungsreaktion

Initial wird ein Argininrest des Proteins unter Zuhilfenahme des Methylgruppendonors S- Adenosyl- L- Methionin (AdoMet) einfach methyliert, es entsteht Monomethylarginin (MMA). Die Fähigkeit zu diesem Reaktionsschritt ist allen Vertretern der PRMT- Familie gemein. Die unterschiedliche Einteilung der PRMT- Familie begründet sich in den verschiedenen Produkten, die im zweiten Schritt der Methylierungsreaktion gebildet werden; beide katalysieren im ersten Schritt Monomethylarginin.

Typ I PRMTs (PRMT1, 3, 4, 6) katalysieren anschließend die Reaktion von Monomethylarginin zu symmetrisch dimethyliertem Arginin (sDMA); Enzyme des Typs II (PRMT 5 & 7) katalysieren die Bildung von asymmetrisch dimethyliertem Arginin (aDMA). Diese Reaktionen sind schematisch in Abbildung 5.1 dargestellt.



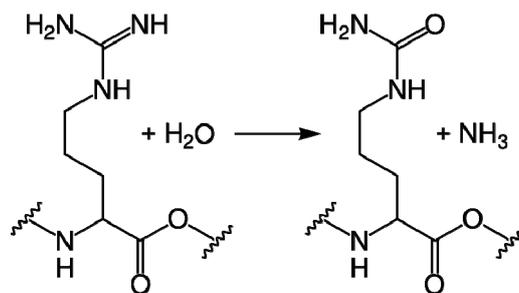
**Abbildung 5.1: Schematische Darstellung der Methylierung von Argininresten durch PRMTs**

Im ersten Schritt der Reaktion wird von beiden Typen der Protein- Arginin- Methyltransferasen (PRMT Typ I & II) Monomethylarginin synthetisiert. Im nächsten Schritt wird von den Typ I PRMTs (PRMT1, 3, 4, 6) asymmetrisch dimethyliertes Arginin (aDMA) gebildet, wohingegen die Enzyme des Typs II (PRMT5 & 7) die Bildung von symmetrisch dimethyliertem Arginin (sDMA) katalysieren. Des Weiteren ist bekannt, dass aus Monomethylarginin auch Citrullin entstehen kann; diese Reaktion wird von so genannten Arginin- deiminasen (Cuthbert et al. 2004; Wang et al. 2004) katalysiert (Abb. aus (Paik et al. 2007)).

Auch in der Substratspezifität unterscheiden sich die verschiedenen Mitglieder der PRMT Familie. Fast allen PRMTs vom Typ I dienen Proteine mit Glycin- und Argininreichen Regionen (GAR) als Substrate (Najbauer et al. 1993). In diesem Zusammenhang stellt nur die Protein- Arginin- Methyltransferase 4 (CARM1) eine Ausnahme dar. Sie erkennt kein spezielles Motiv, welches anschließend methyliert wird.

Im Gegensatz zu den Vertretern der Typ I PRMTs haben Methyltransferasen vom Typ II einen weitergefassten Rahmen an Substraten. Sie können GARs, wie auch einzelne, isoliert liegende Arginine methylieren (Boisvert et al. 2003; Ong et al. 2004; Wu et al. 2004).

### 3.7.2. Citrullin (Deiminierung von Arginin)



**Abbildung 5.2: Schematische Darstellung der Deiminierung von Arginin**

Die Enzyme der Familie der Peptidylarginin Deaminasen (PAD) katalysieren die Reaktion, bei welcher ein terminales Stickstoffatom der Arginin-Seitenkette eines Proteins durch ein Sauerstoffatom ersetzt wird. Bei diesem Prozess entsteht ein Ammoniak-Molekül.

Eine weitere posttranslationale Modifikation von Argininen ist die Deiminierung. Hierbei wird von Enzymen der Familie der Peptidylarginin Deaminasen (PAD) eine Reaktion katalysiert, bei welcher ein terminales Stickstoffatom der Arginin-Seitenkette eines Proteins durch ein Sauerstoffatom ersetzt wird. Bei diesem Prozess entsteht ein Ammoniak-Molekül. Diese Modifikation ändert die Hydrophobizität des Proteins und führt damit zu Änderungen in der Faltung der Polypeptidkette. Zu Proteinen, die Citrulline enthalten, zählen z.B. Fillagrin, Myelic basic protein (MBP) und zahlreiche Histonproteine.

### 3.8. Die Arginin- Glycin (RG-) Repetition von EBNA2

An der Position 339- 354 seiner Aminosäuresequenz besitzt EBNA2 eine Arginin-Glycin Repetition. Nach allgemeiner Annahme stellt die RG- Repetition eine regulatorische Einheit innerhalb des EBNA2- Proteins dar und beeinflusst auch dessen Transaktivierungsaktivität. Wird die RG- Repetition ( $\Delta$ RG) deletiert führt dies zu einer schlechteren Transformationsrate des mutierten Virus *in vitro* und setzt außerdem die Chromatin- Bindefähigkeit von EBNA2 herab (Tong et al. 1994).

Im Gegensatz zu diesen negativen Effekten ist es dem so deletierten  $\Delta$ RG-EBNA2 möglich, den viralen LMP1- Promotor um das 4-fache stärker zu aktivieren als der Wildtyp des Proteins, wobei die Deletionsmutante immer noch in der Lage ist eine Aktivierung des Cp- Promotors durchzuführen. Außerdem wird der RG- Repetition eine Affinität für poly- Guanin (Poly (G)) Motive der DNA zugeschrieben (Tong et al. 1994). Die in der RG- Repetition vorhandenen Arginine kommen theoretisch in 3 verschiedenen Methylierungskonfigurationen vor.

**Tabelle 2: Die unterschiedlich methylierten Formen der RG- Repetition von EBNA2:**

<u>Methylierungskonfiguration</u>	<u>Abkürzung</u>	<u>Katalysiert von</u>
Nicht methylierte Arginine	NMA	-
Symmetrisch- dimethylierte Arginine	sDMA	PRMT Typ 1
Asymmetrisch- dimethylierte Arginine	aDMA	PRMT Typ 2

Es konnte bisher gezeigt werden, dass ausschließlich die sDMA- modifizierte RG- Repetition von EBNA2 an das Survival of Motor Neuron Protein (SMN) bindet (Barth et al. 2003). SMN, ein Protein welches unter Anderem am RNA- Splicing Prozess beteiligt ist, bindet auch an das sDMA- modifizierte SmD3, ein weiteres Protein des Spleissprozesses (Friesen et al. 2001) und an DP103 (Voss et al. 2001).

---

Außerdem kann SMN die LMP1- Promotoraktivierung von EBNA2 erhöhen (Voss et al. 2001). Die mit der Methylierung einhergehende mögliche regulatorische Funktion einer RG- Repetition konnte schon bei anderen Proteinen, wie z.B. dem Fragile X Mental Retardation Protein (FMRT), bei dem die RNA- Bindefähigkeit beeinflusst wird (Denman 2002), gezeigt werden.

### **3.9. Humane Endogene Retroviren**

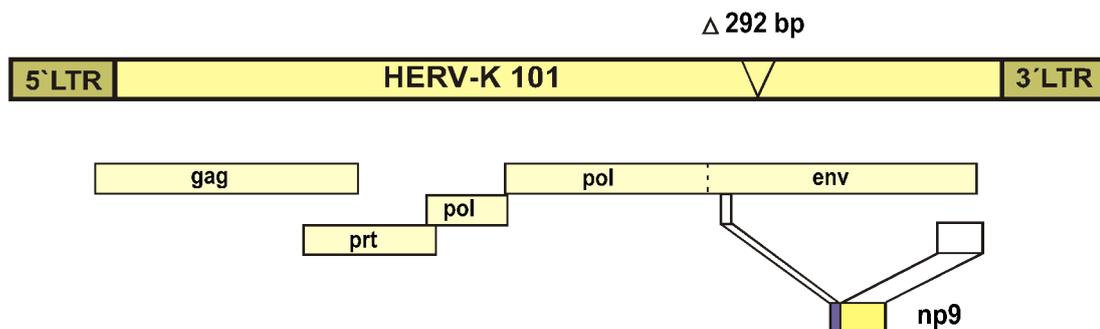
Da im weiteren Verlauf dieser Arbeit eine Interaktion des NP9- Proteins, das durch ein humanes endogenes Retrovirus kodiert wird, und EBNA2 nachgewiesen werden konnte wird die Familie der humanen endogenen Retroviren an dieser Stelle näher beleuchtet.

Retroviren sind nach dem Enzym Reverse Transkriptase (RT) benannt, das die Fähigkeit besitzt die virale RNA in DNA umzuschreiben. Diesem DNA- Fragment ist es nun möglich ins Wirtsgenom zu integrieren (Provirus) (Coffin et al. 1997). Retroviren kommen bei vielen Lebewesen vor und verursachen eine Vielzahl an Erkrankungen. Zu den bekanntesten und klinisch relevantesten Vertretern der infektiösen, exogenen Retroviren gehören das Humane Immundefizienz- Virus (HIV) und das Humane T- Zell Leukämie Virus (HTLV-1).

Neben diesen exogenen Vertretern existieren auch endogene Retroviren, die ihr Genom in Keimbahnzellen integriert haben und somit von Generation zu Generation weitervererbt werden. Nach ersten Hinweisen auf die Existenz solcher Elemente im menschlichen Genom, ist heute bekannt, dass mehr als 8 Prozent der menschlichen Genomsequenz aus endogenen Retroviren besteht. Obwohl die meisten Vertreter durch Deletionen nicht mehr in der Lage sind, Proteine zu exprimieren, kommt es doch vereinzelt zur Expression von retroviralen Genprodukten; sei es in malignem Gewebe (Tomita et al. 1990; Sauter et al. 1995; Oppelt et al. 2009) oder kontrolliert z.B. in der humanen Plazenta (Blond et al. 1999; Blond et al. 2000).

### 3.9.1. Das HERV-K 101 kodierte NP9- Protein

Einige Mitglieder der HERV- K Familie endogener Retroviren besitzen einen intakten offenen Leserahmen für die viralen gag, pol und env Gene (Lower et al. 1993; Mueller-Lantzsch et al. 1993), von denen das Rec Protein, kodiert durch den env Leserahmen des HERV-K (HML-2), onkogenes Potenzial besitzt (Boese et al. 2001; Galli et al. 2005). Das humane endogene Retrovirus HERV- K 101 ist durch eine Deletion von 292 bp im env Leserahmen des HERV-K (HML-2) entstanden. Das nukleäre Protein von 9 kDa Größe (NP9) ist ein weiteres vom env- Leserahmen des HERV-K 101 kodiertes Protein (Armbruester et al. 2002).



**Abbildung 6: Schematische Darstellung von HERV-K 101**

Neben den an 5' und 3'- Position gelegenen Long Terminal Repeats (LTR) besitzt HERV-K 101 Leserahmen für retrovirale gag, prt, pol und env Genprodukte. Durch eine Deletion von 292bp im env- Leserahmen codiert jener für das NP9- Protein (Abb. aus (Armbruester et al. 2004)).

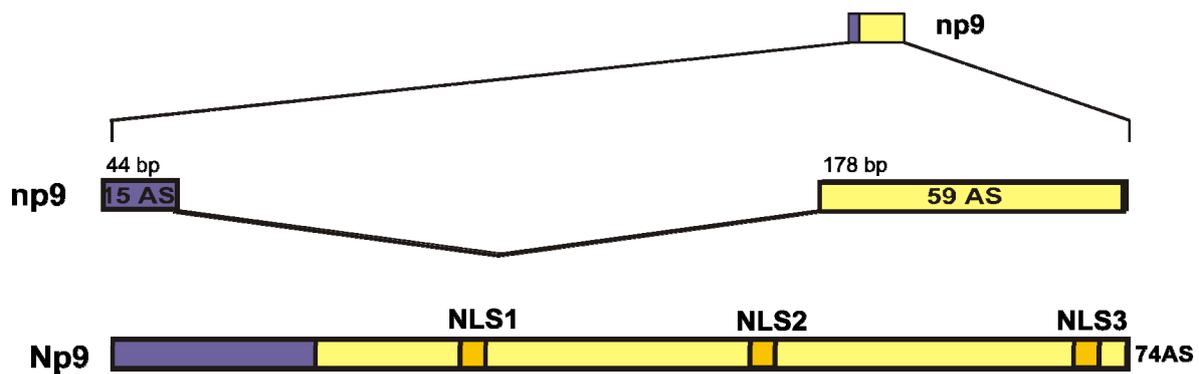


Abbildung 7: Schematische Darstellung des NP9- Proteins

Das NP9- Protein besitzt 3 Kernlokalisationssequenzen (NLS). Seine Sequenz ist 74AS lang (Abb. aus (Armbruester et al. 2004)).

NP9 verfügt über drei potentielle Kernlokalisationssignale (NLS, nuclear localisation signal) und seine mRNA ist ausschließlich in Karzinomen oder transformierten Zellen zu finden. Es ist außerdem bekannt, dass NP9 an das Ligand of numb protein X (LNX) bindet (Armbruester et al. 2004), welches Numb zum proteasomalen Abbau markiert. Durch den so vermittelten Abbau von Numb wird Notch, ein zelluläres funktionales Homolog zu EBNA2, aktiviert (Nie et al. 2004).

Ein Zusammenhang zwischen der EBV- Infektion und humanen endogenen Retroviren ist bekannt. Die Infektion von B- Lymphozyten mit EBV führt zur Hochregulation von vielen zellulären Transkripten, darunter auch jene mit endogenem retroviralem Ursprung. So induziert EBV die Expression eines durch HERV-K 18 env kodierten Superantigens (Hsiao et al. 2006).

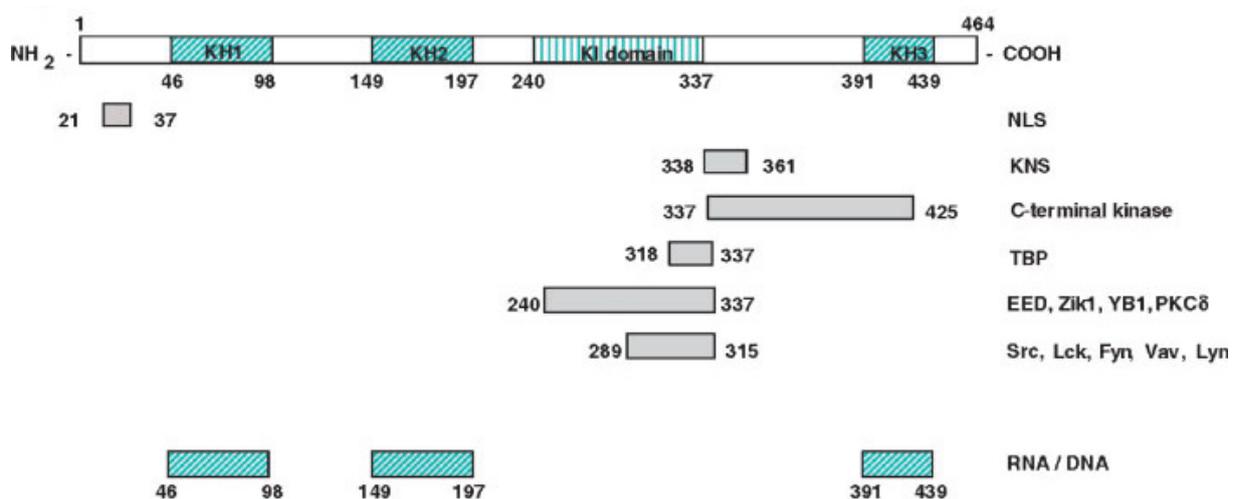
### 3.10. Das heterogene nukleäre Ribonukleoprotein K (hnRNP-K)

Im Verlauf dieser Arbeit konnte eine Interaktion des hnRNP- K- Proteins, und EBNA2 nachgewiesen werden. Als heterogenes nukleäres Ribonukleoprotein (hnRNP) wird der Proteinkomplex bezeichnet, der sich schon während der Transkription im Zellkern um die neu synthetisierte mRNA lagert. Diese Proteine, die in hoher Zahl im Zellkern vorkommen, übernehmen einige essentielle Funktionen im Transport der mRNA, der Vorbereitung des Spleißprozesses, der Anheftung des poly(A)- Endes und in der Stabilisierung der mRNA. Je nach Reifungsgrad der mRNA ändert sich die Proteinzusammensetzung dieser Komplexe.

Bestimmte hnRNPs (hnRNP-K, E1, E2) spielen bei der Stabilisierung der mRNA und der translationalen Regulation im Cytoplasma eine entscheidende Rolle. Diesen Vertretern der hnRNP-Familie ist das Vorhandensein von jeweils 3 KH- (hnRNP K homology) Domänen gemein, die es ihnen ermöglichen mit der Ziel-RNA zu interagieren (Ostareck-Lederer et al. 1998). Diese Domänen von 65- 70 AS Länge sind auch in weiteren, RNA-bindenden Proteinen zu finden.

hnRNP-K selbst ist ein 65 kDa großes Protein, dessen Gen auf dem Chromosom 9q21- q22.33 lokalisiert ist (Tommerup and Leffers 1996). Das Protein enthält 3 KH-Domänen und eine zwischen KH2 und KH3 gelegene Interaktionsdomäne (KI Domäne; siehe Abb. 7), die unter anderem 2 RGG- (Arg-Gly-Gly) Boxen enthält.

Eine weitere in der KI Domäne enthaltene prolinreiche Region vermittelt die *in vitro*-Bindung an die SH3- Domäne der Src- Tyrosinkinasen (Weng et al. 1994).



**Abbildung 8: Schematische Darstellung des hnRNP-K- Proteins**

hnRNP- K besitzt 3 KH- (hnRNP- K homology) Domänen, mit deren Hilfe es in der Lage ist, an RNA zu binden. Diese Regionen sind blau schraffiert dargestellt. Außerdem besitzt es eine sog. KI- (K-interactive) Domäne (blau liniert). In grau sind die Bindestellen von bisher identifizierten Interaktionspartnern von hnRNP- K markiert sowie das nuclear localisation signal (NLS – AS 21-37) und die nuclear shuttling Domäne (KNS – AS 338 – 361) dargestellt (Bomsztyk et al. 2004).

hnRNP- K ermöglicht es anderen Proteinen, die nicht an Nukleinsäuren binden können, indirekt an diese zu binden, sei es durch Anschluss an hnRNP- Komplexe oder durch eine direkte Bindung über hnRNP- K an mRNA (Bomsztyk et al. 2004).

Eine weitere Funktion von hnRNP- K ist die direkte Beteiligung an der Transkription. So bindet hnRNP- K an ein CT- reiches Element des c- myc Promotors, um so eine transkriptionelle Aktivierung zu ermöglichen (Takimoto et al. 1993).

hnRNP- K selbst kann an den Argininresten seiner RGG- Boxen durch die Argininmethyltransferase PRMT1 asymmetrisch dimethyliert werden. Diese Methylierung erfolgt durch eine direkte Interaktion der beiden Proteine (Ostareck-Lederer et al. 2006; Chan et al. 2009).

### **3.11. Ausgangspunkt und Ziele der Arbeit**

EBNA2 ist ein essentielles Protein für die Transformation von B- Zellen durch EBV (Cohen et al. 1989). Die Arginin- Glycin Repetition von EBNA2 stellt eine für diese Funktion des Proteins wichtige, aber nicht essentielle Region dar (Tong et al. 1994).

In unserer Arbeitsgruppe konnte zuvor gezeigt werden, dass das Survival of Motor Neuron Protein (SMN), ein Spleissfaktor, an die symmetrisch dimethylierte Arginin - Glycin- (RG-) Repetition von EBNA2 bindet (Barth et al. 2003). Aufbauend auf dieser Entdeckung wurden in Kooperation mit Frau Dr. E. Kremmer (Helmholz Zentrum, München) monoklonale Antikörper hergestellt, die spezifisch gegen die methylierte RG- Repetition [(asymmetrisch dimethylierte Arginine (aDMA), symmetrisch dimethylierte Arginine (sDMA), nicht methylierte Arginine (NMA) und Citrulline (Citr)] von EBNA2 gerichtet sind. Mit Hilfe dieser Antikörper sollte die Frage geklärt werden, ob neben der bekannten sDMA- Modifikation von EBNA2 (Barth et al. 2003) noch andere Methylierungskonfigurationen der RG- Repetition vorkommen. Die initiale Charakterisierung der Antikörper wurde von Herrn Alfredo Mamiani durchgeführt. Aus den Ergebnissen dieser Untersuchungen konnte abgeleitet werden, dass mit der Ausnahme eines Antikörpers (aDMA 6F12) alle methylierungsspezifischen Antikörper kein Signal im Western Blot erzeugen, wohl aber in einer Immunpräzipitation einsetzbar sind. Der Nachweis von Citrullin- modifiziertem EBNA2 gelang nicht.

Diese nun charakterisierten Antikörper wurden danach zur Untersuchung der *in vivo* Verteilung der verschiedenen EBNA2- Spezies in EBV- positiven Raji- Zellen verwendet. So hatte es den Anschein, dass die RG- Repetition von EBNA2 in allen 3 unterschiedlich methylierten Formen *in vivo* vorkommt.

Diese Ergebnisse, die als Grundlage meiner vorangegangenen Diplomarbeit dienten, mussten jedoch aufgrund einer Kreuzreaktivität des NMA - spezifischen Antikörpers

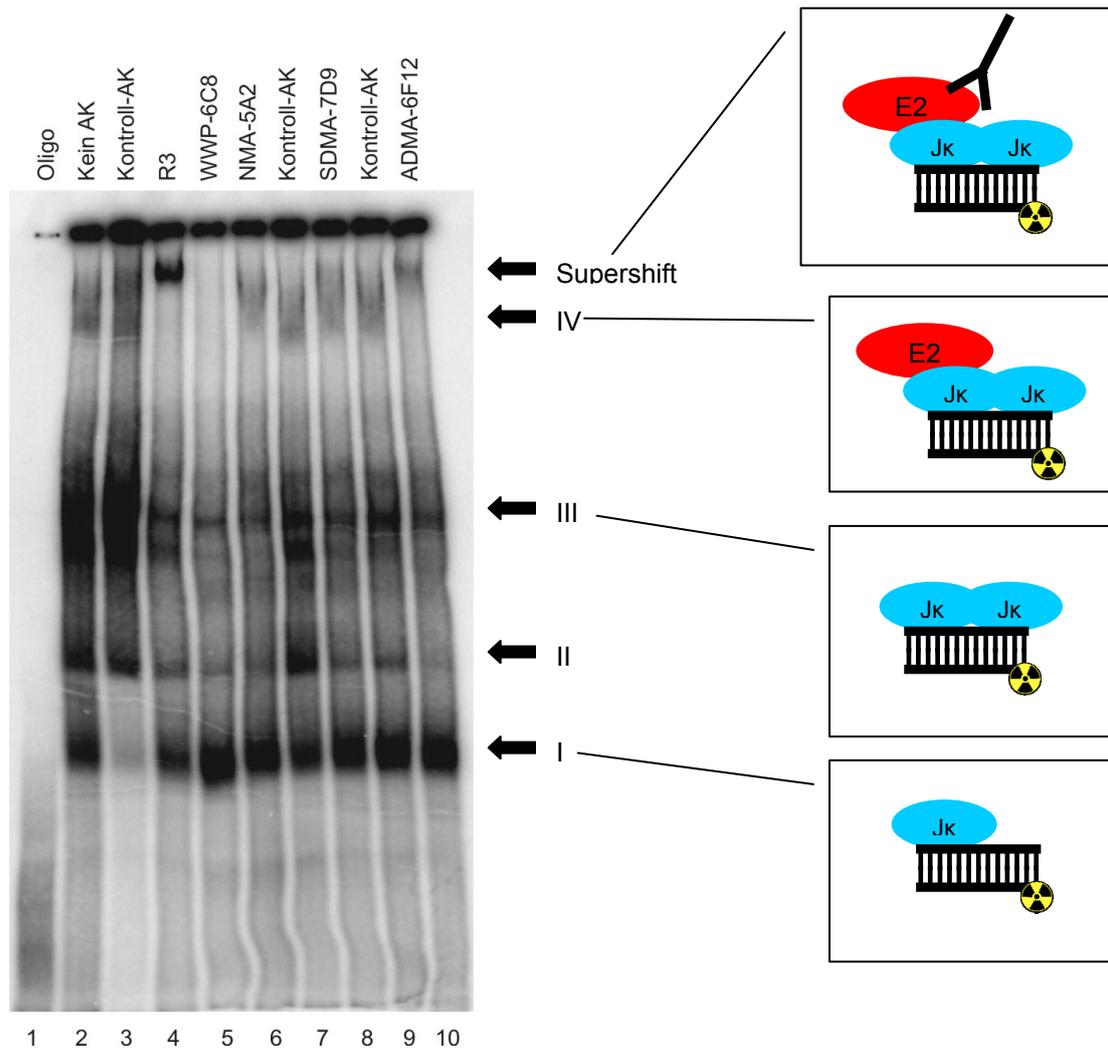
(NMA 5A2), welche nach Abschluss der Diplomarbeit identifiziert wurde, verworfen werden.

Ziel dieser Arbeit war die weitere Charakterisierung der gegen die verschiedenen methylierten RG- Repetitionen von EBNA2 gerichteten Antikörper, was auf Grund der Kreuzreaktivität des NMA Antikörpers 5A2 notwendig war, und die Identifikation von EBNA2 assoziierten Proteinen, die wie SMN (Barth et al. 2003), eine bestimmte Methylierungskonfiguration von EBNA2 zur Bindung an selbiges bevorzugen. Dies sollte mit einem Fusionsprotein von GST und einem Fragment von EBNA2, welches die Aminosäuren 300- 400 enthält (EBNA2aa300-400 - in Vorarbeiten von Herrn Alfredo Mamiani erstellt) überprüft werden. Dieses Fusionsprotein sollte in einem anschließenden *in vitro*- Methylierungsassay mit den verschiedenen Protein- Arginin-Methyltransferasen (PRMTs) verwendet werden um eine spezifische Methylierung zu erzeugen. Ein weiteres Ziel der Arbeit war die Identifizierung weiterer zellulärer Proteine, die auch von den methylierungsspezifischen Antikörpern, die gegen die RG- Repetition von EBNA2 gerichtet sind, erkannt werden und somit strukturelle Homologe von EBNA2 in der Zelle darstellen könnten.

Im Rahmen meiner vorangegangenen Diplomarbeit wurde, aufbauend auf den Voruntersuchungen von Herrn Alfredo Mamiani, mit Hilfe sogenannter Electrophoretic- Mobility- Shift Assays (EMSA) die Verteilung der methylierten EBNA2 Spezies am viralen LMP2a/Tp- Promotor untersucht um einen Überblick der Verteilung der verschiedenen methylierten EBNA2- Spezies an einem viralen Promotor zu erhalten.

Bei allen durchgeführten Gelshifts wurde ein 54bp großes Oligonukleotid verwendet, was der Sequenz des von EBNA2 aktivierten LMP2A/TP1- Promotors entspricht, und über 2 Bindestellen für RBPJ<sub>k</sub> verfügt (Zimmer-Strobl et al. 1994; Gross 2008).

Ein typischer Gelshift unter Verwendung der in dieser Arbeit charakterisierten monoklonalen methylierungsspezifischen Antikörper gegen EBNA2 ist in Abbildung 9 gezeigt.



**Abbildung 9: : Analyse der Zusammensetzung von EBNA2- haltigen DNA- bindenden Komplexen mit Hilfe von Kernextrakten EBV- positiver Raji- Zellen (Gross 2008)**

Kernextrakt aus Raji-Zellen wurde in vorgelegtem Bindungsmix mit dem entsprechenden Antikörper inkubiert. Als Antikörper wurden die methylierungsspezifischen NMA-5A2 (nicht methylierte RG-Repetition), SDMA-7D9 (symmetrisch dimethylierte RG- Repetition) und ADMA 6F12 (asymmetrisch dimethylierte RG- Repetition) und die nicht methylierungsspezifischen R3 (Epitop: C- Terminus von EBNA2) und WWP-6C8 (Epitop: WWP- Motiv von EBNA2, welches die Bindung zu RBP-Jk vermittelt), sowie die entsprechenden Isotyp- Kontrollen verwendet. Das Autoradiogramm wurde im Phosphoimager® erstellt. Komplex I stellt die Bindung eines RBP-Jk- Proteins an das Oligonukleotid dar; Komplex III eine Bindung von 2 RBP-Jk- Proteinen. Bei Komplex IV („Shift“) handelt es sich um eine zusätzliche Bindung eines EBNA2- Proteins an Komplex III, der bei erfolgter Antikörperbindung als „Supershift“ bezeichnet wird. Komplex II stellt eine unspezifische Bindung zellulärer Proteine an das Oligonukleotid dar. Die jeweilige Zusammensetzung der Komplexe ist in der rechten Bildhälfte schematisch dargestellt (Gross 2008).

Wie in Abb.9 zu erkennen ist, konnte nur aDMA methyliertes EBNA2 am viralen LMP2a- Promotor identifiziert werden.

---

Des Weiteren konnte im Rahmen der Diplomarbeit gezeigt werden, dass die Methylierung von EBNA2 eine essentielle Rolle bei der Bildung von EBNA2- haltigen DNA- bindenden Komplexen spielt. Nach einer Behandlung der Raji- Zellen mit dem Methylierungsinhibitor AdOx (Hoffman and McConnell 1987) war unter Verwendung dieser Kernextrakte in einem EMSA- Experiment eine Signalreduktion der EBNA2- haltigen „Shift“- Bande um bis zu 67% zu erkennen (Gross 2008).

Diese Beobachtung konnte unter Verwendung von *in vitro* synthetisiertem EBNA2, aus einem auf *E. Coli* basierenden *in vitro* Translationskit (RTS 500, Roche), bestätigt werden. Mit diesem Protein waren in einem Gelshift- Experiment keinerlei EBNA2- haltige Komplexe nachweisbar, welche jedoch nach *in vitro* Methylierung wieder erzeugbar waren (Gross 2008).

## 4. Material

### 4.1. Geräte

Blotkammer	LKB 2005 Transphor Electro Blotting Unit
Zellzähl-Gerät	CASY™- Counter, Schade Systems
PCR-Maschine	Peltier Thermal Cycler 200 der Firma MJ Research
Phosphoimager	Phosphoimager™- Typhoon mit Exponierplatten, - Kammer und Belichter, Personal Densitometer, Molecular Dynamics/Amersham
Photometer	Pharmacia Biotech Ultraspec 3000
Semi-Dry Blotter	2117 Multiphor, LKB Bromma
Ultraschallgerät	Bronson Sonifier 250
UV-Gerät	MWG Biotech Gelprint 2000 i
Zentrifugen	Heraeus Megafuge 1,0 R (mit Kühlung) Heraeus Picofuge (Tischzentrifuge ohne Kühlung) Sigma 202 MK (Tischzentrifuge mit Kühlung)

### 4.2. Chemikalien, Membranen, Filter

Acrylamid	Serva
Agarose	Seakem
Amidoschwarz	Sigma
Ammoniumpersulfat	Serva
Ampicillin (Binotal™)	Bayer
Bactoagar	DIFCO
Bisacrylamid	Serva
Bromphenolblau	Serva
Bovines Serumalbumin (BSA)	New England Biolabs
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Serva

---

Ethanol	Roth
Ethidiumbromid	Sigma
Fötale Kälberserum (FKS)	PAA Laboratories GmbH
Glycin	Serva
Hybond N+ Membran	Amersham
Hyperfilm ECL™	Amersham
Isopropanol	Roth
Isopropylthiogalactosid (IPTG)	Novagen
Magermilchpulver	Töpfer
3-Mercapto-1,2-propandiol	Sigma
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva
Natriumjodid	Sigma
Nitrocellulosemembran (Protran™)	Schleicher&Schuell
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Serva
NucleoSpin Extract™	Macherey-Nagel
Nukleotide (dNTPs)	Boehringer Mannheim
Paraformaldehyd	Sigma
Penicillin/ Streptavidin	Paa Laboratories
Poly d[(I-C)]	Roche
Ponceau S	Sigma
Röntgen-Entwickler-Konzentrat	ADEFO Chemie GmbH
Röntgen-Fixier-Konzentrat	ADEFO Chemie GmbH
SequaGel®Sequencing System	National Diagnostics
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Serva
Zellulosefilter Whatman™	Herolab (Maidstone, USA)

Alle weiteren, hier nicht aufgeführten Chemikalien, wurden über die Firmen Merck (Darmstadt) und Roth (Karlsruhe) in analysereiner Form bezogen.

---

**4.3. Puffer und Lösungen**

Amidoschwarz-Färbelösung	:	Isopropanol	25,0% (v/v)
		Essigsäure	10,0% (v/v)
		Amidoschwarz	0,1% (w/v)
Bindungspuffer für Gelshifts	:	HEPES	412 µl 1M Lösung, pH 7,9
		KCl	1,028 ml 1M Lösung
		EDTA	80µl 0,5M Lösung
		Ficoll	1,6g
Ad 10ml H <sub>2</sub> O			
Blaumarker	:	Bromphenolblau	0,25% (w/v)
		Glycerol	50% (v/v)
		EDTA	50 mM
Blockingpuffer	:	Magermilchpulver in PBS-Puffer	5% (w/v)
2xBromphenolblau Ladepuffer	:	Urea	8 M
		EDTA	50 mM
		Bromphenolblau	0,2-0,4 mg/ml
dNTPs	:	dATP, dCTP, dGTP, dTTP	je 10 mM
ECL-Lösung A	:	Luminol in DMSO	250 mM
ECL-Lösung B	:	p-Coumarsäure in DMSO	90 mM

---

ECL-Lösung C	:	Tris HCL pH 8,5	1M
ECL-Lösungs-Mix	:	Lösung A	2,5 ml
		Lösung B	1,13 ml
		Lösung C	2ml
		ad 250 ml H <sub>2</sub> O	
Entfärbelösung	:	Isopropanol	10% (v/v)
		Essigsäure	10% (v/v)
EMSA Puffer A	:	HEPES	5 ml 1M
		Lösung, pH 7,9	
		KCl	5 ml 1M Lösung
		MgCl <sub>2</sub>	750 µl 1M Lösung
		Ad 500 ml H <sub>2</sub> O	
		Zum Gebrauch: 10ml Puffer A + 50µl 1M	
		DTT + 50µl 0,1M PEFA	
EMSA Puffer B	:	HEPES	10 ml 1M Lösung, pH 7,9
		NaCl	42 ml 5M Lösung
		MgCl <sub>2</sub>	750 µl 1M Lösung
		EDTA	200 µl 0,5M Lösung, pH 8,5
		Glycerol	110 ml 100%-ige Lösung
		Ad 500 ml H <sub>2</sub> O	
		Zum Gebrauch: 10 ml Puffer B + 50µl 1M	
		DTT + 50µl 0,1M PEFA + 100µl 100% NP40	

---

Ethidiumbromidlösung	:	Ethidiumbromid	10 mg/ml H <sub>2</sub> O
PBS	:	NaCl	140 mM
		KCl	25 mM
		MgCl <sub>2</sub>	0,5 mM
		CaCl <sub>2</sub>	1 mM
		Na-K-Phosphat	10 mM
S1-Puffer	:	Tris-HCl	50 mM
		EDTA	10 mM
		RNase A	100 µg/ml
		ad pH 8.0	
S2-Puffer	:	NaOH	200 mM
		SDS	1% (w/v)
S3-Puffer	:	Kaliumacetat	2,8 M
		ad pH 5.1	
2x Sample-Buffer	:	Tris HCL (pH6,8)	130 mM
		SDS	6% (w/v)
		3-Mercapto-1,2propandiol	10% (v/v)
		Glycerol	10% (w/v)
		Bromphenolblau	0,05% (w/v)
20xSSC-Puffer (Stammlösung)	:	NaCl	3 M
		tri-Natriumcitrat-2-hydrat	0,3 M
SDS-Laufpuffer	:	Tris/HCl	0,025 M
		SDS	0,1% (w/v)
		Glycin	0,2 M

---

SOB-Medium	:	Trypton	20,0 g
		Hefe-Extrakt	5,0 g
		NaCl	0,6 g
		KCl	0,5 g
		ad 1000 ml H <sub>2</sub> O bidest., autoklaviert	
		Zugabe von 20 mM MgCl <sub>2</sub> direkt vor Gebrauch	
STET-Puffer	:	Tris (pH 8,0)	10 mM
		EDTA (pH 8,0)	50 mM
		Triton X-100	0,5% (v/v)
		Saccharose	8% (w/v)
		Zugabe von 0,5 mg/ml Lysozym direkt vor Gebrauch	
T4-Ligasepuffer (10×)	:	ATP	10 mM
		MgCl <sub>2</sub>	50 mM
		DTT	10 mM
		Tris/HCl (pH 7,5)	660 mM
TAE-Puffer 50x	:	Tris	2 M
		Natriumacetat	25 mM
		EDTA	0,5 M
		ad pH 7,8 mit Essigsäure	
TE-Puffer	:	Tris	10 mM
		EDTA	1 mM
		ad pH 7,6 mit Essigsäure	
Transferpuffer	:	Tris/HCl	25 mM
		Glycin	192 mM
		Methanol	20% (v/v)
		SDS	0,05% (w/v)

---

Trenngelstock	:	Tris-HCl pH 8,8	1,5 M
		SDS	0,4% (w/v)
10× Polymerase- Reaktionspuffer (Sigma)	:	KCl	500 mM
		Tris-HCl, pH 8,3	100 mM
		Gelatine	1 mg/ml
Sammelgelstock	:	Tris-HCl pH 6,8	0,5 M
		SDS	0,4% (w/v)
Mg <sup>2+</sup> Lösung	:	(2M) MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	20,33 g (1M)
		MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	24,65 g (1M)
		ad 100 ml H <sub>2</sub> O bidest., sterilfiltrieren	
Transformations-Lösung 1	:	RbCl	0,10 M
		MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0,05 M
		CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,01 M
		CH <sub>3</sub> COOH (pH7)	0,03 M
		Glycerol	15,0% (v/v)
		ad 1000 ml H <sub>2</sub> O bidest., sterilfiltriert	
		ad pH 5,8 mit 0,2 M CH <sub>3</sub> COOH	
Transformations-Lösung 2	:	MOPS (pH6,8)	0,500 M
		RbCl	0,010 M
		CaCl <sub>2</sub> ·H <sub>2</sub> O	0,075 M
		Glycerol	15% (v/v)
		ad 1000 ml H <sub>2</sub> O bidest., sterilfiltriert	

#### 4.4. Protein-Molekulargewichtsmarker

Zur Molekulargewichtsbestimmung von Proteinen bei der SDS-PAGE (Polyacrylamidgelelektrophorese) wurde ein selbst angesetzter „Low molecular weight –Marker“ (LMW-Marker) eingesetzt.

Dieser enthält folgende Proteine (Sigma Aldrich) in angegebener Konzentration:

Phosphorylase b	94	kDa	0,5 mg/ml
Kälberserumalbumin	67	kDa	0,7 mg/ml
Ovalbumin	43	kDa	1 mg/ml
Carboanhydrase	30	kDa	0,5 mg/ml
Trypsininhibitor aus Sojabohnen	20,1	kDa	1 mg/ml
Lactalbumin	14,4	kDa	0,5 mg/ml

#### 4.5. Antikörper

##### 4.5.1. Primärantikörper

**Tabelle 3: Liste der verwendeten Primärantikörper mit entsprechendem Epitop und Verdünnung im Western Blot**

Antikörper		Isotyp	Epitop	Verdünnung
R3 (Helmholz Zentrum München)	$\alpha$ - EBNA2 monoklonaler Antikörper (Kremmer et al. 1995)	Ratte IgG 2a	C- Terminus von EBNA2	1:10
aDMA 6F12 (Helmholz Zentrum München)	$\alpha$ - EBNA2 monoklonaler Antikörper (Gross et al. 2010)	Maus IgG 2b	EBNA2 aDMA RG- Repetition	1:10
sDMA 13B10 (Helmholz Zentrum München)	$\alpha$ - EBNA2 monoklonaler Antikörper (Gross et al. 2010)	Ratte IgG 2c	EBNA2 sDMA RG- Repetition	1:10

GQSR 8C3 (Helmholz Zentrum München)	$\alpha$ - EBNA2 monoklonaler Antikörper (Gross et al. 2010)	Ratte IgG 2c	EBNA2 NMA RG- Repetition	1:10
WWP 6C8 (Helmholz Zentrum München)	$\alpha$ - EBNA2 monoklonaler Antikörper	Ratte IgG 2a	EBNA2 WWP- Motiv	1:10
$\alpha$ – HA 3F10 (Roche)	$\alpha$ - HA Tag Antikörper	Ratte	HA- Tag	1:10
$\alpha$ - GST 6G9 (Helmholz Zentrum München)	$\alpha$ – GST Antikörper (Gross et al. 2010)	Ratte IgG 2a	GST	1:10
$\alpha$ - hnRNP-K (Santa Cruz)	$\alpha$ - hnRNP-K	Maus		1:5000
$\alpha$ $\beta$ -Actin (Sigma Aldrich)	$\alpha$ $\beta$ -Actin	Maus		1:5000

**Tabelle 4: Liste der verwendeten Isotypkontrollen für Immunpräzipitationen**

Name	Isotyp
RCC 3C2	Ratte IgG 2c
Anti-HA 12CA5	Maus IgG 2b
Gemp	Ratte IgG 2a

#### 4.5.2. Sekundärantikörper

(Gross 2008)

Die Sekundärantikörper anti Ratte - Pox (Kaninchen) und anti Maus - Pox (Ziege), welche Meerrettich- Peroxidase gekoppelt sind, wurden von der Firma Sigma- Aldrich bezogen und in der Regel in einer Verdünnung von 1:5000 eingesetzt.

---

#### 4.6. Zelllinien

- 293T: Eine humane Nierenepithelzelllinie, die durch den Adenovirus Typ5 transformiert wurde. Diese Zellen wurden außerdem stabil mit einer temperatursensitiven Variante des SV40- Virus infiziert und exprimieren dauerhaft das große T- Antigen des SV-40 Virus. Somit zeichnen sie sich bei Verwendung von Plasmiden mit SV-40- Promotor durch hohe Transfizierbarkeit aus.
- Raji: EBV- positive, non-producer Zelllinie. Sie wurde aus einem Burkitt-Lymphom (EBV Typ1) eines afrikanischen Patienten etabliert (Pulvertaft, 1965). In diesen Zellen liegt außerdem eine Chromosomentranslokation (t (8,14)) vor.
- B95.8: *In vitro* EBV- immortalisierte lymphoblastoide Zelllinie (LCL) aus B-Zellen eines Krallenaffen, welche mit dem Typ I- Virus eines IM-Patienten (Miller and Lipman 1973) infiziert wurden.
- P3HR1: Bei der P3HR1- Zelllinie handelt es sich um eine Subzelllinie der Jijoye-Zellen. Diese wurden aus EBV Typ2- positivem Burkitt- Lymphom-Tumormaterial eines afrikanischen Patienten etabliert. Die P3HR1 Zelllinie produziert jedoch nicht immortalisierende Viren mit einer Deletion im EBNA-LP/EBNA2- Bereich.
- DG75: EBV- negative Burkitt- Lyphom Zelllinie (Ben-Bassat et al. 1977).
- BL-41: Eine EBV- negative B- Zelllinie, die aus Biopsiematerial eines afrikanischen Burkitt- Lymphom- Patienten etabliert wurde.
- SF158: Insektenzelllinie aus Ovarzellen von *Spodoptera frugiperda* (Knudson and Tinsley 1974), welche zur Fremdexpression von Proteinen mit modifizierten Viren des Bakulovirusstammes AcNPV infiziert werden kann. Das Virus ist außerdem in der Lage, sich *in vitro* in der Zelllinie zu vermehren.

#### 4.7. Bakterienstämme

Zur Amplifikation von Plasmiden wurden die *E.Coli* Stämme MOSBlue (kultiviert aus pMOSBlue-T Vector™- Kit (Amersham/GE Healthcare) eingesetzt. Zur IPTG-induzierten Proteinexpression wurde der *E.Coli* Stamm BL21-DE3 (Studier et al. 1990) eingesetzt.

#### 4.8. Rekombinante Bakuloviren

Zur Herstellung von NP9 eukaryotischen Ursprungs wurde ein rekombinantes NP9-exprimierendes Bakulovirus eingesetzt. Hierzu wurde NP9 in einer PCR amplifiziert und als BamHI Fragment in den Bakulovirusvektor pAC360 eingefügt.

#### 4.9. Enzyme

(Gross 2008)

Klenow Fragment

Invitrogen

#### 4.10. Proteinextrakte

##### 4.10.1. PRMT5/WD45:

Ein in 20 mM NaHepes (pH 7.5), 200 mM NaCl und 5 mM DTT gelöstes Extrakt aus *Sf21*Insektenzellen in welchen PRMT5 und deren Co- Faktor WD45 co- exprimiert wurden und über eine Ni-ATA Säule dreistufig aufgereinigt wurden. Dieses Extrakt wurde unserer Arbeitsgruppe freundlicherweise von U. Fischer (Universität Würzburg) zur Verfügung gestellt.

#### 4.11. Peptide

OVA bzw. KLH gekoppelte Peptide, deren Argininreste jeweils entweder die ADMA,SDMA oder keine Methylierung trugen wurden von der Firma PSL, Heidelberg synthetisiert gemäß folgender Sequenz:

NH<sub>2</sub>-C-GQSRGRGRGRGRGRGKGKSRDK

Der N-Terminale Cysteinrest dient dem Koppeln von OVA bzw KLH.

---

## 4.12. Vektoren und Effektorstrukture

### 4.12.1. pSG5:

Der eukaryotische Expressionsvektor (4,1 kb) der Firma Stratagene ist sowohl *in vivo* als auch zur *in vitro* Translation einsetzbar. Neben einem SV40- Promotor (*in vivo* Transkription) enthält der pSG5- Vektor einen T7- Promotor, der eine *in vitro* Transkription ermöglicht. Zur Selektion der Bakterien verfügt er über ein Ampicillin Resistenzgen.

### 4.12.2. pGex4T1:

Ein Vektor der Firma Amersham Pharmacia Biotech (4,9 kb) der der IPTG induzierten Expression von Glutathion- S- Transferase (GST)- Fusionsproteinen in E.Coli dient.

### 4.12.3. pSG5 EBNA2 wt:

Vollängen EBNA2 Klon (AS 1-485; M-ABA-Stamm), der unserer Arbeitsgruppe freundlicherweise von M. Rowe (University of Wales, Cardiff, UK) zur Verfügung gestellt wurde.

### 4.12.4. pSG5- EBNA2 –LE

EBNA2 Mutante, die an der Stelle 323 der Aminosäuresequenz ein Leucin anstatt eines Tryptophanrestes besitzt (Barth et al. 2003).

### 4.12.5. pSG5- EBNA2-Δ121- 215

EBNA2 Mutante, die eine Deletion der Aminosäuren 121- 215 aufweist (Voss et al. 2001).

### 4.12.6. pSG5- EBNA2ΔRG

EBNA2- Deletionsmutante, deren RG- Repetition deletiert ist. Dieser Klon wurde unserer Arbeitsgruppe freundlicherweise von E. Kieff (Harvard Medical School, Boston, USA) zur Verfügung gestellt.

**4.12.7. pSG5-EBNA2 $\Delta$ Nco**

EBNA2 Mutante, die eine Deletion der Aminosäuren 325- 375 aufweist (Sauder et al. 1996).

**4.12.8. pSG5- EBNA2 $\Delta$ 202-328**

EBNA2 Mutante, die eine Deletion der Aminosäuren 202- 328 aufweist (Sauder et al. 1996).

**4.12.9. pSG5- EBNA2 $\Delta$ 341-472**

EBNA2 Mutante, die eine Deletion der Aminosäuren 341- 472 aufweist (Sauder et al. 1996).

**4.12.10. pSG5- CBF1:**

Vollängen RBP-Jk- Klon (Maier et al. 2005), der unserer Arbeitsgruppe von B. Kempkes (Helmholz Zentrum. München) freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurde.

**4.12.11. pSG5-NP9:**

Vollängen NP9- Klon (Armbruester et al. 2002; Armbruester et al. 2004), der unserer Arbeitsgruppe freundlicherweise von N. Müller- Lantzsch (Universität des Saarlandes, Homburg) zur Verfügung gestellt wurde.

**4.12.12. pEGFP- EBNA2:**

Kodiert für ein GFP-EBNA2 Fusionsprotein (Voss et al. 2001).

**4.12.13. pEGFP- SMN:**

Kodiert für ein GFP-SMN Fusionsprotein (Barth et al. 2003).

**4.12.14. dsRed-NP9**

Kodiert für ein dsRed-NP9 Fusionsprotein (Armbruester et al. 2004).Dieses Konstrukt wurde unserer Arbeitsgruppe freundlicherweise von N. Müller- Lantzsch (Universität des Saarlandes, Homburg) zur Verfügung gestellt.

**4.12.15. pIVEX2.3- MCS EBNA2**

Zur Herstellung dieses Vektors wurde die kodierende Region des EBNA2- Gens unter Verwendung einer PCR amplifiziert und als NdeI- SalI- Fragment in den pIVEX2.3- MCS- Vektor (Roche) eingefügt.

**4.12.16. pGEX4T1-EBNA2-aa300-400**

IPTG induzierbares EBNA2 Fragment, das die Aminosäuren 300- 400 des EBNA2- Proteins als GST- Fusionsprotein exprimiert. Dieses Konstrukt wurde von Alfredo Mamiani angefertigt.

**4.12.17. pET28b-His-PRMT1:**

IPTG induzierbarer His- PRMT1 Klon (Zhang and Cheng 2003), der unserer Arbeitsgruppe freundlicherweise von D.Ostareck und A. Ostareck- Lederer (Universitätsklinikum, Aachen) zur Verfügung gestellt wurde.

**4.12.18. pET28a+ His-PRMT1-His-hnRNP-K-His-PRMT1**

IPTG induzierbares Konstrukt, das ein Insert mit 2 His-PRMT1 und einer His-hnRNP-K kodierenden Region enthält, das unserer Arbeitsgruppe freundlicherweise von D.Ostareck und A. Ostareck- Lederer (Universitätsklinikum, Aachen) zur Verfügung gestellt wurde. Mit diesem Konstrukt ist es möglich direkt in Bakterien eine Methylierungsreaktion mit PRMT1 durchzuführen.

**4.13. Computersoftware**

*(Gross 2008)*

Zur Textverarbeitung dient Microsoft Word 2007™ (Microsoft Corp.). Grafiken wurden mit dem Programm Corel Elements 2 (Corel) erstellt. Die Erfassung der EMSA- Gele und die anschließende Quantifizierung erfolgte mit Image Quant 5.1 (Molecular Dynamics); die graphische Darstellung der Werte erfolgte mit Excel 2007™ (Microsoft Corp.).

#### 4.14. Kulturmedien für Säugerzellen

(Gross 2008)

DMEM: „Dulbecco's Modified Eagle Medium“ (Bio-Whittaker) wurde für eukaryotische Zellen verwendet, die in adhärenter Monolayer- Kultur wachsen. Es wurde jeweils mit 10% fötalem Kälberserum (FKS) und einem „4er Antibiotikum“ aus 40 U/ml Penicillin- G40, 10 U/ml Moronal, 10µg/ml Neomycinsulfat und 50 µg/ml Streptomycinsulfat versetzt.

RPMI 1640: Zur Kultivierung eukaryotischer Suspensionszellen wurde RPMI 1640-Medium (Sarstedt) verwendet. Dieses Medium wurde noch mit 10%igem fötalem Kälberserum und einem „4er Antibiotikum“ aus 40 U/ml Penicillin- G40, 10 U/ml Moronal, 10µg/ml Neomycinsulfat und 50 µg/ml Streptomycinsulfat, sowie 5% Natrium Pyruvat versetzt.

TC100: Dieses Medium (PAA) wurde zur Kultivierung der Insektenzelllinie SF158 benutzt. Es wurde 10% (v/v) FKS (PAA) und einem „4er Antibiotikum“ aus 40 U/ml Penicillin- G40, 10 U/ml Moronal, 10µg/ml Neomycinsulfat und 50 µg/ml Streptomycinsulfat, sowie 5% Natrium Pyruvat versetzt.

#### 4.15. Synthetische Oligonukleotide

(Gross 2008)

Zur Durchführung der RT- PCR wurden folgende Oligonukleotide (Armbruester et al. 2002) verwendet:

env/NP9-5' ATGAACCCATCGGAGATGCAA

env/NP9-3' ACAGAATCTCAAGGCAGAAG

gag-5' GGCCATCAGAGTCTAAACCACG

gag-3' GCAGCCCTATTTCTTCGGACC

GAPDH-5' AGTCCAGTGAGCTTCCCGTTCAGCA

GAPDH-3' TGGTATCGTGGAAGGACTCATGAC

Zur Durchführung eines Gelshifts wurden Oligonukleotide bestellt (MWG), annealt (3.2.1) und radioaktiv markiert (3.2.2).

O54bp-5' ctcgactcgtgggaaaatgggcggaagggcaccgtgggaaaatagttccagg

O54bp-3' cctggaactatftcccacggtgccctccgcccattftcccacgagtcgag

---

## 5. Methoden

### 5.1. Methoden eukaryotischer Zellkultur

#### 5.1.1. Kultur von B-Zellen in Suspension

(Gross 2008)

Die B- Zellen der Stämme „Raji“, „BL-41“ und „P3HR1“ wurden jeweils in 100 ml RPMI 1640 Medium (Sarstedt, ergänzt mit 10% FKS, „4er“ Antibiotikum 1:1000 und 5% Na- Pyruvat) in 175 cm<sup>2</sup> Flaschen bei 37°C und 7% CO<sub>2</sub> kultiviert, bei 2 mal wöchentlich durchgeführter Subkultivierung. Hierzu wurde die Zellsuspension abzentrifugiert (4°C und 1200 rpm), der Überstand verworfen, das erhaltene Pellet auf 2 Flaschen aufgeteilt und mit frischem Medium versetzt, um schädliche Stoffwechselprodukte zu entfernen und das Wachstum der Zellen nicht zu behindern. Um einen schädlichen Einfluss auf die B- Lymphozyten durch Spülmittelrückstände zu vermeiden, wurden in der Kultur ausschließlich sterile Plastikpipetten verwendet.

#### 5.1.2. Kultur von Monolayerzellen

(Gross 2008)

Im Gegensatz zu Suspensionskulturen wachsen Monolayer Zellkulturen adhärent auf einer speziellen Unterlage. Sie wurden in 20 ml DMEM Medium, dem 10% FKS und „4er“ Antibiotikum zugesetzt war, in 75cm<sup>2</sup> Flaschen bei 37°C und 7% CO<sub>2</sub> kultiviert, bei 2-mal wöchentlich durchgeführter Subkultivierung. Hierzu wurde das verbrauchte Medium unter sterilen Bedingungen abgenommen und der Zellrasen mit 1,5 ml Trypsin/EDTA gespült und anschließend mit 1 ml Trypsin/EDTA, nach kurzer Inkubation bei 37°C und 7% CO<sub>2</sub>, abgelöst. Die Zellen wurden danach auf 10 ml Gesamtvolumen mit DMEM- Medium verdünnt. Jeweils 1 ml dieser Lösung wurde in eine neue 75cm<sup>2</sup> Flasche übertragen und auf ein Volumen von 20 ml mit DMEM aufgefüllt. Die Zelllinie SF158 wurde in TC-100- Medium bei 27°C kultiviert und zweimal wöchentlich durch Abschaben und Verdünnung subkultiviert.

### 5.1.3. Transiente Transfektion eukaryotischer Zellen mit Nanofectin™

(Gross 2008)

Bei Nanofectin™ (PAA Laboratories) handelt es sich um ein positiv geladenes Polymer, das an DNA binden kann und in einen porösen Nanopartikel eingebunden ist. Dieser Komplex kann nun von den zu transfizierenden Zellen über Endocytose aufgenommen werden und verhindert außerdem die DNA- Degradation in der Zelle. Adhärente Zellen wurden einen Tag vor Transfektion gemäß den Herstellerangaben ausgesät und am darauf folgenden Tag, bei 60%igem Zellrasen, transfiziert. Für 75cm<sup>2</sup> Schalen wurden jeweils 8 µg Gesamt- DNA mit 492 µl 150 mM steriler NaCl- Lösung und 25µl Nanofectin™ mit 475µl steriler NaCl- Lösung gemischt. Von diesem Ansatz wurde jeweils 1 ml auf die Zellen aufgetropft. Die Weiterverwendung der transfizierten Zellen erfolgte 24 Stunden später.

### 5.1.4. Radioaktive Markierung eukaryotischer Zellen

Ca.  $3 \times 10^7$  Zellen wurden zur metabolischen Markierung zweimal in PBS und einmal in Phosphat- freiem RPMI-1640- Medium gewaschen und in 5ml Phosphat- freiem RPMI- 1640- Medium (inkl.: 10% dialysiertes FKS und 5mCi H<sub>3</sub><sup>32</sup>PO<sub>4</sub> ) für 4h inkubiert. Anschließend erfolgte nach 2 maligem Waschen in PBS eine native Lyse (5.4.2). Dem Lysepuffer wurde vorher Phosstop™ (Roche) zugesetzt. Das so erhaltene Extrakt wurde nun zur Immunpräzipitation eingesetzt.

## 5.2. Methoden der Bakterienkultur

### 5.2.1. Kultivierung von *E.Coli*

*E.Coli*- Suspensionskulturen wurden über Nacht bei 37°C im Brutraum kultiviert. Die Selektion erfolgte durch Zugabe der entsprechenden Antibiotika ins Kulturmedium. Zur Stammhaltung wurden 400µl der Suspensionskultur 200µl 20%-iges (v/v) DMSO zugesetzt und bei -70°C gelagert.

### 5.2.2. Herstellung kompetenter Bakterien nach der RbCl- Methode

(Kuschner 1978)

Hierzu wurden 30ml SOB- Medium mit einer Kolonie oder einem Aliquot einer Bakteriensuspension beimpft und unter Schütteln über Nacht bei 37°C kultiviert. 8 ml dieser Vorkultur wurden in 200 ml SOB- Medium überführt und bis zu einer optischen Dichte von 0,3 (bei 550 nm) kultiviert, was der exponentiellen Wachstumsphase entspricht. Danach werden die Bakterien zu jeweils 50 ml aliquotiert und 15 min auf Eis inkubiert. Nun erfolgt ein Zentrifugationsschritt (2000 rpm, 4°C) um die Bakterien zu pelletieren.

Diese werden danach in 16 ml Transformationspuffer 1 resuspendiert und 15 min auf Eis inkubiert. Nach erneutem Zentrifugationsschritt (2000 rpm, 4°C) wurde das Pellet in 4 ml Transformationspuffer 2 aufgenommen, aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert.

SOB-Medium:

Trypton	20 g/l
Hefeextrakt	5 g/l
NaCl	0,6 g/l
KCl	0,5 g/l

autoklaviert  
vor Gebrauch 10 ml/l 2M Mg<sup>2+</sup>-Lösung zugegeben

Transformationspuffer 1:

RbCl	12 g/l
MnCl <sub>2</sub> x4H <sub>2</sub> O	9,9 g/l
K-Acetat	30 ml/l 1M Lösung
Glycerol	150 ml/l

pH 5,8 mit 0,2 M Essigsäure eingestellt

Transformationspuffer 2:

MOPS	20 ml 0,5 M Lösung, pH 6,8
RbCl	1,2 g/l
CaCl <sub>2</sub> x2H <sub>2</sub> O	11 g/l
Glycerol	150 ml/l

### 5.2.3. Transformation kompetenter Bakterien

(Lederberg and Cohen 1974)

Die Aufnahme freier DNA durch kompetente Bakterien (siehe 3.22) wird als Transformation bezeichnet.

Ein Aliquot kompetenter Bakterien wurde auf Eis aufgetaut und 50 µl dieses Ansatzes mit 50 ng Plasmid-DNA versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Bakterien für 90 s bei 42°C im Wasserbad einem Hitzeschock ausgesetzt, wodurch die Aufnahme der Plasmid-DNA erleichtert wird. Nach kurzer Abkühlung von 1-2 min auf Eis wurde der Ansatz in die entsprechende Menge LB-Medium überführt und über Nacht bei 37°C kultiviert.

## 5.3. DNA- Techniken

### 5.3.1. Agarosegelelektrophorese von DNA- Fragmenten

DNA-Fragmente werden in einer Agarosegelelektrophorese gemäß ihrer Größe in einem elektrischen Feld aufgetrennt. Anhand der Größe der aufzutrennenden Fragmente wird im Vorfeld die Konzentration der Agarose im Gel bestimmt, um eine optimale Auftrennung zu gewährleisten. Das entsprechende Volumen Agarose wird in 1x TBE unter Kochen aufgelöst und nach dem Abkühlen auf ca. 50°C mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid, welches ein interkalierender Farbstoff ist und sich in die DNA einlagert, versetzt und in eine Gießvorrichtung zum Aushärten gegossen. Die entsprechenden DNA-Proben werden mit 1/5 Ladepuffer versetzt und in einer Gelelektrophoresekammer bei 80-120V aufgetrennt. Die Analyse der Gele erfolgt in einem Dokumentationssystem der Firma Biorad.

TAE-Puffer (50x):	Tris/HCl (pH 7,8)	2 M
	Na-Acetat	0,25 M
	EDTA	0,5 M
Ladepuffer:	Bromphenolblau	0,25 % (w/v)
	Glycerin	50 % (v/v)
	EDTA	50 mM

### 5.3.2. Polymerase- Kettenreaktion (PCR)

Ein Verfahren zur selektiven Amplifikation von Nukleinsäuren bestimmter Länge und Sequenz ist die Polymerase- Kettenreaktion (PCR). Dieses Verfahren beruht auf der Eigenschaft von DNA- Polymerasen, einen Nukleinsäureeinzelstrang zu einem Doppelstrang auffüllen zu können, wenn ihnen ein kurzer doppelsträngiger Bereich zur Verfügung steht. Zuerst wird die doppelsträngige DNA („Template“), welche es zu amplifizieren gilt, bei 95°C denaturiert. Im folgenden Schritt kühlt die Probe ab und es lagern sich die synthetischen komplementären Oligonukleotide an („Primer“), die wiederum als Ausgangspunkt des neu synthetisierten Stranges fungieren. Die DNA- Polymerase synthetisiert den neuen Einzelstrang in Gegenwart von Desoxyribonukleotiden („dNTPs“) wobei die freien 3`- Hydroxylenden als Synthesestartpunkt dienen. Durch die Wiederholung (30- 40 Zyklen) dieser Schritte kommt es zu einer Anreicherung der gewünschten Sequenz. Die für die PCR eingesetzte Taq- Polymerase, ein aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* stammendes Protein, ist auch bei hohen Temperaturen stabil. Die Reaktionsschritte werden vollautomatisch durch das PCR- Gerät Progene (Teche, Cambridge) durchgeführt.

### 5.3.3. Reverse Transkriptase- PCR (RT- PCR)

Um die Expression von Genen auf Nukleinsäureebene nachzuweisen ist es von Nöten, die Menge der entsprechenden mRNA zu bestimmen. Mit Techniken, die auf der Amplifikation von DNA beruhen ist es nicht möglich die Menge an vorhandener mRNA zu untersuchen. Somit macht man sich die Funktion der Reversen Transkriptase von Retroviren zu Nutze, die in der Lage ist RNA in cDNA umzuschreiben. Nach einem Solchen Schritt ist es möglich die nun vorhandene cDNA mittels einer DNA- abhängigen DNA- Polymerase zu amplifizieren und anschließend Gelelektrophoretisch nachzuweisen.

### 5.3.4. Annealing einzelsträngiger Oligonukleotide

(Gross 2008)

Komplementäre Oligonukleotide, die einzelsträngig vorliegen, können zu Doppelsträngen hybridisieren. Die in dieser Arbeit verwendeten Oligos wurden in

einem Volumen von 100µl gemischt ( $C=0,1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ), auf  $94^{\circ}\text{C}$  für 5 min erhitzt und danach über mehrere Stunden in Wasser abgekühlt um das Annealing zu ermöglichen.

### **5.3.5. Radioaktive Markierung von DNA- Fragmenten mit Klenowfragment**

(Gross 2008)

Das Klenowfragment ist die große Untereinheit der DNA- Polymerase I, welcher jedoch die 5'-3' - Exonukleaseeigenschaft des nativen Proteins fehlt. Die 5'-Überhänge der in 3.2.1 beschriebenen Oligonukleotide werden mit Hilfe des Klenowfragments aufgefüllt. In einem 30µl Ansatz wurden 100-150 ng Oligonukleotid, welches doppelsträngig vorliegt, mit 2 µl 10x Klenowpuffer, 1µl dNTP Mix ohne dCTP (dATP, dTTP, d GTP, je 2,5mM), 20 µCurrie [ $\alpha^{32}\text{P}$ ]-dCTP und 2 Einheiten Klenow-Enzym inkubiert. Der Ansatz wurde im Wasserbad bei  $25^{\circ}\text{C}$  für 1h inkubiert.

Die Aufreinigung der Nukleotide erfolgt über kommerziell erworbene Säulen („Illustra NICK columns“, GE Healthcare) gemäß der Angaben des Herstellers. Die Aktivität der aufgereinigten Fragmente wird mit Hilfe eines Szintillisationszählers gemessen und die Fraktion mit der höchsten Aktivität verwendet.

## **5.4. Proteintechniken**

### **5.4.1. Herstellung von Gesamtzellextrakten**

(Maniatis 1989; Gross 2008)

Die am Vortag 1:2 gesplitteten Suspensionszellen wurden für 10 min bei 1200 rpm abzentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde mit PBS gewaschen und danach in Samplebuffer (2-faches Pelletvolumen) aufgenommen. Um einen möglichst vollständigen Aufschluss der Zellen und eine Fragmentierung der DNA zu gewährleisten, wurde das gelöste Pellet für 10 Sekunden einer Ultraschallbehandlung unterzogen. Anschließend wurde die Probe 10 min lang im Wasserbad gekocht. Wurde im anschließenden Westernblot der methylierungsspezifische Antikörper „aDMA 6F12“ verwendet, wurde das Extrakt nach Ultraschallbehandlung nicht gekocht, sondern mit einem Proteaseinhibitorcocktail (Roche) versetzt und danach weiterverwendet.

#### **5.4.2. Herstellung nativer Gesamtzellextrakte**

Die Zellen (Suspension/Monolayer) wurden zweimal mit PBS gewaschen und danach mit dem entsprechenden Volumen Lysepuffer 1 versetzt, 10 min auf Eis inkubiert, die chromosomale DNA mit Ultraschall fragmentiert und zur Beseitigung von Zelltrümmern 10 min bei 4°C und 13.000 rpm zentrifugiert. Der so erhaltene Überstand wurde entweder direkt in den Immunpräzipitationsexperimenten eingesetzt oder bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

#### **5.4.3. Herstellung von Kernextrakten**

(modifiziert nach Dignam et al., 1983)

Die 48h vorher 1:2 gesplitteten Zellen werden mit kaltem, sterilem PBS gewaschen. Das nach Zentrifugation bei 1200rpm für 10 min erhaltene Pellet wird im 3-4 fachen Volumen an Puffer A resuspendiert. Es folgt eine einstündige Inkubation auf Eis, während der es zu einem starken Anschwellen der Zellen kommt. Die aufgequollenen Zellen werden anschließend durch mehrere Kolbenbewegungen in einem Dounce- Homogenisator aufgeschlossen.

Die Kontrolle der Aufschlusseffizienz erfolgt mit Hilfe einer Tryptanblaufärbung und anschließender Betrachtung unter dem Mikroskop.

Die intakten Zellkerne werden nun für 10sec bei 14000 rpm abzentrifugiert und der cytoplasmahaltige Überstand abpipetiert. Das Pellet aus Kernen wird einmal in Puffer A gewaschen und wiederum abzentrifugiert.

Danach wird es im 3-fachen Volumen an Puffer B resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert, was eine vollständige Freisetzung der Proteine ermöglicht. Durch eine 20 minütige Zentrifugation bei 4°C und 13000rpm werden die Kernproteine von den Zelltrümmern getrennt. Der kernproteinhaltige Überstand wird abpipetiert und bei -70°C gelagert.

#### 5.4.4. Konzentrationsbestimmung von Proteinextrakten

(Gross 2008)

Um eine Konzentrationsmessung einer Proteinlösung unter Verwendung eines Photometers durchzuführen, wird der Umstand ausgenutzt, dass das Absorptionsmaximum hauptsächlich vom Gehalt der aromatischen Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan geprägt wird und somit bei 280 nm liegt. Eine Absorptionseinheit entspricht der Konzentration von 1,8 mg/ml.

Um eine photometrische Messung der Proteinextrakte durchzuführen, wurde bei deren Herstellung ein 2x SDS- Probenpuffer (Samplebuffer) ohne Bromphenolblau verwendet und die Probe anschließend in einer Verdünnung von 1:50 in 0,1 M NaOH- Lösung gemessen.

Die erhaltene Extinktion wurde in folgende Formel eingesetzt um die erforderliche Proteinmenge für eine Gelelektrophorese zu bestimmen.

$$\frac{6,4}{E_{280}} \mu l = 15 \mu g \text{ Protein}$$

Durch dieses Ergebnis wird die Menge an 2x Sample- Buffer- Extrakt bestimmt, die einer Gesamtproteinmenge von 15µg entspricht.

#### 5.4.5. SDS- Polyacrylamid- Gelelektrophorese (SDS- Page)

(Laemmli, 1970; Maniatis, 1989(Gross 2008))

In einer SDS- Page können Proteine anhand ihres Molekulargewichts, ihrer Gesamtladung oder ihrer dreidimensionalen Struktur aufgetrennt werden. In dieser Diplomarbeit wurde ausschließlich unter denaturierenden Bedingungen gearbeitet, was zu einer Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht führt. Denaturierende Bedingungen werden durch die Zugabe von SDS (Sodiumdodecylsulfat) in Puffer und Gelmatrix erreicht.

Das negativ geladene SDS- Molekül lagert sich an die hydrophoben Regionen der Proteine an (pro 2 Aminosäurereste ein SDS- Molekül), was zu einer Kompensation der ursprünglich positiven Ladung des Proteins führt und dessen Ladung in eine stark negative verändert. Diese Überlagerung der eigentlichen Ladung geschieht proportional zu der Masse des Proteins. Außerdem werden alle nicht- kovalenten

Wechselwirkungen und dadurch die Tertiärstruktur des Proteins zerstört. Somit wird eine vollständige Denaturierung und ausschließliche Wanderung zur Anode erreicht. Die Matrix des Gels besteht aus Ketten polymerisierten Acrylamids, welche durch N, N'- Methyl- Bisacrylamid quervernetzt sind. Die Polymerisation wird durch Ammoniumpersulfat (APS) gestartet und durch Zugabe von N, N, N', N'- Tetramethylethyldiamin (TEMED) katalysiert. Das Mengenverhältnis von Acrylamid und Bisacrylamid, welches zur Herstellung des Gels eingesetzt wird, bestimmt die Porengröße und somit die Auftrennungseigenschaften. Um eine hohe Auflösung bei der Auftrennung zu erreichen, wurde eine diskontinuierliche Gelelektrophorese durchgeführt. Hierbei wird das aufzutrennende Proteingemisch auf ein, aus zwei Systemen mit unterschiedlicher Porengröße und unterschiedlichem pH- Wert bestehendes Gel aufgetragen. Das Proteingemisch läuft zuerst durch ein grobporiges Sammelgel (Uppergel), wo es konzentriert und zu einer einheitlichen Lauffront komprimiert wird. Danach wandert das Gemisch in ein feinporigeres Trenngel (Bottomgel), in dem die eigentliche Auftrennung der Proteine erfolgt. Um eine Bestimmung und Zuordnung der aufgetrennten Proteine zu erleichtern, wurde zusätzlich ein Gemisch aus Markerproteinen, deren Molekulargewicht bekannt ist, aufgetragen.

#### **5.4.6. Herstellung eines SDS- Polyacrylamidgels**

(Gross 2008)

Zwei Glasplatten (14,5 x 16,5 cm; eine mit Aussparung) wurden unter Verwendung von 70% [v/v] Ethanol gereinigt. In die drei Seiten ohne Aussparung wurde jeweils ein Teflon- Abstandshalter (Spacer) eingelegt. Die Platten wurden anschließend mit Klammern fixiert. Um ein Auslaufen des SDS- Gels zu verhindern, wurden die Ränder mit 1%-iger Agarose abgedichtet. Hierauf wurde das Trenngel zwischen die Platten gegossen (bis ca. 3 cm unter den Rand der Aussparung) und mit Aqua dest. überschichtet. Nach erfolgter Polymerisation des Trenngels wurde das Sammelgel gegossen und die später benötigten Geltaschen mit einem Teflonkamm ausgespart. Nach Polymerisation des Sammelgels wurde der Kamm sowie der untere Spacer entfernt und das Gel senkrecht in einer Elektrophoresekammer fixiert. Diese besteht aus 2 Behältern, die beide mit Laufpuffer gefüllt werden. Somit bildet das eingespannte Gel eine „Brücke“ zwischen den Pufferbehältern, durch die der Strom

fließen kann. Die Proteinproben werden mit Hilfe einer Hamilton- Pipette aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei 20 mA im Sammelgel und 40 mA im Trenngel für 2 – 2,5h.

**Tabelle 5: Komponenten und Mengen für ein 10%-iges Polyacrylamidgel**

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

#### 5.4.7. Coomassie- Färbung

Nach Auftrennung in der SDS- Page wurden die Proteine durch eine zweistündige Inkubation des Polyacrylamidgels in Coomassie- Blue- Lösung bei Raumtemperatur und anschließendem zweifachen Waschen in Entfärberlösung unspezifisch gefärbt. Das Gel konnte danach entweder in Folie eingeschweißt oder in einem Vakuumtrockner bei 80°C für 2h getrocknet werden.

Coomassie-Lösung:	Isopropanol	10% (v/v)
	Eisessig	25% (v/v)
	Coomassie Blue	0,02% (w/v)

Entfärber:	Isopropanol	10% (v/v)
	Eisessig	10% (v/v)

#### **5.4.8. Western Blot (Immunoblot)**

(Gross 2008)

Die zuvor durch eine SDS- Page aufgetrennten Proteine werden beim Western Blot auf eine Membran (Nitrocellulose) übertragen, wobei das bei der Elektrophorese entstandene Auftrennungsmuster erhalten bleibt und auf der Membran immobilisiert wird. Die Proteine binden hierbei über hydrophobe Wechselwirkungen an das Membranmaterial. Da bei diesem Verfahren die Immunreaktivität und funktionelle Aktivität der Proteine erhalten bleibt, können diese im weiteren Verlauf durch Einsatz spezifischer Antikörper immunologisch nachgewiesen werden (Immunoblot).

##### **5.4.8.1. Proteintransfer**

Vor dem Aufbau der Blotapparatur wurde die verwendete Nitrocellulosemembran (Schleicher & Schuell) in Transferpuffer äquilibriert. Anschließend wurde der Blot in einer mit Transferpuffer gefüllten Wanne aufgebaut.

Es wurde eine Vorrichtung aus zwei PVC- Gittern verwendet, die zusammengesteckt werden können und den Blotaufbau zwischen sich fixieren. Auf das erste Gitter wurde ein Schwammtuch, das mit 2 Whatmanpapieren überdeckt wird, gelegt. Darauf wird das Polyacrylamidgel, das luftblasenfrei von der Nitrocellulosemembran bedeckt ist, aufgelegt und mit 2 Whatmanpapieren und einem Schwammtuch bedeckt. Durch das Zusammenstecken der Gittervorrichtung wird der Aufbau luftblasenfrei arretiert. Schließlich wurde er, in richtiger Orientierung (Gel zur Anode) in die mit Transferpuffer gefüllte Blottingkammer (LKB 2005 Transphor Electro Blotting Unit) eingespannt und der Transfer bei 330 mA, 1h lang durchgeführt. Nach dem Transfer wurde die Membran zur unspezifischen Färbung aller Proteine ca. 10 min in PonceauS™ (Sigma- Aldrich), was eine reversible mit Wasser auswaschbare Färbung verursacht, gefärbt.

Die Markerspur wurde mit einem Skalpell abgetrennt und für 15 min in Amidoschwarzlösung irreversibel gefärbt. Die restliche Membran wurde anschließend für 30- 60 min bei Raumtemperatur in 5%-iger PBS- Milch geblockt, um unspezifische Bindungen der später eingesetzten Antikörper zu minimieren, indem die Bindungsstellen der Membran abgesättigt werden.

#### **5.4.9. Immunologischer Nachweis von membrangebundenen Proteinen**

(Gross 2008)

Der immunologische Nachweis der geblotteten Proteine erfolgt mit Hilfe von Antikörpern, die gegen die zu untersuchenden Proteine gerichtet sind. Die darauf folgende Detektion kann radioaktiv oder durch Chemilumineszenz erfolgen. In dieser Diplomarbeit wurde ausschließlich die chemilumineszente Methode verwendet.

Nach dem Absättigen mit PBS- Milch wurde die Membran mit dem entsprechenden Antikörper in 5- 10 ml PBS- Milch luftblasenfrei in Klarsichtfolie eingeschweißt und über Nacht auf einem Taumler bei 4°C inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde die Membran 3x15 min mit PBS gewaschen, um die ungebundenen Antikörper zu entfernen. Danach wurde die Membran mit dem entsprechenden Sekundärantikörper, der gegen die konstante Region der vorher eingesetzten Antikörper gerichtet und an Meerrettich- Peroxidase gekoppelt ist, in 5 ml PBS- Milch luftblasenfrei eingeschweißt und für 1h bei 4°C auf einem Taumler inkubiert.

Nach diesem Inkubationsschritt wurde die Membran wiederum 3x 15 min mit PBS gewaschen. Darauf erfolgte die Detektion der gebundenen Sekundärantikörper mit Hilfe des ECL™- Kits (Enhanced Chemiluminescence, Amersham). Bei Zugabe der ECL- Lösung erfolgt eine Peroxidase- katalysierte Reduktion von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und gleichzeitige Oxidation von Luminol, was mit einer Lichtemission verbunden ist ( $\lambda=428$  nm), die von einem blaulichtempfindlichen ECL™- Film (Hyperfilm ECL™, Amersham) dokumentiert wird. Hierzu wurde die Membran mit den kurz vorher gemischten ECL™- Lösungen 1 & 2 (je 3ml) für eine Minute inkubiert, mit Whatmanpapier kurz getrocknet und der ECL™- Film für eine entsprechende Expositionszeit aufgelegt. Nach anschließender Entwicklung und Fixierung wurde der Film zum Trocknen aufgehängt.

#### **5.4.10. Dot Blot Assay**

Um die hergestellten monoklonalen Antikörper in ihrer Affinität zu überprüfen wurde auf Nitrocellulosestreifen 0,1 µg OVA-gekoppeltes Peptid aufgetropft. OVA- HA diente als interne Kontrolle. Die so beladenen Streifen wurden in 1%igem PBS- Magermilchgemisch geblockt und über Nacht mit den entsprechenden Antikörpern (1:10 verdünnt) inkubiert. Der Nachweis der gebundenen Antikörper geschah mittels ECL® Methode.

#### 5.4.11. Immunfluoreszenzen

Um die subzelluläre Lokalisation von Proteinen untersuchen zu können wurden 293T Zellen in 6- Well Platten auf Deckgläser ausgesät und mit der Nanofectin- Methode transient transfiziert. 24h nach Transfektion wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, 5 min bei RT mit 4%iger Paraformaldehydlösung fixiert und 2 min bei -20°C in 0,2% Triton-X-100 permeabilisiert. Um die Kerne sichtbar zu machen, erfolgte eine Inkubation der Zellen für 2 min bei 37°C in einer DAPI- Methanol- Lösung (0,2 µg/ml) mit anschließendem einmaligem Methanol Waschschrift. Die so behandelten Zellen wurden abschließend auf mit Elvanol betropfte Objektträger gelegt, versiegelt und bis zur weiteren Auswertung bei 4°C gelagert.

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

Auswertung und Dokumentation erfolgte an einem Leica TCS SP2 (Leica Microsystems, Wetzlar) konfokalen Laser- Scanning Mikroskop in Kooperation mit Frau Dr. Elfriede Nössner, Helmholtz Zentrum, München.

Fluochrom	Anregungswellenlänge	Detektionswellenlänge	% Anregungslicht
GFP	488 nm	500 – 540 nm	23 %
dsRed	534 nm	590 – 659 nm	40%

Kontrast und Helligkeit wurden mit der Leica LCS Lite Software korrigiert.

##### 5.4.11.1. Auswertung von Kollokalisierungen

Die erhaltenen Fluoreszenzaufnahmen wurden mit Hilfe der Huygens Essential Software (Scientific Volume Imaging B.V. (SVI), Hilversum, Niederlande) dekonvuliert um eine Eliminierung des Streulichts zu erreichen. Die Kollokalisierung wurde mit Hilfe des softwareeigenen Kollokalisationswerkzeugs mit Auswahl des „Pearson colocalization coefficient“ untersucht. Zellen die Kollokalisationshotspots, eine Region mit hoher Intensität beider Fluochrome, enthalten wurden gezählt und in Verhältnis mit der Gesamtzellzahl gesetzt.

#### **5.4.12. (Co-) Immunpräzipitation von Proteinen**

Konstante Fc- Abschnitte von Antikörpern besitzen eine hohe Affinität zu Protein- G- Sepharose. So lassen sich mit an Protein- G- Sepharose gekoppelten Antikörpern Proteine oder Proteinkomplexe aus nativen Zellextrakten isolieren.

Zuerst erfolgte die Kopplung der Antikörper an 150µl einer 1:3 in PBS vorliegenden Protein- G- Sepharose Lösung für 3h bei 4°C auf einem Rotator. Von monoklonalen, unaufgereinigten Antikörpern wurden 500 µl, von aufgereinigten, monoklonalen Antikörpern wurde eine Verdünnung von 1:1000 in PBS zugegeben.

Nach erfolgter Inkubation und einmaligem Waschen in Lysepuffer 1 wurde native Zellextrakt aus Suspensions- oder Monolayerzelllinien (transfiziert/untransfiziert) zugegeben und für 4h bei 4°C (Immunpräzipitation) oder 2h bei 4°C (Co-Immunpräzipitation) auf einem Rotator inkubiert.

Anschließend erfolgte ein dreimaliger Waschschrift mit Lysepuffer 2 und ein einmaliger Waschschrift mit Lysepuffer 1 bevor nach kompletter Abnahme der Waschlösung 100µl 2x Probenpuffer zugegeben wurden und die Sepharose für 10 min bei 99°C im Wasserbad gekocht wurde. Danach wurde die Sepharose abzentrifugiert (13.000 rpm, 5 min) und der Überstand in der SDS- Page und im Western- Blot analysiert.

#### **5.4.13. Rekombinante Genexpression in Bakterien**

Um eine rekombinante Expression von Glutathion- S- Transferase (GST)- Fusionsproteinen durchzuführen wurden mit pGEX4T1- Konstrukten transformierte BL21DE3- Bakterien bis zu einer optischen Dichte von  $OD_{600}=0,6$  kultiviert und die Expression durch Zugabe von 0,1 mM IPTG induziert. Nach vierstündiger Inkubation wurden die Bakterien bei 6000rpm, 4°C pelletiert anschließend in 2x Probenpuffer denaturiert oder nativ zur weiteren Verwendung in der Affinitätschromatografie aufgeschlossen.

Eine Ausnahme bildet das pet21-PRMT1-hnRNP-K-PRMT1 Konstrukt bei welchem zur vollständigen Methylierung von hnRNP-K eine weitere Inkubation mit Erythromycin (2h) an die 4 stündige Inkuabtion angeschlossen wurde.

#### 5.4.13.1. GST- Affinitätschromatographie („GST- PullDown“)

Die mit Hilfe des pGEX4T1 exprimierten Fusionsproteine enthalten am N- Terminus einen GST- Anteil durch den eine spezifische Bindung an Glutathion- Sepharose ermöglicht wird. Die Bakterienpellets werden in Lysepuffer resuspendingiert, durch Beschallen lysiert und abzentrifugiert (6000 rpm, 1h, 4°C). Der so erhaltene Überstand wurde für 2-3 h mit 500 µl 50%iger Glutathion- Sepharose bei 4°C auf dem Rotator inkubiert. Anschließend erfolgen 4 Waschschrirte mit Kopplungspuffer. Die so gereinigten und an Sepharose gebundenen GST- Fusionsproteine wurden nun mit einem nativen Gesamtzellextrakt inkubiert, welchen den mutmaßlichen Bindungspartner enthält. Die Inkubation erfolgt für ca. 3h bei 4°C in Kopplungspuffer. Danach werden die Ansätze 6- 8 mal mit Kopplungspuffer gewaschen, in 100 µl 2x Probenpuffer aufgenommen und die an die Sepharose gebundenen Proteine durch 10 minütiges Kochen im Wasserbad denaturiert. Die Interaktion der Proteine wird anschließend in einer SDS- Page und einem Western- Blot analysiert.

Lysepuffer:	Tris/HCl, pH 8.0	20 mM
	EDTA	1 mM
	NaCl	100 mM
	NP40	1% (v/v)
	Lysozym	100 µg/ml

Kopplungspuffer:	Tris/HCl, pH8.0	20 mM
	EDTA	1 mM
	NaCl	100 mM
	NP40	1% (v/v)

---

#### 5.4.14. *In vitro* Translation von Proteinen

(Gross 2008)

##### 5.4.14.1. TNT® Coupled Reticulocyte Lysate System

Zur zellfreien Herstellung von Protein wurde im Rahmen dieser Arbeit das TNT® Coupled Reticulocyte Lysate System der Firma Promega verwendet. Dieses Kit zeichnet sich durch die Kombination von T7-Polymerase, die von dem eingesetzten DNA- Template, welches aus einem pSG5- Vektor, mit eingefügtem, zu exprimierendem Gen und einem T7- Promotor besteht, eine mRNA erzeugt und einem Hasen-Reticulocytenlysat, welches die Translation des Proteins veranlasst, aus. Der Versuch wurde gemäß der Angaben des Herstellers durchgeführt.

##### Eine Reaktionslösung enthält:

- 25 µl TNT Rabbit Reticulocyte Lysat
- 2µl TNT Reaktionspuffer
- 1µl TNT T7 Polymerase
- 1µl Aminosäuren Mixture (ohne Leucin)
- 1µl Aminosäuren Mixture (ohne Methionin)
- 1µl RNasin Ribonuclease Inhibitor
- 16µl Aqua bidest.
- 1µg DNA Template (Plasmid)

Der Reaktionsansatz wurde bei 30°C für 90 min inkubiert.

##### 5.4.14.2. *E.Coli* Rapid Translation System 500 (RTS 500)

Zur zellfreien Herstellung von Proteinen in prokaryotischer Umgebung wurde in der vorliegenden Arbeit das *E.Coli* Rapid Translation System 500 (RTS 500, Roche) verwendet. Die Durchführung der Reaktion erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers und wurde freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Zimmermann, Biochemie, Homburg durchgeführt.

## 5.4.15. *In vitro* Methylierung von Proteinen

### 5.4.15.1. Aufbereitung der Proteine

Nach nativem Aufschluss der induzierten Bakterien (5.4.13) wurde zur weiteren Aufreinigung des Lysats eine NAP™25 Säule der Firma GE Healthcare eingesetzt. Diese wurde zuerst mit 25ml PBS äquilibriert und danach wurden 2,5 ml des Lysats zugegeben.

Die Säule ist mit Sephadex™- G25- Sepharose beladen, welche als molekulares Sieb agiert wobei kleine Moleküle zurückgehalten werden und größere Moleküle hindurchlaufen. Die Elution der aufgereinigten Proteine wurde mit 3,5 ml PBS durchgeführt, das Eluat jeweils zu 100 µl aliquotiert und bei -70°C gelagert.

### 5.4.15.2. Methylierungsansatz

Der *in vitro* Methylierungsansatz setzte sich folgendermaßen zusammen:

- His- PRMT1 bzw. PRMT5/WD45                      20 µl / 5µl
- Substrat (EBNA2 aa300-400)                      20µl
- S- Adenosyl- Methionin (SAM/ 0.5 nM)              5µl

Der Ansatz wurde 1 h bei 37°C im Heizblock inkubiert.

## 5.4.16. Methylierung von Proteinen mittels Reticolucytenlysat

(Gross 2008)

Es ist bekannt, dass in kommerziell erhältlichen *in vitro*- Translationskits PRMTs vorhanden sind und somit eine nachträgliche Methylierung auf diesem Wege erfolgreich sein sollte (Denman 2008). Somit sollte es möglich sein mit DNA- freiem Reticolucytenlysat mit dem Methylgruppdonor S- Adenosyl- Methionin (SAM) unmethylierte Proteine nachträglich zu methylieren.

Die Methylierung erfolgte gemäß folgendem Ansatz:

- |  |       |
|--|-------|
| • Reticolucyten Lysat*                 | 25 µl |
| • TNT®- Reaktionspuffer*               | 2 µl  |
| • Aminosäuren- Mix*                    | 3 µl  |
| • Aqua bidest.                         | 16 µl |
| • RTS 500 EBNA2                        | 40 µl |
| • S- Adenosyl- Methionin (SAM/ 0.5 nM) | 3 µl  |

Der Ansatz wurde 2h bei 30°C im Wasserbad inkubiert.

Die mit "\*" gekennzeichneten Bestandteile sind im TNT® Coupled Reticulocyte Lysate System enthalten.

## 5.5. Untersuchung von Protein- DNA- Wechselwirkungen

### 5.5.1. Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA/Gelshift)

(Modifiziert nach Fried und Crothers, 1981)

Freie DNA wandert in einer nativen Gelelektrophorese schneller als DNA-Proteinkomplexe. Die vorher mit dem DNA- Fragment inkubierten Proteinlösungen werden auf ein 4%iges Polyacrylamid- Gel aufgetragen und unter nativen, den DNA-Proteinkomplex nicht zerstörenden Bedingungen aufgetrennt.

Ein proteingebundenes Fragment wandert langsamer als die freie DNA und erscheint als nach oben verschobene (Shift) Bande. Zur Identifikation der gebundenen Proteine werden zusätzlich Antikörper in der Bindungsreaktion eingesetzt.

Bindet ein Antikörper an den DNA- Proteinkomplex, wird dieser noch größer und wandert wiederum langsamer als der Komplex der Shift- Bande. Solche schweren Komplexe erscheinen als weiter nach oben verschobene Bande oberhalb der Höhe der Shift- Bande (Supershift). Zur Durchführung dieses Versuches wurden entweder 4 µl Zellkernextrakt (siehe 3.3.2) oder 4 µl *in vitro* translatiertes Protein (TNT™ Reaktionsansatz) (siehe 3.3.9.1) und 9 µl Bindungsmix mit einem Antikörper für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde 4µl radioaktiv markiertes Oligonukleotid (siehe 3.2.1) hinzugegeben und der Ansatz für weitere 15 min bei Raumtemperatur inkubiert, mit 5 µl Blaumarker versetzt und auf das native Gel

aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 18 mA und 4°C für ca. 3h. Anschließend wurde das Gel auf einem Gelrockner unter Vakuum bei 60°C für 45 min getrocknet und die Banden durch Autoradiographie mit Hilfe eines Phosphorstoragecreens (Molecular Dynamics) detektiert.

Gebrauchspuffer:

- 200 µl Bindungspuffer (siehe 2.3)
- 1 µl 1 M DTT
- 1 µl 0,1 M PEFA

Bindungsmix (Je 9 µl pro Reaktionsansatz):

- 5 µl Gebrauchspuffer
- 2 µl Poly[d(I-C)] (c=2 µg/µl)
- 2 µl BSA (c=10mg/ml)

4%-iges natives Polyacrylamidgel:

- 28 ml Aqua bidest.
- 4 ml Rotiphor40® (Roth)
- 8 ml 1xTBE
- 400 µl APS
- 50 µl TEMED

Vor Erstellen des Gelansatzes wurde die verwendete Gelkassette (Protean® Xii, BioRad) nach Angaben des Herstellers zusammengesetzt, das Gel gegossen, nach Polymerisation in die Gelkammer eingespannt und bei 18 mA, 4°C 1h vorlaufen gelassen.

## 6. Ergebnisse

In EBV- transformierten Zellen werden 11 sogenannte latente Gene exprimiert, von denen EBNA2 zu den essentiellsten für die Transformation gehört.

EBNA2 ist ein multifunktionaler Transaktivator (Palermo et al. 2008), der nicht direkt mit der DNA interagieren kann, dies aber durch Bindung seines Trp- Trp- Pro („WWP“) Motivs an den Repressor RBPJk vermag (Zimber-Strobl et al. 1993; Henkel et al. 1994). EBNA2 bindet an eine Vielzahl von zellulären Proteinen wie z.B. Transkriptionsfaktoren (Bornkamm and Hammerschmidt 2001), am RNA Metabolismus beteiligte Proteine wie DDX20 (DP103/Gemin3) (Grundhoff et al. 1999) und SMN (Voss et al. 2001; Barth et al. 2003).

EBNA2 besitzt an der Position 339- 354 seiner Aminosäuresequenz eine Arginin- Glycin- (RG-) Repetition, welche eine regulatorische Funktion der Aktivität von EBNA2 einnimmt (Tong et al. 1994). Eine Deletion der RG- Repetition führt zu einer schlechteren Transformationsrate und hat außerdem einen negativen Einfluss auf die Transaktivierungsaktivität am Cp- Promotor (Tong et al. 1994), wohingegen die Aktivierung des LMP1- Promotors erhöht ist.

Die Methylierung von Argininresten in Proteinen ist eine posttranslationale Modifikation, die eine Vielzahl von zellulären Prozessen beeinflusst und im Gegensatz zu anderen posttranslationalen Modifikationen (Phosphorylierung, Acetylierung) eine recht stabile Modifikation darstellt.

In Kooperation mit Frau Dr. Elisabeth Kremmer (Helmholz Zentrum, München) wurden monoklonale Antikörper gegen die möglichen (unmethyliert, sDMA- und aDMA- modifiziert) Methylierungszustände der EBNA2- RG- Repetition hergestellt. Des Weiteren wurden Antikörper gegen eine Citrullin- modifizierte RG- Repetition erstellt, da es sich hierbei auch um eine gängige Modifikation von Argininen handelt.

Durch die Ergebnisse meiner vorangegangenen Diplomarbeit (Gross 2008) konnte gezeigt werden, dass die in der RG- Repetition vorhandenen Arginine in 3 verschiedenen Methylierungskonfigurationen vorkommen, wobei die Existenz der unmethylierten (NMA) Form der RG- Repetition aufgrund einer Kreuzreaktivität des entsprechenden Antikörpers kritisch zu betrachten ist. Ein Nachweis einer Citrullin- modifizierten RG- Repetition gelang jedoch nicht.

Ziel dieser Arbeit war die weitere Charakterisierung der gegen die verschiedenen methylierten EBNA2 Spezies gerichteten Antikörper und die Identifikation von

assoziierten Proteinen der EBNA2 RG- Repetition. Außerdem sollten weitere zelluläre Proteine, die direkt von den methylierungsspezifischen Antikörpern, die gegen die RG- Repetition von EBNA2 gerichtet sind, erkannt werden und somit strukturelle Homologe von EBNA2 in der Zelle darstellen könnten, identifiziert werden.

### **6.1. Die Arginin- Glycin (RG-) Repetition von EBNA2**

In meiner vorangegangenen Diplomarbeit (Gross 2008) und den Arbeiten von Herrn Alfredo Mamiani wurden die gegen die verschiedenen methylierten Arten der EBNA2- RG- Repetition gerichteten monoklonalen Antikörper bereits charakterisiert. So konnte gezeigt werden, dass der aDMA- spezifische Antikörper 6F12 als einziger der methylierungsspezifischen Antikörper in einem Western Blot Experiment zur Detektion von aDMA EBNA2 aus nativen Extrakten eingesetzt werden kann. sDMA und NMA- spezifische Antikörper konnten hingegen nur in einer Immunpräzipitation zur Detektion der entsprechenden modifizierten EBNA2 Spezies eingesetzt werden. Da jedoch nach Abschluss der Arbeit eine Kreuzreaktivität des verwendeten NMA 5A2 Antikörpers erkannt wurde, wurden die methylierungsspezifischen monoklonalen Antikörper in ersten Experimenten einer neuerlichen Charakterisierung unterzogen.

#### **6.1.1. Charakterisierung der methylierungsspezifischen Antikörper**

Um einen Überblick über die Kreuzreaktivität der Antikörper zu erhalten, wurde ein ELISA durchgeführt und die monoklonalen Antikörper hierbei gegen die verschiedenen OVA- gekoppelten Peptide, die entweder nicht methylierte (NMA)-, symmetrisch dimethylierte (SDMA)- oder asymmetrisch dimethylierte (ADMA)- Arginine bzw. Citrulline enthalten getestet. Da die Immunisierung der Ratten bzw. Mäuse mit KLH- oder BSA- Konjugaten der verschiedenen Peptide durchgeführt wurde, wurden im ELISA OVA- gekoppelte Peptide zur Verifizierung der Antikörper verwendet um ein Signal durch KLH- bzw. BSA- spezifische Antikörper zu unterbinden, die das Ergebnis der Charakterisierung verfälscht hätten. Die an die Ova- gekoppelten Peptide gebundenen Antikörper wurden nach Bindung entsprechender Peroxidase-gekoppelter Sekundärantikörper mit Hilfe eines Substrats (TMB, Pierce) detektiert. Dieses Substrat erfährt durch die Peroxidase eine Farbänderung, die bei einer Messung der Absorption bei 650nm detektierbar ist. Die

Durchführung des ELISA erfolgte in der Arbeitsgruppe von Elisabeth Kremmer, München. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 aufgelistet. Die Antikörper erzeugen ihrer Spezifität entsprechend Signale (fett hervorgehoben). Signale unterhalb  $OD_{650nm} = 0,1$  wurden als Hintergrund betrachtet.

**Tabelle 6: Ergebnisse des ELISA- Screenings der methylierungsspezifischen Antikörper (Elisabeth Kremmer, München)**

Antikörper	Antigen	OVA	NMA	sDMA	aDMA	CITR
Kontrolle		0,076	0,051	0,055	0,055	0,056
		0,055	0,054	0,057	0,051	0,052
sDMA (13B10)		0,066	0,061	<b>0,568</b>	0,06	0,06
		0,058	0,059	<b>0,528</b>	0,069	0,06
aDMA (6F12)		0,07	0,076	0,093	<b>0,596</b>	0,055
		0,065	0,074	0,094	<b>0,487</b>	0,063
NMA (8C3)		0,096	<b>0,134</b>	0,063	0,07	0,067
		0,057	<b>0,139</b>	0,074	0,076	0,053

Wie in Tabelle 6 ersichtlich zeigen die Antikörper jeweils nur eine Reaktion mit dem entsprechenden Peptid, welches zur Immunisierung verwendet wurde. Eine Kreuzreaktivität kann somit ausgeschlossen werden.

In nächsten Schritt wurden die Antikörper in einem Dotblot Assay einer Spezifitäts- und Kreuzreaktivitätsprüfung unterzogen um die im ELISA erhaltenen Daten zu verifizieren und Bindungseigenschaften der Antikörper in einem anderen Assay zu überprüfen. Hierzu wurden OVA- gekoppelte Peptide, die entweder nicht methylierte (NMA)-, symmetrisch dimethylierte (SDMA)- oder asymmetrisch dimethylierte (ADMA)- Arginine bzw. Citrulline enthalten, auf Nitrocellulosestreifen aufgetragen und ein HA gekoppeltes OVA- Peptid als interne Kontrolle verwendet, dessen Detektion durch den HA- spezifischen 3F10 Antikörper erfolgte (Roche, Penzberg). Jeder Streifen wurde anschließend mit dem entsprechenden Antikörper inkubiert und die gebundenen Antikörper mit der ECL- Methode detektiert.

	NMA 8C6	SDMA 2B5	SDMA 13B10	SDMA 7D9	ADMA 6F12	Citr. 4A6	Anti-HA
HA							•
Citr.						•	
NMA	•						
SDMA		•	•	•	•		
ADMA				•	•		

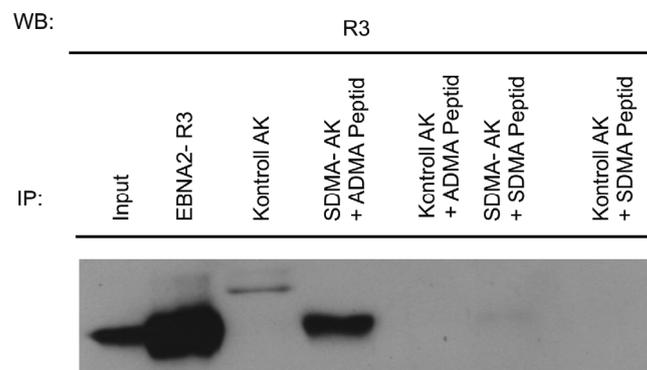
**Abbildung 10: Dotblot zur Bestimmung der Kreuzreaktivität der methylierungsspezifischen Antikörper**

*Charakterisierung der methylierungsspezifischen, gegen die EBNA2- RG- Repetition gerichteten monoklonalen Antikörper. OVA- gekoppelte Peptide, die entweder nicht methylierte (NMA)-, symmetrisch dimethylierte (SDMA)- oder asymmetrisch dimethylierte (ADMA)- Arginine bzw. Citrulline enthalten wurden auf Nitrocellulosestreifen aufgetragen. OVA- HA diente als interne Kontrolle zu deren Detektion der HA- spezifische 3F10 Antikörper verwendet wurde (Roche, Penzberg). Jeder Streifen wurde mit dem entsprechenden Antikörper inkubiert und die Detektion der gebundenen Antikörper erfolgte via ECL- Methode.*

Wie in Abb. 10 zu erkennen ist, zeigen alle getesteten Antikörper ein Signal für das entsprechende Peptid.

Nachdem eine grundsätzliche Kreuzreaktivität ausgeschlossen werden konnte, wurde der sDMA- spezifische Antikörper 13B10 einer weiteren Spezifitätsprüfung unterzogen. Hierzu wurde er in einer Immunpräzipitation aus EBV positiven B95.8 Zellen eingesetzt und der Reaktion freie Peptide zugesetzt, die einerseits die aDMA bzw. die sDMA Konfiguration der EBNA2- RG Repetition repräsentieren. Somit sollte ein Konkurrieren um die Bindungsstelle des Antikörpers erzeugt und bei erfolgter Bindung des Peptides die Präzipitation von EBNA2 geschwächt werden oder

ausbleiben. Die Detektion von gebundenem EBNA erfolgt mit dem R3 Antikörper in einer 1:10 Verdünnung im Western Blot.

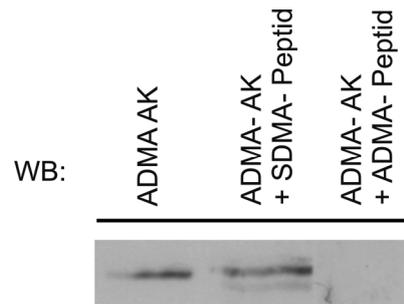


**Abbildung 11: Inhibition des methylierungsspezifischen sDMA 13B10 Antikörpers mit freien Peptiden - Immunpräzipitation**

*Der an Protein G Sepharose gekoppelte sDMA- spezifische Antikörper 13B10 wurde vor der Immunpräzipitation mit dem entsprechenden freien Peptid vorinkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit B95.8- Zellextrakt. Präzipitiertes EBNA2 wurde in einem darauffolgenden Western- Blot mit dem methylierungsunspezifischen R3 Antikörper detektiert.*

Wie in Abb. 11 zu erkennen ist, war nur das sDMA modifizierte Peptid in der Lage die Bindung von EBNA2 an den sDMA spezifischen Antikörper 13B10 zu inhibieren. Dies gibt einen weiteren Hinweis auf die Spezifität des Antikörpers.

Nun sollte die Spezifität des im Western Blot funktionalen aDMA 6F12 Antikörpers weiter überprüft werden, da nur dieser eine Subklon der methylierungsspezifischen Antikörper in der Lage war, in einem Western Blot Experiment ein Signal zu erzeugen. Hierzu wurde unbehandeltes, natives B95.8 – Zellextrakt per SDS- Page aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrocellulosemembran geblotted. Der mit dem entsprechenden Peptid (sDMA oder aDMA) präinkubierte aDMA 6F12 Antikörper wurde nun in einer Verdünnung von 1:10 zugegeben. Eine Bindung des Peptids an den Antikörper würde eine Detektion von EBNA2 im darauffolgenden Western Blot verhindern.



**Abbildung 12: Inhibition des methylierungsspezifischen aDMA 6F12 Antikörpers mit freien Peptiden - Western Blot**

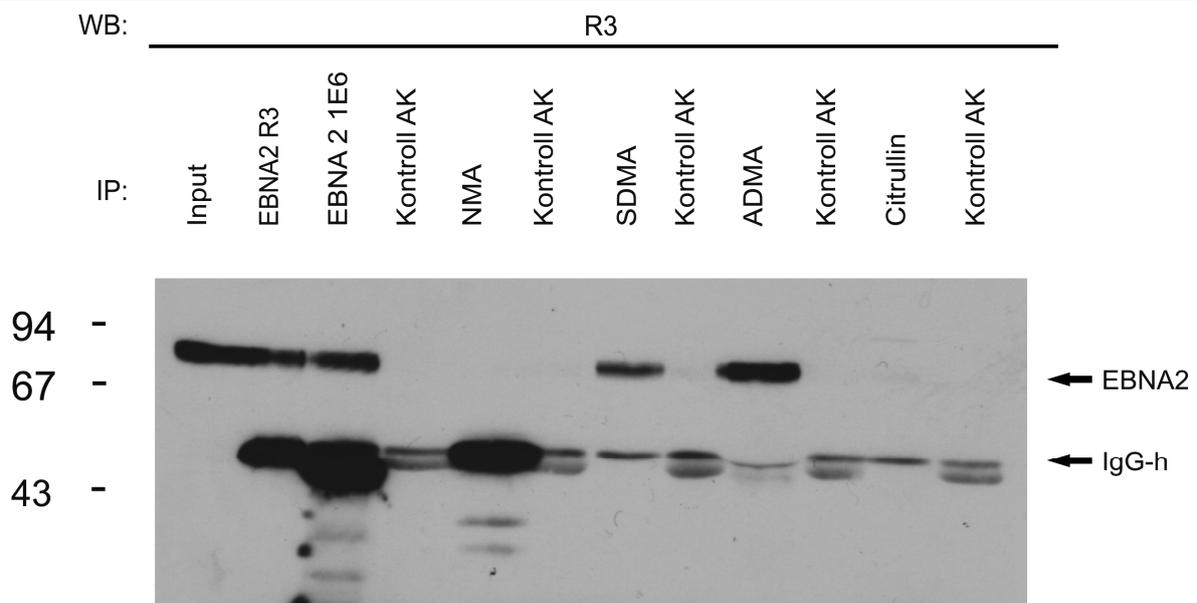
*Der aDMA- spezifische Antikörper wurde entweder mit freiem sDMA oder aDMA- Peptid präinkubiert und anschließend in einem Western- Blot zur Detektion von EBNA2 aus B95.8 Zellen verwendet.*

Wie in Abb. 12 zu erkennen ist, vermag nur das aDMA modifizierte Peptid die Bindung an EBNA2 durch den aDMA- spezifischen 6F12 Antikörper in einem Western Blot Experiment zu inhibieren. Somit kann eine Kreuzreaktivität des aDMA spezifischen Antikörpers mit der sDMA modifizierten Variante von EBNA2 ausgeschlossen werden.

### 6.1.2. Charakterisierung der EBNA2 RG- Repetition

Nachdem die Spezifität der methylierungsspezifischen Antikörper sichergestellt war, wurde die EBNA2- RG- Repetition *in vivo* einer neuerlichen Charakterisierung unterzogen.

Hierzu wurde als erstes Experiment eine Immunpräzipitation mit den methylierungsspezifischen Antikörpern mit entsprechenden Isotypkontrollen aus EBV- positiven B95.8- Zellen durchgeführt. Zur internen Kontrolle des Experimentes wurden die Antikörper R3 und 1E6 eingesetzt, die EBNA2 unabhängig von der Methylierung seiner RG- Repetition erkennen. Die Detektion von gebundenem EBNA2 erfolgte mit dem R3 Antikörper in einer Verdünnung von 1:10 im Western Blot.

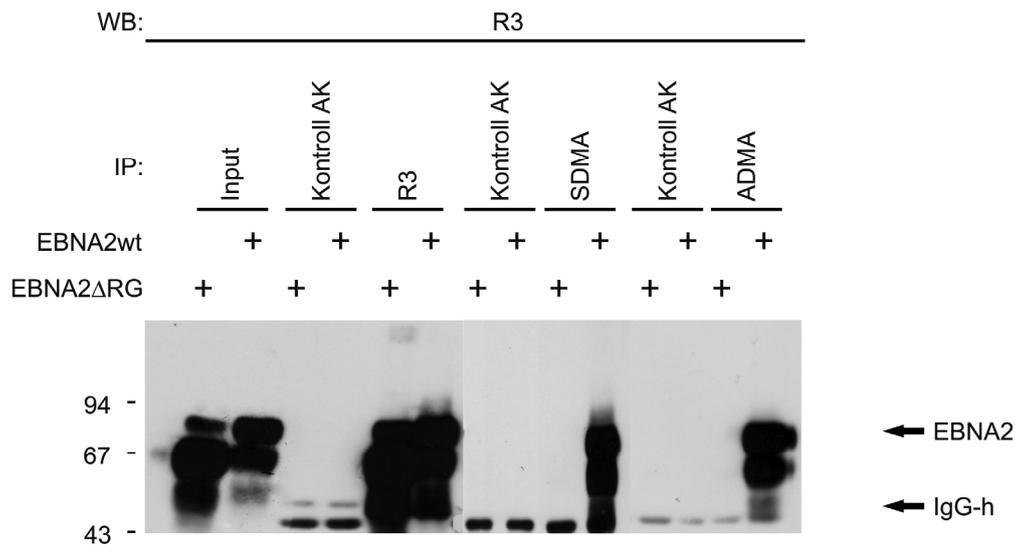


**Abbildung 13: Detektion der verschieden methylierten EBNA2 Spezies in B95.8- Zellen**

Die monoklonalen Antikörper, die gegen die unmethylierte (NMA)-, symmetrisch dimethylierte (sDMA)- und asymmetrisch dimethylierte (aDMA)- EBNA2 RG Repetition gerichtet sind wurden in einer Immunpräzipitation von EBV positiven B95.8 Zellen getestet. Für jeden Antikörper wurde eine entsprechende Isotypenkontrolle mitgeführt. Der Nachweis von gebundenem EBNA2 Protein erfolgte im Western- Blot mittels des methylierungsunspezifischen Antikörpers R3. Die schweren („IgG-h“) Ketten der Antikörper wurden vom eingesetzten, Peroxidase gekoppelten Sekundärantikörper detektiert.

Wie in Abb. 13 zu erkennen ist, konnte EBNA2 nur in den Spuren der Antikörper R3 und 1E6 und mit den sDMA- und aDMA- spezifischen Antikörpern präzipitiert werden. Der NMA- spezifische Antikörper 8C3 war jedoch nicht in der Lage das Protein zu präzipitieren. Somit ließen sich nur die sDMA- und aDMA- modifizierte Varianten von EBNA2 *in vivo* detektieren, d.h. es existiert kein unmethyliertes (NMA) EBNA2 *in vivo*.

Als zusätzliche Kontrolle wurde von Herrn Alfredo Mamiani eine Immunpräzipitation aus HEK 293T Zellen durchgeführt. Jene waren entweder mit einem für das EBNA2 Wildtyp Protein kodierenden Plasmid transfiziert oder mit einem Konstrukt, welches eine Deletionsmutante von EBNA2 kodiert, der die RG- Repetition fehlt (EBNA2ΔRG). Hierzu wurden dieselben methylierungsspezifischen Antikörper eingesetzt wie im vorangegangenen Experiment. Als Kontrolle diente der R3 Antikörper. Der Nachweis von gebundenem EBNA2 erfolgte mit dem R3 Antikörper in einer Verdünnung von 1:10 im Western Blot.



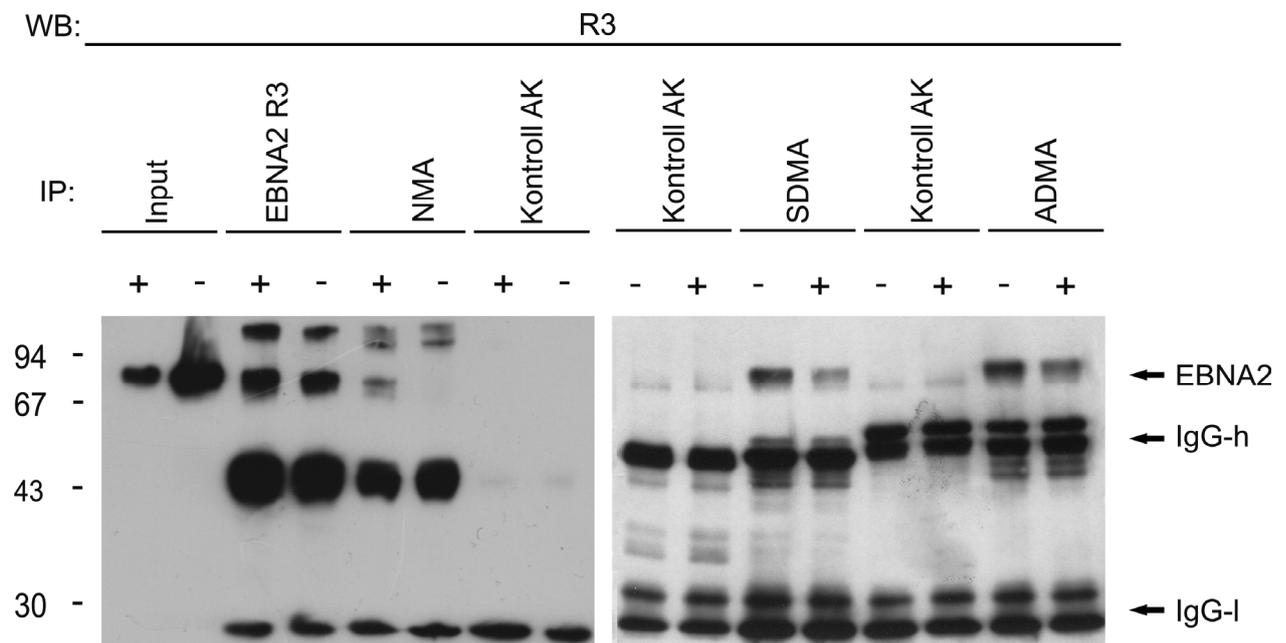
**Abbildung 14: Feststellung der Spezifität der methylierungsspezifischen Antikörper mit Hilfe der EBNA2 $\Delta$ RG Mutante (Alfredo Mamiani)**

HEK 293T- Zellen wurden jeweils mit einem Plasmid, welches für den EBNA2 Wildtyp kodiert (pSG5-EBNA2 wt), oder mit einem Plasmid transfiziert, welches eine Mutante von EBNA2, bei welcher die RG- Repetition deletiert ist, kodiert (pSG5-EBNA2 $\Delta$ RG). Der methylierungsunspezifische Antikörper R3 und die jeweiligen methylierungsspezifischen Antikörper wurden zur Immunpräzipitation eingesetzt. Die Detektion von EBNA2 erfolgte im Western- Blot mit Hilfe des R3 Antikörpers. Die schweren („IgG-h“) Ketten der Antikörper wurden vom eingesetzten, Peroxidase gekoppelten, Sekundärantikörper detektiert.

Wie in Abb. 14 zu sehen ist sind die methylierungsspezifischen Antikörper im Gegensatz zum methylierungsunspezifischen R3 Antikörper nur in der Lage den Wildtyp des EBNA2- Proteins, welcher die RG- Repetition enthält, zu präzipitieren, was ein weiterer Hinweis für ihre Spezifität hinsichtlich der EBNA2- RG- Repetition ist. Im Gegensatz hierzu präzipitierte der R3 Antikörper auch die EBNA2 $\Delta$ RG- Deletionsmutante.

Da es durch die monoklonalen methylierungsspezifischen Antikörper nun möglich war die verschieden methylierten EBNA2 Spezies zu präzipitieren und zu unterscheiden, sollte nun in einem nächsten Schritt der Einfluss des Methylierungsinhibitors AdOx (Hoffman and McConnell 1987) auf die *in vivo* Verteilung der verschiedenen methylierten RG- Repetitionen von EBNA2 untersucht werden. Hierzu wurde eine Immunpräzipitation mit den Antikörpern, den entsprechenden Isotypkontrollen, aus EBV- positiven, unbehandelten bzw. AdOX behandelten B95.8- Zellen durchgeführt. Zur Kontrolle wurde der Antikörper R3

eingesetzt. Die Detektion von präzipitiertem EBNA2 erfolgte mit dem R3 Antikörper in einer Verdünnung von 1:10 im Western Blot.



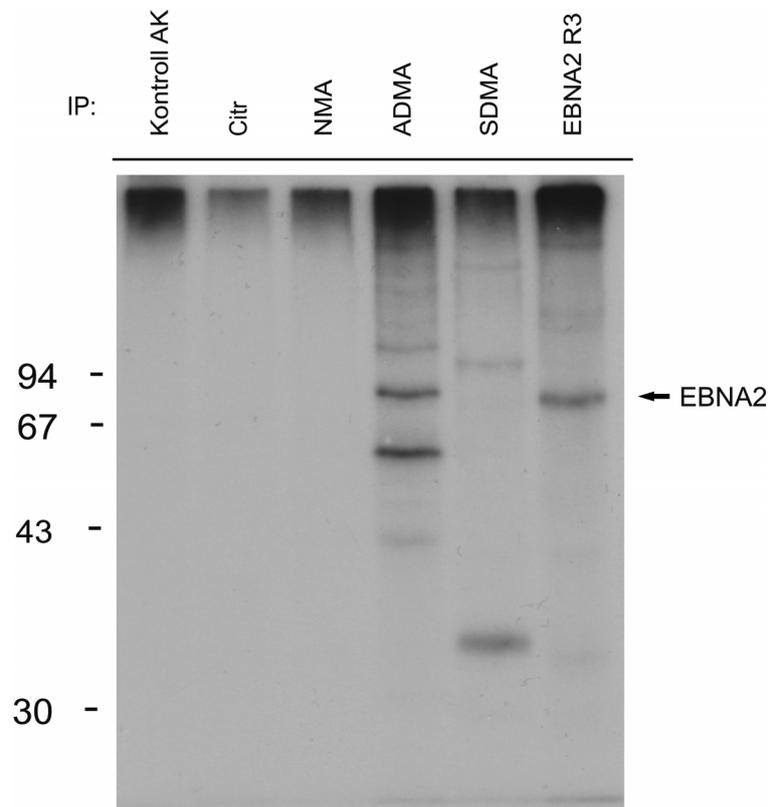
**Abbildung 15: Einfluss des Methylierungsinhibitors AdOx auf die verschiedenen methylierten EBNA2 Spezies *in vivo***

EBNA2 wurde mit Hilfe von den verschiedenen methylierungsspezifischen Antikörpern und dem R3 Antikörper aus vorher mit dem Methylierungsinhibitor AdOx behandelten EBV positiven B95.8 Zellen präzipitiert. Der Nachweis von gebundenem EBNA2 erfolgte im Westen- Blot mit Hilfe des R3-Antikörpers. Die schweren („IgG-h“) und leichten („IgG-l“) Ketten der Antikörper wurden vom eingesetzten, Peroxidase gekoppelten, Sekundärantikörper detektiert.

Wie in Abb. 15 zu sehen ist, ist der Einfluss von AdOx auf die Gesamtmenge von präzipitiertem EBNA2 (Spur „EBNA2 R3“) gering. Die Menge der methylierten Spezies von EBNA2 (Spuren „aDMA“ und „sDMA“) sinkt jedoch nach AdOx Behandlung der Zellen, wohingegen die unmethylierte Variante des Proteins nach Inhibition der Methylierung erstmals detektierbar ist (Spur „NMA“), wodurch auch die *in vivo* Spezifität des NMA- spezifischen Antikörpers 8C3 bestätigt wurde.

Da bekannt ist, dass es sich bei EBNA2 um ein Phosphoprotein handelt (Petti et al. 1990; Grässer et al. 1992), bei welchem Hyperphosphorylierung die Transaktivierungsaktivität herabsetzt (Yue et al. 2005), sollten in einem weiteren Experiment die Phosphorylierungszustände der einzelnen, verschiedenen methylierten, EBNA2 Spezies untersucht werden. Hierzu wurden EBV- positive B95.8 Zellen

metabolisch mit  $H_3^{32}PO_4$  radioaktiv markiert und eine Immunpräzipitation mit den verschiedenen methylierungsspezifischen Antikörpern durchgeführt. Zur Präzipitation der gesamten Menge an EBNA2 wurde der methylierungsunspezifische R3 Antikörper verwendet. Das präzipitierte Protein wurde per SDS- Page und anschließender Autoradiografie detektiert.



**Abbildung 16: Bestimmung des Phosphorylierungszustandes der unterschiedlich methylierten EBNA2- Spezies**

Die verschiedenen methylierungsspezifischen, an Protein G- Sepharose gebundenen, Antikörper wurden benutzt um EBNA2 aus  $^{32}P$ - markiertem B95.8 Zellextrakt zu präzipitieren. Gebundenes EBNA (Pfeil) Protein wurde per SDS- Page aufgetrennt und mittels Autoradiografie detektiert.

Als Größenstandard (wie angezeigt) fungierte  $^{14}C$ - markierter Marker bestehend aus (in absteigender Reihenfolge): Phosphorylase B, Bovines Serum Albumin (BSA), Ovalbumin (OVA), und Carboanhydrase.

Wie in Abb. 16 zu sehen ist, konnte nur mit dem aDMA- spezifischen Antikörper  $^{32}P$ - markiertes EBNA2 präzipitiert werden, was für eine exklusive Phosphorylierung des aDMA- modifizierten EBNA2- Proteins spricht.

---

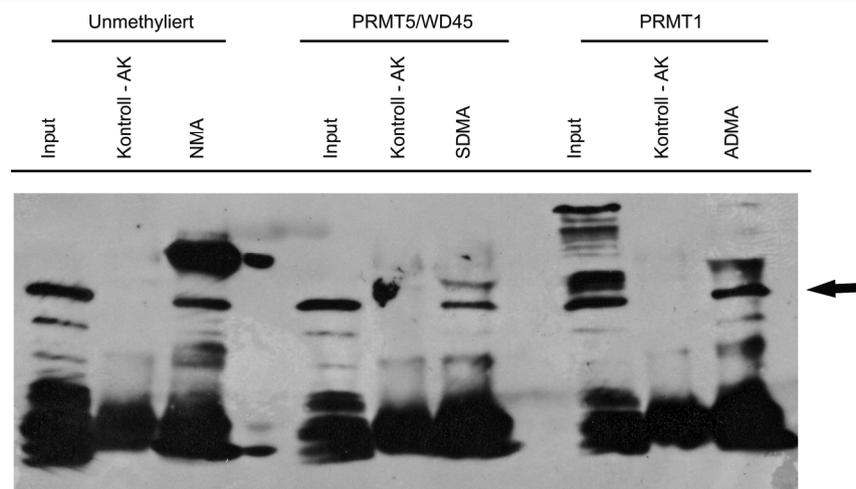
Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass EBNA2 *in vivo* in den sDMA- und aDMA- modifizierten Formen vorkommt und die aDMA- modifizierte Variante des Proteins eine Phosphorylierung aufweist. Die unmethylierte (NMA) Spezies von EBNA2 ist hingegen nur nach Inhibition der Methylierung in Zellen detektierbar und kommt in unbehandelten Zellen gar nicht oder in nur sehr geringem Maße unterhalb der Nachweisgrenze vor.

### **6.1.3. *In vitro* Charakterisierung der EBNA2- RG Repetition**

Nachdem die Verteilung der verschiedenen methylierten EBNA2- Spezies *in vivo* aufgeklärt war, wurde die EBNA2- RG- Repetition einer weiteren Charakterisierung *in vitro* unterzogen. In den folgenden Experimenten sollte mit Hilfe eines GST- EBNA2- Fusionsproteins, welches nur die Aminosäuren 300-400 von EBNA2 (WWP<sub>325</sub>- Motiv und RG<sub>339-355</sub>- Repetition) enthält, und entsprechenden Protein- Arginin- Methyltransferasen ein *in vitro* Methylierungsassay durchgeführt werden, um die Spezifität der Antikörper zu überprüfen und einen Fänger für folgende „GST- Pulldown“ Assays herzustellen.

Nach Transformation von BL21/DE3 Bakterien mit dem pGEX4T1- EBNA2aa300-400 Plasmid (Alfredo Mamiani, 4.12.16) wurden diese, wie in 5.4.13 beschrieben, mit IPTG induziert. Das erhaltene Lysozymextrakt wurde anschließend mit Hilfe einer NAP<sup>TM</sup>25 Säule aufgereinigt (5.4.15.1). Mit dem Plasmid, welches für His- PRMT1 (4.12.17) kodiert, wurde genauso verfahren.



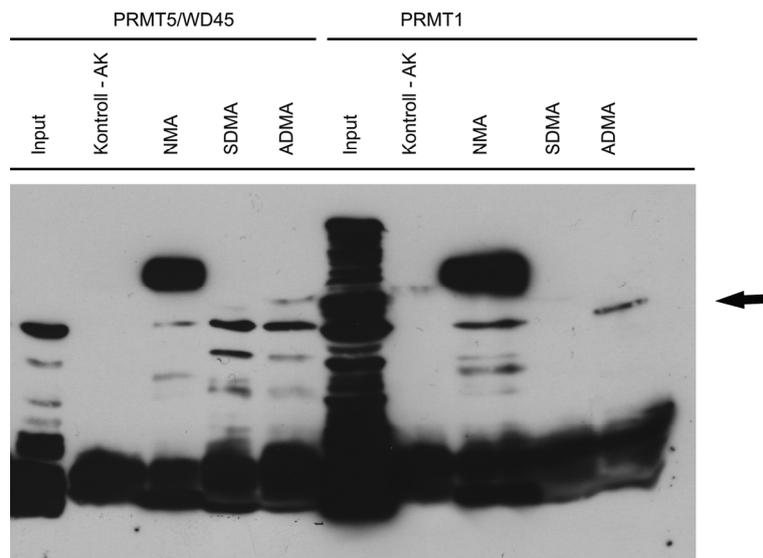


**Abbildung 18: *in vitro* Methylierung des GST- EBNA2 aa300- 400 Fusionsproteins**

Die aufgereinigten Fusionsproteine wurden, wie in 5.4.15 beschrieben, einer *in vitro* Methylierung unterzogen. Als katalysierende Enzyme dienten PRMT5/WD45 (4.10.1) zur Erzeugung von sDMA methylierter RG- Repetition und His- PRMT1 (4.12.17) zu Erzeugung von aDMA methylierter RG- Repetition. Diese Ansätze wurden anschließend in einer Immunpräzipitation mit den Methylierungsspezifischen Antikörpern verwendet. Als Positivkontrolle diente der GST 6G9 Antikörper, welcher auch zum Nachweis des gebundenen EBNA2 Fusionsproteins (Pfeil) im Western Blot diente.

Wie in Abb. 18 zu erkennen ist, sind beide Methyltransferasen in der Lage das erwartete Methylierungsmuster zu katalysieren. Des Weiteren war eine Präzipitation des methylierten Fusionsproteins durch die entsprechenden methylierungsspezifischen Antikörper möglich. Bei den zusätzlich zum Fusionsprotein detektierten Banden in Abbildung 19 handelt es sich um kleinere Abbauprodukte (Banden unterhalb der Fusionsprotein- Bande) oder Antikörper-spezifische Banden (Spur „NMA“).

Um nun ausschließen zu können, dass sich im PRMT1- Methylierungsansatz sDMA-modifiziertes oder im PRMT5/WD45- Ansatz aDMA- modifiziertes Fusionsprotein befindet, wurde die Immunpräzipitation mit allen vorher verifizierten methylierungsspezifischen Antikörpern durchgeführt.



**Abbildung 19: Charakterisierung der Spezifität der verwendeten PRMTs in der *in vitro* Methylierung**

Die aufgereinigten Fusionsproteine wurden, wie in 5.4.15 beschrieben, einer *in vitro* Methylierung unterzogen. Als katalysierende Enzyme dienten PRMT5/WD45 (4.10.1) zur Erzeugung von sDMA methylierter RG- Repetition und His- PRMT1 (4.12.17) zur Erzeugung von aDMA methylierter RG- Repetition. Diese Ansätze wurden anschließend in einer Immunpräzipitation mit den methylierungsspezifischen Antikörpern verwendet. Als Positivkontrolle diente der GST 6G9 Antikörper, welcher auch zum Nachweis des gebundenen EBNA2 Fusionsproteins (Pfeil) im Western Blot diente.

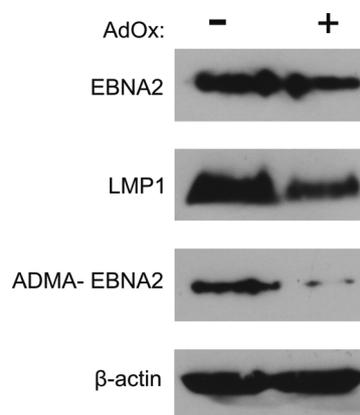
Wie in Abb. 19 zu erkennen ist, konnte im PRMT1- *in vitro* Methylierungsansatz kein sDMA- modifiziertes GST- EBNA2 Fusionsprotein nachgewiesen werden, wohingegen im PRMT5/WD45 Ansatz ein Signal für aDMA- modifiziertes GST- EBNA2aa300-400 detektierbar war, was ein Hinweis auf das Vorhandensein einer aDMA- katalysierenden PRMT im PRMT5/WD45 Ansatz sein kann. Dies ist vermutlich auf Kontamination des im Baculovirus- System exprimierten und aufgereinigten PRMT5/WD45- Extrakts zurückzuführen. Bei den zusätzlich zum Fusionsprotein detektierten Banden in Abbildung 19 handelt es sich um kleinere Abbauprodukte oder Antikörper- spezifische Banden (Spur „NMA“).

Durch diese Experimente konnte ein Fänger für folgende GST- Pulldown Assays erstellt werden, durch den es möglich ist, weitere interagierende Proteine zu identifizieren, die an die unterschiedlich methylierten EBNA2- RG- Repetitionen binden. Allerdings kann nur in den aDMA (PRMT1) und NMA- Ansätzen eine Kontamination mit anderen PRMT's ausgeschlossen werden.

#### 6.1.4. Effekte der Methylierung der EBNA2- RG- Repetition

In der vorangegangenen Diplomarbeit (Gross 2008) konnten durch Gelshift-Experimente bereits Einblicke in die Verteilung der verschiedenen methylierten EBNA2 Spezies an einem Oligonukleotid aus der Promotorsequenz des viralen LMP2a Promotors gewonnen werden. So konnte gezeigt werden, dass nur aDMA EBNA2 mittels des entsprechenden Antikörpers in EBNA2- haltigen DNA- bindenden Komplexen nachweisbar war. In einem weiteren Experiment sollten nach erfolgter Charakterisierung des Methylierungszustandes der RG- Repetition die Effekte der Methylierung überprüft werden und welche Folgen aus einer Inhibition der Methylierung resultieren. In einem ersten Experiment sollte die Menge des EBNA2 induzierten viralen LMP1 Proteins im Falle einer Inhibition der Methylierung untersucht werden.

Hierzu wurde Zellextrakt aus unbehandelten oder mit dem Methylierungsinhibitor AdOx behandelten EBV- positiven B95.8 Zellen in einer SDS- Page aufgetrennt und EBNA2 (R3), LMP1 (S12), die aDMA methylierte Variante von EBNA2 (6F12) und  $\beta$ -Actin (AC15) als Ladekontrolle im anschließenden Western Blot detektiert.

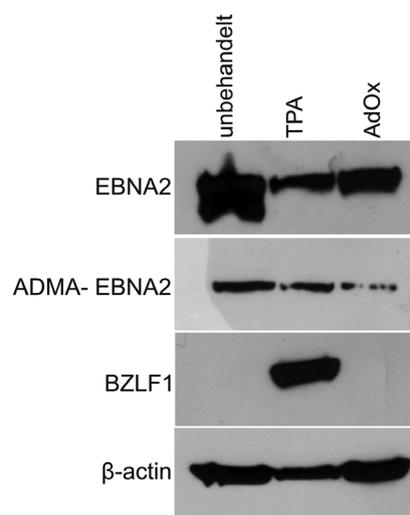


**Abbildung 20: Effekt der Inhibition der Methylierung der EBNA2- RG -Repetition auf die Expression des EBNA2 responsiven LMP1- Proteins**

*EBV positive B95.8 Zellen wurden mit dem Methylierungsinhibitor AdOx behandelt („+“) oder blieben unbehandelt („-“). Zellextrakte wurden per SDS- Page mit den entsprechenden Antikörpern( EBNA2: R3; LMP1: S12; aDMA EBNA2: 6F12;  $\beta$ - Actin: AC15) analysiert.*

Wie in Abb. 20 zu sehen ist, sinkt das Expressionsniveau des von EBNA2 aktivierten LMP1 Proteins nach AdOx- Behandlung der Zellen um ca. 40- 50%.

Die aDMA- modifizierte Spezies von EBNA2 ist fast nicht mehr nachzuweisen, wohingegen die Gesamtmenge an EBNA2 nahezu unverändert bleibt. Somit ist die Methylierung der EBNA2- RG- Repetition für die Expression vom LMP1 essentiell. Nach diesem ersten ermittelten Effekt der Methylierung der EBNA2- RG- Repetition auf die Expression eines EBNA2- aktivierten Gens sollte in einem nächsten Schritt die Auswirkung der Methylierungsinhibition auf die Induktion des lytischen Zyklus von EBV untersucht werden. Hierzu wurden Zellextrakte aus einer EBV- positiven, mit dem Stamm B95.8 immortalisierten lymphoblastoiden Zelllinie (LCL) IB4, entweder unbehandelt, für 48h mit TPA oder für 72h mit AdOx behandelt, mittels SDS- Page aufgetrennt und die Proteine EBNA2 (R3), die aDMA modifizierte Variante von EBNA2 (6F12), des viralen Transaktivators BZLF1 (BZ.1) und  $\beta$ - Actin (AC15) als Ladekontrolle in einem darauffolgenden Western Blot detektiert.



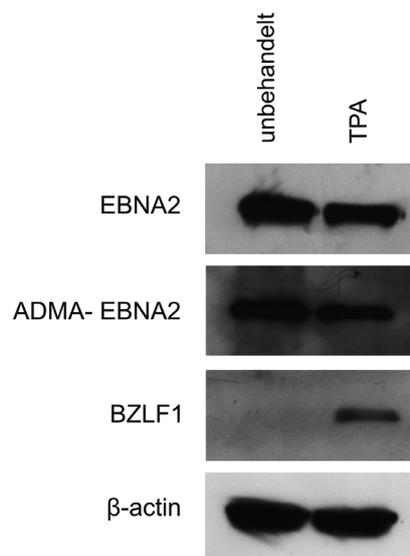
**Abbildung 21: Effekt der Inhibition der Methylierung der EBNA2 RG- Repetition auf die Induktion des lytischen Zyklus von EBV**

*Die humane lymphoblastoide Zelllinie (LCL) IB4, welche mit dem EBV B95.8 Stamm immortalisiert ist wurde entweder für 48h mit TPA oder für 78h mit AdOx inkubiert. Zellextrakte wurden per SDS- Page mit den entsprechenden Antikörpern(EBNA2: R3; aDMA EBNA2: 6F12 ; BZLF1: BZ.1;  $\beta$ - Actin: AC15) analysiert.*

Wie in Abbildung 21 zu erkennen ist, konnte nur durch TPA Zugabe die Expression des viralen Transaktivators BZLF1 induziert werden, was die Induktion des lytischen Zyklus von EBV beweist. Mit der Inhibition der Methylierung, die ihrerseits den erwarteten Effekt in Form einer Herunterregulation des aDMA- EBNA2 Niveaus zur Folge hatte, war dies nicht möglich.

Eine Auswirkung der Inhibition der Methylierung der EBNA2- RG- Repetition auf die Induktion des lytischen Zyklus kann somit ausgeschlossen werden.

Da mit TPA- Behandlung der Zellen eine geringfügige Verringerung der aDMA- EBNA2 Menge zu beobachten war, sollte nun im nächsten Schritt untersucht werden, ob die Induktion des lytischen Zyklus von EBV einen Einfluss auf die Menge von aDMA- EBNA2 hat. Hierzu wurde wiederum die EBV- positive, mit dem Stamm B95.8 immortalisierte lymphoblastoide Zelllinie (LCL) IB4 entweder nicht oder für 48h mit TPA behandelt, die entsprechenden Zellextrakte mittels SDS- Page aufgetrennt und die Proteine EBNA2 (R3), die aDMA modifizierte Variante von EBNA2 (6F12), die virale Polymerase BZLF1 (BZ.1) und  $\beta$ - Actin (AC15) als Ladekontrolle in einem darauffolgenden Western Blot detektiert.



**Abbildung 22: Effekt der Induktion des lytischen Zyklus auf die Methylierung der EBNA2 RG- Repetition**

*Die humane lymphoblastoide Zelllinie (LCL) IB4, welche mit dem EBV B95.8 Stamm immortalisiert ist wurde für 48h mit TPA inkubiert. Zellextrakte wurden per SDS- Page mit den entsprechenden Antikörpern(EBNA2: R3; aDMA- EBNA2: 6F12 ;BZLF1: BZ.1;  $\beta$ - Actin: AC15) analysiert.*

Wie in Abbildung 22 zu sehen ist, konnte kein Einfluss des durch TPA induzierten lytischen Zyklus auf die Menge an aDMA- EBNA2 detektiert werden. Es lässt sich somit festhalten, dass die Methylierung der EBNA2- RG- Repetition zwar einen Einfluss auf die Expression von EBNA2 transaktivierten Genen hat (LMP1) aber den lytischen Zyklus von EBV nicht beeinflusst und auch nicht durch dessen Induktion beeinflusst wird.

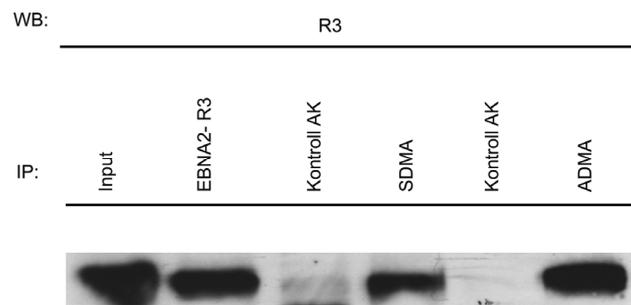
### **6.1.5. Verteilung der verschiedenen methylierten EBNA2- Spezies an EBNA2 kontrollierten Promotoren mittels CHIP Assay**

In der vorangegangenen Diplomarbeit (Gross 2008) konnte durch mehrere Gelshifftexperimente ein Einblick in die Verteilung der verschiedenen methylierten EBNA2- Spezies *in vitro* erlangt werden. So konnte gezeigt werden, dass an der Sequenz des viralen LMP2a- Promotors nur die aDMA- modifizierte Variante von EBNA2 detektierbar ist (siehe Abbildung 9). Um nun die Situation *in vivo* zu beleuchten, wurden von Richard Palermo im Labor von Michelle West (Brighton, UK) Chromatin Immunpräzipitationen (ChIP) mit den methylierungsspezifischen Antikörpern durchgeführt.

Das Prinzip der Chromatin Immunpräzipitation (ChIP) beruht auf der Präzipitation von Formaldehyd- fixierten Protein- DNA Komplexen. Anschließend erfolgt eine Fragmentierung der DNA mittels Ultraschallbehandlung und die Amplifikation von bestimmten Regionen. Diese wurden im Vorhinein festgelegt und passende Primerpaare dazu hergestellt. Somit korreliert die Menge an entsprechendem Amplifikat mit der Menge an präzipitierter DNA und somit gebundenem Protein.

Hierzu wurden die Burkitt- Lymphomzelllinien Mutu I und Mutu III verwendet. Bei Mutu I Zellen handelt es sich um eine EBV- positive Zelllinie, welche im Latenzstadium I ist und kein EBNA2 exprimiert, wohingegen sich die Zellen der Mutu III Zelllinie im Latenzstadium III befinden und eine Expression von EBNA2 stattfindet. Somit ist ein Vergleich der transkriptionellen Effekte von EBNA2 vor demselben Zellhintergrund möglich. Da die unmethylierte Form von EBNA2 (NMA) *in vivo* nicht nachweisbar war, wurden für dieses Experiment nur die Antikörper, die gegen sDMA und aDMA EBNA2 gerichtet sind, verwendet.

Hierzu wurde als erstes Experiment eine Immunpräzipitation mit den methylierungsspezifischen Antikörpern mit entsprechenden Isotypkontrollen aus Mutu III Zellen zur Überprüfung der EBNA2- Expression durchgeführt. Zur methylierungsunspezifischen Präzipitation von EBNA2 und internen Kontrolle des Experimentes wurde der Antikörper R3 eingesetzt, der auch zur Detektion von gebundenem EBNA2 im Western Blot diente.

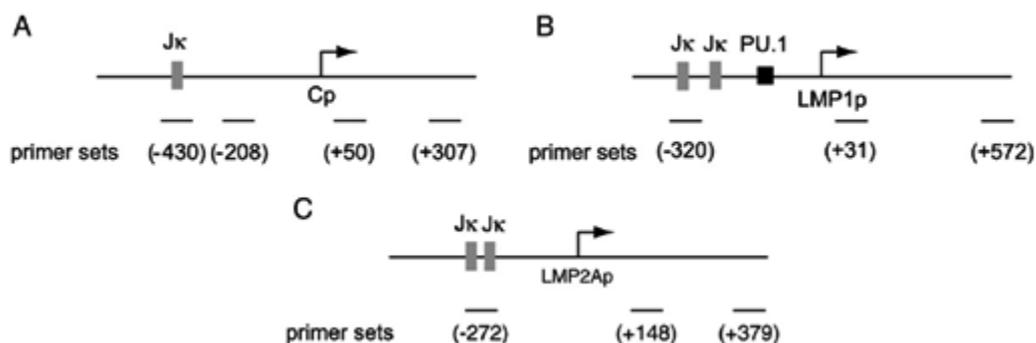


**Abbildung 23: Immunpräzipitation aus Mutu III Zellen**

Die monoklonalen Antikörper die gegen die symmetrisch dimethylierte (sDMA)- und asymmetrisch dimethylierte (aDMA)- EBNA2 RG Repetition gerichtet sind wurden in einer Immunpräzipitation von EBV positiven Mutu III Zellen verwendet. Für jeden Antikörper wurde eine entsprechende Isotypenkontrolle mitgeführt. Der Nachweis von gebundenem EBNA2 Protein erfolgte im Western- Blot mittels des methylierungsunspezifischen R3- Antikörpers.

Wie in Abbildung 23 zu erkennen ist, werden alle schon auch in B95.8 Zellen nachgewiesenen methylierten Varianten von EBNA2 (sDMA und aDMA) auch in der Mutu III Zelllinie gebildet.

Durch diese Ergebnisse war es nun möglich eine Chromatin Immunpräzipitation durchzuführen. Zuerst wurden für 3 virale Promotoren (C- Promotor, LMP1, LMP2a/TP) Primerpaare hergestellt, um somit bis zu 4 verschiedene Amplifikate pro Promotor zu generieren. Eine schematische Darstellung der Promotoren, der jeweiligen Primerbindestellen und Amplifikate ist in Abbildung 24 dargestellt.

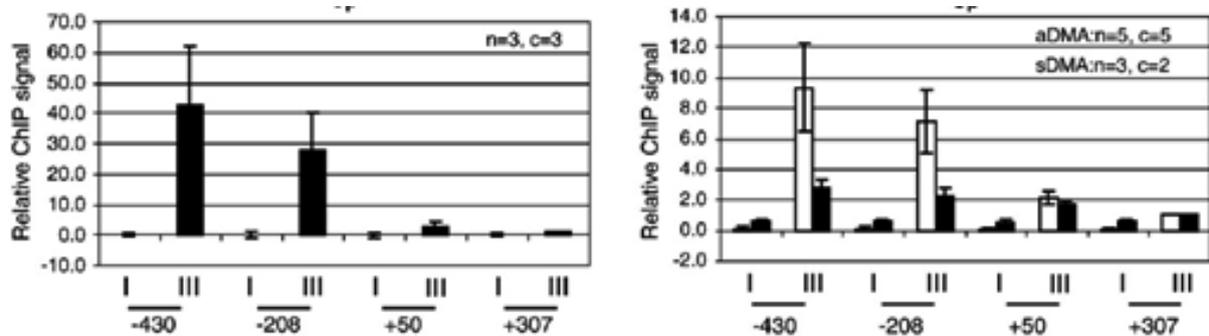


**Abbildung 24: Schema der verwendeten Promotoren und Primersets der ChIP Analyse**

Dargestellt ist die Lage der Real Time PCR Primerpaare und Amplifikate an den 3 verwendeten EBV Promotoren: C Promotor (A), LMP1 Promotor (B) und LMP2A Promotor (C).

RBPJku und PU.1 Bindestellen sind durch graue bzw. schwarze Blöcke dargestellt. Die LMP1 Promotorsequenz wurde der Einfachheit halber invertiert dargestellt und liegt im Genom von EBV in reverser Orientierung vor.

Als Erstes wurde die Verteilung der verschiedenen methylierten EBNA2 Spezies am viralen C- Promoter untersucht. Um eine statistische Auswertung zu ermöglichen wurde dieses Experiment 3- 5 mal (Abb. 25, „n“) wiederholt.

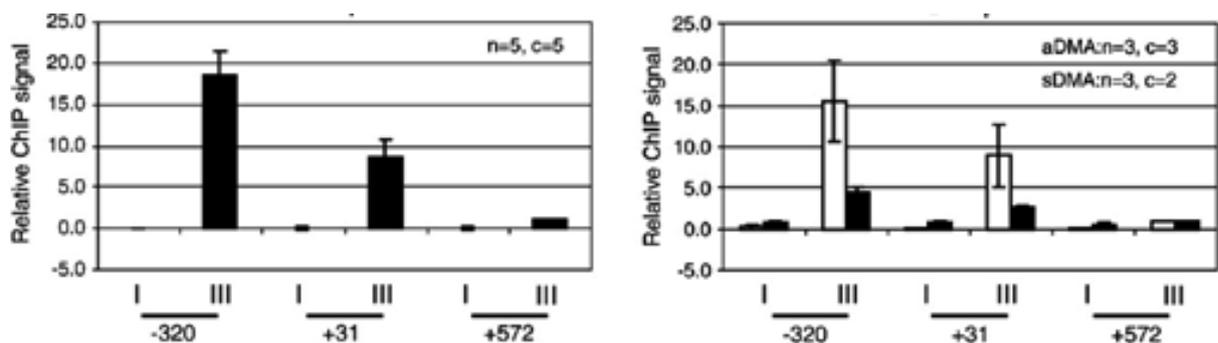


**Abbildung 25: Graphische Darstellung der Ergebnisse des CHIP- Assays: C- Promotor (Cp)**

Chromatin aus Mutu I („I“) oder Mutu III („III“) Zellen wurde entweder mit dem methylierungsunspezifischen R3 Antikörper (linker Graph- schwarze Balken) oder mit den aDMA- (rechter Graph – weiße Balken) bzw sDMA- (rechter Graph – schwarze Balken) spezifischen Antikörpern präzipitiert. Zu sehen sind die Standardabweichungen von mindestens 3 unabhängigen Experimenten („n“). Die Anzahl der unterschiedlichen Chromatinchargen ist mit „c“ vermerkt.

Wie aus Abb. 25 ersichtlich, ist hauptsächlich die aDMA- Variante von EBNA2 am viralen C- Promotor detektierbar, während die Menge der sDMA Variante sehr gering ist. Die größte Menge an Amplifikat ist in der Region der RBPJ- $\kappa$  Bindestelle detektierbar.

Als nächster Promotor wurde der LMP1- Promotor analysiert.

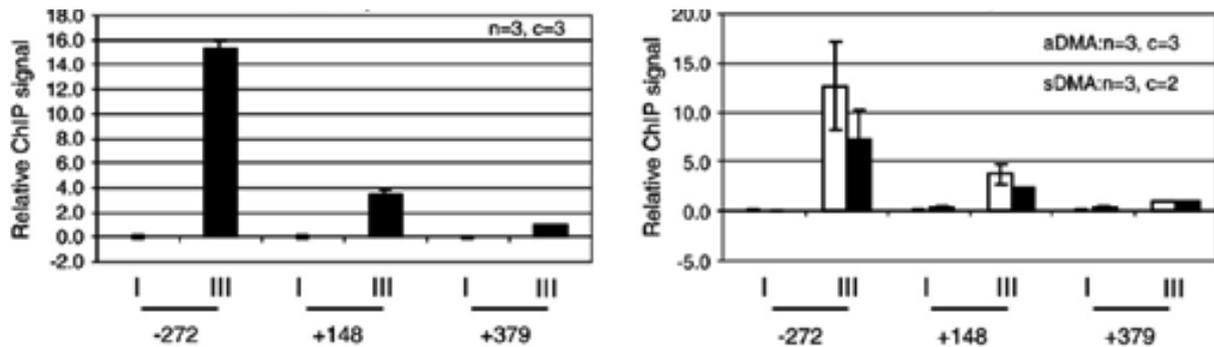


**Abbildung 26: Graphische Darstellung der Ergebnisse des CHIP- Assays: LMP1- Promotor (LMP1p)**

Chromatin aus Mutu I („I“) oder Mutu III („III“) Zellen wurde entweder mit dem methylierungsunspezifischen R3 Antikörper (linker Graph- schwarze Balken) oder mit den aDMA- (rechter Graph – weiße Balken) bzw sDMA- (rechter Graph – schwarze Balken) spezifischen Antikörpern präzipitiert. Zu sehen sind die Standardabweichungen von mindestens 3 unabhängigen Experimenten („n“). Die Anzahl der unterschiedlichen Chromatinchargen ist mit „c“ vermerkt.

Wie aus Abb. 26 hervorgeht, ist auch am LMP1- Promotor die Situation ähnlich wie am C- Promotor. Es wird erheblich mehr aDMA EBNA2 detektiert als sDMA EBNA2. Außerdem ist auch hier die größte Menge an Amplifikat in der Region um die RBPJ- $\kappa$  und PU1 Bindestellen detektierbar.

Als letztes wurde die Situation am LMP2a Promotor (Abb. 27), dessen Sequenz auch als Grundlage des in den Gelshiftexperimenten verwendeten Oligonukleotids diente, beleuchtet.



**Abbildung 27: Graphische Darstellung der Ergebnisse des ChIP- Assays: LMP2a- Promotor (Tp/LMP2ap)**

Chromatin aus Mutu I („I“) oder Mutu III („III“) Zellen wurde entweder mit dem methylierungsunspezifischen R3 Antikörper (linker Graph – schwarze Balken) oder mit den aDMA- (rechter Graph – weiße Balken) bzw sDMA- (rechter Graph – schwarze Balken) spezifischen Antikörpern präzipitiert. Zu sehen sind die Standardabweichungen von mindestens 3 unabhängigen Experimenten („n“). Die Anzahl der unterschiedlichen Chromatinchargen ist mit „c“ vermerkt.

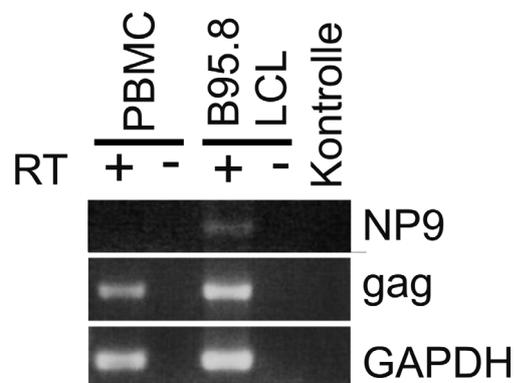
Auch an diesem Promotor wurde dieselbe Verteilung der verschiedenen methylierten EBNA2 Spezies vorgefunden. Wiederum ist das meiste Amplifikat in der Region der RBPJ- $\kappa$  Bindestelle bei Verwendung der Antikörper R3 und aDMA 6F12 zu finden. Zusammenfassend ist festzustellen, dass an allen 3 untersuchten viralen Promotoren eine höhere Menge an aDMA- EBNA2 als an sDMA- EBNA2 detektierbar war, was sich mit den Ergebnissen der Gelshiftexperimente aus der vorangegangenen Diplomarbeit deckt (Gross 2008). Die *in vivo* Verteilung der verschiedenen methylierten EBNA2 spezies entspricht jener Verteilung die zuvor *in vitro* analysiert wurde.

## 6.2. Die Interaktion von EBNA2 und Np9

Eine Infektion von B- Zellen mit EBV führt zu einer erhöhten Expression von vielen zellulären Transkripten, darunter auch solchen, die von endogenen Retroviren kodiert werden. Das Epstein- Barr- Virus induziert so unter anderem die Expression eines durch HERV-K 18 env codierten Superantigens (Hsiao et al. 2006).

NP9 bindet an Ligand of Numb Protein X (LNX) (Armbruster et al. 2004), welches Numb zum proteasomalen Abbau markiert und somit das durch Numb aktivierte Notch Protein, ein zelluläres Homolog von EBNA2, hochreguliert (Hofelmayr et al. 2001).

Wegen der Homologie zwischen EBNA2 und Notch sollte in einem ersten RT- PCR Experiment die Expression der NP9 mRNA in EBV- immortalisierten peripheren Lymphozyten („B95.8- LCL“) im Vergleich zu EBV- negativen peripheren mononukleären Blutzellen („PBMC“) untersucht werden. Als Kontrolle diente die HERV-K gag mRNA und die GAPDH mRNA. Um Kontamination mit DNA auszuschließen, wurde die Reaktion entweder mit („+“) oder ohne („-“) das Enzym Reverse Transkriptase durchgeführt.

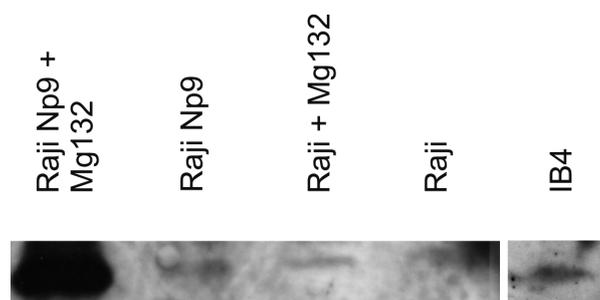


**Abbildung 28: Expression der NP9 mRNA nach Transformation durch EBV**

Die aus peripheren mononukleären Blutzellen („PBMC“) oder EBV- immortalisierten peripheren Blutzellen („B95.8- LCL“) stammende mRNA wurde auf das Vorhandensein der HERV-K(HML-2) Typ1 kodierten NP9 mRNA, der HERV-K gag mRNA oder der GAPDH mRNA (als Kontrolle) untersucht. Um Kontamination mit DNA auszuschließen, wurde die Reaktion entweder mit („+“) oder ohne („-“) das Enzym Reverse Transkriptase durchgeführt. Die als „Kontrolle“ gekennzeichnete Spur bezeichnet eine Reaktion ohne Zugabe von RNA.

Wie in Abbildung 28 zu erkennen ist, wird die NP9 mRNA, wie auch die mRNA der HERV-K gag Kontrolle, nach Transformation der Zellen durch EBV stark hochreguliert. Die Konzentration der GAPDH mRNA bleibt nahezu unverändert.

Da die mRNA des NP9 Proteins nach EBV- Transformation in den Zellen stark ansteigt, sollte in einem folgenden Versuch das Vorhandensein des NP9 Proteins in EBV positiven Zelllinien überprüft werden. Hierzu wurde Zellextrakt aus Raji und IB4 Zelllinien, die entweder mit dem Proteasominhibitor MG132 versetzt oder unbehandelt waren, mittels SDS- Page aufgetrennt und die NP9 Proteinexpression im darauffolgenden Western Blot untersucht. Als Kontrolle diente eine stabil mit einem NP9 exprimierenden Plasmid transfizierte Raji- Zelllinie (Armbruster et al. 2002). Die Detektion von NP9 erfolgt mit Hilfe eines polyklonalen Kaninchenserums gegen NP9 (Armbruster et al. 2002).

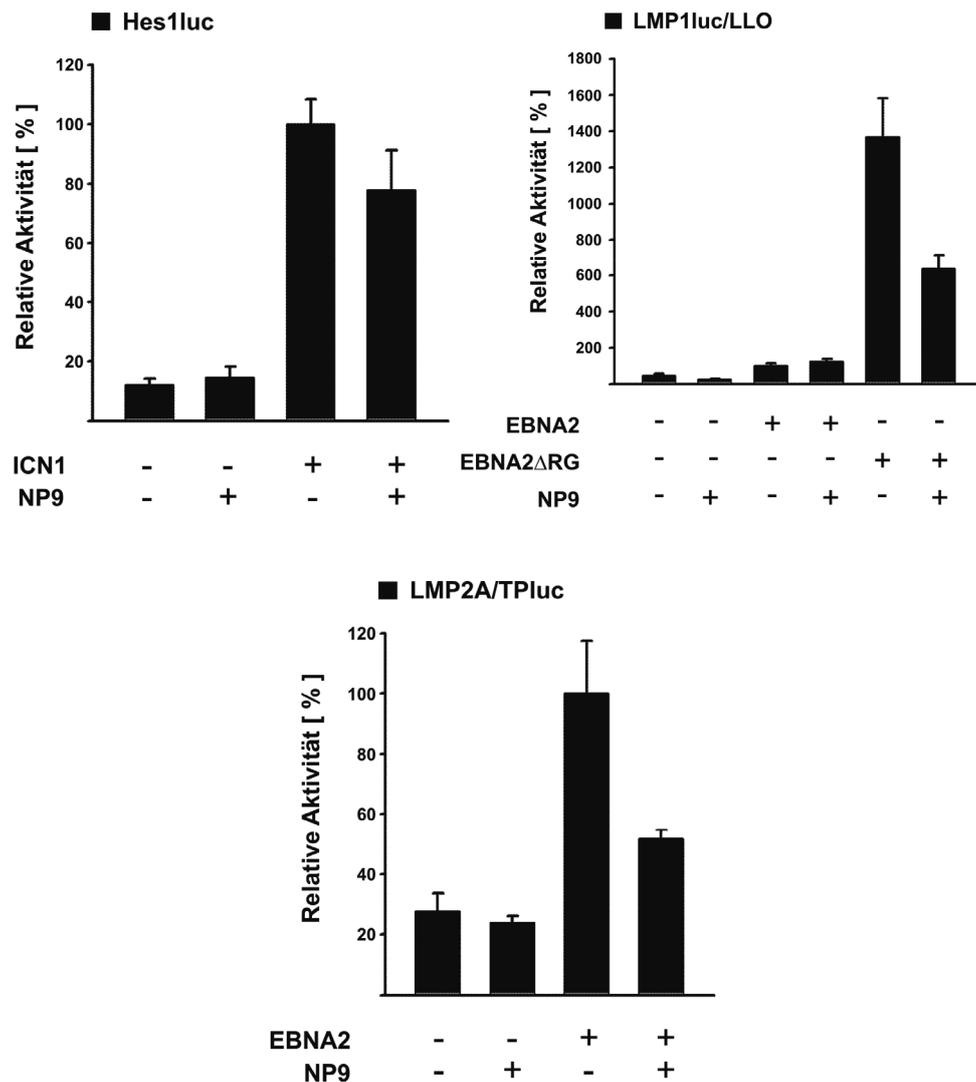


**Abbildung 29: Expression von NP9 in B- Zelllinien**

*Raji und IB4 Zelllinien wurden, entweder mit dem Proteasominhibitor Mg132 versetzt oder unbehandelt, auf die Expression des NP9 Proteins untersucht. Als Kontrolle diente eine stabil mit einem NP9 exprimierenden Plasmid transfizierte Raji- Zelllinie. Die Detektion von NP9 erfolgt mit Hilfe eines polyklonalen Kaninchenserums gegen NP9.*

Wie in Abb. 29 zu sehen, ist das NP9 Protein in beiden EBV- positiven Zelllinien nachweisbar, ob sie nun mit dem Proteasominhibitor MG132 behandelt waren oder nicht. Die Konzentration in den mit MG132 behandelten Spuren ist jedoch höher, was durch den geringeren proteasomalen Abbau von NP9 zu erklären ist.

Aufgrund dieser Ergebnisse und der Verbindung von NP9 zu Notch, dem zellulären Homolog von EBNA2, wurden in Luciferase- Reporterassays verschiedene EBNA2 und Notch aktivierte Promotoren auf ihre Sensibilität gegenüber NP9 getestet. Diese Versuche wurden von Herrn Andreas Spurk durchgeführt und die Ergebnisse sind in Abbildung 30 zu sehen.

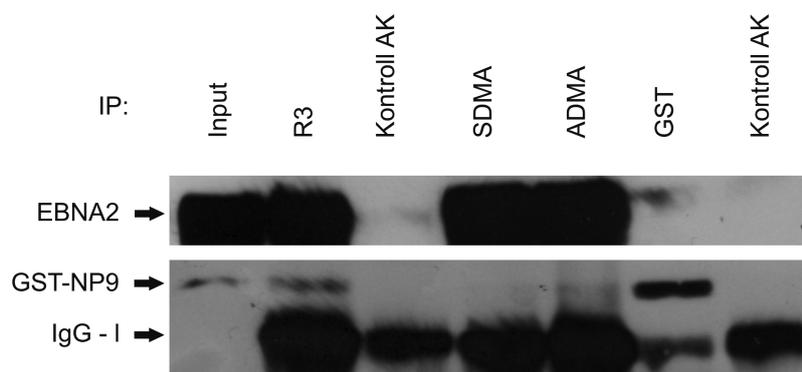


**Abbildung 30: Einfluss von NP9 auf EBNA2/ Notch aktivierte Promotoren**

Der zelluläre Hes1- Promotor (links oben) wurde in den angegebenen Kombinationen mit einem Notch- exprimierenden („ICN1“) und einem für NP9 kodierenden Vektor getestet. Der virale LMP1/LL0- Promotor (rechts oben) wurde mit einem für EBNA2- kodierenden Vektor, einem EBNA2 $\Delta$ RG- kodierenden und einem für NP9 kodierenden Vektor getestet. Der virale LMP2a- Promotor (unten,Mitte) wurde mit einem EBNA2- exprimierenden und einem für NP9 kodierenden Vektor getestet.

Wie in Abbildung 30 zu erkennen ist, hat NP9 keinen signifikanten Einfluss auf die Aktivität des Notch- kontrollierten, zellulären HES1- Promotors. Jedoch kann NP9 die EBNA2 vermittelte Transaktivierung des viralen LMP2a Promotors herunterregeln, wie auch die EBNA2 $\Delta$ RG vermittelte Transaktivierung des LMP1- Promotors, welche um ein Vielfaches höher ist als die des EBNA2 Wildtyps (Tong et al. 1994). Im Hinblick auf EBNA2 hat NP9 keinerlei Einfluss auf die Aktivierung des LMP1- Promotors.

Vor dem Hintergrund dieser Ergebnisse stellte sich die Frage, in welcher Weise NP9 die Transaktivierung von EBNA2 inhibiert. Eine eventuelle Bindung der beiden Proteine sollte in einer Co- Immunpräzipitation untersucht werden. Auf Grund der geringen Expression und der kurzen Halbwertszeit des NP9 Proteins (Armbruester et al. 2004), wurden in diesem Experiment HEK 293T Zellen jeweils mit pSG5- EBNA2 und pSG5-GST- NP9 transfiziert und eine Immunpräzipitation durchgeführt. Der Nachweis von gebundenem EBNA2 erfolgte im Western- Blot mit dem R3- Antikörper, der Nachweis von GST- NP9 mit dem GST spezifischen Antikörper 6G9.

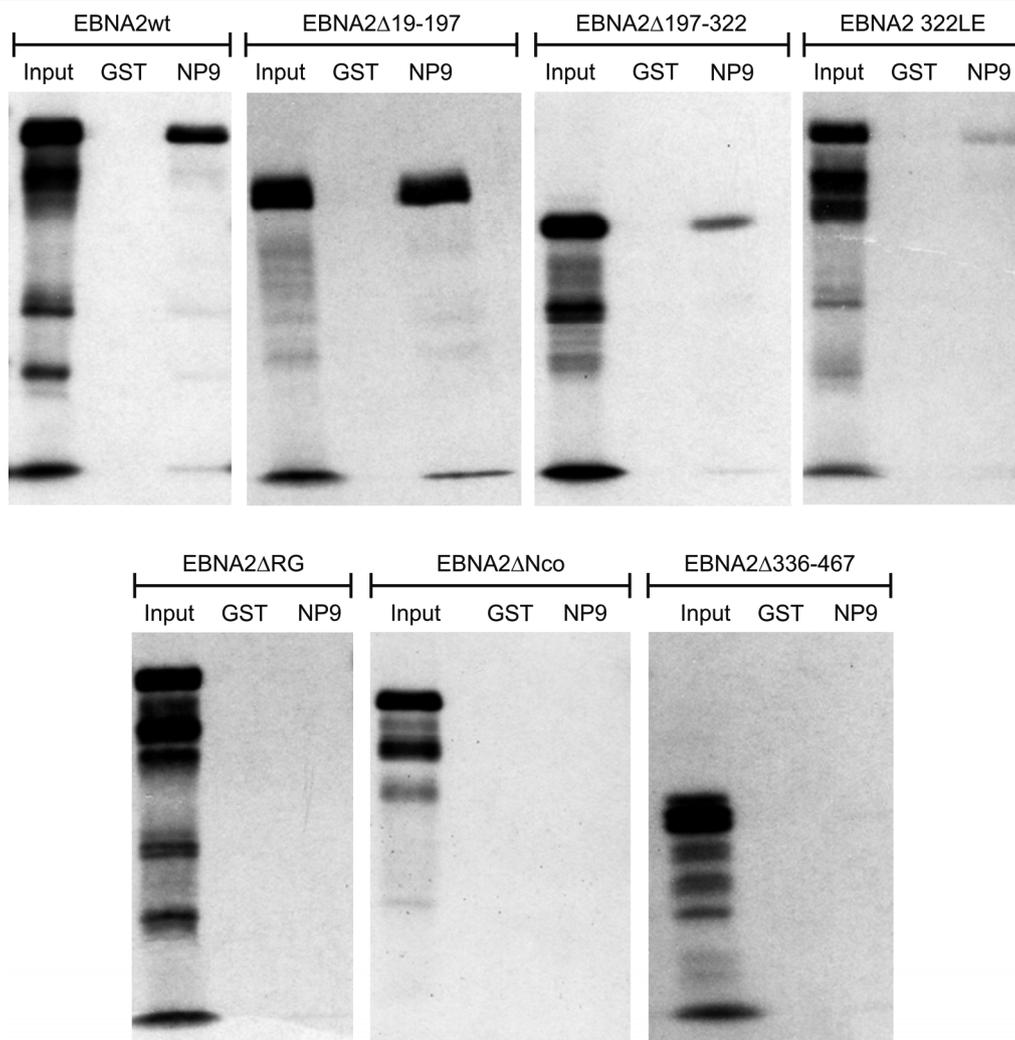


**Abbildung 31: Co- Immunopräzipitation von NP9 und EBNA2**

Mit den Plasmiden pSG5-GST-NP9 und pSG5-EBNA2 transient transfizierte HEK 293T- Zellen wurden in der Immunpräzipitation mit verschiedenen Antikörpern eingesetzt (R3: C- Terminus von EBNA2, aDMA 6F12: aDMA modifiziertes EBNA2, sDMA 13B10: sDMA modifiziertes EBNA2, GST 6G9: GST- Tag und entsprechende Isotypkontrollen). Der Nachweis von präzipitiertem EBNA2 wurde mit Hilfe des R3- Antikörpers durchgeführt, der Nachweis von GST- NP9 mit dem GST 6G9 Antikörper.

Wie in Abbildung 31 zu erkennen ist, kann GST- NP9 vom EBNA2- spezifischen R3 Antikörper co- präzipitiert werden. Dies ist auch in geringem Maße im umgekehrten Fall zu sehen (Spur: „GST“). Dieses Ergebnis spricht für eine Bindung beider Proteine *in vivo*.

Um nun die Binderegion von NP9 an EBNA2 genauer zu lokalisieren, wurden GST- Pulldown Assays mit verschiedenen EBNA2- Deletionsmutanten und GST- NP9 bzw. GST alleine als Fänger durchgeführt.

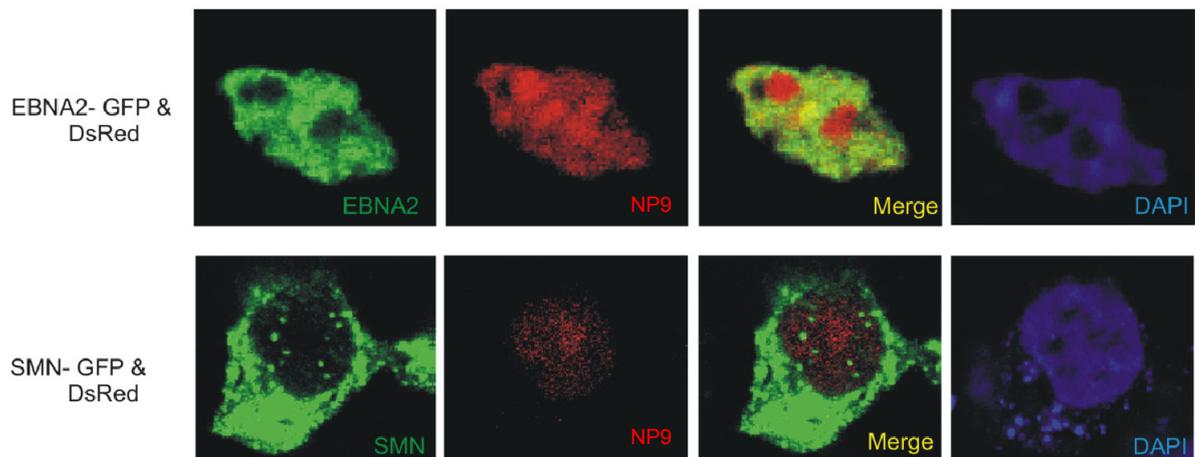


**Abbildung 32: GST- PullDown Assays mit GST- NP9 und Mutanten von EBNA2**

In den GST- Pulldown Assays wurde entweder GST- NP9 oder GST alleine (als Kontrolle) an Glutathion Sepharose gekoppelt. Die jeweiligen EBNA2- Deletionsmutanten wurden *in vitro* mittels eines reticulocytenbasierenden Systems synthetisiert. Das gebundene  $^{35}\text{S}$ - markierte EBNA2 wurde mittels SDS- Page und anschließender Autoradiografie detektiert.

Wie in Abbildung 32 zu sehen ist, kann die Bindung von EBNA2 an NP9 auch *in vitro* bestätigt werden. Es lässt sich aus den Pulldown Assays mit den verschiedenen Deletionsmutanten von EBNA2 ablesen, dass NP9 nur an EBNA2 bindet, wenn dessen RG- Repetition vorhanden ist (EBNA2wt, EBNA2Δ19-197, EBNA2Δ197-322, EBNA2 322 LE) wohingegen bei Deletionsmutanten, denen die RG- Repetition fehlt, keine Bindung von NP9 detektierbar war (EBNA2ΔRG, EBNA2ΔNco, EBNA2Δ336-467). Jedoch ist auch bei Deletion des WWP- Motivs (Mutante EBNA2 322 LE), welches die RBP- Jk Bindung vermittelt, eine verminderte Bindung feststellbar, was auf eine Beteiligung jener Region an der Bindung beider Proteine hindeutet.

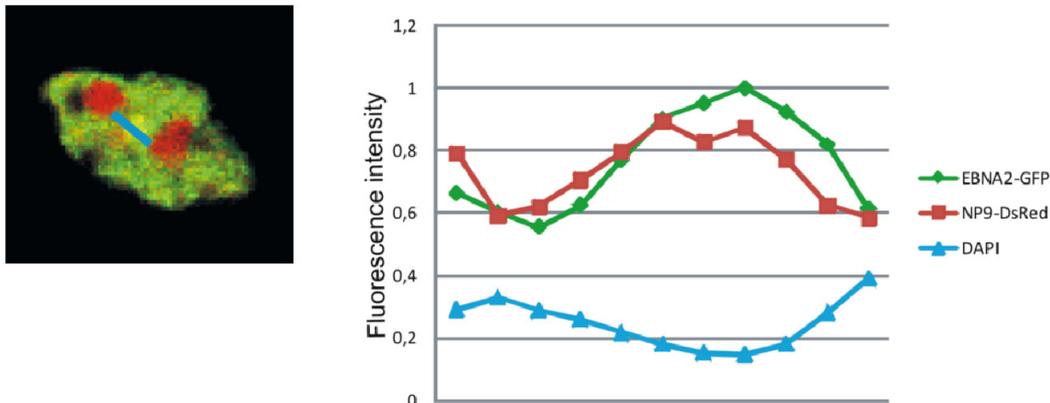
Um nun zu überprüfen ob es sich bei der bisher beobachteten Bindung beider Proteine um eine *in vivo* stattfindende Interaktion handelt und diese nicht erst nach der Zellyse eintritt, sollte im nächsten Schritt die Lokalisation beider Proteine in der Zelle und eine mögliche Colokalisation per Fluoreszenzmikroskopie analysiert werden. Hierzu wurden COS- Zellen entweder mit EGFP- EBNA2, EGFP- SMN (als Negativkontrolle) oder NP9- DsRed transfiziert und mittels konfokaler Laserscanmikroskopie analysiert.



**Abbildung 33: Lokalisierung von NP9 und EBNA2 im Nukleus mittels Fluoreszenzmikroskopie**  
 COS Zellen wurden entweder mit EGFP- EBNA2, EGFP- SMN oder NP9- DsRed transfiziert und mittels konfokaler Laserscanmikroskopie analysiert. Dargestellt sind die Signale für EBNA2 (grün, obere Reihe), SMN (grün, untere Reihe), NP9 (rot) und die DNA- Färbung durch DAPI (blau). Die überlagerten Signale („Merge“) resultieren in einer Gelbfärbung.

Wie aus Abbildung 33 hervorgeht, kolokalisieren beide Proteine im Kern mit Ausnahme der Nucleoli. SMN und NP9 kolokalisieren nicht, obwohl SMN mit EBNA2 in den sogenannten „Gems“ im Kern assoziiert ist (Voss et al. 2001; Barth et al. 2003).

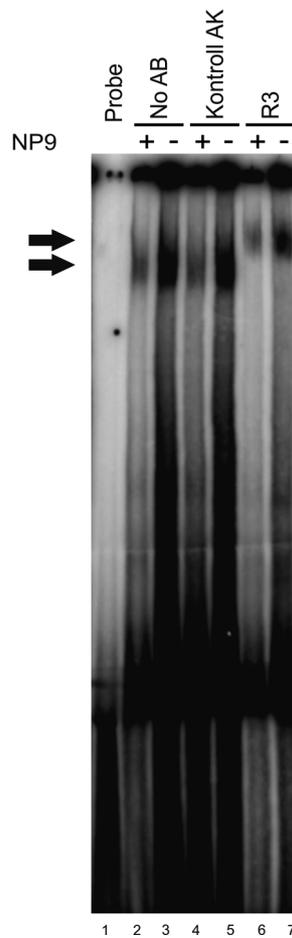
Eine nähere Betrachtung eines solchen Kolokalisationshotspots, an welchem die Fluoreszenzintensitäten von GFP- EBNA2 und NP9- DsRed besonders hoch sind, ist in Abbildung 34 dargestellt.



**Abbildung 34: Verlauf der Fluoreszenzintensitäten von EBNA2 und NP9**

Die Fluoreszenzintensitätsprofile von EBNA2 und NP9 an einem Kolokalisationshotspot (Blaue Linie) wurden mit Hilfe der Leica Application Suite Software ermittelt. Während die Signale für EBNA2 und NP9 denselben Verlauf nehmen, zeigt die Fluoreszenzintensität der DAPI-Färbung ein inverses Profil.

Beide Fluochrome (GFP- EBNA2 und NP9- DsRed) weisen denselben Intensitätsverlauf innerhalb eines Hotspots auf (Abb. 34, blaue Linie). Die DNA-spezifische DAPI-Färbung jedoch nimmt einen genau umgekehrt proportionalen Verlauf in ihrer Intensität an einer solchen Stelle. Dies deutet auf einen transkriptionell aktiven Teil des Chromatins als Interaktionsort hin (Schweizer 1980). Nach der nun analysierten Bindung und Kolokalisation von NP9 und EBNA2 und dem Einfluss des endogenen retroviralen Proteins auf die EBNA2-vermittelte Transaktivierung verschiedener Promotoren, wurde in einem folgenden Experiment der Einfluss von NP9 auf die Fähigkeit von EBNA2 zur Bildung von DNA-bindenden Komplexen in einem Gelshiftexperiment überprüft. Hierzu wurde Zellextrakt aus Raji-Zellen entweder mit NP9, welches in einem Baculovirussystem exprimiert wurde, („+“) oder mit Wildtyp Virus infiziertem SF158 Zellextrakt („-“) inkubiert. Als Oligonukleotid diente die Sequenz des viralen LMP2a Promotors welcher auch in vorangegangenen Gelshiftexperimenten verwendet wurde (Gross 2008).

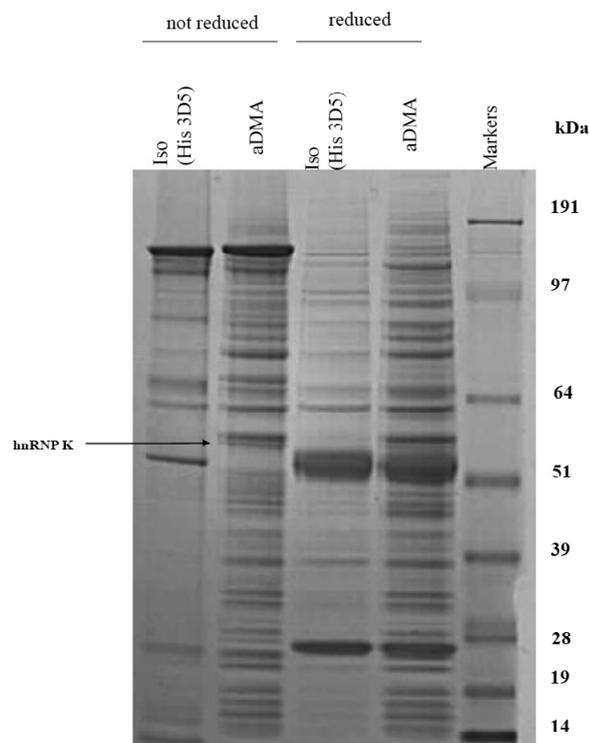


**Abbildung 35: NP9 inhibiert die Formation von EBNA2- haltigen DNA- bindenden Komplexen**  
 Zellextrakt aus Raji- Zellen wurde entweder mit NP9, welches in einem Baculovirussystem exprimiert wurde, („+“) oder mit Wildtyp Virus infiziertem SF158 Zellextrakt („-“) inkubiert. Das Gelshiftexperiment wurde ohne Antikörper (Spuren 2 & 3), unspezifischer Isotypkontrolle (Ratte, Spuren 4 & 5) oder dem EBNA2- spezifischen R3 Antikörper (Spuren 6 & 7) durchgeführt. Der untere Pfeil („Shift“) zeigt den EBNA2- haltigen DNA- bindenden Komplex mit 2 RBPJk- Molekülen an. Der obere Pfeil markiert den durch den R3 Antikörper zusätzlich vergrößerten Komplex („Supershift“). In Spur 1 wurde kein Zellextrakt hinzugegeben.

Wie in Abbildung 35 zu erkennen, inhibiert NP9 die Bildung von EBNA2-haltigen DNA- bindenden Komplexen. Die Intensität der Banden ist bis zu 40% in den NP9 haltigen Ansätzen (Abb. 35: Spuren 2, 4, 6) im Vergleich zu den mit dem Wildtyp behandelten Ansätzen (Abb. 35: Spuren 3, 5, 7) verringert. Hintergrundsignale wurden berücksichtigt.

### 6.3. Die Interaktion von EBNA2 und hnRNP-K

Mit Hilfe der neu synthetisierten und charakterisierten Antikörper war es nun möglich weitere aDMA- enthaltende Proteine oder Interaktionspartner von aDMA-modifiziertem EBNA2 in EBV- positiven Zellen zu identifizieren. So wurde nach abgeschlossener Charakterisierung mit dem aDMA- spezifischen Antikörper 6F12 von Frau Christine Hennard am Helmholtz Zentrum in München eine Immunpräzipitation aus EBV- positiven Raji- Zellen durchgeführt. Die so präzipitierten Proteine wurden per SDS- Page einmal unter reduzierenden Bedingungen und einmal unter nativen, nicht reduzierenden Bedingungen aufgetrennt. Die nach Coomassie- Färbung erhaltenen Banden wurden mittels MALDI-Massenspektroskopie analysiert und entsprechenden Proteinen zugeordnet. Das Ergebnis ist in Abbildung 36 dargestellt.

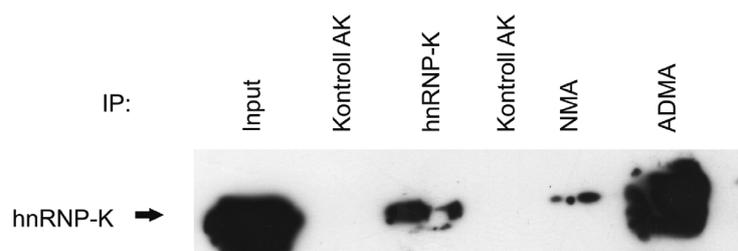


**Abbildung 36: Immunpräzipitation aus EBV- positiven Raji- Zellen mittels des methylierungsspezifischen aDMA 6F12 Antikörpers (Christine Hennard)**

*Mit dem neu synthetisierten aDMA- methylierungsspezifischen 6F12 Antikörper wurde nach abgeschlossener Charakterisierung eine Immunpräzipitation aus EBV- positiven Raji- Zellen durchgeführt. Präzipitierte Proteine wurden per SDS- Page entweder unter reduzierenden Bedingungen oder unter nativen, nicht reduzierenden Bedingungen, aufgetrennt. Nach anschließender Coomassie- Färbung wurden die erhaltenen Banden mittels MALDI-Massenspektroskopie analysiert und entsprechenden Proteinen zugeordnet (Das Experiment wurde von Frau Christine Hennard (Helmholtz Zentrum, München) durchgeführt).*

Bei einem der so identifizierten Proteine handelt es sich um hnRNP-K. Der Proteinkomplex, der sich während der Transkription um die neu synthetisierte mRNA lagert, wird als heterogenes nukleäres Ribonukleoprotein (hnRNP) bezeichnet. Ein Vertreter dieser Familie, hnRNP-K, ein 65 kDa großes Protein, enthält eine Interaktionsdomäne (KI Domäne), die unter anderem 2 RGG- (Arg-Gly-Gly) Boxen enthält. hnRNP-K ermöglicht es anderen Proteinen, die nicht an Nukleinsäuren binden können, indirekt an diese zu binden. hnRNP-K selbst kann an seinen Argininresten der RGG-Boxen durch die Argininmethyltransferase PRMT1 asymmetrisch dimethyliert werden. Diese Methylierung erfolgt durch eine direkte Interaktion der beiden Proteine (Ostareck-Lederer et al. 2006; Chan et al. 2009).

In einem nächsten Experiment sollte nun die beobachtete Präzipitation von hnRNP-K im Hinblick auf eine eventuelle Bindung an EBNA2 überprüft werden. Als erster Schritt wurde eine Immunpräzipitation aus Lysozymextrakt, welches IPTG-induziertes, aDMA-methyliertes hnRNP-K enthält (Plasmid pET28a+ His-PRMT1-His-hnRNP-K-His-PRMT1, 4.12.18) mit den methylierungsspezifischen NMA 8C3 und aDMA 6F12, einem methylierungsunspezifischen  $\alpha$  hnRNP-K – Antikörper (Santa Cruz) und entsprechenden Isotypkontrollen durchgeführt. Die gebundenen Proteine wurden im Western-Blot mit Hilfe des  $\alpha$  hnRNP-K – Antikörpers (Santa Cruz) detektiert.

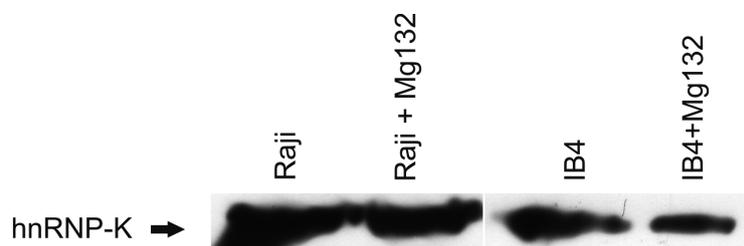


**Abbildung 37: Präzipitation von *in vitro* in Bakterien synthetisiertem hnRNP-K mit Hilfe des monoklonalen  $\alpha$ -aDMA – Antikörpers**

Es wurde eine Immunpräzipitation aus Lysozymextrakt, welches IPTG-induziertes, aDMA-methyliertes hnRNP-K enthält (Plasmid pET28a+ His-PRMT1-His-hnRNP-K-His-PRMT1, 2.12.12) mit den methylierungsspezifischen NMA 8C3 und aDMA 6F12, einem methylierungsunspezifischen  $\alpha$  hnRNP-K – Antikörper (Santa Cruz) und entsprechenden Isotypkontrollen durchgeführt. Die gebundenen Proteine wurden im Western-Blot mit Hilfe des  $\alpha$  hnRNP-K – Antikörpers (Santa Cruz) detektiert.

Wie aus Abb. 37 hervorgeht, wird aDMA methyliertes hnRNP-K direkt durch den aDMA 6F12 Antikörper präzipitiert. Bei der geringen Menge an unmethyliertem (NMA) hnRNP- K handelt es sich um noch nicht durch die im Plasmid enthaltene PRMT1 methyliertes hnRNP-K. Somit konnte die direkte Präzipitation von hnRNP- K in Abbildung 36 durch den Antikörper 6F12 im *E.Coli*- basierenden System bestätigt werden.

Da vor dem Hintergrund dieser Ergebnisse eine Bindung von EBNA2 an hnRNP- k nicht ausgeschlossen werden kann, und es sich somit bei der in Abb. 38 beobachteten Präzipitation von hnRNP- K um eine Co- Präzipitation der beiden Proteine handeln kann, wurde nun in einem folgenden Experiment zuerst die Expression von hnRNP- K in verschiedenen EBV- positiven B- Zelllinien untersucht. Hierzu wurden EBV- positive Raji und IB4 Zelllinien, entweder mit dem Proteasominhibitor Mg132 versetzt oder unbehandelt, auf die Expression des hnRNP-K Proteins untersucht. Die Detektion von hnRNP-K erfolgt mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers gegen hnRNP-K (Santa Cruz).



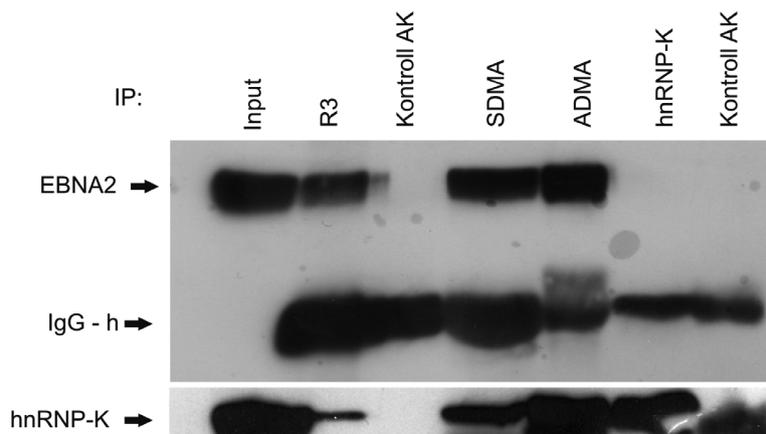
**Abbildung 38: Expression von hnRNP-K in B-Zelllinien**

*Raji und IB4 Zelllinien wurden, entweder mit dem Proteasominhibitor Mg132 versetzt oder unbehandelt, auf die Expression des hnRNP-K Proteins untersucht. Die Detektion von hnRNP-K erfolgt mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers gegen hnRNP-K (Santa Cruz).*

Wie in Abbildung 38 zu erkennen ist, ist hnRNP- K in beiden Zelllinien unabhängig von der Behandlung mit dem Proteasominhibitor Mg132 exprimiert.

Nach erfolgter Bestätigung der Expression von hnRNP- K in EBV- positiven B- Zellen wurde in einem folgenden Experiment nun überprüft, ob hnRNP- K *in vivo* an EBNA2 bindet. Hierzu wurde eine Immunpräzipitation aus EBV- positiven Raji Zellen durchgeführt.

Es wurden die verschiedenen methylierungsspezifischen Antikörper eingesetzt (aDMA 6F12: aDMA modifiziertes EBNA2, sDMA 13B10: sDMA modifiziertes EBNA2), ein hnRNP-K spezifischer Antikörper (Santa Cruz), der EBNA2 methylierungsunspezifische R3 Antikörper sowie entsprechende Isotypkontrollen. Der Nachweis von präzipitiertem EBNA2 wurde mit Hilfe des R3- Antikörpers durchgeführt, der Nachweis von hnRNP-K mit monoklonalem hnRNP-K Antikörper der Firma Santa Cruz.

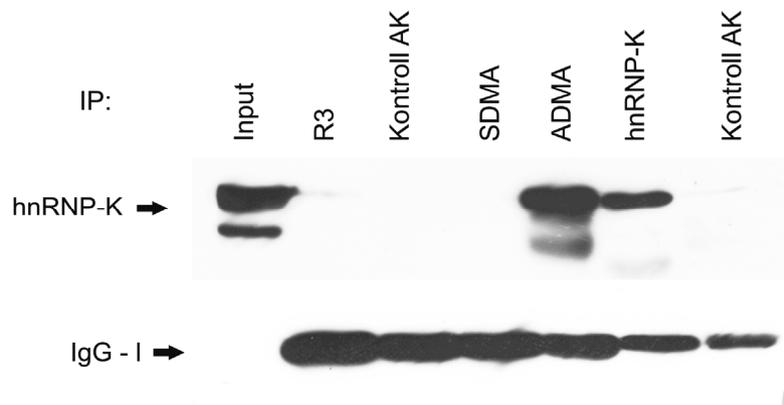


**Abbildung 39: Co- Immunpräzipitation von EBNA2 und hnRNP-K aus Raji- Zellen**

*EBV positive Raji Zellen wurden in der Immunpräzipitation mit verschiedenen Antikörpern eingesetzt (R3: C- Terminus von EBNA2, aDMA 6F12: aDMA modifiziertes EBNA2, sDMA 13B10: sDMA modifiziertes EBNA2, hnRNP-K (Santa Cruz): hnRNP-K und entsprechende Isotypkontrollen). Der Nachweis von präzipitiertem EBNA2 wurde mit Hilfe des R3- Antikörpers durchgeführt, der Nachweis von hnRNP-K mit monoklonalem hnRNP-K Antikörper der Firma Santa Cruz.*

In Abbildung 39 ist zu erkennen, dass hnRNP-K bei der Präzipitation mit dem EBNA2 methylierungsunspezifischen R3 Antikörper, nicht jedoch mit der Kontrolle, detektierbar ist. hnRNP- k ist außerdem mit den methylierungsspezifischen sDMA- und aDMA Antikörpern, sowie auch mit dem hnRNP- K spezifischen Antikörper der Firma Santa Cruz detektierbar. Dies spricht für eine Bindung von hnRNP- K an EBNA2.

Um nun einen Überblick der Präzipitation von hnRNP- K durch die methylierungsspezifischen Antikörper ohne den Einfluss von EBNA2 zu erhalten, wurde dasselbe Experiment unter Verwendung von EBV- negativen BL- 41 Zellen wiederholt. Somit sollte auch festgestellt werden, ob die Präzipitation von hnRNP- K durch den sDMA- spezifischen Antikörper in Abbildung 39 durch Bindung von hnRNP- K an EBNA2 oder direkt erfolgt.



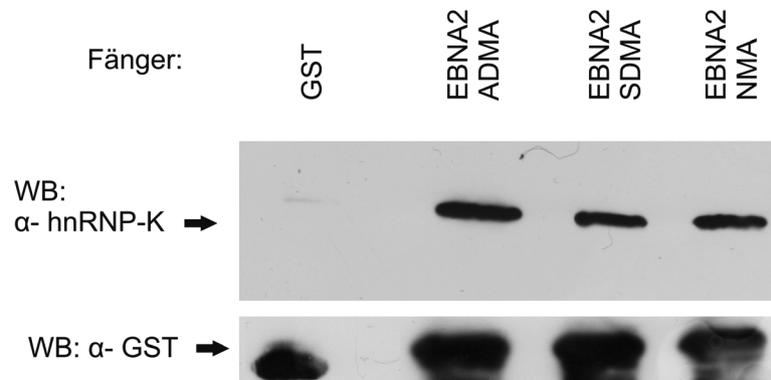
**Abbildung 40: Immunpräzipitation von hnRNP-K aus EBV negativen BL- 41 mit dem aDMA-spezifischen Antikörper 6F12**

EBV negative BL- 41 Zellen wurden in der Immunpräzipitation mit verschiedenen Antikörpern eingesetzt (R3: C- Terminus von EBNA2, aDMA 6F12: aDMA modifiziertes EBNA2, sDMA 13B10: sDMA modifiziertes EBNA2, hnRNP-K (Santa Cruz): hnRNP-K und entsprechende Isotypkontrollen). Der Nachweis von präzipitiertem hnRNP- K wurde mit Hilfe des monoklonalen hnRNP-K Antikörpers der Firma Santa Cruz durchgeführt.

Wie in Abbildung 40 zu sehen ist, kann hnRNP- K in EBV negativen Zellen nur mit dem aDMA und dem hnRNP- K spezifischen Antikörper präzipitiert werden. Eine Präzipitation mit dem EBNA2 spezifischen R3 Antikörper ist nicht möglich. Die in Abbildung 39 beobachtete Präzipitation durch den sDMA- spezifischen Antikörper ist somit auf eine Interaktion mit EBNA2 zurückzuführen.

Um nun einen Einblick zu erhalten, ob hnRNP- K spezifisch an eine bestimmte Methylierungskonfiguration von EBNA2 bindet, wurde ein GST- Pulldown Assay durchgeführt. Hierzu wurde entweder vorher entsprechend *in vitro* methyliertes (5.4.15) GST- EBNA2 (aa300 -400) oder GST alleine (als Kontrolle) an Glutathion-Sepharose gekoppelt. Nach Inkubation mit EBV negativem DG75- Zellextrakt wurde an das Fusionsprotein gebundenes hnRNP-K per SDS- PAGE und anschließendem Western- Blot detektiert.

Der Nachweis von präzipitiertem hnRNP- K wurde mit Hilfe des monoklonalem hnRNP-K Antikörpers der Firma Santa Cruz durchgeführt; der Nachweis der GST-Fusionsproteine (als Bindekontrolle) erfolgte mit dem GST 6G9 Antikörper.

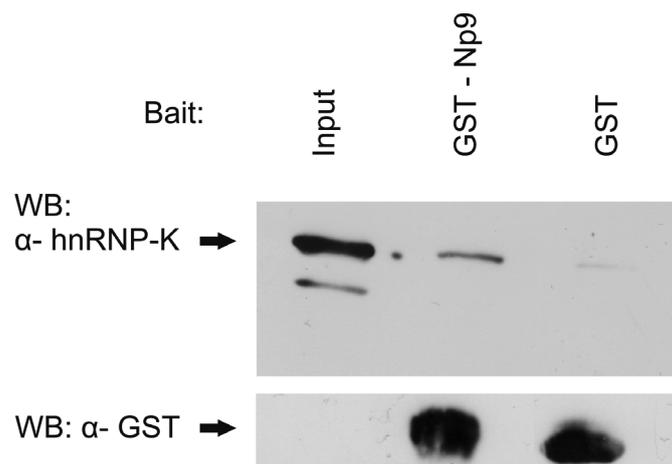


**Abbildung 41: Pull- Down Assay mit in vitro methylierten GST- EBNA2 (aa300-400) Fusionsproteinen und hnRNP- K**

In dem GST- Pulldown Assay wurde entweder vorher entsprechend in vitro methyliertes GST- EBNA2 (aa300 -400) oder GST alleine (als Kontrolle) an Glutathion Sepharose gekoppelt. Nach Inkubation mit EBV negativem DG75- Zellextrakt wurde an das Fusionsprotein gebundenes hnRNP-K per SDS Page und anschließendem Western- Blot detektiert. Der Nachweis von präzipitiertem hnRNP- K wurde mit Hilfe des monoklonalen hnRNP-K Antikörpers der Firma Santa Cruz durchgeführt; der Nachweis der GST- Fusionsproteine erfolgte mit dem GST 6G9 Antikörper.

Wie aus Abbildung 41 hervorgeht, bindet hnRNP- K an alle 3 Methylierungskonfigurationen von EBNA2, nicht jedoch an GST alleine. Da das verwendete PRMT5/WD45- Extrakt in einem *in vitro* Methylierungsassay neben sDMA- EBNA2 auch aDMA- EBNA2 erzeugt (Abbildung 19), ist nicht mit Sicherheit feststellbar, ob hnRNP- K auch an sDMA- modifiziertes EBNA2 bindet.

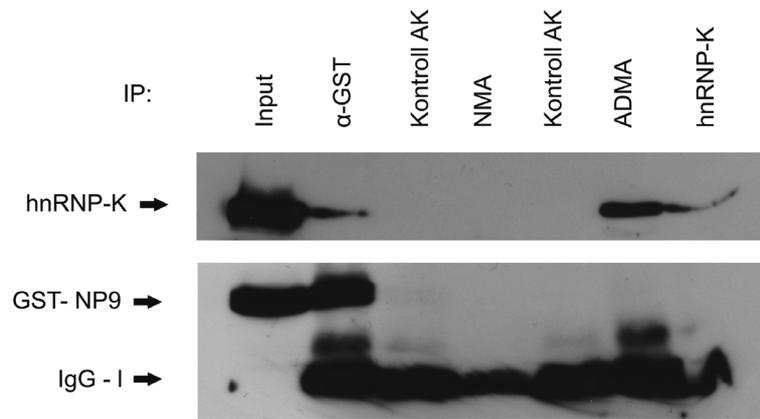
Da hnRNP- k vom methylierungsspezifischen aDMA- Antikörper, der gegen ein von EBNA2 stammendes Epitop generiert wurde, präzipitiert wird, liegt die Vermutung einer strukturellen Ähnlichkeit beider Proteine nahe. Um diesen Aspekt weiter zu untersuchen sollte eine mögliche Bindung von hnRNP- K an NP9, welches selbst wiederum an die aDMA- modifizierte RG- Repetition von EBNA2 bindet, analysiert werden. So wurde dasselbe Experiment (Abb. 41) ein weiteres Mal unter Verwendung von GST- NP9 als Fänger und GST als Kontrolle wiederholt.



**Abbildung 42: Pull Down Assay mit GST- NP9 Fusionsprotein und hnRNP-K**

In dem GST- Pulldown Assay wurde entweder GST- NP9 oder GST alleine (als Kontrolle) an Glutathion Sepharose gekoppelt. Nach Inkubation mit EBV negativem DG75- Zellextrakt wurde an das Fusionsprotein gebundenes hnRNP-K per SDS Page und anschließendem Western- Blot detektiert. Der Nachweis von präzipitiertem hnRNP- K wurde mit Hilfe des monoklonalem hnRNP-K Antikörpers der Firma Santa Cruz durchgeführt; der Nachweis der GST- Fusionsproteine erfolgte mit dem GST 6G9 Antikörper.

Wie in Abbildung 42 ersichtlich, bindet hnRNP- K an das GST- NP9- Fusionsprotein, an GST alleine jedoch nicht. Dies ist ein Hinweis auf eine strukturelle Ähnlichkeit von hnRNP- K und EBNA2, da beide Proteine denselben Bindungspartner NP9 besitzen. Um die so erhaltenen *in vitro* Daten auch *in vivo* zu überprüfen, wurde eine Co-Immunpräzipitation von hnRNP- K und NP9 durchgeführt. Wie auch in einem Co-Präzipitationsexperiment von NP9 und EBNA2 wurden auf Grund der geringen Expression und der kurzen Halbwertszeit des NP9 Proteins in EBV- positiven B- Zellen in diesem Experiment HEK 293T Zellen mit pSG5-GST- NP9 transfiziert und eine Immunpräzipitation durchgeführt. Der Nachweis von gebundenem hnRNP- K erfolgte im Western- Blot mit dem hnRNP- K spezifischen Antikörper der Firma Santa Cruz, der Nachweis von GST- NP9 mit dem GST 6G9- Antikörper.



**Abbildung 43: Co- Immunpräzipitation von GST- NP9 und hnRNP- K aus transfizierten HEK 293T Zellen**

Mit dem Plasmid pSG5-GST-NP9 transfizierte HEK 293T- Zellen wurden in der Immunpräzipitation mit verschiedenen Antikörpern eingesetzt (GST 6G9: GST- Tag, aDMA 6F12: aDMA modifiziertes EBNA2, NMA 8C3: nicht meethyliertes EBNA2, hnRNP-K: hnRNP-K Antikörper der Firma Santa Cruz) und entsprechende Isotypkontrollen). Der Nachweis von präzipitiertem hnRNP- K wurde mit Hilfe des hnRNP-K spezifischen Antikörpers (Santa Cruz) durchgeführt, der Nachweis von GST- NP9 mit dem GST 6G9 Antikörper.

Wie sich in Abbildung 43 erkennen lässt, wird hnRNP- K mit dem GST- spezifischen GST 6G9 Antikörper wie auch NP9 präzipitiert. Dies spricht für eine Bindung beider Proteine *in vivo*.

## 7. Diskussion

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte die Methylierung der Arginin- Glycin Repetition des Epstein- Barr Virus kodierten nukleären Antigens 2 (EBNA2) mit Hilfe von spezifischen monoklonalen Antikörpern weiter charakterisiert werden. Des Weiteren wurde der Einfluss der Methylierung der EBNA2 RG- Repetition auf den viralen Lebenszyklus untersucht.

Auch wurde das Vorhandensein von zellulären Interaktionspartnern von EBNA2, die ihrerseits an die Region um die methylierte RG- Repetition binden, untersucht. Mit Hilfe der monoklonalen Antikörper, die gegen die verschiedenen methylierten RG- Repetitionen von EBNA2 gerichtet sind, wurde nach zellulären strukturellen Homologen von EBNA2 gesucht und diese weiter charakterisiert.

Die Methylierung von Proteinen, welche sowohl an Arginin-, Lysin-, Histidin-, Prolin- als auch Carboxylreste erfolgen kann (Paik et al. 2007), ist eine posttranslational erfolgende, stabile, reversible Modifikation und beeinflusst Wechselwirkungen von Proteinen untereinander (Gary and Clarke 1998), die Signaltransduktion in der Zelle, und weitere Prozesse in der Zelle. Die Methylierung von Argininresten in Proteinen wurde 1967 zuerst beschrieben (Paik and Kim 1967). Bis zum heutigen Tag wurde bereits eine Vielzahl an verschiedenen Protein- Arginin- Methyltransferasen (PRMTs) in unterschiedlichen eukaryotischen Organismen entdeckt (Gary and Clarke 1998; McBride and Silver 2001; Boulanger, Miranda et al. 2004; Miranda, Sayegh et al. 2006).

Im Lebenszyklus von EBV wie auch bei der durch EBV verursachten Immortalisierung von B-Lymphozyten nimmt EBNA2 eine entscheidende Rolle ein. Die mRNA des nukleären Phosphoproteins (Grasser, Gottle et al. 1992) ist das erste nachweisbare Transkript nach erfolgter Infektion mit EBV. EBNA2 agiert in der infizierten Zelle als Transaktivator einer Vielzahl zellulärer (z.B. CD23) und viraler Gene (z.B. LMP1, LMP2A). Die EBNA2- deletierte EBV Mutante P3HR1, welche ihre Fähigkeit B- Zellen zu transformieren verloren hat (Sixbey, Shirley et al. 1991), macht die essentielle Rolle von EBNA2 bei der Transformation durch EBV deutlich.

EBNA2 besitzt eine methylierte Arginin- Glycin Repetition (RG- Repetition) an der Stelle 339- 354 seiner Aminosäuresequenz.

Es wird allgemein angenommen, dass die RG- Repetition eine regulatorische Einheit innerhalb des EBNA2- Proteins darstellt (Tong et al. 1994) und einen Einfluss auf die Transaktivierungsaktivität des Proteins hat, was anhand einer Deletionsmutante ( $\Delta$ RG), die *in vitro* eine schlechtere Transformationsrate und Chromatin-Bindfähigkeit aufweist (Tong et al. 1994), deutlich wird.

Die in der RG- Repetition vorhandenen Arginine kommen theoretisch in drei verschiedenen Methylierungskonfigurationen vor (unmethyliert, sDMA, aDMA). Die Modifikation der Arginine zu Citrullinen ist ebenfalls möglich.

## 7.1. Die EBNA2 RG- Repetition

### 7.1.1. Die Charakterisierung der methylierungsspezifischen Antikörper

Den Ausgangspunkt dieser Arbeit bildeten die Vorarbeiten von Frau Dr. Stephanie Barth, Herrn Alfredo Mamiani und die Ergebnisse meiner vorangegangenen Diplomarbeit (Gross 2008). Es war bisher bekannt, dass die sDMA- modifizierte RG- Repetition von EBNA 2 an das Survival of Motor Neurons Protein (SMN) bindet (Barth et al. 2003). Auf Grund dieser Ergebnisse wurden monoklonale Antikörper, die gegen die verschieden methylierten Spezies der EBNA2- RG- Repetition (NMA, sDMA, aDMA und Citrullin) gerichtet sind, in Kooperation mit Frau Dr. Elisabeth Kremmer (Helmholz Zentrum, München) hergestellt. Die initiale Charakterisierung dieser neu synthetisierten Antikörper wurde von Herrn Alfredo Mamiani begonnen und in meiner vorangegangenen Diplomarbeit (Gross 2008) weitergeführt. So konnte gezeigt werden, dass EBNA2 *in vivo* in 2 verschiedenen Methylierungskonfigurationen (sDMA und aDMA) vorkommt und hauptsächlich die aDMA- modifizierte Variante des EBNA2- Proteins am viralen LMP2a Promotor *in vitro* nachweisbar ist (Abbildung 9). Durch die Entdeckung einer Kreuzreaktivität des NMA 5A2 Antikörpers mit der aDMA- modifizierten Variante der EBNA2 RG- Repetition nach Abschluss der Diplomarbeit, musste die Detektion der unmethylierten EBNA2- Spezies kritisch betrachtet werden und die methylierungsspezifischen Antikörper wurden einer erneuten Charakterisierung unterzogen. Als NMA- spezifischer Antikörper wurde deshalb in den folgenden Experimenten der Klon „8C6“ verwendet.

Um einen Überblick über die Spezifität der verschiedenen Antikörper zu erhalten, wurde in der Arbeitsgruppe von Frau Dr. Elisabeth Kremmer (Helmholz Zentrum, München) ein ELISA durchgeführt. Dabei wurden die monoklonalen Antikörper gegen die verschiedenen OVA- gekoppelten Peptide getestet. Wie aus Tabelle 6 hervorgeht, zeigen alle auch im weiteren Verlauf dieser Arbeit verwendeten Antikörper ausschließlich eine Reaktion bei dem entsprechenden Peptid. Eine Kreuzreaktivität der nun verwendeten Antikörper kann mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden.

Daraufhin wurden die Antikörper in einem „Dotblot Assay“ gegen verschieden methylierte, OVA- gekoppelte Peptide getestet. Als interne Kontrolle diente ein OVA- gekoppeltes HA- Peptid. Das Ergebnis ist in Abbildung 10 dargestellt und lässt auf ein hohes Maß an Spezifität der von nun ab verwendeten Antikörper schließen. Die geringfügige Kreuzreaktivität des aDMA 6F12 Antikörpers mit dem sDMA- Peptid wurde aufgrund des starken Signals, welches am aDMA- Peptid erzeugt wurde, vernachlässigt. Als sDMA- spezifischer Antikörper wurde für die folgenden Experimente der Klon „13B10“ ausgewählt und in einer folgenden Immunpräzipitation aus EBV- positivem B95.8 Zellextrakt mit freien aDMA- und sDMA- Peptiden kompetetiert, um so die Spezifität des Antikörpers *in vivo* zu bestimmen. Wie aus Abbildung 11 hervorgeht, ist nur das sDMA- Peptid in der Lage den sDMA- Antikörper in einer Immunpräzipitation zu inhibieren und somit die Bindung von EBNA2 an den Antikörper zu verhindern.

Als nächster Punkt der Charakterisierung wurde der aDMA- spezifische Antikörper 6F12, welcher als einziger in einem Immunoblot/Western- Blot funktional ist, einer Kompetition unterzogen. Hierzu wurde der mit freien Peptiden (sDMA oder aDMA) präinkubierte aDMA- spezifische 6F12 Antikörper auf Nitrozellulosestreifen gegeben, auf welchen zuvor natives B95.8 nach SDS- PAGE Auftrennung geblottet wurde. In Abbildung 12 lässt sich erkennen, dass nur das freie aDMA- Peptid in der Lage ist, die Bindung des Antikörpers zu inhibieren. Somit standen hochspezifische Reagenzien für die folgenden Experimente zur Verfügung.

### 7.1.2. Charakterisierung der EBNA2- RG- Repetition

Die RG- Repetition von EBNA2 wurde einer erneuten Charakterisierung *in vivo* unterzogen. Hierzu wurde zuerst eine Immunpräzipitation mit den monoklonalen Antikörpern aus EBV- positiven B95.8 Zellen durchgeführt, um die Verteilung der verschiedenen EBNA2 Spezies *in vivo* zu ermitteln. Als Kontrollen dienten die methylierungsunspezifischen R3 und 1E6  $\alpha$ - EBNA2 Antikörper. Aus Abbildung 13 lässt sich erkennen, dass EBNA2 *in vivo* in sDMA und aDMA modifizierter Form vorkommt, jedoch nicht in unmethylierter Form.

Die in den Vorarbeiten von Herrn Alfredo Mamiani detektierte Existenz von NMA-EBNA2 ließ sich somit nicht bestätigen und ist auf die Kreuzreaktivität des damals verwendeten NMA „spezifischen“ Antikörpers 5A2 zurückzuführen. Um dieses Ergebnis zu verifizieren wurde die Spezifität der Antikörper mit Hilfe der EBNA2- Deletionsmutante  $\Delta$ RG, deren RG- Repetition deletiert ist, getestet. 293T Zellen wurden entweder mit einem für den Wildtyp von EBNA2 kodierenden Plasmid oder mit einem für die Deletionsmutante  $\Delta$ RG kodierenden Plasmid transfiziert. Anschließend erfolgte eine Immunpräzipitation. Diese Arbeiten wurden von Herrn Alfredo Mamiani durchgeführt. In Abbildung 14 lässt sich erkennen, dass die methylierungsspezifischen Antikörper lediglich die Wildtyp- Variante des EBNA2- Proteins erkennen, nicht jedoch die um die RG- Repetition deletierte  $\Delta$ RG- Mutante. Sie sind somit auch *in vivo* spezifisch für das Motiv gegen das sie gerichtet sein sollen. Die Präzipitation beider Mutanten durch den R3 Antikörper ist durch das ihm zugrundeliegende Epitop am C- Terminus von EBNA2, außerhalb der RG- Repetition begründet.

Nach der nun abgeschlossenen Charakterisierung der Antikörper und der Analyse der verschiedenen EBNA2 Spezies *in vivo*, wurde in einem nächsten Experiment der Einfluss des Methylierungsinhibitors AdOx (Hoffman and McConnell 1987) auf die Verteilung der verschieden methylierten EBNA2 RG- Repetitionen untersucht. Hierzu wurden EBV- positive B95.8 Zellen unbehandelt oder AdOx behandelt in einer Immunpräzipitation mit den methylierungsspezifischen Antikörpern eingesetzt. Aus Abbildung 15 geht hervor, dass nun auch die unmethylierte (NMA) Variante von EBNA2 nur nach Behandlung der Zellen mit AdOx präzipitierbar war.

Dies bestätigen die vorangegangenen *in vivo* Ergebnisse (Abbildung 13). Die Existenz von NMA- EBNA2 in unbehandelten Zellen kann somit ausgeschlossen werden. Umgekehrt konnte dadurch die Spezifität des NMA- spezifischen Antikörpers bestätigt werden.

Da es sich bei EBNA2 um ein Phosphoprotein handelt (Petti et al. 1990; Grässer et al. 1992), welches durch Hyperphosphorylierung eine Herabsetzung seiner Transaktivierungsaktivität erfährt, wurden in einem folgenden Experiment die Phosphorylierungszustände der unterschiedlich methylierten EBNA2- Spezies ermittelt. Dies erfolgte mittels einer Immunpräzipitation durch die methylierungsspezifischen Antikörper aus vorher metabolisch radioaktiv ( $H_3^{32}PO_4$ ) markierten EBV- positiven B95.8 Zellen.

Aus Abbildung 16 geht hervor, dass nur der aDMA- spezifische 6F12 Antikörper in der Lage ist,  $^{32}P$ - markiertes EBNA2 zu präzipitieren. Daraus lässt sich schließen, dass nur die aDMA- modifizierte Variante von EBNA2 phosphoryliert ist. Die anderen detektierten Banden, die entweder mit dem sDMA oder dem aDMA Antikörper präzipitiert wurden, könnten weitere zelluläre Faktoren sein, die mit den unterschiedlich methylierten EBNA2 Spezies interagieren. Aufgrund der unterschiedlichen Bandenmuster in den Spuren des sDMA und des aDMA- Antikörpers lässt sich aber auf verschiedene assoziierte Proteine schließen.

### 7.1.3. *In vitro* Charakterisierung der EBNA2- RG Repetition

Nachdem die Charakterisierung der EBNA2- RG Repetition *in vivo* abgeschlossen war, wurde nun mit einem GST- EBNA2- Fusionsprotein, welches als EBNA2- Anteil die Aminosäuren 300-400 enthält, ein *in vitro* Methylierungsassay durchgeführt. Als katalysierende Enzyme dienten His- PRMT1 (4.12.17 - aDMA EBNA2) und PRMT5/WD45 (4.10.1 - sDMA EBNA2). Durch diesen Test wurde eine weitere Spezifitätsprüfung der Antikörper möglich. Außerdem konnte ein Fänger für folgende GST- Pull Down Experimente entwickelt werden. Zuerst wurde das für das GST- EBNA2 Fusionsprotein kodierende Plasmid pGEX4T1- EBNA2aa300-400 nach Transformation in BL21/DE3 Bakterien einer Expressionskontrolle unterzogen, welche auch eine Prüfung der Löslichkeit des Proteins unter nativen Aufschlussbedingungen ermöglichte.

Aus Abbildung 17 geht hervor, dass das GST- EBNA2aa300-400 Fusionsprotein erfolgreich hergestellt werden konnte und außerdem unter nativen Bedingungen in einer löslichen Form vorliegt. Die, wie in 5.4.15.1 beschrieben, aufgereinigten Proteine (GST-EBNA2aa300-400, His- PRMT1) und das schon zuvor aufbereitete PRMT5/WD45, wurden im folgenden Experiment in einem *in vitro* Methylierungsansatz (5.4.15.2) verwendet und nach Abschluss der Methylierung in einer Immunpräzipitation mit den monoklonalen methylierungsspezifischen Antikörpern eingesetzt um den Erfolg der Methylierungsreaktion zu überprüfen. Aus dem in Abbildung 18 dargestellten Ergebnis lässt sich der Erfolg der Reaktion ableiten. So war in den Spuren des sDMA Antikörpers sDMA- Fusionsprotein detektierbar, in der Spur des aDMA- spezifischen Antikörpers aDMA- Fusionsprotein. Im Ansatz ohne Protein- Arginin Methyltransferase („unmethyliert“) war mit Hilfe des NMA- spezifischen Antikörpers Fusionsprotein nachweisbar. In einer folgenden Immunpräzipitation wurden zum Überprüfen der Spezifität der Reaktion und zum Ausschluss eventueller Kontaminationen die Ansätze von PRMT1 und PRMT5/WD45 einer Präzipitation aller methylierungsspezifischen Antikörper unterzogen. Die Ergebnisse eines anschließenden Western- Blot, welche in Abbildung 19 grafisch dargestellt sind, lassen jedoch auf eine Kontamination des PRMT5/WD45- Ansatzes mit einer aDMA- katalysierenden PRMT schließen, da in diesem Ansatz mit dem aDMA- spezifischen Antikörper eine beträchtliche Menge an aDMA- Fusionsprotein präzipitierbar war. Die bei der vorangegangenen Charakterisierung der Antikörper beobachtete Kreuzreaktivität des aDMA- 6F12 Klon kann aufgrund des geringen Signals im DotBlot Assay (Abbildung 10) und dem Fehlen jeglicher Hinweise auf eine Kreuzreaktivität in den weiteren Experimenten ausgeschlossen werden. Im *in vitro* Methylierungsansatz, welcher die Methyltransferase PRMT1 enthält, war, wie zu erwarten, nur aDMA- und kein sDMA- Fusionsprotein detektierbar. Der rein auf *E.Coli*- Extrakten basierende PRMT1 Ansatz kann somit im Gegensatz zu dem im Bacculo- System synthetisierten PRMT5/WD45 Ansatz als frei von Kontaminationen betrachtet werden.

Dadurch ließ sich das aDMA modifizierte Fusionsprotein in einem folgenden GST- Pulldown Assay einsetzen, das sDMA modifizierte Fusionsprotein jedoch nur unter Vorbehalt, da in diesem Ansatz auch aDMA- EBNA2aa300-400 enthalten ist.

#### **7.1.4. Inhibition der Methylierung reduziert die Menge an LMP1**

In der vorangegangenen Diplomarbeit (Gross 2008) konnte mittels Gelshift-Experimenten die Verteilung der verschiedenen methylierten EBNA2 Spezies an einem viralen Promotor (LMP2a) aufgeklärt werden. Es konnte gezeigt werden, dass nur das aDMA- modifizierte EBNA2- Protein in den DNA- bindenden Komplexen enthalten ist, was somit Rückschlüsse auf die essentielle Rolle dieser einen methylierten Form von EBNA2 zulässt. Nun sollte der Einfluss der Methylierung auf die Transaktivierungsaktivität von EBNA2 untersucht werden. Hierzu wurde die Menge an LMP1, dessen Promotor durch EBNA2 transaktiviert wird, nach Behandlung der EBV- positiven B95.8 Zelllinie mit AdOx untersucht. Außerdem wurde zur Überprüfung des Erfolges der Inhibition der Methylierung die Menge an aDMA- modifiziertem EBNA2 überprüft sowie die Gesamtmenge an Proteins mit Hilfe des methylierungsunspezifischen R3- Antikörpers.  $\beta$ - Actin diente als Ladekontrolle. Wie aus Abbildung 20 hervorgeht, sinkt das Expressionsniveau von LMP1 nach AdOx- Behandlung der Zellen um 40- 50%. Die Menge an aDMA- modifiziertem EBNA2- Proteins nimmt im Gegensatz zur Gesamtmenge des Proteins deutlich ab (Reduktion um fast 70%). Eine Änderung der Menge von  $\beta$ - Actin war nicht zu detektieren. Es geht hieraus deutlich hervor, dass die Methylierung des EBNA2- Proteins einen entscheidenden Anteil an der Expression des viralen LMP1- Proteins hat. Ähnliche Ergebnisse ließen sich mit der humanen EBV- positiven Raji- Zelllinie erzielen.

Betrachtet man das Verhalten der EBNA2 $\Delta$ RG- Deletionsmutante am LMP1- Promotor so fällt auf, dass diese in der Lage ist den Promotor um ein Vielfaches stärker zu aktivieren als der Wildtyp des EBNA2- Proteins (Tong et al. 1994). Da jedoch eine zu hohe Expression von LMP1 für die Zellen toxisch ist, ist die verminderte Transformationsrate der EBNA2 $\Delta$ RG- Mutante möglicherweise in der verstärkten Transaktivierung des LMP1- Promotors begründet. Im Zusammenhang mit dem beschriebenen Effekt der Inhibition der Methylierung des EBNA2- Proteins auf die Expression von LMP1 kann festgehalten werden, dass die RG- Repetition eine regulierende Funktion in der EBNA2- gesteuerten LMP1- Expression hat und die Methylierung der RG- Repetition einen entscheidenden Faktor zur geregelten, nicht-toxischen Expression von LMP1 darstellt.

### **7.1.5. Inhibition der Methylierung hat keinen Einfluss auf die Induktion des lytischen Zyklus**

Nachdem der erste Effekt der Methylierungsinhibition von EBNA2 detektiert wurde, wurde nun die Auswirkung der AdOx- Behandlung auf die Induktion des lytischen Zyklus von EBV untersucht. Hierzu wurde die humane lymphoblastoide Zelllinie (LCL) IB4 entweder unbehandelt, mit dem Methylierungsinhibitor AdOx oder dem Phorbol-12-myristat-13-acetat (TPA), welches den lytischen Zyklus induziert, behandelt und auf die Expression von EBNA2, aDMA-EBNA2, die virale DNA-Polymerase BZLF1 untersucht. Wie in Abbildung 21 zu erkennen ist, hat die Inhibition der Methylierung keinerlei Einfluss auf die Induktion des viralen Transaktivators BZLF1 und somit des lytischen Zyklus von EBV. Um nun im Umkehrschluss einen Einfluss der Induktion des lytischen Zyklus auf die Methylierung von EBNA2 auszuschließen, wurden erneut IB4-Zellen mit TPA behandelt und die Mengen an aDMA-EBNA2 verglichen. Wie aus Abbildung 22 hervorgeht, zeigt sich auch in diesem Experiment keinen Einfluss des lytischen Zyklus, welcher durch Expression von BZLF1 bestätigt wurde, auf die aDMA-Modifikation des EBNA2-Proteins.

### **7.1.6. Hauptsächlich aDMA-EBNA2 bindet an Promotoren *in vivo***

Durch die in der vorangegangenen Diplomarbeit (Gross 2008) durchgeführten Gelshift-Experimente konnte ein Einblick in die DNA-Bindung der verschiedenen methylierten EBNA2-Spezies *in vitro* erlangt werden. Um die Bindung von methyliertem EBNA2 an DNA *in vivo* analysieren zu können, wurden Chromatin-Immunopräzipitationen (ChIP) von Herrn Richard Palermo aus der Arbeitsgruppe von Michelle West (University of Sussex, England) durchgeführt. Für diese Experimente wurden Mutu I und Mutu III Zelllinien verwendet. Mutu I Zellen sind EBV-positiv, befinden sich jedoch im Latenzstadium 1 und exprimieren somit kein EBNA2. Mutu III Zellen, auch EBV-positiv, befinden sich hingegen im Latenzstadium 3 und exprimieren somit EBNA2. Die Mutu I Zelllinie diente so dem Vergleich, indem sie eine EBV-positive aber EBNA2-freie Vergleichsumgebung darstellt. In einem ersten Experiment wurde das Vorhandensein aller verschiedenen methylierten EBNA2-Spezies in den verwendeten EBNA2-positiven Mutu III Zellen überprüft. Hierzu wurde eine Immunpräzipitation mit den verschiedenen methylierungsspezifischen Antikörpern durchgeführt.

Wie in Abbildung 23 ersichtlich, ist EBNA2 sDMA und aDMA Konfiguration detektierbar. Somit war eine Verwendung dieser Zellen zur Chromatin Immunpräzipitation möglich. Es wurden die viralen LMP1-, LMP2a- und C-Promotoren untersucht.

Durch die Präzipitation von Formaldehyd- fixierten Protein- DNA Komplexen und die anschließende Fragmentation der DNA durch Ultraschall ist es möglich, bestimmte Regionen der präzipitierten DNA zu amplifizieren. Hierzu werden zuerst Primerpaare festgelegt, die eine bestimmte Region der zu untersuchenden genomischen Region flankieren und somit die Herstellung von bis zu 4 Amplifikaten pro Promotor ermöglichen. Eine schematische Darstellung der Lokalisierung dieser Primerpaare ist in Abbildung 24 dargestellt.

Als Erstes wurde die Verteilung der verschiedenen methylierten EBNA2 Spezies am viralen C- Promotor untersucht. Betrachtet man die Signale des R3 Antikörpers (Abbildung 25, linker Graph), so ist zu erkennen, dass die größte Menge an Amplifikat vom Primerpaar in der Region der RBP-Jk- Bindestelle erzeugt wird. Dies ist einleuchtend, da dort auch die größte Menge an EBNA2, welches via RBP-Jk an die DNA bindet, erwartet wird. Vergleicht man nun die Signale des aDMA- mit dem sDMA- spezifischen Antikörper (Abbildung 25, rechter Graph), so kann viel mehr aDMA- als sDMA- modifiziertes EBNA2 detektiert werden. Die Verteilung der Signale über den Promotor gleicht denen des R3- Antikörpers, wobei auch hier das größte Signal mit dem Primerpaar an Position -430 erzielt wird, welches relativ nahe an der RBP-Jk- Bindestelle liegt. Es lässt sich somit festhalten, dass am viralen C- Promotor mehr aDMA- EBNA2 als sDMA- EBNA2 detektiert werden kann.

Eine ähnliche Situation wurde am viralen LMP1- Promotor vorgefunden. Auch hier sind die Signale des R3 Antikörpers (Abbildung 26, linker Graph) in Höhe der 2 RBP- Jk- und PU1- Bindestellen am stärksten, da dort die größte Menge an EBNA2 zu erwarten ist. Im Vergleich der aDMA- und sDMA- Antikörper (Abbildung 26, rechter Graph) zeigt sich dasselbe Bild wie am viralen C- Promotor. Auch am LMP1- Promotor ist mehr aDMA- als sDMA- modifiziertes EBNA2 detektierbar.

Bei dem letzten untersuchten Promotor, dem viralen LMP2a Promotor, welcher in seiner Sequenz auch das in den Gelshift- Experimenten verwendete Oligonukleotid widerspiegelt, ist die Verteilung der Signale des R3- Antikörpers (Abbildung 27, linker Graph) ähnlich der der anderen untersuchten Promotoren.

Auch hier findet sich die größte Menge an EBNA2 in der Region der RBP-Jk-Bindestellen. Vergleicht man nun die Signale von aDMA- modifiziertem und sDMA- modifiziertem EBNA2, so fällt auf, dass mehr aDMA- EBNA2 als sDMA- EBNA2 detektierbar ist, jedoch der Mengenunterschied/Signalunterschied im Vergleich zu den viralen C- und LMP1 Promotoren geringer ausfällt.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass durch die größeren präzipitierten Mengen an aDMA- EBNA2 davon auszugehen ist, dass es sich um die transkriptionell aktivere Form des Proteins handelt. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen der Gelshift- Experimente aus der vorangegangenen Diplomarbeit (Gross 2008), in welchen nur die aDMA- modifizierte Variante des Proteins detektierbar war. Die geringen aber nicht vernachlässigbaren Mengen an sDMA- EBNA2, die in der CHIP präzipitiert wurden und somit als promotorassoziiert angesehen werden, stehen jedoch im Widerspruch zu den Gelshift- Experimenten, in denen keinerlei sDMA- EBNA2 zu detektieren war. Eine mögliche Erklärung wäre eine Verdeckung der Antikörperbindestelle des sDMA- modifizierten Proteins *in vitro* oder die Bildung von aus aDMA und sDMA EBNA2 bestehenden Heterodimeren was die Erzeugung eines Supershifts im Gelshift- Experiment unmöglich machen würde.

Betrachtet man vor diesem Hintergrund die Ergebnisse der Immunpräzipitation aus metabolisch mit  $H_3^{32}PO_4$  markierten Raji- Zellen (Abbildung 16) so fällt auf, dass nur bei der in den CHIP- Assays vermehrt an Promotoren gefundenen aDMA- modifizierten Variante von EBNA2 eine Phosphorylierung detektierbar war. Es ist bekannt, dass die Hyperphosphorylierung von EBNA2 (an Ser-243) die Transaktivierung des LMP1- Promotors herabsetzt (Yue et al. 2005). Außerdem wird EBNA2 bei der Reaktivierung von EBV in latent infizierten B- Zellen einer Hyperphosphorylierung unterzogen. Da die aDMA- modifizierte Variante von EBNA2 die an den untersuchten Promotoren vorherrschende Spezies des Proteins ist, wäre die Phosphorylierung ein möglicher regulierender Faktor um eine zu hohe und somit toxische Expression von LMP1 zu verhindern.

## **7.2. Die Interaktion von EBNA2 und NP9**

Nach erfolgter Infektion von B- Zellen durch EBV kommt es zu einer erhöhten Expression von zellulären Transkripten, welche auch endogenen retroviralen Ursprungs sind. Es ist bekannt, dass EBV die Expression eines durch HERV-K 18 exprimierten Superantigens induziert (Hsiao et al. 2006). Die Verbindung von NP9 und EBNA2 besteht in der Bindung von NP9 an das „Ligand of Numb Protein X“ (LNx) (Armbruster et al. 2004), wodurch Numb zum proteasomalen Abbau markiert wird und dadurch das durch Numb regulierte Notch Protein, ein zelluläres Homolog von EBNA2 (Hofelmayr et al. 2001), hochreguliert wird.

### **7.2.1. Die Expression der NP9 mRNA ist in EBV- transformierten Zellen induziert**

Da HERV- K kodierte Transkripte in einer Vielzahl von Tumoren hochreguliert sind (Armbruster et al. 2002), wurde nun in einem ersten Experiment überprüft ob die Immortalisierung von peripheren Blutzellen durch EBV eine Erhöhung der NP9 mRNA zur Folge hat. Hierfür wurde ein RT- PCR- Experiment durchgeführt und die Menge an NP9 mRNA in EBV transformierten Lymphozyten („B95.8- LCL“) und EBV- negativen peripheren mononukleären Blutzellen („PBMC“) verglichen. Wie in Abbildung 28 zu erkennen ist, ist die Menge an NP9 mRNA in B95.8- LCL deutlich hochreguliert, wohingegen die EBV Transformation keinerlei Einfluss auf die HERV- K 101 exprimierte gag mRNA und die GAPDH mRNA, welche als interne Kontrolle diente, hat. Dies lässt auf eine induzierte Expression des NP9- Proteins durch EBV- Infektion schließen.

### **7.2.2. NP9 ist in EBV- positiven B- Zellen exprimiert**

Da NP9 indirekt an der Regulation des zellulären EBNA2 Homologes Notch beteiligt ist, wurde nun im nächsten Schritt ein Einfluss von NP9 auf die EBNA2- transaktivierten Promotoren untersucht. Zunächst wurde jedoch überprüft, ob NP9 auf Proteinebene in EBV- positiven B- Zellen detektierbar ist.

Hierzu wurde Zellextrakt aus EBV- positiven Raji oder IB4 Zelllinien, die entweder mit dem Proteasominhibitor MG132 behandelt worden waren oder unbehandelt blieben, nach Auftrennung mittels SDS- Page mit Hilfe eines polyklonalen Kaninchensersums (Armbruster et al. 2002) auf das Vorhandensein von NP9 überprüft.

Als Positivkontrolle diente eine stabil mit einem für NP9 kodierenden Plasmid transfizierte Raji Zelllinie. Die Behandlung der Zellen mit MG132 ist unerlässlich, da NP9 eine sehr geringe Halbwertszeit aufweist und somit eine Detektion ohne Behandlung mit einem abbauverlangsamenden Agens schwierig wäre (Armbruster et al. 2004). Wie in Abbildung 29 zu sehen ist, ist NP9 in beiden untersuchten B-Zelllinien exprimiert, wobei die Detektion des Proteins auch in der nicht MG132-behandelten IB4- Zelllinie möglich war.

### **7.2.3. NP9 beeinflusst die Transaktivierung durch EBNA2**

Nach erfolgreicher Detektion des NP9- Proteins in B- Zellen wurden nun Transaktivierungstests mit verschiedenen viralen, EBNA2 transaktivierten, Promotoren sowie dem zellulären Hes1- Promotor, welcher durch das zelluläre Homolog zu EBNA2, Notch, transaktiviert wird, durchgeführt um einen Einfluss von NP9 auf die Transaktivierung jener Promotoren zu analysieren. Diese Arbeiten wurden von Herrn Dr. Andreas Spurk durchgeführt.

Betrachtet man die Situation am zellulären HES1- Promotor (Abbildung 30, links oben) so kann kein signifikanter ( $p=0,19$ ) Einfluss von NP9 auf die Transaktivierung durch Notch („ICN1“) festgestellt werden. Im Gegensatz hierzu konnte eine Reduktion der EBNA2 vermittelten Transaktivierung des viralen LMP2a- (Abbildung 30, unten Mitte) und des viralen C- Promotors sowie eines künstlichen 12x RBP-Jk Promotors, welcher 12 Bindestellen für RBP-Jk enthält, festgestellt werden. Die Möglichkeit, dass die Reduktion an diesen Promotoren durch etwaige Degradation von EBNA2 oder RBP-Jk verursacht wurde, konnte durch entsprechende Kontrollexperimente ausgeschlossen werden.

Im Gegensatz zu den negativen Effekten von NP9 auf die EBNA2 vermittelte Transaktivierung der viralen LMP2a- & C- Promotoren und am 12x RBP-Jk- Promotor stehen die Ergebnisse am viralen LMP1- Promotor (Abbildung 30, rechts oben). Hier ist NP9 nicht in der Lage, die Transaktivierung durch EBNA2 (Wildtyp) signifikant herabzusetzen. NP9 ist hingegen in der Lage die starke EBNA2 $\Delta$ RG- vermittelte Aktivierung des LMP1- Promotors, welche typisch für diese Deletionsmutante ist (Tong et al. 1994), zu verringern.

---

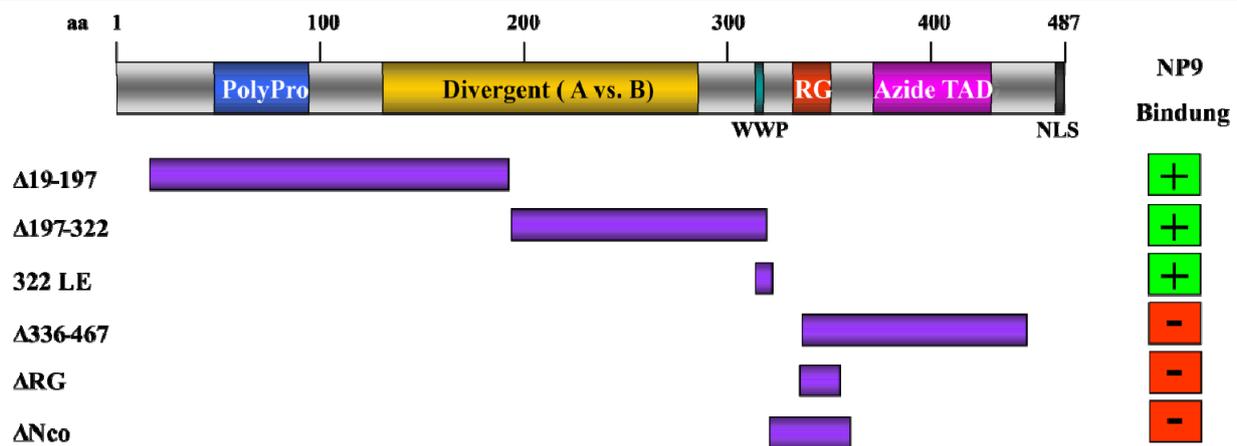
Dies spricht für eine Beteiligung weiterer Regionen des EBNA2- Proteins oder weiterer Interaktionspartner bei der Interaktion von NP9 und EBNA2 und den beobachteten Effekten. Dies deckt sich auch mit den Ergebnissen der Pulldown Experimente, wo keine Bindung der EBNA2 $\Delta$ RG Mutante an NP9 nachweisbar war (siehe 7.2.5). Abschließend ist festzuhalten, dass die in den Luciferase-Reporterassays analysierten Effekte einer promotorspezifischen Inhibition von EBNA2 durch NP9 zuzuschreiben sind.

#### **7.2.4. NP9 bindet an EBNA2 *in vivo***

Nachdem der Einfluss von NP9 auf die Transaktivierungsaktivität von EBNA2 analysiert worden war, wurde nun eine Bindung von EBNA2 an NP9 untersucht, was die in den Transaktivierungsassays betrachteten Effekte erklären würde. Hierzu wurden HEK 293T- Zellen jeweils mit einem für ein GST- NP9- Fusionsprotein kodierenden Plasmid und einem für EBNA2 kodierenden Plasmid transfiziert und anschließend eine Immunpräzipitation durchgeführt. Der Einsatz eines GST- NP9- Fusionsproteins ist aufgrund der geringen Halbwertszeit von NP9 notwendig um eine Co- Präzipitation zu ermöglichen. Wie in Abbildung 31 dargestellt, konnte GST- NP9 mit dem EBNA2- spezifischen R3-, sowie dem EBNA2- RG- methylierungsspezifischen  $\alpha$ DMA Antikörper präzipitiert werden. Eine Präzipitation von EBNA2 durch den  $\alpha$ - GST Antikörper konnte ebenso detektiert werden. Dies spricht einerseits für eine generelle Bindung der beiden Proteine, andererseits auch für eine vermehrte, selektive Bindung von NP9 an das  $\alpha$ DMA- modifizierte EBNA2, welches nach Ergebnissen der vorangegangenen Experimente die transkriptionell aktivere Variante von EBNA2 darstellt. Hiermit lassen sich auch die Ergebnisse der Transaktivierungsassays erklären, da NP9 durch die Bindung an  $\alpha$ DMA- EBNA2 genau die Spezies von EBNA2 inhibiert, welche am Transaktivierungsprozess beteiligt zu sein scheint.

### 7.2.5. Die EBNA2- RG Repetition ist ein wichtiger Teil der Binderegion für NP9

Um die Region von EBNA2, an die NP9 bindet, genauer zu lokalisieren, wurden GST- PullDown Versuche mit GST- NP9 als Fänger, einem Wildtyp EBNA2 und verschiedenen EBNA2- Deletionsmutanten durchgeführt. Bei den Deletionsmutanten handelt es sich um EBNA2- Proteine die entweder eine Deletion größerer Regionen ihrer Aminosäuresequenz aufweisen ( $\Delta 19-197$ ,  $\Delta 197-322$ ,  $\Delta 366-467$ ) oder denen nur bestimmte für die Funktion des Proteins essentielle Regionen fehlen (322 LE: WWP Motiv mutiert,  $\Delta$ RG: RG- Repetition deletiert,  $\Delta$ Nco: Deletion der Aminosäuren 325-375 (inkl. RG- Repetition)). Die einzelnen Ergebnisse sind in Abbildung 32 aufgelistet. Es lässt sich erkennen, dass NP9 in der Lage ist den Wildtyp des EBNA2- Proteins, sowie alle Deletionsmutanten, welche eine RG- Repetition besitzen, zu binden. Bei Betrachtung der 322 LE- Deletionsmutante, welche eine Deletion des WWP- Motivs trägt, jedoch noch die RG- Repetition besitzt, fällt auf, dass die Fähigkeit von NP9 diese Mutante zu binden im Vergleich zu den anderen RG- Repetitions- tragenden Mutanten stark verringert ist. Dies lässt auf eine Beteiligung des WWP- Motivs an der NP9- EBNA2 Interaktion schließen. Da das WWP- Motiv von EBNA2 die Bindung an RBP-Jk vermittelt und somit die Interaktion zwischen der DNA und EBNA2 ermöglicht, liegt bei der Beteiligung dieses Motivs an der Bindung von NP9 an EBNA2 die Vermutung nahe, dass NP9 die Bindung von RBP-Jk an EBNA2 behindert und somit dessen DNA Interaktion inhibiert. Dies wäre eine Erklärung für die in den Luciferase- Reporter Assays beobachteten Effekte von NP9 auf EBNA2 transaktivierte Promotoren, z.B. auch bei der  $\Delta$ RG- Mutante. Die Ergebnisse der PullDown Assays der EBNA2 Deletionsmutanten sind zusammenfassend in Abbildung 44 schematisch dargestellt.



**Abbildung 44: Zusammenfassung der Pulldown Assays**

Im oberen Bereich des Schaubildes ist eine schematische Darstellung von EBNA2 abgebildet welche die N- terminalen Polyprolin- Region, die divergierende Region zwischen Typ A und Typ B EBV, das Trp- Trp- Pro („WWP“)- Motiv, welches die Bindung an RBPJk vermittelt, die RG- Repetition, die azide Transaktivierungsdomäne und die C- terminale nukleäre Lokalisierungssequenz („NLS“) enthält. Die darunter befindlichen Balken bezeichnen die jeweiligen Deletionen der entsprechenden EBNA2 Mutanten. Ein rechts zu findendes „+“ oder „-“, bezeichnet das Vorhandensein einer Bindung von NP9 und EBNA2 oder das Fehlen einer Solchen.

### 7.2.6. EBNA2 und NP9 kolokalisieren im Nukleus

Um eine Aussage über die Verteilung beider Proteine in der Zelle und eine mögliche Kolokalisation, welche für eine *in vivo* Relevanz der ermittelten Co- Präzipitations und Pulldown Daten sprechen würde, treffen zu können, wurde ein Experiment mit konfokaler Laserscanmikroskopie in Kooperation mit Frau Dr. Elfriede Nössner (Helmholz Zentrum, München) durchgeführt. Hierzu wurden COS- Zellen entweder mit EGFP- EBNA2, EGFP- SMN (als Negativkontrolle für NP9) oder mit NP9- dsRed transfiziert. Diese Zellen wurden nach Fixierung und DAPI- Färbung mittels konfokaler Laserscanmikroskopie analysiert. Wie in Abbildung 33 zu erkennen ist, kolokalisieren NP9 (-dsRED, rot, obere Reihe) und EBNA2 (-GFP, grün, obere Reihe) im Nukleus der Zellen, außerhalb der Nukleoli. In den Nukleoli ließ sich NP9 vermehrt detektieren. Beide assoziierten Fluochrome zeigen in solchen Kolokalisations- „Hotspots“ einen gleichen Intensitätsverlauf. SMN (-GFP, grün, untere Reihe) und NP9 (-dsRed, rot, untere Reihe) kolokalisieren nicht und weisen deutlich unterschiedliche Lokalisationen innerhalb der Zelle auf.

Das gleiche Experiment wurde außerdem mit der EBNA2- Deletionsmutante  $\Delta$ RG durchgeführt und führte zu einem ähnlichen Ergebnis, wobei jedoch die Anzahl von Zellen, welche eine Kolo-kalisation aufweisen, um den Faktor 2,3 verringert war. Dies unterstreicht die in den Pulldown Assays ermittelten Ergebnisse und deutet auf eine Beteiligung weiterer Regionen des EBNA2 Proteins an der Bindung von NP9 hin.

Zur weiteren Analyse solcher Kolo-kalisations- Hotspots wurde der Intensitätsverlauf der Fluochrome entlang einer definierten Linie (Abbildung 34, blaue Linie) mit Hilfe der Leica Application Suite Software ermittelt. So konnte festgestellt werden, dass entlang solcher definierter Linien die Intensitäten beider Fluochrome (dsRed: NP9 und GFP: EBNA2) den gleichen Verlauf nehmen, die Färbung der DNA mittels DAPI jedoch umgekehrt proportional verläuft. Dies lässt auf eine Lokalisation der NP9-EBNA2 Komplexe in transkriptionell aktivem Chromatin schließen, da DAPI nur schlecht an aktives Chromatin bindet (Schweizer 1980). Somit ist es NP9 möglich die EBNA2 gesteuerte Genregulation direkt zu beeinflussen. Dieser Intensitätsverlauf der Fluochrome ließ sich auch bei den Experimenten mit der EBNA2 $\Delta$ RG- Mutante beobachten.

#### **7.2.7. NP9 reduziert die DNA- bindenden Eigenschaften von EBNA2**

In einem abschließenden Experiment wurde nun der Einfluss von NP9 auf die Bildung von EBNA2- haltigen DNA- bindenden Komplexen *in vitro* untersucht. Hierzu wurde ein Gelshift- Experiment durchgeführt, um am Beispiel der Sequenz des viralen LMP2a Promotors, welcher in den Transaktivierungsassays NP9- sensitiv war, einen Einblick in die Effekte von NP9 auf die EBNA2- haltigen DNA- bindenden Komplexe zu bekommen. So wurde NP9, welches in einem Baculovirussystem exprimiert wurde, (Abbildung 35, „+“) oder mit Wildtyp- Virus infiziertes SF158 Zellextrakt (Abbildung 35, „-“) mit EBV- positivem, EBNA2- haltigem Raji- Kernextrakt inkubiert und ein EMSA durchgeführt. Das Ergebnis ist in Abbildung 35 dargestellt.

Es ist klar erkennbar, dass in den Spuren, in welchen NP9 zugesetzt worden war, eine deutliche Reduktion der Signale der EBNA2- haltigen DNA- bindenden Komplexe (Abbildung 35, unterer Pfeil) stattfand. Nach Auswertung der Intensität und der Einberechnung der Hintergrundsignale konnte eine Reduktion der Signale von bis zu 40% ermittelt werden.

Betrachtet man nun die Bande des „Supershift“- Signals (Abbildung 35, oberer Pfeil), so ist auch hier eine deutliche Reduktion zu beobachten.

Diese Beobachtungen unterstützen die Annahme, dass NP9 die Formation der EBNA2- haltigen Komplexe verhindert und dies zu den in den Transaktivierungsassays betrachteten Effekten führt.

NP9 kann als eine Anpassung des Wirtsorganismus an Infektionen mit Viren wie EBV angesehen werden, um deren für die Zellen toxische Effekte zu regulieren und mit dazu beizutragen eine asymptomatische, latente Infektion zu etablieren. Im Umkehrschluss kann die EBNA2- RG- Repetition auch als Anpassung des Virus an die Wirtszelle gesehen werden um einer erhöhten Expression von toxischen Produkten wie z.B. LMP1 entgegenzuwirken und den Lebenszyklus des Virus zu regulieren.

### **7.3. Die Interaktion von EBNA2 und hnRNP- K**

Nach Abschluss der Charakterisierung der monoklonalen methylierungsspezifischen Antikörper wurde mit dem aDMA- spezifischen 6F12 Antikörper eine Immunpräzipitation aus EBV- positiven Raji- Zellen von Frau Christine Hennard durchgeführt. Präzipitierte Proteine wurden per SDS- Page aufgetrennt, mittels Coomassie angefärbt und die einzelnen Banden mit Hilfe einer MALDI- Massenspektroskopie analysiert. Ein solches angefärbtes Gel ist in Abbildung 36 dargestellt. Es ist zu erkennen, dass der aDMA- spezifische Antikörper eine große Menge zellulärer Proteine im Vergleich zur Isotypenkontrolle präzipitiert. Eines der mittels MALDI- Massenspektroskopie ermittelten präzipitierten Proteine war hnRNP- K. hnRNP- K ist Teil eines Proteinkomplexes, des heterogenen nukleären Ribonukleoproteins, welcher sich während der Transskription um die neu synthetisierte RNA lagert. hnRNP- K selbst ist ein 65 kDa großes Protein, welches unter anderem eine Interaktionsdomäne (KI Domäne) und 2 RGG- (Arginin- Arginin- Glycin) Boxen enthält. Es ermöglicht anderen, zur Nukleinsäure- Bindung nicht befähigten Proteinen, eine Interaktion mit jener einzugehen. Es ist außerdem bekannt, dass hnRNP- K an den Argininresten seiner RGG- Boxen durch die Protein- Arginin- Methyltransferase 1 (PRMT1) asymmetrisch methyliert wird (Ostareck- Lederer et al. 2006; Chan et al. 2009).

### 7.3.1. Der EBNA2- RG spezifische aDMA 6F12 Antikörper präzipitiert hnRNP-K

Durch diese strukturelle Ähnlichkeit (RGG- Box) zu EBNA2 (RG- Repetition) und der vermuteten Interaktion beider Proteine mit PRMT1 lag die Vermutung nahe, dass die Grundlage der Präzipitation von hnRNP- K eine strukturelle Ähnlichkeit beider Proteine ist. So wurde in einem ersten Experiment eine Immunpräzipitation aus Lysozymextrakt, welches in Bakterien (BL21/DE3) synthetisiertes, asymmetrisch dimethyliertes, hnRNP- K enthält (Plasmid pet28a+ His-PRMT1-HishnRNP-K-HisPRMT1, 2.12.18) mit den methylierungsspezifischen NMA 8C3 und aDMA 6F12 durchgeführt. Das Ergebnis des Western Blots ist in Abbildung 37 dargestellt und zeigt eine Präzipitation des hnRNP- K Proteins durch den NMA und aDMA-spezifischen Antikörper. Bei der geringen Menge an präzipitiertem NMA- hnRNP- K handelt es sich um neusynthetisiertes, aber noch nicht methyliertes Protein. Hiermit konnte gezeigt werden, dass beide eigentlich gegen die EBNA2- RG- Repetition gerichteten Antikörper, hnRNP- K in unmethyliertem Zustand und im aDMA-modifizierten Zustand erkennen und direkt präzipitieren. Dies ist ein Hinweis auf die strukturelle Ähnlichkeit von EBNA2 und hnRNP- K.

Bei einer Immunpräzipitation aus EBV- positiven, metabolisch mit  $H_3^{32}PO_4$  markierten Raji Zellen mit dem aDMA- spezifischen Antikörper 6F12 (Abbildung 16, Spur „ADMA“) kann neben EBNA2 eine weitere Bande von ca. 65 kDa detektiert werden. Da hnRNP- K ein Phosphoprotein ist (Kimura et al. 2010) und der aDMA- spezifische Antikörper aDMA- spezifisches hnRNP- K präzipitiert (Abbildung 37), liegt die Vermutung nahe, dass es sich bei der hier identifizierten Bande um hnRNP- K handeln könnte.

### **7.3.2. hnRNP- K ist in EBV- positiven B- Zellen exprimiert**

Da aber eine Co- Präzipitation der beiden Proteine an einander in den Experimenten von Christine Hennard durch die Verwendung von EBV- und somit EBNA2- positiven Zellen Raji- Zellen nicht ausgeschlossen werden konnte, sollte in den folgenden Experimenten eine mögliche Interaktion der beiden Proteine näher beleuchtet werden. Zuerst wurde die Expression des hnRNP- K Proteins in B- Zellen untersucht. Hierzu wurde Zellextrakt aus EBV- positiven Raji- und IB4- Zellen (entweder mit MG132 versetzt oder unbehandelt) per SDS- Page aufgetrennt und die hnRNP- K Expression im Western Blot analysiert. Wie in Abbildung 38 dargestellt ist, wird hnRNP- K in beiden Zelllinien exprimiert.

### **7.3.3. hnRNP- K bindet an EBNA2 *in vivo***

Um die Bindung der beiden Proteine zu untersuchen, wurde eine Co- Immunpräzipitation aus EBV- positiven Raji Zellen mit den verschiedenen methylierungsspezifischen Antikörpern, dem methylierungsunspezifischen  $\alpha$ - EBNA2 R3 Antikörper, einem  $\alpha$ - hnRNP- K Antikörper und entsprechenden Isotypkontrollen durchgeführt. Der Nachweis beider Proteine erfolgte im Western Blot und ist in Abbildung 39 dargestellt. Aus dieser geht hervor, dass es möglich ist, hnRNP- K mittels des EBNA2- spezifischen Antikörpers zu präzipitieren, wie auch mit den sDMA- und aDMA- spezifischen Antikörpern. Eine Co- Präzipitation von EBNA2 mit dem hnRNP- K- spezifischen Antikörper war nicht möglich. Dies könnte an der geringen Menge an copräzipitiertem EBNA2 liegen, welches im Western Blot unterhalb der Nachweisgrenze des R3 Antikörpers liegt. Da in diesem Experiment auch eine Präzipitation von hnRNP- K mit dem sDMA- spezifischen Antikörper möglich war, jedoch keine Interaktion von hnRNP- K mit sDMA- katalysierenden PRMT's bekannt ist, musste nun geklärt werden, ob diese Präzipitation direkt oder durch Bindung an sDMA- modifiziertes EBNA2 erfolgte. Hierzu wurde eine Immunpräzipitation mit den gleichen Antikörpern aus EBV- negativen BL-41 Zellen durchgeführt. Das Ergebnis ist in Abbildung 40 dargestellt. Man kann erkennen, dass in einer zellulären Umgebung, in der EBNA2 nicht vorhanden ist, eine Präzipitation von hnRNP- K nur mit den aDMA- und hnRNP- K- spezifischen Antikörpern möglich ist. Eine Präzipitation mit dem sDMA- spezifischen Antikörper konnte nicht nachgewiesen werden.

Somit handelt es sich bei der beobachteten Präzipitation von hnRNP- K durch den sDMA- spezifischen Antikörper in Abbildung 39 um eine Co- Präzipitation mit sDMA- modifiziertem EBNA2.

Abschließend lässt sich festhalten, dass hnRNP- K *in vivo* an EBNA2 bindet, jedoch auch in EBNA2- negativen Zelllinien (BL- 41) vom aDMA- spezifischen Antikörper erkannt wird. Dies bedeutet, dass EBNA2 und hnRNP- K gleiche Oberflächenstrukturen besitzen müssen.

#### **7.3.4. hnRNP- K bindet an NMA-, sDMA- und aDMA- modifiziertes EBNA2 *in vitro***

Da aus den vorangegangenen Präzipitationsexperimenten durch die direkte Bindung des aDMA- spezifischen Antikörpers an hnRNP- K nicht eindeutig bestimmt werden konnte, an welche Methylierungskonfigurationen der EBNA2- RG- Repetition hnRNP- K bindet, wurde ein GST- PullDown Assay mit den verschiedenen methylierten RG- Repetitionen in Form der EBNA2aa300-400 Mutante durchgeführt. Das Protein wurde vor der Verwendung im GST- PullDown in einem *in vitro* Methylierungsassay mit den entsprechenden PRMT's methyliert. Hierzu wurde His- PRMT1 zur Erzeugung von aDMA- EBNA2aa300-400 und PRMT5/WD45 zur Erzeugung von sDMA- EBNA2aa300-400 verwendet. Diese so methylierten Proteine, sowie GST alleine, wurden, an Glutathion- Sepharose gebunden, als Fänger eingesetzt und mit nativem Extrakt, welchem der Methylierungsinhibitor AdOx zugesetzt wurde, um endogene Methylierung zu verhindern, aus EBV- negativen DG75 Zellen inkubiert. Gebundenes Protein wurde im Western Blot nachgewiesen. Das Ergebnis ist in Abbildung 41 grafisch dargestellt. Wie zu erkennen ist, bindet hnRNP- K an alle 3 verschiedenen Formen der EBNA2- RG- Repetition, jedoch nicht an GST alleine. Durch die möglicherweise nicht komplett inhibierte endogene Methylierung durch die AdOx- Behandlung des DG75- Zellextrakts und die in Abbildung 19 detektierte aDMA- Modifikation in PRMT5/WD45 behandeltem EBNA2aa300-400, welche möglicherweise auf eine Kontamination im PRMT5/WD45- Extrakt zurückzuführen ist, kann nicht ausgeschlossen werden, dass die hier beobachtete Bindung von zellulärem hnRNP- K an alle 2 methylierten Epitope und die unmethylierte RG- Repetition Bestand hat, obwohl auch in einem Co- Immunpräzipitationsexperiment von EBNA2 und hnRNP- K aus EBV- positiven Raji- Zellen (Abbildung 39) eine Co-

---

Präzipitation von hnRNP- K mit aDMA- und sDMA- modifiziertem EBNA2 möglich war. Es gilt festzuhalten, dass die Region von Aminosäure 300- 400 von EBNA2 die Bindungsregion von hnRNP- K darstellt.

### **7.3.5. hnRNP- K bindet an NP9 *in vitro* und *in vivo***

Durch die Präzipitation von hnRNP- K durch den aDMA- EBNA2 spezifischen 6F12 Antikörper liegt die Vermutung einer strukturellen Ähnlichkeit beider Proteine nahe. Um dies weiter zu untersuchen wurde eine mögliche Bindung von hnRNP- k und NP9, welches im Verlaufe dieser Arbeit als Bindungspartner von EBNA2 identifiziert wurde und dessen Binderegion an EBNA2 ähnlich der vermuteten Region, die hnRNP- K nutzt um an EBNA2 zu binden (Aminosäuren 300 -400 von EBNA2), analysiert.

In einem ersten Schritt wurde ein GST- PullDown Assay mit GST- NP9 und GST als Fänger durchgeführt und mit EBV- negativem DG75- Zellextrakt inkubiert. Der Nachweis von gebundenem hnRNP- K erfolgte mittels Western- Blot und ist in Abbildung 42 dargestellt. hnRNP- K bindet an NP9, jedoch nicht an GST alleine. Durch diese Bindung liegt eine strukturelle Ähnlichkeit von EBNA2 und hnRNP- K nahe, da beide somit den gleichen Bindungspartner haben.

Um die *in vitro* beobachteten Effekte *in vivo* zu bestätigen, wurde nun eine Immunpräzipitation durchgeführt. Wie auch in einem Co- Präzipitationsexperiment von NP9 und EBNA2 wurden auf Grund der geringen Expression und der kurzen Halbwertszeit des NP9 Proteins in EBV- positiven B- Zellen in diesem Experiment HEK 293T Zellen mit pSG5-GST- NP9 transfiziert und eine Immunpräzipitation durchgeführt. Der Nachweis von gebundenem Protein erfolgte per Western Blot. Das Ergebnis ist in Abbildung 43 dargestellt. hnRNP- K wird vom GST- spezifischen Antikörper zusammen mit NP9 Co- präzipitiert. Somit konnte die Bindung beider Proteine auch *in vivo* und die vermutete strukturelle Ähnlichkeit von hnRNP- K und EBNA2 bestätigt werden.

#### **7.4. Ausblick**

Im Rahmen dieser Arbeit konnte das heterogene nukleäre Ribonukleoprotein K (hnRNP- K) als Interaktionspartner und zelluläres strukturelles Pendant von EBNA2 identifiziert werden. Da hnRNP- K an einer Vielzahl von Prozessen des RNA-Metabolismus beteiligt ist, würden sich weitere Experimente anschließen um eine eventuelle Beteiligung von EBNA2 am RNA- Metabolismus, bedingt durch seine strukturelle Ähnlichkeit zu hnRNP- K, aufzuklären. Aufgrund der Interaktion beider Proteine sollten sich Experimente hinsichtlich der Funktionen von hnRNP- K, die durch EBNA2 beeinflusst oder imitiert werden, anschließen um den Nutzen der strukturellen Ähnlichkeit von hnRNP- K und EBNA2 im Hinblick auf den viralen Lebenszyklus und die Konsequenzen für die Wirtszelle zu beleuchten.

Des Weiteren gilt es aufzuklären in wie fern das funktionale zelluläre Homolog von EBNA2, Notch, mit hnRNP- K interagiert bzw. in seinen Funktionen beeinflusst wird.

---

## 8. Literaturverzeichnis

- Andre, B., J. Y. Springael (1994). "WWP, a new amino acid motif present in single or multiple copies in various proteins including dystrophin and the SH3-binding Yes-associated protein YAP65." *Biochem Biophys Res Commun* 205(2): 1201-5.
- Armbruster, V., M. Sauter, E. Krautkraemer, E. Meese, A. Kleiman, B. Best, K. Roemer, N. Mueller-Lantsch (2002). "A novel gene from the human endogenous retrovirus K expressed in transformed cells." *Clin Cancer Res* 8(6): 1800-7.
- Armbruster, V., M. Sauter, K. Roemer, B. Best, S. Hahn, A. Nty, A. Schmid, S. Philipp, A. Mueller, N. Mueller-Lantsch (2004). "Np9 protein of human endogenous retrovirus K interacts with ligand of numb protein X." *J Virol* 78(19): 10310-9.
- Barth, S., M. Liss, M. D. Voss, T. Dobner, U. Fischer, G. Meister, F. A. Grasser (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.
- Bedford, M. T., S. Richard (2005). "Arginine methylation an emerging regulator of protein function." *Mol Cell* 18(3): 263-72.
- Ben-Bassat, H., N. Goldblum, S. Mitrani, T. Goldblum, J. M. Yoffey, M. M. Cohen, Z. Bentwich, B. Ramot, E. Klein, G. Klein (1977). "Establishment in continuous culture of a new type of lymphocyte from a "Burkitt like" malignant lymphoma (line D.G.-75)." *Int J Cancer* 19(1): 27-33.
- Blond, J. L., F. Beseme, L. Duret, O. Bouton, F. Bedin, H. Perron, B. Mandrand, F. Mallet (1999). "Molecular characterization and placental expression of HERV-W, a new human endogenous retrovirus family." *J Virol* 73(2): 1175-85.
- Blond, J. L., D. Lavillette, V. Cheynet, O. Bouton, G. Oriol, S. Chapel-Fernandes, B. Mandrand, F. Mallet, F. L. Cosset (2000). "An envelope glycoprotein of the human endogenous retrovirus HERV-W is expressed in the human placenta and fuses cells expressing the type D mammalian retrovirus receptor." *J Virol* 74(7): 3321-9.
- Boese, A., U. Galli, M. Geyer, M. Sauter, N. Mueller-Lantsch (2001). "The Rev/Rex homolog HERV-K cORF multimerizes via a C-terminal domain." *FEBS Lett* 493(2-3): 117-21.
- Boisvert, F. M., J. Cote, M. C. Boulanger, S. Richard (2003). "A proteomic analysis of arginine-methylated protein complexes." *Mol Cell Proteomics* 2(12): 1319-30.
- Bomsztyk, K., O. Denisenko, J. Ostrowski (2004). "hnRNP K: one protein multiple processes." *Bioessays* 26(6): 629-38.
- Bornkamm, G. W., W. Hammerschmidt (2001). "Molecular virology of Epstein-Barr virus." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 356(1408): 437-59.
- Burkitt, D. (1958). "A sarcoma involving the jaws in African children." *Br J Surg* 46(197): 218-23.
- Chan, D. C., M. T. Bedford, P. Leder (1996). "Formin binding proteins bear WWP/WW domains that bind proline-rich peptides and functionally resemble SH3 domains." *EMBO J* 15(5): 1045-54.
- Chan, J. Y., T. Y. Hsieh, S. T. Liu, W. Y. Chou, M. H. Chung, S. M. Huang (2009). "Physical and functional interactions between hnRNP K and PRMT family proteins." *FEBS Lett* 583(2): 281-6.

- Cho, Y., J. Ramer, P. Rivaller, C. Quink, R. L. Garber, D. R. Beier, F. Wang (2001). "An Epstein-Barr-related herpesvirus from marmoset lymphomas." *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(3): 1224-9.
- Coffin, J. M., S. H. Hughes, H. E. Varmus (1997). "The Interactions of Retroviruses and their Hosts."
- Cohen, J. I., F. Wang, J. Mannick, E. Kieff (1989). "Epstein-Barr virus nuclear protein 2 is a key determinant of lymphocyte transformation." *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(23): 9558-62.
- Cuthbert, G. L., S. Daujat, A. W. Snowden, H. Erdjument-Bromage, T. Hagiwara, M. Yamada, R. Schneider, P. D. Gregory, P. Tempst, A. J. Bannister, T. Kouzarides (2004). "Histone deimination antagonizes arginine methylation." *Cell* 118(5): 545-53.
- Delecluse, H. J., R. Feederle, B. O'Sullivan, P. Taniere (2007). "Epstein Barr virus-associated tumours: an update for the attention of the working pathologist." *J Clin Pathol* 60(12): 1358-64.
- Denman, R. B. (2002). "Methylation of the arginine-glycine-rich region in the fragile X mental retardation protein FMRP differentially affects RNA binding." *Cell Mol Biol Lett* 7(3): 877-83.
- Denman, R. B. (2008). "Protein Methyltransferase Activities in Commercial In vitro Translation Systems." *J Biochem.*
- Frank, A., W. A. Andiman, G. Miller (1976). "Epstein-Barr virus and nonhuman primates: natural and experimental infection." *Adv Cancer Res* 23: 171-201.
- Friesen, W. J., S. Massenet, S. Paushkin, A. Wyce, G. Dreyfuss (2001). "SMN, the product of the spinal muscular atrophy gene, binds preferentially to dimethylarginine-containing protein targets." *Mol Cell* 7(5): 1111-7.
- Galli, U. M., M. Sauter, B. Lecher, S. Maurer, H. Herbst, K. Roemer, N. Mueller-Lantzsch (2005). "Human endogenous retrovirus rec interferes with germ cell development in mice and may cause carcinoma in situ, the predecessor lesion of germ cell tumors." *Oncogene* 24(19): 3223-8.
- Gordadze, A. V., D. Poston, P. D. Ling (2002). "The EBNA2 polyproline region is dispensable for Epstein-Barr virus-mediated immortalization maintenance." *J Virol* 76(14): 7349-55.
- Grässer, F. A., S. Göttel, P. Haiss, B. Boldyreff, O. G. Issinger, N. Mueller-Lantzsch (1992). "Phosphorylation of the Epstein-Barr virus nuclear antigen 2." *Biochem Biophys Res Commun* 186(3): 1694-701.
- Gross, H. (2008). Untersuchung zur Funktion der Methylierung der Glycin-Arginin-Repetition des Epstein-Barr-Virus-kodierten nukleären Antigens 2 (EBNA2). Institut für Virologie. Homburg, Universität des Saarlandes.
- Gross, H., S. Barth, R. D. Palermo, A. Mamiani, C. Hennard, U. Zimmer-Strobl, M. J. West, E. Kremmer, F. A. Grasser (2010). "Asymmetric Arginine dimethylation of Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 promotes DNA targeting." *Virology* 397(2): 299-310.
- Grundhoff, A. T., E. Kremmer, O. Tureci, A. Glieden, C. Gindorf, J. Atz, N. Mueller-Lantzsch, W. H. Schubach, F. A. Grasser (1999). "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.
- Hammerschmidt, W., B. Sugden (1989). "Genetic analysis of immortalizing functions of Epstein-Barr virus in human B lymphocytes." *Nature* 340(6232): 393-7.

- Henkel, T., P. D. Ling, S. D. Hayward, M. G. Peterson (1994). "Mediation of Epstein-Barr virus EBNA2 transactivation by recombination signal-binding protein J kappa." *Science* 265(5168): 92-5.
- Henle, W., G. Henle (1974). "The Epstein-Barr Virus (EBV) in Burkitt's lymphoma and nasopharyngeal carcinoma." *Ann Clin Lab Sci* 4(2): 109-14.
- Hofelmayr, H., L. J. Strobl, G. Marschall, G. W. Bornkamm, U. Zimmer-Strobl (2001). "Activated Notch1 can transiently substitute for EBNA2 in the maintenance of proliferation of LMP1-expressing immortalized B cells." *J Virol* 75(5): 2033-40.
- Hoffman, J. L., K. P. McConnell (1987). "Periodate-oxidized adenosine inhibits the formation of dimethylselenide and trimethylselenonium ion in mice treated with selenite." *Arch Biochem Biophys* 254(2): 534-40.
- Hsiao, F. C., M. Lin, A. Tai, G. Chen, B. T. Huber (2006). "Cutting edge: Epstein-Barr virus transactivates the HERV-K18 superantigen by docking to the human complement receptor 2 (CD21) on primary B cells." *J Immunol* 177(4): 2056-60.
- Kimura, Y., K. Nagata, N. Suzuki, R. Yokoyama, Y. Yamanaka, H. Kitamura, H. Hirano, O. Ohara (2010). "Characterization of multiple alternative forms of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K by phosphate-affinity electrophoresis." *Proteomics* 10(21): 3884-95.
- Knudson, D. L., T. W. Tinsley (1974). "Replication of a nuclear polyhedrosis virus in a continuous cell culture of *Spodoptera frugiperda*: purification, assay of infectivity, and growth characteristics of the virus." *J Virol* 14(4): 934-44.
- Kremmer, E., B. R. Kranz, A. Hille, K. Klein, M. Eulitz, G. Hoffmann-Fezer, W. Feiden, K. Herrmann, H. J. Delecluse, G. Delsol, G. W. Bornkamm, N. Mueller-Lantzsch, F. A. Grassert (1995). "Rat monoclonal antibodies differentiating between the Epstein-Barr virus nuclear antigens 2A (EBNA2A) and 2B (EBNA2B)." *Virology* 208(1): 336-42.
- Kuschner, S. (1978). "An improved method for transformation of *Escherichia coli* with coli-derived plasmids." *Genetic Engineering*, Elsevier, Amsterdam.
- Lederberg, E. M., S. N. Cohen (1974). "Transformation of *Salmonella typhimurium* by plasmid deoxyribonucleic acid." *J Bacteriol* 119(3): 1072-4.
- Lower, R., K. Boller, B. Hasenmaier, C. Korbmayer, N. Muller-Lantzsch, J. Lower, R. Kurth (1993). "Identification of human endogenous retroviruses with complex mRNA expression and particle formation." *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(10): 4480-4.
- Lucchesi, W., G. Brady, O. Dittrich-Breiholz, M. Kracht, R. Russ, P. J. Farrell (2008). "Differential gene regulation by Epstein-Barr virus type 1 and type 2 EBNA2." *J Virol* 82(15): 7456-66.
- Maier, S., M. Santak, A. Mantik, K. Grabusic, E. Kremmer, W. Hammerschmidt, B. Kempkes (2005). "A somatic knockout of CBF1 in a human B-cell line reveals that induction of CD21 and CCR7 by EBNA-2 is strictly CBF1 dependent and that downregulation of immunoglobulin M is partially CBF1 independent." *J Virol* 79(14): 8784-92.
- Maniatis, T., Sambrook, J. and Fritsch, E. F. (1989). "Molecular cloning, a laboratory manual." Cold Spring Harbor, Laboratory Press 1-3. 2nd ed.:
- Miller, G., M. Lipman (1973). "Comparison of the yield of infectious virus from clones of human and simian lymphoblastoid lines transformed by Epstein-Barr virus." *J Exp Med* 138(6): 1398-412.

- Miyashita, E. M., B. Yang, K. M. Lam, D. H. Crawford, D. A. Thorley-Lawson (1995). "A novel form of Epstein-Barr virus latency in normal B cells in vivo." *Cell* 80(4): 593-601.
- Mueller-Lantzsch, N., M. Sauter, A. Weiskircher, K. Kramer, B. Best, M. Buck, F. Grasser (1993). "Human endogenous retroviral element K10 (HERV-K10) encodes a full-length gag homologous 73-kDa protein and a functional protease." *AIDS Res Hum Retroviruses* 9(4): 343-50.
- Najbauer, J., B. A. Johnson, A. L. Young, D. W. Aswad (1993). "Peptides with sequences similar to glycine, arginine-rich motifs in proteins interacting with RNA are efficiently recognized by methyltransferase(s) modifying arginine in numerous proteins." *J Biol Chem* 268(14): 10501-9.
- Nie, J., S. S. Li, C. J. McGlade (2004). "A novel PTB-PDZ domain interaction mediates isoform-specific ubiquitylation of mammalian Numb." *J Biol Chem* 279(20): 20807-15.
- Ong, S. E., G. Mittler, M. Mann (2004). "Identifying and quantifying in vivo methylation sites by heavy methyl SILAC." *Nat Methods* 1(2): 119-26.
- Oppelt, P., R. Strick, P. L. Strissel, K. Winzierl, M. W. Beckmann, S. P. Renner (2009). "Expression of the human endogenous retrovirus-W envelope gene syncytin in endometriosis lesions." *Gynecol Endocrinol* 25(11): 741-7.
- Ostareck-Lederer, A., D. H. Ostareck, M. W. Hentze (1998). "Cytoplasmic regulatory functions of the KH-domain proteins hnRNPs K and E1/E2." *Trends Biochem Sci* 23(11): 409-11.
- Ostareck-Lederer, A., D. H. Ostareck, K. P. Rucknagel, A. Schierhorn, B. Moritz, S. Huttelmaier, N. Flach, L. Handoko, E. Wahle (2006). "Asymmetric arginine dimethylation of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K by protein-arginine methyltransferase 1 inhibits its interaction with c-Src." *J Biol Chem* 281(16): 11115-25.
- Paik, W. K., S. Kim (1967). "Enzymatic methylation of protein fractions from calf thymus nuclei." *Biochem Biophys Res Commun* 29(1): 14-20.
- Paik, W. K., D. C. Paik, S. Kim (2007). "Historical review: the field of protein methylation." *Trends Biochem Sci* 32(3): 146-52.
- Palermo, R. D., H. M. Webb, A. Gunnell, M. J. West (2008). "Regulation of transcription by the Epstein-Barr virus nuclear antigen EBNA 2." *Biochem Soc Trans* 36(Pt 4): 625-8.
- Petti, L., C. Sample, E. Kieff (1990). "Subnuclear localization and phosphorylation of Epstein-Barr virus latent infection nuclear proteins." *Virology* 176(2): 563-74.
- Rickinson, A. B., E. Kieff (2007). *Epstein-Barr Virus*. Fields Virology. A. M. Knipe and P. M. Howley. Philadelphia, Lippincott-Raven. 2: 2655-2700.
- Rotin, D. (1998). "WW (WWP) domains: from structure to function." *Curr Top Microbiol Immunol* 228: 115-33.
- Rowe, M., D. T. Rowe, C. D. Gregory, L. S. Young, P. J. Farrell, H. Rupani, A. B. Rickinson (1987). "Differences in B cell growth phenotype reflect novel patterns of Epstein-Barr virus latent gene expression in Burkitt's lymphoma cells." *EMBO J* 6(9): 2743-51.
- Sauder, C., N. Gotzinger, W. H. Schubach, G. C. Horvath, E. Kremmer, A. Krebs, S. Konig, U. Zimmer Strobl, N. Mueller Lantzsch, F. A. Grasser (1996). "Mutational analysis of the Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 by far-Western blotting and DNA-binding studies." *J Gen Virol* 77 ( Pt 5): 991-6.
- Sauter, M., S. Schommer, E. Kremmer, K. Remberger, G. Dolken, I. Lemm, M. Buck, B. Best, D. Neumann-Haefelin, N. Mueller-Lantzsch (1995). "Human

- endogenous retrovirus K10: expression of Gag protein and detection of antibodies in patients with seminomas." *J Virol* 69(1): 414-21.
- Schweizer, D. (1980). "Simultaneous fluorescent staining of R bands and specific heterochromatic regions (DA-DAPI bands) in human chromosomes." *Cytogenet Cell Genet* 27(2-3): 190-3.
- Sjoblom, A., A. Nerstedt, A. Jansson, L. Rymo (1995). "Domains of the Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 (EBNA2) involved in the transactivation of the latent membrane protein 1 and the EBNA Cp promoters." *J Gen Virol* 76 ( Pt 11): 2669-78.
- Studier, F. W., A. H. Rosenberg, J. J. Dunn, J. W. Dubendorff (1990). "Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes." *Methods Enzymol* 185: 60-89.
- Takimoto, M., T. Tomonaga, M. Matunis, M. Avigan, H. Krutzsch, G. Dreyfuss, D. Levens (1993). "Specific binding of heterogeneous ribonucleoprotein particle protein K to the human c-myc promoter, in vitro." *J Biol Chem* 268(24): 18249-58.
- Tomita, N., A. Horii, S. Doi, H. Yokouchi, M. Ogawa, T. Mori, K. Matsubara (1990). "Transcription of human endogenous retroviral long terminal repeat (LTR) sequence in a lung cancer cell line." *Biochem Biophys Res Commun* 166(1): 1-10.
- Tommerup, N., H. Leffers (1996). "Assignment of human KH-box-containing genes by in situ hybridization: HNRNPK maps to 9q21.32-q21.33, PCBP1 to 2p12-p13, and PCBP2 to 12q13.12-q13.13, distal to FRA12A." *Genomics* 32(2): 297-8.
- Tong, X., R. Yalamanchili, S. Harada, E. Kieff (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.
- Voss, M. D., A. Hille, S. Barth, A. Spurk, F. Hennrich, D. Holzer, N. Mueller-Lantzsch, E. Kremmer, F. A. Grasser (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.
- Wang, Y., J. Wysocka, J. Sayegh, Y. H. Lee, J. R. Perlin, L. Leonelli, L. S. Sonbuchner, C. H. McDonald, R. G. Cook, Y. Dou, R. G. Roeder, S. Clarke, M. R. Stallcup, C. D. Allis, S. A. Coonrod (2004). "Human PAD4 regulates histone arginine methylation levels via demethyliminination." *Science* 306(5694): 279-83.
- Weng, Z., S. M. Thomas, R. J. Rickles, J. A. Taylor, A. W. Brauer, C. Seidel-Dugan, W. M. Michael, G. Dreyfuss, J. S. Brugge (1994). "Identification of Src, Fyn, and Lyn SH3-binding proteins: implications for a function of SH3 domains." *Mol Cell Biol* 14(7): 4509-21.
- Wu, C. C., M. J. MacCoss, G. Mardones, C. Finnigan, S. Mogelsvang, J. R. Yates, 3rd, K. E. Howell (2004). "Organellar proteomics reveals Golgi arginine dimethylation." *Mol Biol Cell* 15(6): 2907-19.
- Xue, S. A., L. G. Labrecque, Q. L. Lu, S. K. Ong, I. A. Lampert, P. Kazembe, E. Molyneux, R. L. Broadhead, E. Borgstein, B. E. Griffin (2002). "Promiscuous expression of Epstein-Barr virus genes in Burkitt's lymphoma from the central African country Malawi." *Int J Cancer* 99(5): 635-43.
- Yalamanchili, R., S. Harada, E. Kieff (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.

- 
- Young, L. S., A. B. Rickinson (2004). "Epstein-Barr virus: 40 years on." *Nat Rev Cancer* 4(10): 757-68.
- Yue, W., E. Gershburg, J. S. Pagano (2005). "Hyperphosphorylation of EBNA2 by Epstein-Barr virus protein kinase suppresses transactivation of the LMP1 promoter." *J Virol* 79(9): 5880-5.
- Zhang, X., X. Cheng (2003). "Structure of the predominant protein arginine methyltransferase PRMT1 and analysis of its binding to substrate peptides." *Structure* 11(5): 509-20.
- Zimber-Strobl, U., E. Kremmer, F. Grasser, G. Marschall, G. Laux, G. W. Bornkamm (1993). "The Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 interacts with an EBNA2 responsive cis-element of the terminal protein 1 gene promoter." *Embo J* 12(1): 167-75.
- Zimber-Strobl, U., L. J. Strobl (2001). "EBNA2 and Notch signalling in Epstein-Barr virus mediated immortalization of B lymphocytes." *Semin Cancer Biol* 11(6): 423-34.
- Zimber-Strobl, U., L. J. Strobl, C. Meitinger, R. Hinrichs, T. Sakai, T. Furukawa, T. Honjo, G. W. Bornkamm (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.
- zur Hausen, H., H. Schulte-Holthausen, G. Klein, W. Henle, G. Henle, P. Clifford, L. Santesson (1970). "EBV DNA in biopsies of Burkitt tumours and anaplastic carcinomas of the nasopharynx." *Nature* 228(5276): 1056-8.

## 9. Anhang

### 9.1. Abkürzungen der Aminosäuren

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

## 9.2. Sequenzen

### 9.2.1. Nukleotidsequenzen

#### 9.2.1.1. Nukleotidsquenz von EBNA2

```

1 ggatcccccc accggccctt ctctctgtcc cctgctcct ctccaacctt cgtccaccc
61 tagaccccag cttctggcct ccccggttcc accaggccag ccggagggac cccggcagcc
121 cgggcgagtc gccttccttc tcccctggcc tctccttccc gcctcccacc cgagcccctt
181 cagcttgccct cccaccggg tccatcaggc cggccggagg gaccccgcg gcccgggtgc
241 agtccccctt gcagccgccc agtctctgcc tccaggcaag ggcgccagct tttctcccc
301 cagcctgagg cccagtctcc tgtgcaactgt ctgtaaagtc cagcctccca gccccgtcca
361 cggctccccg gcccagcctc gtccaccctt cccacgggtg gacaggccct ctgtccaccc
421 gggccatccc cgcccccttg tgtccacccc agtcccgtcc aggggggact ttatgtgacc
481 cttgggcctg gtcccccata gactcccatt taagcctgcc tcgagtaggt gcctccagag
541 ccccttttgc ccccctggcg gcccagcccg acccccgggc gccccaaac tttgtccaga
601 tgtccagggg tccccgaggg tgaggcccag ccccctctcg cccaagctgc tttgattcct
661 gggatatttt tgggaatggt gttaaccttc tccccttgta tttgtattc aatcaacctg
721 attccccctg ctcatacctc cacttacaac caagccacta cggccacgtc cccggcctcc
781 cgctcgggta agtgcttttt catttttagc cccagcccct cctctataag ttctaggcaa
841 acctccaatc accagccacc ttccaatgta gtctcttaga gagtggctgc tacgcattag
901 agaccacttt gagccacca cagtaaccac ccagcgccaa tctgtctaca tagaagaaga
961 agaggatgaa gactaagtca caggcttagc caggtgattt gtgaatttca gtttatttac
1021 tttcttccaa tcaagctttc ccagcctccg cttgttaggt cctagttatg ggttttccat
1081 gggggactta gtatccgttc tattagatta acgtgcaaga cgctaaactt aaccaaggtc
1141 agccaagggg cgcgtgttat cccaggctgc ccaccctgag gatttcccc caaaatctc
1201 ctaccctctc tttatgccat gtgtgttgtt ggcttgtgtt agtgctatgt aatgcgttgc
1261 cgccaggtgg cagcctgttt atagatgtgc agtaccctt aatgttaggt ctgctttagg
1321 gctgccaggt ggcgcaatct aggattaatt cacctgtatc cttttccctc caccgcagt
1381 aaccagcac tggcgtgtga cgtggtgtaa agttttgcct gaacctgtgg ttgggcaggt
1441 acatgccaac aaccttctaa gcacccgcgc ttgtgttttg ctttatctgc cgccatcatg
1501 cctacattct atcttgcggt acatggggga caaacatata atctaattgt tgacacggat
1561 agtcttgga aaccgctact ctcaagtaatt ccctcgaatc cctaccagga acaactgtca
1621 gacactccat taattccact aacaatcttt gttggggaaa acacgggggt gccccacca
1681 ctcccaccac cccccccacc accaccccca cacccccacc cacccccacc acccccacca
1741 cccccaccac cccccaccac tccaccacct tcaccaccac ccccgcccc accaccacca
1801 ccacctcagc gcagggatgc ctggacacaa gagccatcac ctcttgatag ggatccgcta
1861 ggatatgacg tcgggcatgg acctctagca tctgctatgc gaatgctttg gatggcta
1921 tataattgtaa gacaatcacg ggggtgaccg ggccttattt tgccacaagg cccacaaaca
1981 gcccctcagg ccaggttggt ccagccacat gtccccctc tacgcccagc agcaccacc
2041 attttgtcac ctctgtcaca accgaggctt acccctccac aaccactcat gatgccacca
2101 aggcctaccc ctctaccacc tctgccacct gcaacactaa cggtgccacc aaggcctacc
2161 cgtcctacca ctctgccacc cacaccacta ctacgggtac tacaaggcc taccgaactt
2221 caaccacac catcaccacc acgcatgcat ctccctgtct tgcattgtgc agaccaatca
2281 atgcaccctc ttactcatca aagcaccoca aatgatccag atagtccaga accacggtcc
2341 ccgactgtat tttataacat tccacctatg ccattacccc cctcacaatt gccaccacca
2401 gcagcaccag cacagccacc tccaggggtc atcaacgacc aacaattaca tcatctaccc
2461 tcggggccac catggtggcc acctatctgc gacccccgc aaccctctaa gactcaaggc
2521 cagagccggg gacagagcag ggggaggggc aggggcaggg gcaggggagc gggcaagggc
2581 aagtccaggg acaagcaacg caagcccggg ggaccttggg gaccagagcc aaacacctcc
2641 agtcttagca tgctgaact aagtccagtc ctccgtcttc atcagggaca aggggctggg
2701 gactcaccia ctctggccc atccaatgcc gccccgctt gtagaaattc acacaggca
2761 accctaacy tttaccaat acatgaaccg gactccata atagcccaga ggctcccatt
2821 ctctccccg atgattgta tctccatct atagaccocg cagacttaga cgaaagttyg
2881 gattacattt ttgagacaac agaatctoct agctcagatg aagattatgt ggagggacc
2941 agtaaaagac ctgcgccctc catccagtaa aaacccttgc cctctccagc aaccaatgta

```

---

```

3001 tcccaaataa atgttacttc ttttgccttt aaccattgac acgcctgtca ttctatcaat
3061 taaacaaggg aaaaagggtt agctattcca ccaacacgac cccaaggaag gcttgccaaa
3121 attgggtgct tgctctcage actttgccag caacttatag catggtaggc agctcaactc
3181 ggcccgtctt actgcccage ctactctcca ctcccagtc atgttcgcac tctatgcat
3241 ttctgcccct cccactttta ccccagtcac aaccacaaac cacacacaac acatagaatt
3301 gttagtttaa acagtttatt gataggtagc tgcttttagc ctaattgtgt attgctctcg
3361 ttgcccacaa ctggtgtaag ggccggcacc cgcaacatgg ggaaaacata accgcccgca
3421 tcccatgggg agggtagagg cgggtgacat gtaggtgagt agtgtaagaa gcatggcgaa
3481 gtagacaggt tacttttaga gtgtagtgta cagggccggg cgcaacagtg ccaccaaccc
3541 ggggtctgag cattccatgg gcagcagggc cactgacta ccgccaagtc ctggggcagc
3601 cggggttcct ggcgctccgg gggcagccgg gcggcccggt gtgggtcccg tgggcccgtg
3661 ccccgctccg ggtggggggg ggcccgcctg ggcaccgctg cgccgcccgc aggtcctggg
3721 gcagccgggg ttccctggcg tccgggggca gccgggcggc cgccggtggg tccgctgggc
3781 cgctgccccg ctccgggtgg ggggtggccc cgctgggcac cgctgcccgg ccgcccaggtc
3841 ctggggcagc cggggttcct ggcgctccgg gggcagccgg gcggcccggt gtgggtccgc
3901 tgggcccgtg ccccgctccg ggtggggggg ggcccgcctg ggaccgctg cgccgcccgc
3961 aggtcctggg gcagccgggg ttccctggcg tccgggggca gccgggcggc cgccggtggg
4021 tccgctgggc cgctgccccg ctccgggtgg ggggtggccc cgctgggcac cgctgcccgg
4081 ccgcccaggtc ctggggcagc cggggttcct ggcgctccgg gggcagccgg gcggcccggt
4141 gtgggtccgc tgggcccgtg ccccgctccg ggtggggggg ggcccgcctg ggcaccgctg
4201 cgccgcccgc aggtcctggg gcagccgggg ttccctggcg tccgggggca gccgggcggc
4261 cgccggtggg tccgctgggc cgctgccccg ctccgggtgg ggggtggccc cgctgggcac
4321 cgctgcccgg ccgcccaggtc ctggggcagc cggggttcct ggcgctccgg gggcagccgg
4381 gcggcccgcg gtgggtccgc tgggcccgtg ccccgctccg ggtggggggg ggcccgcctg
4441 ggcaccgctg cgccgcccgc aggtcctggg gcagccgggg ttccctggcg tccgggggca
4501 gccgggcggc cgccggtggg tccgctggcg cgctgccccg ctccgggtgg ggggtggccc
4561 cgctgggcac cgctgcccgg ccgcccaggtc ctggggcagc cggggttcct ggcgctccgg
4621 gggcagccgg gcggcccgcg gtgggtccgc tgggcccgtg ccccgctccg ggtggggggg
4681 ggcccgcctg ggcaccgctg cgccgcccgc aggtcctggg gcagccgggg ttccctggcg
4741 tccgggggca gccgggcggc cgccggtggg tccgctgggc cgctgccccg ctccgggtgg
4801 ggggtggccc cgctgggcac cgctgcccgg ccgcccaggtc ctggggcagc cggggttcct
4861 ggcgctccgg gggcagccgg gcggcccgcg gtgggtccgc tgggcccgtg ccccgctccg
4921 ggtggggggg ggcccgcctg ggcaccgctg cgccgcccgc aggtcctggg gcagccgggg
4981 ttccctggcg tccactgcac ctggaatgca ggggtggggc gtggtcccct ggaccccagc
5041 cccgcccgat

```

### 9.2.1.2. Nukleotidsequenz von HERV-K (HML-2.HOM) NP9

```

1 atgaacccat cggagatgca aagaaaaggg cctccacgga gatgtctgca ggtgtacca
61 acagctccga agagacagcg accatcgaga acgggccatg atgacgatgg cggttttgtc
121 gaaaagaaaa gggggaaatg tggggaaaag caagagagat cagattgtta ctgtgtctgt
181 gtagaaaaga gtagacatgg gagactccat tttgttatgt gttaa

```

### 9.2.1.3. Nukleotidsequenz von hnRNP- K

```

1 ccctagccgc ccctcccccc agctagttag tgccgcaacg agaaaggagg agggcgctcc
61 agggcagacg actgcagacg ccattatcct ctgtttctct gctgcaccga cctcgacgtc
121 ttgcctgtgt cccacttggt cgccggcctat aggctactgc agcactgggg tgtcagttgt
181 tgggtccgacc cagaacgctt cagttctgct ctgcaaggat atataataac tgattggtgt
241 gcccgtttaa taaaagaata tggaaactga acagccagaa gaaaccttcc ctaactactga
301 aaccaatggg gaatttggtg aacgcctctg agaagatatg gaagaggaaac aagcatttaa
361 aagatctaga aacctgatg agatgggtga attacgcatt ctgcttcaga gcaagaatgc
421 tggggcagtg attggaaaag gaggcaagaa tattaaggct ctccgtacag actacaatgc
481 cagtgtttca gtcccagaca gcagtggccc cgagcgcata ttgagtatca gtgctgatat
541 tgaacaatt ggagaaatc tgaagaaaat catccctacc ttggaagagg gcctgcagtt
601 gccatcacc actgcaacca gccagctccc gctcgaatct gatgctgtgg aatgcttaaa
661 ttaccaacac tataaaggaa gtgactttga ctgagagttg aggtctgtga ttcatcagag
721 tctagcagga ggaattattg ggggtcaaag tgctaaaatc aaagaacttc gagagaacac

```

---

```

781 tcaaaccacc atcaagcttt tccaggaatg ctgtcctcat tccactgaca gagttgttct
841 tattggagga aaacccgata gggttgtaga gtgcataaag atcatccttg atcttatatc
901 tgagtctccc atcaaaggac gtgcacagcc ttatgatccc aatttttacg atgaaaccta
961 tgattatggt ggttttacaa tgatgtttga tgaccgtcgc ggacgcccag tgggatttcc
1021 catgcgggga agaggtggtt ttgacagaat gcctcctggt cgggggtgggc gtcccatgcc
1081 tccatctaga agagattatg atgatatgag ccctcgtcga ggaccacctc cccctcctcc
1141 cggacgaggc ggccggggtg gtagcagagc tcggaatcct cctcttcctc caccaccacc
1201 acctagaggg ggagacctca tggcctatga cagaagaggg agacctggag accgttacga
1261 cggcatgggt ggtttcagtg ctgatgaaac ttgggactct gcaatagata catggagccc
1321 atcagaatgg cagatggcct atgaaccaca ggggtggctcc gगतatgatt attcctatgc
1381 agggggctgt ggctcatatg gtgatcttgg tgaccctatt attactacac aagtaactat
1441 tcccaaagat ttggctggat ctattattgg caaagggtgg cagcggatta aacaaatccg
1501 tcatgagtcg ggagcttcga tcaaaattga tgagccttta gaaggatccg aagatcggat
1561 cattaccatt acaggaacac aggaccagat acagaatgca cagtatttgc tgcagaacag
1621 tgtgaagcag tatgcagatg ttgaaggatt ctaatgcaag atattttttc ttttttatag
1681 tgtgaagcag tattctggaa agtttttcta agactagtga agaactgaag gagtcctgca
1741 tctttttttt tttatctgct tctgtttaaa aagccaacat tcctctgctt cataggtggt
1801 ctgcatttga ggtgtagtga aatctttgct gttcaccaga tgtaatgttt tagttcctta
1861 caaacagggt tggggggggg aagggcgtgc aaaaactaac attgaaattt tgaacagca
1921 gcagagtgag tggattttat ttttcgttat tgttgggtgg ttaaaaaatt cccccatgt
1981 aattattgtg aacaccttgc tttgtggtea ctgtaacatt tgggggggtg gacagggagg
2041 aaaagtaaca atagtccaca tgtccctggc atctgttcag agcagtgtgc agaatgtaat
2101 gctcttttgt aagaaacgtt ttatgatatt taaaataaat ttagtgaacc tatttttgggt
2161 ggtcattttt tttttaagac agtcatttta aaatgggtgg tgaatttccc aaccacccc
2221 caaactaaac actaagttta attttcagct cctctgttgg acatataagt gcatctcttg
2281 ttggacatag gcaaaataac ttggcaaact tagttctggt gatttcttga tggtttgaa
2341 gtctattgct ggaagaagaat tccatcatac atattcatgc ttataataag ctggggattt
2401 tttgtttggt tttgcaaatg cttgccccta cttttcaaca attttctatg ttagttgtga
2461 agaactaagg tggggagcag tactacaagt tgagtaatgg tatgagtata taccagaatt
2521 ctgattggca gcaagtttta ttaatcagaa taacacttgg ttatggaagt gactaatgct
2581 gaaaaaattg attattttta ttagataaatt tctcacctat agacttaaac tgtcaatttg
2641 ctctagtgtc ttattagtta aactttgtaa aatataatata tacttgttt tccattgtat
2701 gcaaattgaa agaaaaagat gtaccatttc tctgttgat gttggattat gtaggaaatg
2761 tttgtgtaca attcaaaaaa aaaaaagatg aaaaaagttc ctgtggatgt tttgttagt
2821 atcttggcat ttgtattgat agttaaatt cacttccaaa taaataaaac acccatgatg
2881 ctagatttga tgtgtgcccg atttgaacaa gggttgattg acacctgtaa aatttgttga
2941 aacgttcctc ttaaaaggaa atatagtaat cttatgtaaa aaaaaaaaaa aaaaa

```

## 9.2.2. Peptidsequenzen

### 9.2.2.1. Aminosäuresequenz von EBNA2

```

1 MPTFYLLALHG GQTYHLIVDT DSLGNPSLSV IPSNPYQEQL SDTPLIPLTI FVGENTGVPP
61 PLPPPPPPPP PPPPPPPPP PPPPPPPSP PPPPPPPPP QRRDAWTQEP SPLDRDPLGY
121 DVGHGPLASA MRMLWMANYI VRQSRGDRGL ILPQGQQTAP QARLVQPHVP PLRPTAPTIL
181 SPLSQPRLTP PQPLMMPRP TPPTPLPPAT LTVPPRPTRP TTLPPTPLLT VLQRPTELQP
241 TPSPPRMHLP VLHVDPQSMH PLTHQSTPND PDSPEPRSPT VFYNIPEMPL PPSQLPPAA
301 PAQPPPGVIN DQQLHHLPSG PPWWPPICDP PQPSKTQGQS RGQSRGRGRG RGRGRGKGS
361 RDKQRKPGGP WRPEPNTSSP SMPELSPVLG LHQQGAGDS PTPGPSNAAP VCRNSHTATP
421 NVSPIHEPES HNSPEAPILF PDDWYPPSID PADLDESWDY IFETTESPSS DEDYVEGPSK
481 RPRPSIQ

```

**9.2.2.1. Aminosäuresequenz von NP9**

1 MNPLEMQRKG PPRRWCLQVY PTAPKRQRPS RTGHDDDDGGF VEKKRGKCGE KQERSDCYCV  
61 CVERSRHGRL HFVMC

**9.2.2.1. Aminosäuresequenz von hnRNP- K**

1 METEQPEETF PNTETNGEFG KRPAEDMEEE QAFKRSRNTD EMVELRILLQ SKNAGAVIGK  
61 GGKNIKALRT DYNASVSVPD SSGPERILSI SADIETIGEI LKKIIP TLEE GLQLPSPTAT  
121 SQLPLESDAV ECLNYQHYKG SDFDCELRLI IHQSLAGGII GVKGAKIKEL RENTQTTIKL  
181 FQECPPHSTD RVVLIGGKPD RVVECIKIIL DLISESPIKG RAQPYDPNFY DETYDYGFT  
241 MMFDDRRGRP VGFPMRGRGG FDRMPPGRGG RPMPPSRRDY DDMSPRRGPP PPPPGRGGRG  
301 GSRARNLPLP P P P P P R G G D L MAYDRRGRPG DRYDGMVGFS ADETWDS AID TWSPSEWQMA  
361 YEPQGGSGYD YSYAGGRGSY GDLGGPIITT QVTIPKDLAG SIIGKGGQRI KQIRHESGAS  
421 IKIDEPLEGS EDRIITITGT QDQIQNAQYL LQNSVKQYAD VEGF

### 9.3. Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Gross H, Barth S, Palermo RD, Mamiani A, Hennard C, Zimmer-Strobl U, West MJ, Kremmer E, Grässer FA. (2009)

Asymmetric Arginine dimethylation of Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 promotes DNA targeting.

**Virology**, 397(2), 299-310.

Gross H\*, Barth S\*, Pfuhl T, Willnecker V, Spurk A, Gurtsevitch V, Sauter M, Hu B, Noessner E, Mueller-Lantsch N, Kremmer E, Grässer FA. (2010)

The NP9 protein encoded by the human endogenous retrovirus HERV-K(HML-2) negatively regulates gene activation of the Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 (EBNA2).

**International Journal Of Cancer**

\*These authors contributed equally to this work

Teile der Arbeit wurden auf folgenden Kongressen vorgestellt:

- 03.2009      Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie (GfV) 2009  
Leipzig
- 07.2009      European Epstein- Barr Virus Meeting 2009  
Brighton, England
- 09.2009      Saar- Lor- Lux Meeting  
Nancy, Frankreich
- 04.2010      4th European Congress of Virology  
Como, Italien
- 08.2010      European Epstein- Barr Virus Meeting 2010  
Birmingham, England
- 03.2011      Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie (GfV) 2011  
Freiburg

#### **9.4. Danksagung**

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Friedrich Grässer danke ich für die Überlassung des interessanten Themas, sein Vertrauen, die Unterstützung während meiner Arbeit, die Hilfs- und Diskussionsbereitschaft und das angenehme Arbeitsklima.

Frau Dr. Elisabeth Kremmer danke ich für die Übernahme der Herstellung der monoklonalen Antikörper, ohne die die Durchführung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Frau Dr. Elfriede Nössner und Herrn Bin Hu möchte ich für die Vermittlung der Kenntnisse der Konfokalmikroskopie und der Hilfestellung bei der Auswertung der Aufnahmen danken.

Ich möchte allen aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Grässer für das sehr angenehme Arbeitsklima, sowie die Hilfsbereitschaft bei Fragen rund um die Laborarbeit, danken.

Frau Ruth Nord möchte ich für ihre Hilfestellung und Unterstützung danken.

Frau Dr. Stefanie Barth danke ich für ihre Ratschläge, Ideen und Geduld.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Martin Hart für seine stete Diskussionsbereitschaft und Freundschaft.

Frau Barbara Best möchte ich für ihre unermüdliche Hilfsbereitschaft in allen Dingen des Laboralltags danken.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern und meiner Frau Kerstin für ihre Unterstützung und ihr Vertrauen in mich.

---

## 9.5. Lebenslauf

### Persönliche Daten:

Name: Henrik Wolfgang Groß, Dipl. Biologe  
Anschrift: Bühler Straße 105  
66130 Saarbrücken  
Telefon: 0681- 8837769  
E-Mail: he.gross@mx.uni-saarland.de

Geburtsdatum und –ort: 13.09.1984, Saarbrücken

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: verheiratet

### Schulbildung:

1990- 1994 Grundschule SB- Gersweiler (Aschbachschule)  
1994- 2003 Marie- Luise- Kaschnitz Gymnasium Völklingen

**Abschluss: Abitur**

### Studium:

2003- 2008 Universität des Saarlandes, Studienfach Human  
und Molekularbiologie  
Hauptfach: Virologie; Nebenfächer: Humangenetik  
und Entwicklungsbiologie.

Thema der Diplomarbeit:

„Untersuchung zur Funktion der Methylierung der  
Glycin-Arginin- Repetition des Epstein- Barr- Virus-  
kodierten nukleären Antigens 2 (EBNA2)“

**Abschluss: Diplom Biologe**

Seit 10/2008 Mitarbeiter am Institut für Virologie,  
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die Arbeit selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Saarbrücken, Juni 2011

-----

(Henrik Groß)