

Überexpression von s-Adenosylhomocystein-Hydrolase (SAH) in Zellen der Epstein-Barr Virus-Genom positiven Zell-Linie B95-8

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

vorgelegt von

Georg Werth

aus Bedburg

Berichter: Universitätsprofessor Dr. med. Klaus Ritter
Privatdozent Dr. med. Sebastian W. Lemmen

Tag der mündlichen Prüfung: 27. September 2005

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online verfügbar.

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	IV
1 EINLEITUNG	1
1.1 DAS EPSTEIN-BARR VIRUS	1
1.2 S-ADENOSYLHOMOCYSTEIN-HYDROLASE	4
1.3 ZIEL UND ARBEITSPROGRAMM	5
2 MATERIAL	7
2.1 ZELL-LINIEN	7
2.1.1 Zell-Linie B95-8	7
2.1.2 Zell-Linie BJAB	7
2.2 <i>E. COLI</i> ONE SHOT [®] TOP10 (INVITROGEN [®])	7
2.3 VEKTOREN	8
2.3.1 pcDNA-AHCY	8
2.3.2 pcDNA-3.1 E	8
2.3.3 pCMVZ'	8
2.4 OLIGONUKLEOTIDE	8
2.4.1 Primer	8
2.4.2 Sonden	9
2.5 INHIBITOREN	9
2.6 ANTIKÖRPER	10
2.7 KITS	11
2.8 CHEMIKALIEN	11
3 METHODEN	12
3.1 ZELLKULTURTECHNIKEN	12
3.1.1 Vermehrung von <i>E. coli</i>	12
3.1.2 Vermehrung eukaryontischer Zellen	12
3.1.3 Kryokonservierung von eukaryontischen Zellen	13
3.1.4 Zellzählung	14
3.2 REKOMBINANTE DNA-TECHNIK	14
3.2.1 Plasmid-Präparation aus <i>E.coli</i>	14
3.2.2 DNA-Präparation aus eukaryontischen Zellen	14
3.2.3 RNA-Präparation aus eukaryontischen Zellen	15
3.2.4 Quantifizierung von DNA und RNA	15
3.2.5 Präzipitation von DNA	15
3.2.6 DNA-Restriktion	16
3.2.7 Spaltung von DNA mit DNase I	16
3.2.8 Isolierung von mRNA aus Gesamt-RNA	17

3.2.9	cDNA- Synthese	17
3.2.10	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	18
3.2.11	Agarose-Gelelektrophorese	19
3.2.12	PCR mit dem LightCycler	21
3.2.12.1	Detektion mit SYBR Green I.....	21
3.2.12.2	Detektion mit Hybridisierungs sonden	22
3.2.12.3	Amplifikationsprotokolle	23
3.2.13	Transfektion durch Endozytose	24
3.2.14	Inhibierung von PLA2 und PKC	25
3.3	REVERSER NORTHERN BLOT	26
3.3.1	Herstellung DIG-markierter cDNA-Sonden mittels PCR	27
3.3.2	Dot Blot	27
3.3.3	Gewinnung von <i>full-length</i> cDNA.....	28
3.3.4	Gelelektrophorese	29
3.3.5	Vakuumblot	30
3.3.6	Prähybridisierung und Hybridisierung	31
3.3.7	Waschschritte und Immundetektion	32
3.3.8	Wiederverwendung der Membran	32
3.4	BESTIMMUNG DER DNA-SYNTHE SERATE.....	32
3.5	IMMUNFLUORESZENZ-TEST	33
3.6	DURCHFLUSSZYTOMETRIE (FACS).....	35
3.7	WESTERN BLOT	36
3.7.1	Proteinisolierung aus eukaryontischen Zellen	36
3.7.2	Bestimmung von Proteinkonzentrationen.....	37
3.7.3	Konzentrieren einer Proteinlösung	37
3.7.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	38
3.7.5	Elektro-Transfer	40
3.7.6	Immun-Färbung	41
4	ERGEBNISSE	43
4.1	IDENTITÄT DES VEKTORS pCDNA-AHCY	44
4.2	NACHWEIS DER ERFOLGREICHEN TRANSFEKTION VON B95-8 ZELLEN MIT pCDNA-AHCY UND pCDNA-3.1 E	45
4.3	SAH-ÜBEREXPRESSION IN B95-8 ZELLEN.....	46
4.3.1	Nachweis von Early Antigen (EA-D) in pcDNA-AHCY transfizierten B95-8 Zellen	46
4.3.2	BZLF1- und BRLF1-Expression in pcDNA-AHCY transfizierten B95-8 Zellen	48
4.4	SIGNALTRANSDUKTION BEI DER SAH ABHÄNGIGEN REAKTIVIERUNG DES LYTISCHEN ZYKLUS	52

4.4.1	Einfluss von spezifischen Inhibitoren der PKC auf die Expression des EA-D in pcDNA-AHCY transfizierten B95-8 Zellen	52
4.4.2	Einfluss von spezifischen PLA2-Inhibitoren auf die Expression des EA-D in B95-8 Zellen.....	54
4.4.3	Expression von BZLF1 in pcDNA-AHCY transfizierten B95-8 Zellen nach Inhibierung von PKC oder PLA2.....	56
4.4.4	Nachweis von PKC in pcDNA-AHCY transfizierten B95-8 Zellen.....	59
4.5	SAH-ÜBEREXPRESSION IN B95-8 ZELLEN	61
4.5.1	Modifizierte DNA-Syntheserate nach Transfektion von B95-8 Zellen mit pcDNA-AHCY	61
4.5.2	Zellproliferation in pcDNA-AHCY transfizierten B95-8 Zellen.....	62
4.5.3	Expression ausgewählter Oberflächenantigene in pcDNA-AHCY transfizierten B95-8 Zellen.....	63
5	DISKUSSION.....	64
5.1	ÜBERPRÜFUNG DER IDENTITÄT DES VEKTORS pcDNA-AHCY	64
5.2	EXPRESSION VON pcDNA-AHCY IN B95-8 ZELLEN	65
5.3	NACHWEIS DER REAKTIVIERUNG DES LYTISCHEN EBV-ZYKLUS NACH SAH-ÜBEREXPRESSION.....	65
5.4	UNTERSUCHUNG DER SIGNALTRANSDUKTIONSWEGE BEI DER SAH GETRIGGERTEN REAKTIVIERUNG DES LYTISCHEN EBV-ZYKLUS	67
5.4.1	PKC abhängige Reaktivierung des lytischen EBV-Zyklus.....	68
5.4.2	Inhibierung der PKC und PLA2 zur Charakterisierung der Signaltransduktionswege.....	68
5.5	WIRKUNG DER SAH-ÜBEREXPRESSION AUF DIE ZELLDIFFERENZIERUNG	71
5.6	AUSBLICK.....	73
6	ZUSAMMENFASSUNG	74
7	LITERATURVERZEICHNIS.....	76

Abkürzungsverzeichnis

Aqua bidet.	Aqua bidestillata
Aqua dest.	Aqua destillata
AHCY	s-Adenosylhomocystein-Hydrolase
Amp.	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
AP1	<i>activator protein 1</i>
b	Base
bp	Basenpaar
BrdU	5-Bromo-2'-Deoxyuridin
BSA	<i>bovine serum albumine</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>complementary DNA, copy DNA</i>
CMV	Zytomegalievirus
CSPD	Dinatrium 3-((4-methoxyspirofl,2-dioxethan-3,2'-(5'-chloro)tricyclodecan) 4-yl)-phenylphosphat
dATP	Desoxyadenosin-5'-triphosphat
dCTP	Desoxycytidin-5'-triphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxyguanosin-5'-triphosphat
DIG	Digoxigenin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> = Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidin-5'-triphosphat
dUTP	Desoxyuridin-5'-triphosphat
E.coli	<i>Escherichia coli</i>
EA-D	<i>Early Antigen diffuse component</i> ; frühes virales Antigen, diffus verteilt
EBV	Epstein-Barr Virus
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>enzyme-linked immuno sorbent assay</i>
FA	Formaldehyd-Agarose
FACS	<i>fluorescence activated cell sorter</i> ; Durchflusszytometrie
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	fötales Kälberserum

GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
GFX	Bisindolylmaleimid I (GF-109203X)
gp	Glykoprotein
H7	H-7 Dihydrochloride
IE	<i>immediate early</i>
IFT	Immunfluoreszenztest
Anti-IgM	Antikörper gegen Immunglobuline der Klasse M
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
LB	Luria Bertani
LC Red 640	LightCycler Red 640
LM1	VI ³ NeuAc-nLcOse ₄ Cer
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	<i>messenger RNA</i>
n	Stichprobengröße
ori	<i>origin of replication</i>
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
P	Promotor
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> = phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> = Polymerase-Kettenreaktion
PKB	Proteinkinase B
PKC	Proteinkinase C
PLA2	Phospholipase A2
POD	Peroxidase
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	<i>ribonucleic acid</i> = Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	<i>rounds per minute</i> = Umdrehungen pro Minute
rRNA	ribosomale RNA
RSV	Respiratorisches Syncytialvirus
Rt	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkriptase
SAH	s-Adenosylhomocystein-Hydrolase
SDS	Natriumdodecylsulfat
snRNA	<i>small nuclear RNA</i>
ss	Einzelstrang

SSC	<i>standard saline citrat</i> = Natriumcitrat
SSH-PCR	<i>suppression subtractive hybridisation PCR</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TPA	12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetat
TR	<i>terminal repeat</i>
Tris	Trihydroxymethylaminoethan
tRNA	Transfer-RNA
U	<i>unit</i>
UV	Ultraviolett
VCA	Virus-Kapsid-Antigen

1 Einleitung

1.1 Das Epstein-Barr Virus

Im Jahre 1964 entdeckten Anthony Epstein und Yvonne Barr in Zellen eines Burkitt-Lymphoms ein neues bis dahin nicht bekanntes Virus [EPSTEIN *et al.*, 1964]. Dieses Virus wurde nach seinen Entdeckern Epstein-Barr Virus (EBV) genannt [HENLE, 1968].

Das EBV ist das ätiologische Agens der infektiösen Mononukleose. Darüber hinaus ist das Virus an der Entstehung verschiedener Tumoren wie z.B. dem Burkitt-Lymphom, dem Hodgkin-Lymphom und dem Nasopharynxkarzinom beteiligt [FAULKNER *et al.*, 2000; RICKINSON *et al.*, 1996; PATHMANATHAN *et al.*, 1995; YOSHIYAMA *et al.*, 1995].

Das Epstein-Barr Virus wurde als Herpesvirus identifiziert und in die Untergruppe γ -Herpesvirus der Gattung Lymphocryptoviren eingeordnet. Abbildung 1.1 zeigt die elektronenmikroskopische Aufnahme von Epstein-Barr Viren.

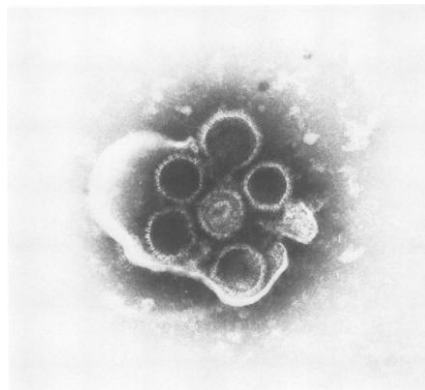


Abbildung 1.1: Elektronenmikroskopische Aufnahme von Epstein-Barr Viren [YAJIMA & NONOYAMA, 1976]

Die Infektion mit dem Epstein-Barr Virus erfolgt oral über die Schleimhaut des Nasopharyngealraumes. Das Virus wird durch Speichel übertragen. Aufgrund dieses Übertragungsweges entstand die Bezeichnung „kissing disease“.

Nach dem Eintritt des EBV in den Nasopharyngealraum kann es sowohl B-Lymphozyten als auch Epithelzellen des Oro- und Nasopharynx infizieren. Die Aufnahme in die Zelle wird durch das Oberflächenantigen CD21 (CRII) vermittelt, an das sich der Glykoproteinkomplex gp220/350 des Epstein-Barr Virus bindet [TANNER *et al.*, 1987; NEMEROW *et al.*, 1987]. Eine Infektion der Epithelzellen ist auch durch eine Fusion mit B-Zellen möglich. Die

Ausscheidung des EBV in den Speichel erfolgt entweder über eine lytische Vermehrung in B-Zellen oder Epithelzellen des Oropharynx [FAULKNER *et al.*, 2000; SIXBEY *et al.*, 1984].

Das Virus ist weltweit verbreitet; ca. 95 % der Erwachsenen sind Virusträger [WALLING *et al.*, 2001]. In Europa und USA erfolgt die Infektion häufig erst im Jugend- und frühen Erwachsenenalter, in Entwicklungsländern im Kleinkindalter.

Nach einer Inkubationszeit von etwa 4 bis 6 Wochen verläuft die Infektion im Kindesalter in der Regel asymptomatisch [YOUNG, 1999]. Bei Jugendlichen und Erwachsenen zeigt sich in ca. 50 % der Fälle das Krankheitsbild der infektiösen Mononukleose [HALLEE *et al.*, 1974]. Hierbei handelt es sich um eine selbstlimitierende, lymphoproliferative Autoimmunerkrankung [RITTER *et al.*, 1994]. Sie geht mit Symptomen wie Halsschmerzen, Fieber, geschwollenen Lymphknoten und Hepato-Splenomegalie einher.

Das von Dennis Burkitt 1958 beschriebene EBV assoziierte Burkitt-Lymphom ist in Zentral- und Ostafrika endemisch. Die Inzidenz beträgt 10 Fälle pro 100.000 Personen. Beim Nasopharynxkarzinom handelt es sich um einen in China und Südostasien häufig vorkommenden Tumor mit einer Inzidenz von etwa 20 Fällen pro 100.000 Personen [MODROW *et al.*, 2003].

In der Frühphase der Infektion wird in einem Teil der B-Zellen das Virus lytisch repliziert. Dabei werden infektiöse Viruspartikel freigesetzt. Die anschließende zelluläre Immunantwort richtet sich gegen Zellen, die die Proteine des produktiven Zyklus synthetisieren. In anderen B-Zellen hingegen findet eine latente Infektion statt. Hierfür sind Faktoren verantwortlich, welche die Expression des ‚immediate early‘-Gens BZLF1 und somit den lytischen Zyklus unterdrücken [SPECK *et al.*, 1997].

Das Virion besitzt einen Durchmesser von 150 – 200 nm. Sein Genom ist ca. 172 kb lang und es enthält 80 – 100 offene Leseraster [BAER *et al.*, 1984]. Im Inneren des Viruspartikels befindet sich das Proteincore. Dieses ist mit dem doppelsträngigen linearen DNA-Genom assoziiert und von einem komplexen ikosaedrischen Kapsid umgeben. Das Kapsid wird von einer Hüllmembran umschlossen, welche sich aus der inneren Kernmembran ableitet. Zwischen beiden Strukturen befindet sich das Tegument, das verschiedene regulatorisch aktive Proteine enthält [ROIZMAN, 1990]. Die Organisation des Virusgenoms ist in Abbildung 1.2 dargestellt. Die Genomenden werden durch eine Anzahl von unterschiedlichen Wiederholungseinheiten (TR, terminal repeat) mit einer Länge von 538 bp charakterisiert. Sie liegen in gleicher Orientierung vor und sind für die Zirkularisierung des viralen Genoms im Latenzstadium und bei der Virusreaktivierung von Bedeutung [OOKA, 1985; MODROW *et al.*, 2003]. Interne Repeats (IR) sind je nach Virusstamm in unterschiedlicher Anzahl aneinander gereiht. Die Wiederholungseinheiten haben eine Größe von 3,1 kb und teilen das Genom in einen kurzen (U_S) und einen langen (U_L) Abschnitt. Das U_L-Segment lässt sich in vier Regionen unterteilen, so dass fünf singuläre Bereiche (unique regions, U1-U5) entstehen [MODROW *et al.*, 2003]. Bisher konnte nur für ca. 30 Gene die Funktion aufgeklärt oder aufgrund von Sequenzhomologien zu anderen Herpesviren abgeleitet werden. Die meisten der bisher charakterisierten Genprodukte sind für den lytischen Zyklus relevant. In latent

infizierten Zell-Linien wurde bisher die Expression von 11 EBV-kodierten Genen identifiziert. Hierzu zählen sechs nukleäre Antigene (EBNA-1, -2, -3A, -3B, -3C und -LP), drei Membranproteine (LMP-1, -2A, -2B) und zwei nicht translatierte RNAs (EBV-encoded RNA's, EBER-1, -2) [LIEBOWITZ & KIEFF, 1993].

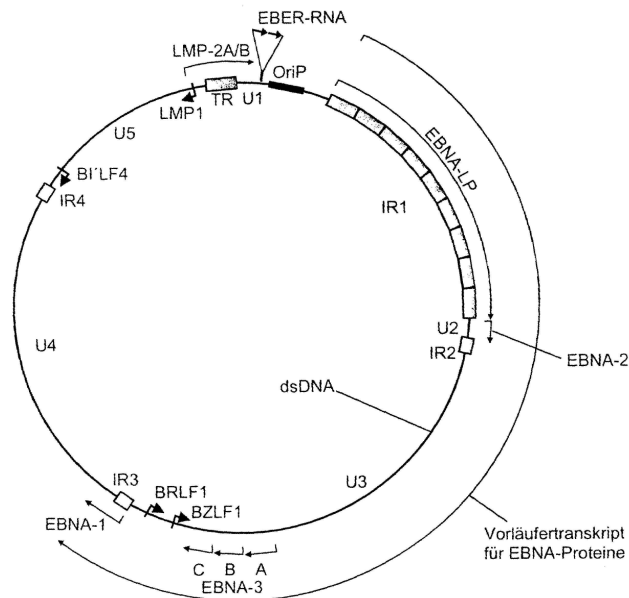


Abbildung 1.2: Genkarte des Epstein-Barr Virus [MODROW *et al.*, 2003]

Eine Reaktivierung des lytischen Zyklus in latent infizierten Zellen ist nach Stimulation mit verschiedenen Reagenzien möglich, u. a. mit 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetat (TPA) [ZUR HAUSEN *et al.*, 1978], anti-Immunglobulin (Anti-IgM) [DAIBATA *et al.*, 1994] oder mit 5-Bromodeoxyuridine [GERBER, 1972; HAMPAR *et al.*, 1972]. Diese Stoffe aktivieren die Expression des ‚immediate early‘-Gens BZLF1 und führen so zu einer Reaktivierung des Virus [COUNTRYMAN & MILLER, 1985; CHEVALLIER-GRECO *et al.*, 1986; TAKADA *et al.*, 1986; FLEMINGTON & SPECK, 1990].

In früheren Untersuchungen wurde nachgewiesen, dass das Gangliosid VI³NeuAc-nLcOse₄Cer (LM1) in Burkitt-Lymphom Zellen der Linie Raji eine Reaktivierung des lytischen Zyklus mit Wachstums hemmung und Zelldifferenzierung verursacht [SCHAAD *et al.*, 1999]. Als Bestandteil der Zellmembran von Mono- und Granulozyten besitzt das Gangliosid LM1 eine Schlüsselrolle in der Zellerkennung, Zellproliferation und Differenzierung.

Nach LM1-Behandlung von Raji Zellen wurden mittels ‚differential-display‘-RT-PCR sowie ‚suppression-subtractive-hybridization‘-PCR (SSH-PCR) insgesamt 35 Gene identifiziert, deren Expression moduliert wird [SCHAADÉ *et al.*, 2000; KLEINES *et al.*, 2000]. Dazu gehört u. a. das Gen für die s-Adenosylhomocystein-Hydrolase (SAH). Die Überexpression von

SAH führt zu einer Reaktivierung des lytischen EBV-Zyklus in EBV-Genom positiven, aber nicht produktiven Raji Zellen [MARET, 2003; MAAS, 2002].

1.2 s-Adenosylhomocystein-Hydrolase

Die s-Adenosylhomocystein-Hydrolase (SAH) katalysiert Transmethylierungsreaktionen. Dabei ist sie in eukaryontischen Zellen das einzig bekannte Enzym, das die reversible Hydrolyse von s-Adenosylhomocystein (AdoHcy) zu Adenosin und Homocystein katalysiert [HU *et al.*, 2001]. Das Enzym existiert in einer offenen Form, bei der das aktive Zentrum unbesetzt ist, und einer geschlossenen Form, bei der das aktive Zentrum mit einem Substrat oder einem Inhibitor besetzt ist [TURNER *et al.*, 2000]. Die SAH reguliert durch Kontrolle der intrazellulären Konzentration von AdoHcy alle s-Adenosylmethionin abhängigen Transmethylierungen. Gleichzeitig stellt AdoHcy wiederum einen starken Inhibitor der s-Adenosylmethionin abhängigen Methyltransferase dar [YIN *et al.*, 2000; YUAN *et al.*, 1996].

Die durch SAH katalysierten Methylierungsreaktionen werden durch Nukleosid-Inhibitoren bzw. durch SAH-Substrate inhibiert. Dieses hat Auswirkungen auf die Methylierung u. a. von DNA, RNA, Proteinen und Phospholipiden [CHIANG *et al.*, 1996]. Durch diese Eigenschaften wurde das Enzym Gegenstand intensiver Forschungen zur Herstellung antiviraler, antiparasitärer, antiarthritischer, immunsuppressiver und antitumoraler Mittel. So konnte gezeigt werden, dass durch die Inhibierung von SAH die Replikation verschiedener Viren (z.B. CMV, Ebola, Rabiesvirus, RSV) gehemmt wird [BRAY *et al.*, 2000; SNOECK *et al.*, 1993].

Das Virostatikum Acycloguanosin (Aciclovir) hemmt die Replikation des EBV *in vitro* sehr gut. Auf den klinischen Verlauf der infektiösen Mononukleose hat es aber keinen Einfluss. Daher beschränkt sich die Therapie auf die Behandlung der begleitenden Symptome. Die Behandlung von Burkitt-Lymphomen erfolgt durch Chemotherapie [ENGELHARD *et al.*, 1998]. Nasopharynxkarzinome lassen sich im Frühstadium durch Radiotherapie, Chemotherapie und chirurgische Maßnahmen gut behandeln [STUPP & VOKES, 1998]. Mit steigendem Grad der Metastasierung sinken die Behandlungschancen.

Ein neues Konzept in der Behandlung EBV-assoziiierter Tumoren zielt darauf ab, EBV positive Tumorzellen durch die Reaktivierung des lytischen Zyklus in Anwesenheit von antiviralen Chemotherapeutika zu eliminieren [GUTIERREZ *et al.*, 1996; WESTPHAL *et al.*, 1999]. Dieses Konzept wurde bereits in ersten klinischen Studien angewendet. Es wurden sechs Patienten, die nach einer Organtransplantation eine EBV assoziierte lymphoproliferative Erkrankung entwickelten, Argininbutyrat als Induktor des lytischen EBV-Zyklus

in Kombination mit dem Virostatikum Ganciclovir gegeben. Aufgrund dieser Behandlung konnte bei vier Patienten eine komplette und bei einem Patienten eine partielle Remission herbeigeführt werden [MENTZER *et al.*, 2001].

Eine Reaktivierung kann durch externe Stimuli wie Bestrahlung, Butyrate oder durch Überexpression von Induktoren des lytischen Zyklus erreicht werden. Zu diesen Induktoren des lytischen Zyklus gehören u. a. BZLF1, LM1 sowie die s-Adenosylhomocystein-Hydrolase (SAH). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde in einer früheren Arbeit, zur Untersuchung der Signaltransduktionswege einer SAH getriggerten Reaktivierung des lytischen EBV-Zyklus in Raji Zellen, das Schema in Abbildung 1.3 erarbeitet [MAAS, 2002].

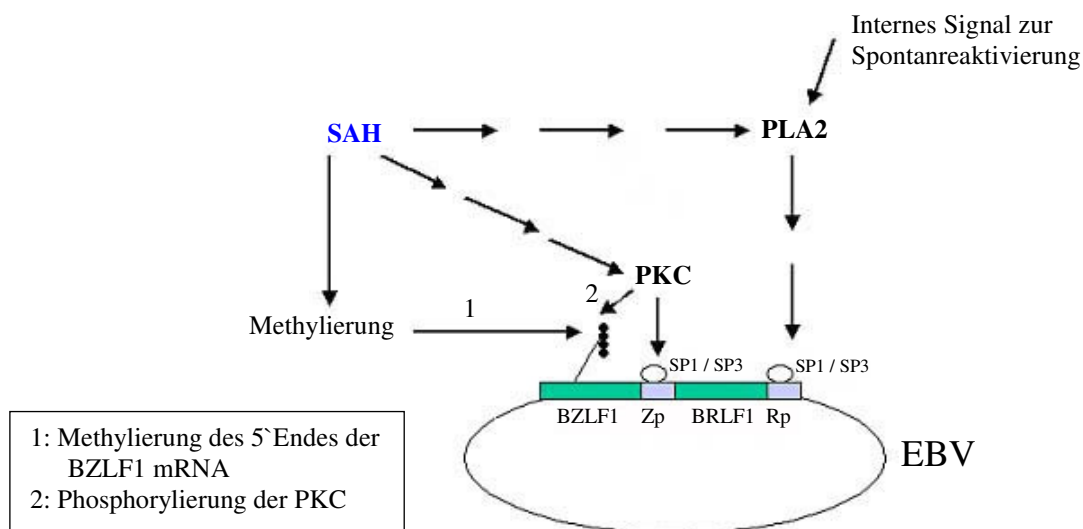


Abbildung 1.3: Signaltransduktionswege bei SAH getriggertter Reaktivierung des lytischen EBV-Zyklus in Raji Zellen [MAAS, 2002]

Wenn es gelingt, die Abläufe bei der Reaktivierung des lytischen EBV-Zyklus aufzuklären, könnten sie Ausgangspunkt für eine neue Therapiestrategie bei der Behandlung EBV-assoziiierter Tumoren werden.

1.3 Ziel und Arbeitsprogramm

Ziel dieser Arbeit ist es, durch Überexpression von s-Adenosylhomocystein-Hydrolase (SAH) die zur Reaktivierung des lytischen EBV-Zyklus und zur begleitenden Differenzierung der Wirtszelle B95-8 führenden Signale aufzuklären.

Dazu waren folgende Aufgaben zu lösen:

- Bestimmung der Expression der ‚immediate early‘-Gene BZLF1 und BRLF1 sowie des „delayed early“-Gens Early Antigen (EA-D) nach Überexpression von SAH in B95-8 Zellen
- Untersuchung der Zellproliferation und des Differenzierungsstatus von B95-8 Zellen nach SAH-Überexpression
- Wirkung der SAH-Überexpression auf die Proteinkinase C (PKC) abhängige Reaktivierung des lytischen Zyklus
- Beteiligung von PLA2 und PKC an der SAH getriggerten Reaktivierung des lytischen EBV-Zyklus in B95-8 Zellen

2 Material

2.1 Zell-Linien

- B95-8 (ECACC - 85011419) [MILLER & LIPMAN, 1973]
- BJAB [MENEZES *et al.*, 1975a]

Die Zell-Linie BJAB wurde freundlicherweise vom Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universität Regensburg zur Verfügung gestellt.

2.1.1 Zell-Linie B95-8

Bei der Zell-Linie B95-8 handelt es sich um Epstein-Barr Virus transfizierte B-Lymphozyten aus Marmosettaffen. Die Virusreplikation führt zu einer lytischen Vermehrung. Auf der Zelloberfläche wird der EBV-Rezeptor CD 21 exprimiert.

2.1.2 Zell-Linie BJAB

BJAB Zellen stammen aus einem Burkitt-Lymphom eines afrikanischen Patienten. Sie sind EBV-Genom negativ.

2.2 *E. coli* One Shot[®] TOP10 (Invitrogen[®])

Genotyp der TOP10 Zellen:

F⁻ *merA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ 80*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74* *recA1* *deoR* *araD139* Δ (*ara-leu*)-7697 *galU galK rpsL* (Str^R) *endA1 nupG*

Diese Zellen wurden zur Transformation eingesetzt.

2.3 Vektoren

2.3.1 pcDNA-AHCY

Der Vektor pcDNA-AHCY ist entstanden aus dem humanen Expressionsvektor pcDNA-3.1, in den das Gen für die s-Adenosylhomocystein-Hydrolase (AHCY) kloniert wurde. Er hat eine Größe von 6,78 kb. Zur Selektion besitzt er ein Ampicillinresistenzgen.

2.3.2 pcDNA-3.1 E

Der Expressionsvektor pcDNA-3.1 E ist 5,36 kb groß und dient als Negativ-Kontrolle für Transfektionen mit pcDNA-Derivaten.

2.3.3 pCMVZ'

Der Vektor pCMVZ' ist 4,5 kb groß und leitet sich vom Vektor pUC18 ab. Er besitzt den bakteriellen Replikationsursprung des Plasmids Col E1 sowie eine Ampicillinresistenz. Außerdem enthält er eine Expressionskassette für das BZLF1-Gen des Epstein-Barr Virus, das unter der Kontrolle des *immediate early gene*-Promotors des Cytomegalievirus liegt.

2.4 Oligonukleotide

2.4.1 Primer

GAPDH

GAPDH-A (20 pmol/μl)	5'-CGG AGT CAA CGG ATT TGG TCG TAT-3'
GAPDH-B (20 pmol/μl)	5'-AGC CTT CTC CAT GGT GGT GAA GAC-3'

BRLF1

BRLF1 3' (20 pmol/μl)	5'-GAT GGA CGA GGA GCT CAT G-3'
BRLF1 5' (20 pmol/μl)	5'-CTG CTC GGT GTC ACT GTT G-3'

BZLF1

BZLF1-Ex3 3' (20 pmol/μl)	5'-CAA ACA GCA GCA GCA GTG G-3'
BZLF1-Ex2 5' (20 pmol/μl)	5'-GCT GCA GCA GTT GCT TAA AC-3'

BZLF1 Sonde

BZLF1-Sonde 3' (20 pmol/μl)	5'-CAA GCT ACC AGA GTC TAT CAG-3'
BZLF1-Sonde 5' (20 pmol/μl)	5'-CAA CTG CTG CTG CTG TTT G-3'

AMP

AMP 3' (20 pmol/μl)	5'-GAA CTG GAT CTC AAC AGC-3'
AMP 5' (20 pmol/μl)	5'-GCT AGA GTA AG TAGT TCG C-3'

Alle Primer wurden von SIGMA-ARK GmbH entsalzt geliefert.

2.4.2 Sonden

GAPDH

GAPDH-HYB-3'	5' -LC Red640-GAG ATC CCT CCA AAA TCA AGT GGG C(p)-3'
GAPDH-HYB-5'	5' -GAA ATC CCA TCA CCA TCT TCC AGG AG(X)-3'

BRLF1

BRLF1-HYB-3'	5' -LC Red640-GCG GGC CTC GGT GTG AGA G(p)-3'
BRLF1-HYB-5'	5' -CAT GAA ACT GTC CGG ACT CGG(X)-3'

Alle Sonden wurden von der Firma TIB MOLBIOL bezogen. Sie waren HPLC-gereinigt und wurden lyophilisiert geliefert. Die 3'-Sonden sind LC Red 640 gekoppelt, die 5'-Sonden enthalten eine 3'-Fluorescein Markierung.

2.5 Inhibitoren

Zur Hemmung der Aktivität von Proteinkinase C wurden die Inhibitoren H-7 Dihydrochloride (H7) und Bisindolylmaleimide (GF-109203-X; GFX) verwendet. H7 ist ein Serin-Threonin-Kinase Inhibitor. Er ist ein starker Inhibitor der Myosin-Leichtketten-Kinase sowie der Proteinkinasen A, C und G [KU *et al.*, 1997; JARVIS *et al.*, 1994; TAKAHASHI *et al.*, 1990]. Die

Substanz bewirkt eine vollständige Blockade der TPA abhängigen Reaktivierung des lytischen EBV-Zyklus [DAVIES *et al.*, 1991]. Dabei blockiert H7 die katalytische Domäne der PKC [HAYASHI, 1992].

Auch die Substanz GFX ist ein starker und selektiver PKC-Inhibitor [ZACHARIAS *et al.*, 1995; TOULLEC *et al.*, 1991].

Zur Inhibierung der zytoplasmatischen Phospholipase A2 (cPLA2) wurden die Inhibitoren Quinacrine und Arachidonyl-trifluoromethylketon verwendet. Der lipophile PLA2-Inhibitor Quinacrine [SAKUTA & YONEDA, 1994], der die katalytische Aktivität hemmt [LU *et al.*, 2001], fand bereits in den 20er Jahren des 20. Jahrhunderts bei der Behandlung von Malaria seine erste Anwendung.

Bei dem PLA2-Inhibitor Arachidonyl-trifluoromethylketon handelt es sich um einen langsam, aber stark bindenden spezifischen Inhibitor der humanen 85 kDa cPLA2 [FONTEH, 2002; STREET *et al.*, 1993] sowie der 80 kDa makrophagen iPLA2 (Calcium-unabhängige PLA2). Die 14 kDa sPLA2 (secretory PLA2) hingegen wird nicht beeinflusst.

2.6 Antikörper

Anti-EA-D, Maus-Anti-EBV (monoklonal)	ABI, Columbia, USA
Anti-human CD11a/LFA-1, PE	Becton Dickinson, Heidelberg
Anti-human CD30, FITC	Becton Dickinson, Heidelberg
Anti-human CD40, FITC	Becton Dickinson, Heidelberg
Anti-IgG, Kaninchen-Anti-Maus, FITC	DAKO, Glostrup, DK
Anti-phospho-PKC α , Kaninchen polyclonal IgG	upstate [®] , Lake Placid, NY
CD 23, APC	Becton Dickinson, Heidelberg
CD19 PerCP, (4G7)	Becton Dickinson, Heidelberg
CD44 (Leu TM -44), FITC	Becton Dickinson, Heidelberg
CD54 PE (Leu TM -54), FITC	Becton Dickinson, Heidelberg
CD58 Anti-LFA-3, PE	Becton Dickinson, Heidelberg
Schwein-Anti-Kaninchen IgG, HRP	DAKO, Glostrup, DK

2.7 Kits

Cell Proliferation ELISA (BrdU-Test)	Roche, Mannheim
Dig Luminescent Detection Kit for Nucleic Acids	Roche, Mannheim
Dig Wash and Block Buffer Set	Roche, Mannheim
Highspeed Plasmid Purification Kit	Qiagen, Hilden
LightCycler-FastStart DNA Master-Hybridization Probes-Kit	Roche, Mannheim
LightCycler-FastStart DNA Master SYBR Green I-Kit	Roche, Mannheim
Oligotex TM mRNA Kit	Qiagen, Hilden
Omniscript TM RT-Kit	Qiagen, Hilden
PCR DIG Probe Synthesis Kit	Roche, Mannheim
QIAamp Blood Kit	Qiagen, Hilden
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
SMART TM PCR cDNA Synthesis Kit	Becton Dickinson, Heidelberg
Taq DNA Polymerase Kit	Qiagen, Hilden

2.8 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien stammen, falls nicht anders erwähnt, von folgenden Firmen: Alexis Biochemicals, Amersham Pharmacia Biotech, Biochrom AG, Calbiochem, Merck und Sigma. Alle Chemikalien sind in der Spezifikation „reinst“ oder in der höchstmöglichen kommerziell erhältlichen Reinheit verwendet worden.

3 Methoden

3.1 Zellkulturtechniken

3.1.1 Vermehrung von *E. coli*

Die Bakterien wurden bei 37 °C unter Schütteln in LB-Medium oder in Petri-Schalen auf LB-Medium, das durch 1,5 %ige Agarose verfestigt wurde, kultiviert.

LB-Medium:

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

Nach Autoklavieren des Nährmediums konnten zum Zweck der Selektion Antibiotika zugegeben werden.

Ampicillin:

Endkonzentration: 100 µg/ml

3.1.2 Vermehrung eukaryontischer Zellen

Die Zell-Linien B95-8 und BJAB wurden in 50 ml oder 200 ml Kulturgefäßen (Greiner) kultiviert. Das Kulturvolumen betrug 15 bzw. 50 ml. Die Vermehrung erfolgte bei 37 °C in wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit 5 % CO₂ in supplementiertem RPMI-1640-Medium (Sigma). Fötale Kälberserum (FKS) wurde sterilfiltriert (Sartolab P-Filter, Sartorius) und 30 Minuten bei 56 °C zur Inaktivierung von Komplement erhitzt, bevor es dem RPMI-Medium zugegeben wurde.

Zusätze für RPMI-1640:

Fötale Kälberserum	10 %
Antibiotika-Stammlösung	
(Penicillin: 200 mM, Streptomycin: 1 mg/ml)	2 %
L-Glutamin (Stammlösung 200 mM)	2 %
Nicht essentielle Aminosäuren (100 x)	0,2 %

3.1.3 Kryokonservierung von eukaryontischen Zellen

Zur Kryokonservierung wurden 50 ml einer gut gewachsenen Zellkultur auf 10 Zentrifugen-Gefäße aufgeteilt. Die Zellen wurden 5 Minuten bei 400 x g sedimentiert, der Überstand dekantiert und das Pellet in 1 ml Lösung A resuspendiert. Anschließend wurde 1 ml Lösung B hinzugefügt, die Suspension vorsichtig durchmischt und in 2 ml Kryo-Röhrchen überführt. Die Röhrchen wurden über 24 Stunden langsam bei -70 °C eingefroren und dann in flüssigen Stickstoff (-180 °C) überführt.

Lösung A (für 10 Kryo-Röhrchen):

RPMI-1640	7,5 ml
FKS	2,5 ml

Lösung B (für 10 Kryo-Röhrchen):

RPMI-1640	5,5 ml
FKS	2,5 ml
DMSO	2,0 ml

Zur Rekultivierung eukaryontischer Zellen wurden die Kryo-Röhrchen in einem Wasserbad (Haake) bei 37 °C aufgetaut. Sobald nur noch ein kleines Stück Eis zu sehen war, wurde das Röhrchen zur Desinfektion kurz in Ethanol (70 %ig) getaucht und die Zellen in 20 ml vorgewärmtes modifiziertes RPMI-1640 Medium gegeben. Die Zellen wurden eine Stunde unter normalen Kulturbedingungen inkubiert, dann bei 200 x g 5 Minuten abzentrifugiert und in 15 ml frisches, vorgewärmtes und modifiziertes Medium aufgenommen. Das Medium wurde nach 24 Stunden erneut gewechselt, um DMSO vollständig zu entfernen. Das modifizierte Anzuchtmedium wurde bis zur zweiten Kulturwoche verwendet.

Zusätze für das modifizierte RPMI-1640:

Fötales Kälberserum	20 %
Antibiotika-Stammlösung	
(Penicillin: 200 mM, Streptomycin: 1 mg/ml)	2 %
L-Glutamin (Stammlösung 200 mM)	2 %
Nicht essentielle Aminosäuren (100 x)	0,2 %

3.1.4 Zellzählung

Die Quantifizierung der Zellen erfolgte mit Hilfe des „CASY 1-Counter“ (Schärfe-System). Das Messprinzip beruht auf einer Widerstandsänderung durch Zellen, die beim Durchtritt durch die Messkapillare eine ihrem Volumen entsprechende Menge Elektrolytlösung verdrängen. Diese Widerstandsänderung ist ein Maß für das Volumen der Zellen. Tote Zellen können durch ihre abweichende Struktur von lebenden unterschieden werden. Voraussetzung für dieses Messverfahren ist, dass die Zellen die Messkapillare einzeln passieren.

Die Messung erfolgte mit 10 ml einer 1:200 (v/v) in isotonischer Salzlösung „CASYton“ (Schärfe-System) verdünnten Zellsuspension. Lebende Zellen der Zell-Linie B95-8 haben einen Durchmesser von 8 – 20 µm. Die größte Zelldichte bei den Messungen wurde bei einem Zelldurchmesser von ca. 12 µm gemessen.

3.2 Rekombinante DNA-Technik

3.2.1 Plasmid-Präparation aus *E.coli*

Durch eine Maxi-Präparation können größere Mengen an Plasmid-DNA schnell und sauber isoliert werden (Plasmid Maxi Kit (Qiagen); HiSpeed™ Plasmid Maxi Kit (Qiagen)). Für die Präparation wurden Übernachtskulturen verwendet (3.1.1). Die Maxi-Präparation erfolgte nach Herstellerangaben.

Plasmid-DNA bindet bei niedriger Salzkonzentration und geeigneten Pufferbedingungen an eine Anionenaustausch-Säule. RNA, Proteine und andere Zellverunreinigungen werden mit höher konzentriertem Salzpuffer entfernt. Durch Hochsalzpuffer wird die Plasmid-DNA eluiert und anschließend durch Ethanol-Fällung konzentriert und gereinigt.

3.2.2 DNA-Präparation aus eukaryontischen Zellen

Die Isolierung von DNA aus B95-8 Zellen erfolgte mit dem „QIAamp DNA Blood Mini Kit“ (Qiagen) nach Herstellerangaben.

Nach Zell-Lyse durch Protease wurde die DNA an eine Säule gebunden. Nach mehreren Waschschritten zur Entfernung von Proteinen, RNA und anderen Zellresten wurde die DNA mit 50 µl AE-Puffer eluiert.

3.2.3 RNA-Präparation aus eukaryontischen Zellen

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus eukaryontischen Zellen erfolgte mit dem „RNeasy Mini Kit“ (Qiagen) nach Anleitung. Um Kontamination mit RNasen zu vermeiden, wurde ausschließlich mit Handschuhen und doppelt autoklavierten Pipettenspitzen (Eppendorf) oder Spitzen mit Filter (Biozym) gearbeitet.

Das Zellpellet wurde mit „RLT-Puffer“ lysiert, der zur RNase-Inhibierung β -Mercaptoethanol enthielt. Die Suspension wurde zur Homogenisierung durch eine „QiagenQiashredder™ - Säule“ (QiagenQiashredder™) gegeben. Anschließend wurde das Zell-Lysat auf eine Nukleinsäure-bindende Säule transferiert. Nach einigen Waschschritten zur Eliminierung von DNA und Verunreinigungen konnte die RNA in 30 μ l DEPC-Wasser eluiert werden.

3.2.4 Quantifizierung von DNA und RNA

Die Messung der DNA- und RNA-Konzentration erfolgte photometrisch im „Spektrophotometer GeneQuant II“ (Pharmacia Biotech) bei 260 nm.

Eine Extinktion von 1,0 entsprach einer DNA-Konzentration von 50 μ g/ml oder einer RNA Konzentration von 40 μ g/ml.

3.2.5 Präzipitation von DNA

Zur Reinigung, Konzentrierung und/oder Umpufferung wurde eine DNA-Fällung durchgeführt. Dazu wurde die DNA-Lösung mit 0,1 Volumen 3 M Na-Acetat-Lösung (pH 5,2) und 2,5 Volumen eiskaltem, absolutem Ethanol gemischt. Nach einer 20 minütigen Inkubationszeit bei -20 °C wurde die gefällte DNA für 20 Minuten bei 4 °C und 15.000 rpm in einer Laborzentrifuge (5403; Eppendorf) zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet mit Ethanol (70 %) für 10 Minuten bei 4 °C und 15.000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet bei Raumtemperatur getrocknet und in 100 μ l TE-Puffer resuspendiert.

TE-Puffer:

Tris	1 M	10 ml
Na ₂ EDTA	0,5 M	2 ml
Aqua bidest.		ad 1000 ml

3.2.6 DNA-Restriktion

DNA kann mit Hilfe von Restriktions-Endonukleasen gespalten werden. Dabei erkennen die Restriktions-Endonukleasen eine spezifische Basensequenz in doppelsträngiger DNA und schneiden sie an einer definierten Stelle innerhalb dieser Konsensussequenz. Die resultierenden Fragmente haben eine vorhersagbare Größe. Für einen analytischen Verdau wurde ein Standard-Reaktionsansatz hergestellt und 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Die Analyse erfolgte durch Agarose-Gelelektrophorese.

Da Bam HI und Xho I nicht in demselben Puffersystem arbeiten können, erfolgte zunächst die DNA-Spaltung mittels Bam HI. Anschließend wurde die DNA präzipitiert (3.2.5) und dann mit Xho I inkubiert.

Standard-Reaktionsansatz:

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

Verwendete Restriktionsenzyme/ Puffer:

Bam HI	MBI Fermentas
Xho I	MBI Fermentas
Roter Puffer (10 x)	MBI Fermentas
Xho I Puffer (10 x)	MBI Fermentas

3.2.7 Spaltung von DNA mit DNase I

Nach der Isolierung von Gesamt-RNA (3.2.3) kann eine Verunreinigung mit genomischer DNA nicht vollkommen ausgeschlossen werden. Deshalb wird die RNA-Präparation mit DNase I behandelt. Dieses Enzym ist eine DNA-Doppelstrang-spezifische Endonuklease aus Rinderpankreas.

Der Standard-Reaktionsansatz wurde 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Die Inaktivierung des Enzyms erfolgte 10 Minuten bei 95 °C.

Standard-Reaktionsansatz:

RNA (50 ng - 2 µg)	x µl
RNase Inhibitor (40 U/µl)	0,5 µl
Puffer für DNase I (10 x)	4,0 µl

DNase I, RNase-frei (10 U/ μ l)	2,0 μ l
RNase-freies Aqua dest.	ad 40,0 μ l

3.2.8 Isolierung von mRNA aus Gesamt-RNA

Zur Isolierung von mRNA aus Gesamt-RNA wurde das „OligotexTM mRNA Kit“ (Qiagen) verwendet.

Oligotex besteht aus Polystyren-Latex-Partikeln ($\varnothing = 1,1 \mu\text{m}$), an deren Oberfläche dC₁₀T₃₀-Oligonukleotide kovalent gebunden sind. Diese sehr stabile Bindung ermöglicht, dass sich poly(A)⁺-Nukleinsäuren anlagern können.

Die isolierte Gesamt-RNA (3.2.3) wurde nach Konzentrationsbestimmung (3.2.4) zur Isolierung der poly(A)⁺-mRNA nach Herstellerangaben eingesetzt.

OBB-Puffer und Oligotex-Lösung wurden zu der in RNase-freiem Wasser gelösten RNA (< 1 mg) gegeben. Zur thermischen Zerstörung der Sekundärstruktur wurde die RNA für 3 Minuten bei 70 °C erwärmt. Die Hybridisierung der RNA mit den Oligotex-Partikeln fand 10 Minuten bei Raumtemperatur statt. Durch Zentrifugation wurde der Oligotex-mRNA-Komplex sedimentiert, in OW2-Puffer resuspendiert und auf eine Säule gegeben. Nach Waschen mit OW2-Puffer wurde die poly(A)⁺-mRNA in einem Endvolumen von 40 μ l mit OEB-Puffer eluiert und bei –70 °C gelagert.

3.2.9 cDNA- Synthese

Für die Amplifikation mittels PCR muss RNA in cDNA umgeschrieben werden. Dieses geschieht mit Hilfe einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase, der Reversen Transkriptase (RT). Als Primer wird ein Oligo(dT)-Primer eingesetzt, der an das poly(A)-Ende am 3'-Ende der mRNA bindet. Das Enzym bindet an die freie 3'-OH-Gruppe des Primers und synthetisiert einen zur RNA-Matrize komplementären cDNA-Strang.

Die Synthese einzelsträngiger cDNA erfolgte nach Herstellerangaben mit dem „OmniscriptTM RT-Kit“ (Qiagen). Es wurden RNA-Mengen zwischen 50 ng und 2 μ g als Matrize eingesetzt. Die isolierte DNA-freie RNA (3.2.7) wurde auf Eis aufgetaut und 5 Minuten bei 65 °C denaturiert (Thermomixer 5436, Eppendorf). Nachdem eine geeignete Menge des Standard-Reaktionsansatzes zugesetzt wurde, erfolgte die Umschreibung für 1 Stunde bei 37 °C. Anschließend wurde der Reaktionsansatz 5 Minuten auf 95 °C erhitzt, um die Reaktion zu stoppen, und sofort auf Eis gekühlt.

Standard-Reaktionsansatz:

10 x RT-Puffer	2,0 µl
dNTP-Mix (5 mM)	2,0 µl
Oligo(dT)-Primer (10 µM, Roche)	2,0 µl
RNase Inhibitor (10 U/µl, Roche)	1,0 µl
Omniscript RT (4 U/µl)	1,0 µl
RNase-freies Aqua bidest.	ad 20,0 µl

3.2.10 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Methode der PCR (*polymerase chain reaction*) [SAIKI *et al.*, 1988] wurde im Jahre 1987 von Kary B. Mullis entwickelt. Aufgrund dieser Methode ist es möglich, ausgewählte Nukleotidsequenzen *in vitro* millionenfach zu vervielfältigen. Dadurch können auch geringe Mengen an DNA einer Analyse schnell zugänglich gemacht werden.

Bei der PCR werden zwei Oligonukleotide (Primer) eingesetzt, die homolog zu den beiden Enden der Zielsequenz sind. Die doppelsträngige DNA wird zunächst denaturiert. In der Annealingphase hybridisieren die Primer an die einzelsträngige Matrizen-DNA. Ein hitzestabiles Enzym, die *Taq*-Polymerase, synthetisiert während der Elongation vom 3'-Ende der Primer ausgehend einen neuen DNA-Doppelstrang. Durch die Wahl eines gegenläufig orientierten Oligonukleotid-Primerpaares kann gezielt die DNA-Sequenz zwischen den beiden Primern vervielfältigt werden. Aufgrund einer zyklischen Wiederholung der einzelnen Reaktionsschritte - Denaturierung, Annealing und Elongation - wird die Ziel-DNA exponentiell amplifiziert.

Die PCR-Reaktionen wurden in einem Thermocycler mit Heizdeckel (Thermocycler UNO II, Biometra) unter *Hot-Start*-Bedingungen durchgeführt.

Hierzu wurde das „*Taq* DNA Polymerase Kit“ (Qiagen) nach Herstellerangaben benutzt.

Standard-Reaktionsansatz:

cDNA (1 ng – 2 µg)	x µl
PCR-Puffer (10 x)	5,0 µl
<i>Taq</i> -Polymerase (5 U/µl)	0,5 µl
dNTP-Mix (2,5 mM)	5,0 µl
3'-Primer (10 µM)	2,0 µl
5'-Primer (10 µM)	2,0 µl
Aqua bidest.	ad 50,0 µl

Thermocycler-Bedingungen für spezifische PCR-Reaktionen:

Ampicillin-PCR:

Diese PCR dient zum Nachweis des Ampicillin-Resistenzgens auf dem Vektor. So kann zum Beispiel eine erfolgreiche Transfektion nachgewiesen werden. Primer: AMP (2.4.1)

94 °C	2 min	
94 °C	1 min	} x 35
56 °C	45 s	
72 °C	1 min	
72 °C	7 min	
4 °C	∞	

BZLF1-PCR:

Die BZLF1-PCR dient dem Nachweis des EBV kodierten BZLF1-Gens, dessen Expression ein Signal für die Reaktivierung des lytischen Zyklus ist. Primer: BZLF1 (2.4.1)

94 °C	2 min	
94 °C	1 min	} x 35
58 °C	45 s	
72 °C	1 min	
72 °C	7 min	
4 °C	∞	

GAPDH-PCR:

Die GAPDH-PCR dient zum Nachweis des eukaryontischen Haushaltsgens Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH). Die PCR dient als Nachweis für eine erfolgreiche RNA-Isolation und cDNA-Synthese. Primer: GAPDH (2.4.1)

94 °C	2 min	
94 °C	1 min	} x 35
56 °C	45 s	
72 °C	1 min	
72 °C	7 min	
4 °C	∞	

3.2.11 Agarose-Gelelektrophorese

Die Elektrophorese ist eine Methode zur Analyse von Nukleinsäuren u. a. zur Charakterisierung von PCR-Produkten (3.2.10). Geladene Teilchen wandern im elektrischen Feld und werden aufgrund ihrer unterschiedlichen Größe aufgetrennt.

Die als Träger verwendete Agarose ist ein Polysaccharid, welches aus Rotalgen hergestellt wird. Es wird durch Aufkochen in Puffer gelöst und polymerisiert beim Abkühlen. Durch

Variation der Agarosekonzentration können lineare DNA-Fragmente der Größe 0,1 bis 60 kb separiert werden [GASSEN & SCHRIMPF, 1999].

DNA-Fragmente von 1 bis 15 kb wurden dabei auf 0,8 %ige TAE-Agarosegele, kleinere Fragmente auf 1,5 %ige TBE-Agarosegele aufgetragen. Zur Herstellung der Gele wurde das Agarose-Puffer-Gemisch solange in einer Mikrowelle aufgeköcht, bis die Agarose gelöst war. Den Agarosegelen wurde, nachdem sie auf 65 °C abgekühlt waren, Ethidiumbromid (siehe unten) zugegeben.

Die DNA-Proben und der entsprechende Größenmarker wurden mit 1/10 Volumen Farbmarker gemischt und in die Probentaschen pipettiert. Je nach Art des Gels erfolgte die Elektrophorese in 0,5 x TBE- bzw. 1 x TAE-Puffer und die DNA wurde bei 5 V/cm Elektrodenabstand aufgetrennt. Die Dokumentation erfolgte durch die „BioDoc Analyze Camera“ (Biometra) und digitale Speicherung.

TAE-Puffer (1 x):

Tris	40 mM
Essigsäure	40 mM
EDTA	1 mM

TAE-Gel, 0,8 %ig (500 ml):

Agarose	4 g	
TAE-Puffer (1 x)	500 ml	➔ aufkochen, auf 65 °C abkühlen
Ethidiumbromid (10 mg/ml)	5 µl	

TBE-Puffer (0,5 x):

Tris	45 mM
Borsäure	45 mM
EDTA	1 mM

TBE-Gel, 1,5 %ig (500 ml):

Agarose	7,5 g	
TBE-Puffer (0,5 x)	500 ml	➔ aufkochen, auf 65 °C abkühlen
Ethidiumbromid (10 mg/ml)	5 µl	

Farbmarker:

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

Größenmarker:

DNA-Längenstandards X: 0,07-12,2 kb (Roche)

DNA-Längenstandards XIV, 100-Basenpaarleiter: 0-2500 bp (Roche)

3.2.12 PCR mit dem LightCycler

Beim LightCycler (Roche) werden „*rapid cycle-PCR*” und „*real-time-PCR*” miteinander kombiniert. Aufgrund von Glaskapillaren mit nur 20 µl Reaktionsvolumen wird das Verhältnis des Flüssigkeitsvolumens zur Oberfläche und damit die Temperaturübertragung optimiert. Schnelle Temperaturveränderungen im Reaktionsgefäß sind möglich, so dass ein PCR-Zyklus weniger als 30 Sekunden dauert (*rapid cycle-PCR*). Die Analyse der PCR-Produkte erfolgt während der Amplifikation mittels Fluoreszenz (*real-time-PCR*). Ein zusätzlicher Analysenschritt wie bei der herkömmlichen PCR entfällt und die Gefahr von Kontaminationen wird minimiert. Im Anschluss an die PCR wird der Schmelzpunkt des Amplikons ermittelt. Für jedes Amplifikationsprodukt besteht eine charakteristische Schmelztemperatur. Diese ist abhängig von den gewählten PCR-Bedingungen, den eingesetzten Primern und der Amplifikationsmethode.

Die Detektion der amplifizierten PCR-Produkte kann über verschiedene Methoden erfolgen. Zum einen können PCR-Produkte mit dem Farbstoff SYBR Green I, zum anderen mit Hybridisierungs sonden erfasst werden.

3.2.12.1 Detektion mit SYBR Green I

Bei der PCR mit Detektion von Amplifikaten durch SYBR Green wurde das „LightCycler-FastStart DNA Master SYBR Green I-Kit” (Roche) verwendet. In Abbildung 3.1 ist die Reaktion schematisch dargestellt. Der Farbstoff SYBR Green I bindet unspezifisch an doppelsträngige DNA.

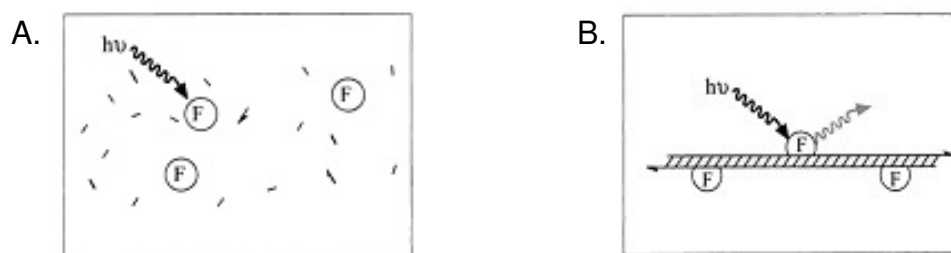


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung der LightCycler-PCR mit SYBR Green I. A. Vor der Amplifikation; B. Nach der Amplifikation. F: Fluorescein [MEUER *et al.*, 2001]

Nach Bestrahlung mit UV-Licht sendet SYBR Green I Fluoreszenzlicht aus, welches bei 530 nm gemessen werden kann. Die Detektion von PCR-Produkten erfolgt in der Elongationsphase, in der doppelsträngige DNA gebildet wird. Eine Quantifizierung wird möglich, da so der Übergang von der lag-Phase in die log-Phase detektiert werden kann, der proportional zur Menge der Matrize ist.

3.2.12.2 Detektion mit Hybridisierungs sonden

Zur Amplifikation von DNA im LightCycler wurde das „LightCycler-FastStart DNA Master Hybridization Probes-Kit“ (Roche) verwendet. Die Hybridisierungssonden sind Oligonukleotide, die an einen Strang der Zielsequenz hybridisieren. Eine Sonde ist 3'-Fluorescein markiert, die andere ist 5'-LightCycler Red Fluorophor markiert und am 3'-Ende durch Phosphorylierung modifiziert (siehe 2.4.2). Da die Zielsequenzen der Sonden auf der DNA unmittelbar benachbart sind (Abstand: 1 - 5 bp), ist nach Anregung von Fluorescein ein Fluoreszenztransfer auf das Red Fluorophor möglich. Dieser Vorgang wird schematisch in Abbildung 3.2 dargestellt. Der Farbstoff reagiert mit Aussendung von Fluoreszenz, welche vom LightCycler bei einer Wellenlänge von 640 nm gemessen wird. Der hierbei detektierbare Übergang von der lag-Phase in die log-Phase ist dem Gehalt an Matrizen-DNA direkt proportional und ermöglicht eine Quantifizierung der Matrizenmenge.

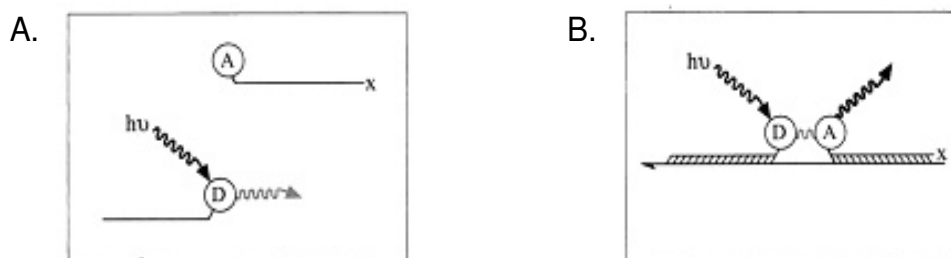


Abbildung 3.2: Schematische Darstellung der LightCycler-PCR mit Hybridisierungssonden. A. Vor der Amplifikation; B. Nach der Amplifikation. A: Akzeptor, D: Donor [MEUER *et al.*, 2001]

Ergänzend zu den zu untersuchenden Proben wurde eine Standard-Verdünnungsreihe (1:10 bis 1:10.000) mit DNA aus B95-8 Zellen, in denen die Gene für BZLF1, BRLF1 und GAPDH nachweisbar waren, als externer Standard mitgeführt. Dabei wurde jeder Probe der Standard-Verdünnungsreihe eine fiktive Anzahl von Kopien des jeweiligen Gens zugeordnet. So wurde der unverdünnten cDNA-Probe eine Anzahl von 10.000 Kopien zugeordnet und der cDNA-Probe, welche 1:10.000 verdünnt wurde, eine Kopie. Mit Hilfe der LightCycler-Software konnte nun aus der Standard-Verdünnungsreihe eine Regressionsgerade erstellt werden.

Daraus ließ sich über die Fluoreszenzintensität die relative Konzentration der zu analysierenden Proben bestimmen. Dabei sollte der Korrelationskoeffizient r zur Validitätsüberprüfung nahe -1 liegen und der Fehler (error) möglichst klein sein.

3.2.12.3 Amplifikationsprotokolle

Für diese Arbeit wurde der LightCycler zum semiquantitativen Nachweis der Gene BZLF1 und BRLF1 genutzt. Hierzu wurde die zuvor gewonnene cDNA (3.2.9) aus transfizierten B95-8 Zellen eingesetzt. Der jeweilige Standard-Reaktionsansatz wurde in die LightCycler-Kapillaren gegeben, die anschließend mit einem Deckel verschlossen wurden. Die Kapillaren wurden in den Rotor des LightCyclers gesetzt und 15 Sekunden bei 3.000 rpm zentrifugiert (LC Carousel Centrifuge, Roche).

Standard-Reaktionsansatz „FastStart DNA Master Hybridization Probes“:

(angewendet bei der GAPDH- sowie BRLF1-spezifischen PCR)

cDNA	2,0 µl
FastStart Reaktions-Mix	2,0 µl
MgCl ₂ (25 mM)	1,6 µl
3'-Fluorescein-markierte Sonde (4 µM)	1,0 µl
5'-LC Red640-markierte Sonde (4 µM)	1,0 µl
3'-Primer (10 µM)	1,0 µl
5'-Primer (10 µM)	1,0 µl
Aqua bidest.	ad 20,0 µl

Standard-Reaktionsansatz „FastStart DNA Master SYBR Green I“:

(angewendet bei BZLF1-spezifischer PCR)

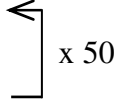
cDNA	2,0 µl
FastStart Reaktions-Mix	2,0 µl
MgCl ₂ (25 mM)	1,6 µl
3'-Primer (10 µM)	1,0 µl
5'-Primer (10 µM)	1,0 µl
Aqua bidest.	ad 20,0 µl

Der FastStart Reaktions-Mix in den LightCycler-Kits enthält die *Taq*-Polymerase, dNTPs (dUTP, anstatt dTTP), 10 x Puffer und 10 mM MgCl₂.

Bedingungen für spezifische PCR mit dem LightCycler:

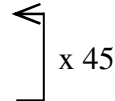
GAPDH-Sonden-PCR

Primer: GAPDH (2.4.1); Sonden: GAPDH (2.4.2)

Denaturierung	10 min	95 °C	
Amplifikation	0 s	95 °C	
	10 s	56 °C	
	13 s	72 °C	
Schmelzkurve	40 °C bis	95 °C	
Kühlung	2 min	40 °C	

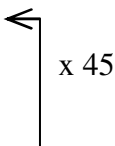
BRLF1-Sonden-PCR

Primer: BRLF1 (2.4.1); Sonden: BRLF1 (2.4.2)

Denaturierung	10 min	95 °C	
Amplifikation	0 s	95 °C	
	10 s	55 °C	
	15 s	72 °C	
Schmelzkurve	40 °C bis	95 °C	
Kühlung	1 min	40 °C	

BZLF1- PCR (innen)

Primer: BZLF1 (2.4.1)

Denaturierung	10 min	95 °C	
Amplifikation	0 s	95 °C	
	10 s	58 °C	
	15 s	72 °C	
	1 s	88 °C	
Schmelzkurve	65 °C bis	95 °C	
Kühlung	90 s	40 °C	

3.2.13 Transfektion durch Endozytose

Eine einfache und schnelle Methode der DNA-Übertragung in eukaryontische Zellen ist die Transfektion mit „SuperFect™ Transfection Reagent“ (Qiagen). Das Reagenz ist ein aktiviertes Dendrimer. Das sind sphärische Moleküle, die einen hohen Grad an kugelförmig von einem zentralen Kernmolekül ausgehenden Verzweigungen aufweisen. Sie enden in geladenen Aminogruppen, mit denen die negativ geladenen Phosphatgruppen der DNA interagieren. Es entsteht ein kompakter positiv geladener Komplex ähnlich der Anordnung der DNA auf Histonen. Dieser lagert sich an die negativ geladenen Oberflächenmoleküle der

Zellmembran an. Durch unspezifische Endozytose wird der Komplex von der Zielzelle aufgenommen. Das Dendrimer puffert den dabei in den Vesikeln vorhandenen Lysosomeninhalt ab, so dass die DNA nicht abgebaut wird und in den Zellkern gelangen kann.

Die Transfektion erfolgte in 24-Lochplatten (Costar®). Dazu wurde die Zellzahl der Kulturen bestimmt (3.1.4). Für jede Kavität wurden 3×10^5 Zellen entnommen und alle gemeinsam in einem Zentrifugenröhrchen bei 1.600 rpm (Labfuge, Heraeus Christ) 10 Minuten zentrifugiert. Die Zellen wurden zweimal mit je 1 ml PBS je 3×10^5 Zellen gewaschen, und der Ansatz in 500 µl supplementiertes RPMI-1640 Medium je 3×10^5 Zellen (3.1.2) aufgenommen und in die Lochplatte pipettiert. Weiterhin wurde pro Transfektionsansatz ein 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 60 µl RPMI-1640 Medium ohne Supplemente vorbereitet. In dieses Reaktionsgefäß wurden 4 bzw. 8 µg DNA pipettiert. Anschließend wurden 10 µl SuperFect gegeben. In ein Kontrollgefäß wurden 60 µl RPMI-1640 Medium und 10 µl SuperFect zugegeben und in ein weiteres Kontrollgefäß ausschließlich Medium. Nach 5 – 10 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Ansätze mit 1 ml supplementiertem RPMI-1640 Medium versetzt und zu den jeweiligen Zellsuspensionen in der Lochplatte gegeben. Jeder Ansatz erhielt 1 ml Medium. Die Kultivierung erfolgte bei 37 °C, 5% CO₂ Gehalt und 90 % Luftfeuchtigkeit.

3.2.14 Inhibierung von PLA2 und PKC

Die pcDNA-AHCY und pcDNA-3.1 E transfizierten B95-8 Zellen wurden mit spezifischen PLA2-Inhibitoren bzw. PKC-Inhibitoren behandelt. Als PLA2-Inhibitoren wurden Arachidonyl-trifluoromethylketon und Quinacrine mit einer Endkonzentrationen von 10 µM eingesetzt. Die Inhibierung erfolgte in 24-Lochplatten (Costar®). Dazu wurde die Zellzahl der Kulturen bestimmt (3.1.4). Für jede Kavität wurden 3×10^5 Zellen entnommen und bei 1.600 rpm (Labfuge, Heraeus Christ) 10 Minuten zentrifugiert. Die Zellen wurden zweimal mit je 1 ml PBS gewaschen, und jeder Ansatz in 500 µl supplementiertem RPMI-1640 Medium (3.1.2) aufgenommen und in die Lochplatte pipettiert. Die Inhibitoren wurden nun, 2 Stunden vor der Transfektion, in einer Endkonzentration von 10 µM zu der Zellsuspension pipettiert. Nach 2 Stunden wurde die Transfektion (3.2.13) durchgeführt. Dabei erhöhte sich das Gesamtvolumen eines Ansatzes auf 2,5 ml. Anschließend wurde die Konzentration der Inhibitoren wieder auf 10 µM eingestellt. Als PKC-Inhibitoren wurden Bisindolylmaleimid I (GFX) und H-7 Dihydrochloride eingesetzt. Bisindolylmaleimid I (GFX) wurde in einer Endkonzentration von 60 µM und H-7 Dihydrochloride in einer Endkonzentration von 25 µM zugegeben.

Bei einem weiteren Versuch wurde die Spontanreaktivierung des lytischen Zyklus von B95-8 Zellen nach Inkubation mit spezifischen PLA2-Inhibitoren untersucht. Dazu wurden 3×10^5 Zellen in 2 ml supplementiertem RPMI-1640 Medium (3.1.2) mit den oben genannten Inhibitor-Endkonzentrationen 12 und 24 Stunden inkubiert. Anschließend wurde die Spontanreaktivierungsrate mittels IFT (3.5) und Reverse Northern-Blot (3.3) analysiert.

3.3 Reverser Northern Blot

Die Reverse Northern Blot Analyse ist eine Methode zur Fixierung gelelektrophoretisch aufgetrennter cDNA auf einer Trägermatrix. Dadurch wird eine spezifische Detektion von Zielsequenzen möglich. Das Prinzip beruht auf der Detektion einer Digoxigenin-markierten Sonde, welche an die Ziel-cDNA hybridisiert (Abbildung 3.3). An die Sonde bindet anschließend eine anti-Digoxigenin-AP. Gebundene Antikörper werden in der Chemilumineszenzreaktion nachgewiesen. Als Substrat für die Alkalische Phosphatase dient CSPD. Durch die enzymatische Dephosphorylierung des Substrates entsteht ein metastabiles Phenolat-Anion, welches zerfällt und dabei Licht mit einem Maximum bei 477 nm emittiert. Die Licht-Emission wird mit Hilfe eines Röntgenfilms detektiert.

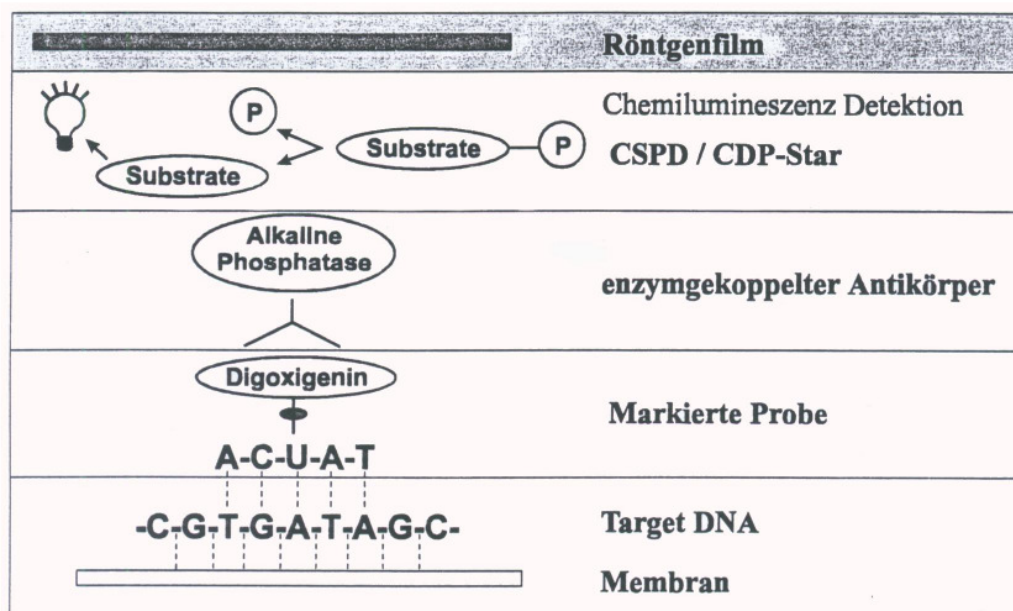


Abbildung 3.3: Schematische Darstellung der Digoxigenin-vermittelten Blot-Analyse mit anschließender Detektion durch Chemilumineszenz (Roche)

3.3.1 Herstellung DIG-markierter cDNA-Sonden mittels PCR

Die DIG-dUTP markierten cDNA-Sonden wurden mit dem „PCR DIG Probe Synthesis Kit“ (Roche) synthetisiert. Die Markierung erfolgt während der PCR durch Einbau von DIG-gekoppeltem dUTP anstelle von dTTP in die cDNA.

Die Synthese von Sonden gegen GAPDH, β -Aktin und BZLF1 wurde nach Herstellerangaben durchgeführt.

Standard-Reaktionsansatz:

PCR-Produkt	5,0 μ l
10 x PCR Buffer	5,0 μ l
10 x PCR DIG Probe Synthesis Mix	5,0 μ l
5'-Primer (10 pmol/ μ l)	2,0 μ l
3'-Primer (10 pmol/ μ l)	2,0 μ l
Enzyme Mix (Roche)	0,75 μ l
Aqua bidest.	ad 50,0 μ l

Bedingungen zur Herstellung einer DIG-dUTP markierten Sonde spezifisch für BZLF1:

Primer: BZLF1 Sonde (2.4.1)

95 °C	2 min	
95 °C	15 s	x 10
58 °C	45 s	
72 °C	1 min	
95 °C	15 s	x 20
58 °C	45 s	
72 °C	1 min	
72 °C	7 min	
4 °C	∞	

→ je Zyklus 20 Sekunden längere Elongationszeit

3.3.2 Dot Blot

Die Markierungs-Effizienz von DIG-dUTP markierten DNA-Sonden wurde mittels Dot Blot überprüft. Beim Dot Blot werden Nukleinsäuren punkt- oder bandenförmig direkt auf eine Membran aufgetragen.

Eine Verdünnungsreihe der DNA-Sonde und der markierten Kontroll-DNA (Dig Luminescent Detection Kit, Roche) von 1:10 bis 1:10.000 wurde mit DNA-Verdünnungspuffer (Dig Luminescent Detection Kit, Roche) hergestellt. Je 1 μ l der Verdünnungsreihen wurde auf eine „Hybond-N⁺ Nylon Tranfer Membrane“ (Amersham Pharmacia Biotech) getropft. Anschließend wurde von jeder Seite ein UV-Crosslinking (UV-StratalinkerTM 2400,

Stratagene) bei 254 nm durchgeführt und die Membran zusätzlich 30 Minuten bei 80 °C gebacken, um die cDNA kovalent an die Membran zu binden.

3.3.3 Gewinnung von *full-length* cDNA

Zur Herstellung von *full-length* cDNA aus geringen Mengen Gesamt- oder poly(A⁺)-mRNA wurde das „SMARTTM PCR cDNA Kit“ (BD Biosciences) verwendet.

Ein modifizierter Oligo(dT)-Primer bindet an die mRNA und startet die Erststrangsynthese. Sobald die Reverse Transkriptase das 5'-Ende der mRNA erreicht, werden durch die Terminale Transferase-Aktivität des Enzyms einige Nukleotide, vor allem Desoxycytidin (dC), an das 3'-Ende der cDNA gebunden. Das SMARTTM-Oligonukleotid (SMART II A Oligonukleotide), welches eine Oligo(dG)-Sequenz am 3'-Ende hat, bindet komplementär die dC-Sequenz und wird durch die DNA-Polymerase elongiert. Es entsteht eine doppelsträngige cDNA, welche die komplette Sequenz am 5'-Ende der mRNA und zudem die Sequenz, die komplementär zum SMARTTM-Oligonukleotid ist, enthält. Die cDNA wird in einer PCR amplifiziert.

cDNA-Erststrangsynthese:

Zur Erststrangsynthese wurde die poly(A)⁺-mRNA (3.2.8) aus transfizierten B95-8 Zellen nach Konzentrationsbestimmung (3.2.4) eingesetzt. In einem RNase-freien 0,2 ml-Reaktionsgefäß wurden 3 µl RNA (1 µg), 1 µl 3' SMART CDS Primer II A (10 µM) und 1 µl SMART II A Oligonukleotide (10 µM) zusammengegeben, der Ansatz wurde 2 Minuten bei 70 °C im Thermocycler inkubiert. Nach Zugabe von je 5 µl des Standard-Reaktionsansatzes folgte eine einstündige Inkubation bei 42 °C im Brutschrank. Dem Ansatz wurden 40 µl TE-Puffer zugesetzt und die Reaktion bei 72 °C (7 Minuten) gestoppt. Die synthetisierte cDNA war bei –20 °C bis zu 3 Monate haltbar.

Standard-Reaktionsansatz:

5 x First Strand Buffer	2,0 µl
DDT (20 mM)	1,0 µl
50 x dNTP (10 mM)	1,0 µl
PowerScript Reverse Transkriptase	1,0 µl

TE-Puffer (1 x) :

Tris (1 M)	10 ml	
Na ₂ EDTA (pH 8,0; 0,5 M)	2 ml	→ in 880 ml Aqua dest. lösen → pH auf 8,0 einstellen
Aqua dest.	ad 1000 ml	

Die Lösung wurde autoklaviert.

cDNA-Amplifikation:

Je 10 µl der cDNA aus der Erststrangsynthese wurde zu 90 µl des Standard-Reaktionsansatzes gegeben. Die SMART cDNA-Amplifikation wurde im Thermocycler unter *Hot-Start*-Bedingungen durchgeführt.

Standard-Reaktionsansatz:

10 x Advantage 2 PCR Puffer	10,0 µl
50 x dNTP-Mix (10 mM)	2,0 µl
5' PCR Primer II A (10 µM)	2,0 µl
50 x Advantage 2 Polymerase Mix	2,0 µl
Aqua bidest.	ad 90,0 µl

Der „50 x Advantage 2 Polymerase Mix“ enthält die „TITANIUM™ Taq DNA Polymerase“, eine geringe Konzentration „proofreading Polymerase“ und „TaqStart™ Antikörper“ (1,1 µg/µl).

Bedingungen für die SMART cDNA-PCR

95 °C	1 min	
95 °C	15 s	← x 19
65 °C	30 s	
68 °C	6 min	
4 °C	∞	

3.3.4 Gelelektrophorese

Die Elektrophorese erfolgte auf einem 0,8 %igem TAE-Gel (3.2.11). Nach photometrischer Konzentrationsbestimmung (3.2.4) wurden je 10 µg der amplifizierten cDNA (3.3.3) eingesetzt und mit 1/10 Volumen Farbmaler (3.2.11) gemischt in die Geltaschen gegeben. Die Elektrophorese erfolgte für etwa 1,5 Stunden in 1 x TAE-Puffer (3.2.11) bei einer

Spannung von 5 V/cm Elektrodenabstand. Zusätzlich wurde ein DNA-Größenstandard (3.2.11) aufgetragen. Nach der Gelelektrophorese wurde das Gel durch die „BioDoc Analyze Camera“ (Biometra) und digitale Speicherung dokumentiert. Als Maßstab für die spätere Größenabschätzung von Banden auf dem Röntgenfilm diente ein angelegtes Lineal.

3.3.5 Vakuumblot

Nach der elektrophoretischen Trennung und Dokumentation der Banden wurde das Gel 20 Minuten in 20 x SSC äquilibriert, dann unter Schwenken 15 Minuten in Fragmentierungslösung, 45 Minuten in Denaturierungslösung und anschließend 45 Minuten in Neutralisierungslösung inkubiert.

Für den Vakuumblot wurde das „VacuGene™ XL-System“ der Firma Pharmacia Biotech verwendet und wie folgt aufgebaut (Abbildung 3.4): Auf die Blotschale wurde zunächst eine poröse Platte gelegt, darauf die passend zugeschnittene Nylonmembran (Hybond-N⁺ Nylon Transfer Membrane, Amersham Pharmacia Biotech) und darauf eine Maske bzw. Folie, deren Fenster etwas kleiner war als die Membran bzw. das Gel. Auf dieses Fenster wurde das äquilibrierte Agarosegel blasenfrei aufgebracht und mit 20 x SSC überschichtet. An die Blotschale wurde eine Vakuumpumpe angeschlossen. Danach wurde 1,5 Stunden mit einem Vakuum von 50 - 60 mbar geblottet. Hierbei wurde die cDNA auf die Nylonmembran übertragen.

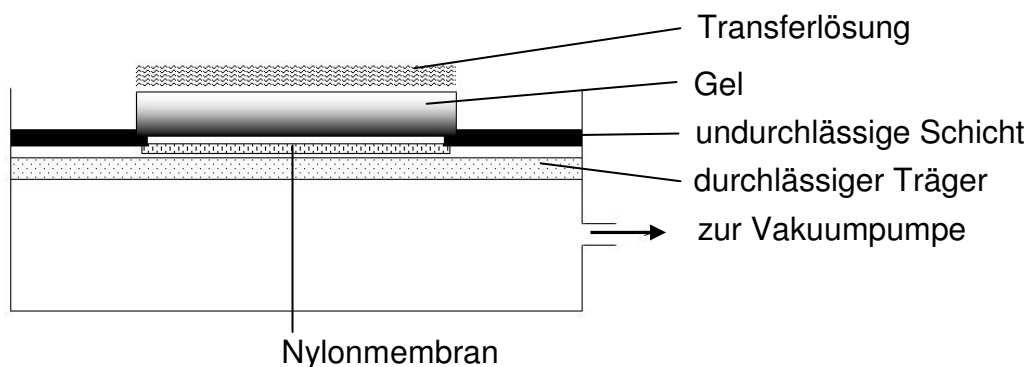


Abbildung 3.4: Schematische Darstellung einer Vakuumblot-Apparatur

Nach dem Blot wurde die Höhe der Slots auf der Nylonmembran markiert und das Gel verworfen. Die Membran wurde 10 Minuten in 5 x SSC geschwenkt. Anschließend wurde die cDNA durch UV-Crosslinking (UV-Stratalinker™ 2400, Stratagene) und Backen auf der Membran fixiert (siehe 3.3.2).

SSC (20 x):

NaCl	173,3 g	
Natriumcitrat Dihydrat	88,2 g	→ in 880 ml Aqua dest. lösen
		→ pH auf 7,0 einstellen
Aqua dest.	ad 1000 ml	

Fragmentierungslösung (0,25 M HCl):

HCl (37 %)	12,3 ml
Aqua dest.	ad 500 ml

Denaturierungslösung :

NaOH (0,5 M)	10 g
NaCl (1,5 M)	43,8 g
Aqua dest.	ad 500 ml

Neutralisierungslösung :

Tris (1 M)	60,6 g	
NaCl (1,5 M)	43,8 g	→ in 450 ml Aqua dest. lösen
		→ pH auf 7,0 einstellen
Aqua dest.	ad 500 ml	

3.3.6 Prähybridisierung und Hybridisierung

Die Nylonmembran mit der fixierten cDNA wurde mit 20 ml 42 °C warmem Hybridisierungspuffer „Dig Easy Hyb“ (Roche) in eine Hybridisierungsröhre gegeben und 1 bis 4 Stunden bei 42 °C prähybridisiert. Währenddessen wurde die Digoxigenin-markierte Sonde bei erster Verwendung 5 Minuten bei 95 °C in 1 ml „Dig Easy Hyb“ (Roche) denaturiert und anschließend in 8 ml frischen, 42 °C warmen Hybridisierungspuffer aufgenommen. Bei Wiederverwendung einer Sonde wurde der bei -20 °C gelagerte Hybridisierungsansatz (DIG-Sonde in 8 ml Dig Easy Hyb) aufgetaut und 10 Minuten bei 68 °C im Wasserbad denaturiert. Die Konzentration der Sonden für Hybridisierungsreaktionen sollte laut Herstellerangaben bei mindestens 5 ng/ml liegen.

Nach der Prähybridisierung wurde der Hybridisierungspuffer gegen die denaturierte, in Hybridisierungspuffer aufgenommene Sonde ausgetauscht. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 42 °C im Hybridisierungssofen.

3.3.7 Waschschritte und Immundetektion

Nach der Hybridisierung wurde die Nylonmembran bei Raumtemperatur zweimal 5 Minuten in 2 x SSC; 0,1 % SDS (w/v) gewaschen. Um unspezifisch gebundene Sondenmoleküle zu entfernen, wurde die Membran anschließend zweimal 15 Minuten bei 65 °C mit 0,1 x SSC; 0,1 % SDS (w/v) inkubiert.

Danach folgte die Detektion unter Verwendung des „Dig Wash and Block Buffer Set“ (Roche) nach Herstellerangaben. Die Membran wurde in Waschpuffer gewaschen und mit „Blocking Solution“ inkubiert, um unspezifische Bindungen abzusättigen. Das „Anti-Dig-AP-Konjugat“ (Dig Luminescent Detection Kit for Nucleic Acids, Roche) wurde 1:1000 (v/v) mit 20 ml Maleinsäure verdünnt. Darin wurde die Membran 30 Minuten unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurde sie zur Entfernung unspezifisch gebundener Antikörper gewaschen. Die Membran wurde in Detektionspuffer äquilibriert und mit dem Substrat CSPD (Dig Luminescent Detection Kit for Nucleic Acids, Roche), welches zuvor 1:100 (v/v) mit Detektionspuffer verdünnt wurde, in eine Plastikfolie eingeschweißt.

Abschließend wurde die eingeschweißte Membran auf einen Röntgenfilm gelegt, dieser 20 Minuten bis 1,5 Stunden bei Raumtemperatur exponiert und dann entwickelt (Röntgenfilmentwickler T-6 Processor, Cronex®).

3.3.8 Wiederverwendung der Membran

Für Hybridisierungen eingesetzte Membranen können mehrfach verwendet werden, wenn es gelingt, die gebundene Sonde vollständig zu entfernen.

Dazu wurde die Membran bei 37 °C für 2 x 15 Minuten in 0,2 M NaOH leicht schwenkend inkubiert und anschließend in 2 x SSC äquilibriert. Danach konnte sie entweder erneut zur Hybridisierung eingesetzt werden oder in 2 x SSC in eine Folie eingeschweißt bei 4 °C gelagert werden.

3.4 Bestimmung der DNA-Syntheserate

Die Zellvermehrung ist mit der Replikation genomischer DNA verbunden, so dass die DNA-Neusynthese sowohl als Parameter für die Zellproliferation als auch für die Regulation der DNA-Synthese verwendet werden kann.

Um die DNA-Syntheserate zu bestimmen, wurde ein „Cell Proliferation ELISA“ (Roche) nach Herstellerangaben durchgeführt. Das Verfahren beruht auf dem Einbau von 5-Bromo-2'-Deoxyuridin (BrdU) in die genomische DNA sich teilender Zellen. Das BrdU kann immunserologisch detektiert werden.

Dazu wurden transfizierte und unbehandelte B95-8 Zellen (1×10^5 Zellen pro Ansatz) für 2 Stunden mit „BrdU-labeling Lösung“ (Roche) versetzt. Nach Entfernung des Kulturmediums wurden die Zellen fixiert und die DNA durch Zugabe der Lösung „FixDenat“ (Roche) denaturiert. Der Nachweis von BrdU erfolgt mit einem spezifischen, POD markierten Antikörper. Nach mehreren Waschschritten wurde das POD-Substrat zugegeben und bis zur deutlichen Färbung 5 - 30 Minuten inkubiert. Nach Stoppen der Reaktion durch 1 M Schwefelsäure wurde die Absorption in einen Mikroplatten-Scanning-Spektrophotometer bei 450 nm (Referenzwellenlänge: 690 nm) bestimmt (Power Wave 200™, Biotek Instruments®).

3.5 Immunfluoreszenz-Test

Die Identifizierung von EBV-kodierten Antigenen (z.B. Early Antigen) in infizierten Zellen erfolgte mittels Immunfluoreszenz. Es kam die indirekte Immunfluoreszenz (IFT) zur Anwendung.

Der IFT beruht auf der spezifischen Bindung von Antikörpern an Antigene. Dabei bindet zunächst ein primärer Antikörper an das spezifische Antigen. Ein sekundärer Antikörper, der mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert ist, bindet an den primären Antikörper. Unter Anregung mit UV-Licht (519 nm) stellen sich die spezifisch erkannten Antigene apfelgrün dar. Die Auswertung erfolgte mit dem Fluoreszenzmikroskop (Axioskop, Zeiss).

Die pcDNA-AHCY und pcDNA-3.1 E transfizierten B95-8 Zellen, die Positiv-Kontrolle (B95-8) und die Negativ-Kontrolle (BJAB) wurden bei 1.600 rpm 5 Minuten (Labfuge, Heraeus Christ) zentrifugiert. Dabei wurden pro Ansatz 1×10^5 Zellen verwendet. Nach zwei Waschschritten in je 1 ml PBS wurden die Zellen in ca. 50 µl PBS aufgenommen. In einen mit absolutem Ethanol entfetteten Spezialobjektträger wurden pro Vertiefung 10 µl Zellsuspension gegeben. Die Zelldichte wurde anschließend mikroskopisch kontrolliert. Hierbei sollten die Zellen dicht zusammenliegen, jedoch nicht überlappen. Die Zellsuspension auf dem Objektträger wurde nun bei 37 °C für 30 Minuten getrocknet und anschließend 10 Minuten in eiskaltem Aceton bei -20 °C fixiert. Nachdem der Objektträger anschließend an der Luft getrocknet war, wurde der Primärantikörper auf die fixierten Zellen gegeben. Der Objektträger wurde bei 37 °C 30 Minuten in einer feuchten Kammer inkubiert und dann 3 x 5 Minuten in PBS leicht schwenkend gewaschen, um nicht gebundene Antikörper zu entfernen. Nun wurde der FITC-markierte Sekundärantikörper auf die Zellen gegeben. Nach weiteren 30 Minuten Inkubation bei 37 °C in einer feuchten Kammer wurde der Objektträger

abermals 3 x 5 Minuten in PBS gewaschen. Beim letzten Waschschrift wurde 50 µl Kontrastfarbstoff „Evans Blue“ (Sigma) zugegeben. Der Objektträger wurde anschließend mit Anti-Fading-Reagenz eingedeckt und bis zur Auswertung bei –20 °C im Dunkeln gelagert.

Zur besseren quantitativen Auswertung wurde die Anzahl der EA-D positiven B95-8 Zellen, die mit pcDNA-3.1 E transfiziert worden waren, gleich 1 gesetzt und die Anzahl der EA-D positiven B95-8 Zellen, welche mit pcDNA-AHCY transfiziert worden waren, auf diese Zahl normiert. Als Beispiel: 70 EA-D positive Zellen bei den mit pcDNA-3.1 E transfizierten B95-8 Zellen und 175 EA-D positive Zellen bei den mit pcDNA-AHCY transfizierten B95-8 Zellen. Normiert würde es dann heißen: Anzahl der EA-D positiven Zellen bei den mit pcDNA-3.1 E transfizierten B95-8 Zellen zu Anzahl der EA-D positiven Zellen bei den mit pcDNA-AHCY transfizierten B95-8 Zellen 1: 2,5.

$$\text{Überexpressionsfaktor} = \frac{\text{EA-D positive pcDNA-AHCY transfizierte Zellen}}{\text{EA-D positive pcDNA-3.1 E transfizierte Zellen}}$$

Anti-Fading-Reagenz:

p-Phenylendiamin	0,1 % (w/v)	100 mg
Glycerin	90 % (v/v)	90 ml
PBS (pH 7,2)	10 % (v/v)	10 ml
Bicarbonat-Puffer (0,5 M, pH 9,0)		ad pH 8,0

PBS:

NaCl	8,00 g	
KCl	0,20 g	
NaHPO ₄	1,44 g	
KH ₂ PO ₄	0,24 g	
Aqua bidest.	ad 1000 ml	→ pH auf 7,4 einstellen

Primärantikörper:

Anti-EA-D, Maus, monoklonal	1:500 in PBS
-----------------------------	--------------

Sekundärantikörper:

Anti-Maus IgG-FITC, Kaninchen	1:20 in PBS
-------------------------------	-------------

3.6 Durchflusszytometrie (FACS)

Die Durchflusszytometrie (FACS = fluorescence activated cell sorter) wurde mit einem „FACSCalibur-Analyse-Gerät“ (Becton Dickinson) durchgeführt. Sie dient zur Analyse von Einzelzellen in Suspension auf Grundlage von Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften. Das FACS-Gerät besteht aus einem Flüssigkeitssystem und einem optischen System. Durch das unter Druck stehende Flüssigkeitssystem werden die Zellen mittels eines Trägerstroms mit konstanter Geschwindigkeit einzeln an einem Laser vorbeigeführt. Das auftreffende Licht wird dabei nicht in alle Richtungen gleichzeitig gestreut. Der größte Teil wird entlang des einfallenden Lichtstrahls gestreut und daher als Vorwärtsstreulicht (forward scatter = FSC) bezeichnet. Da kleine Zellen Licht weniger streuen, stellt das Vorwärtsstreulicht in erster Linie ein Maß für die Zellgröße dar. Das im rechten Winkel zum einfallenden Licht gestreute Licht hängt hauptsächlich von der Granularität der Zelle ab und wird als Seitwärtsstreulicht (side ward scatter = SSC) bezeichnet. Darüber hinaus kann der Laser an Antikörper gebundene Chromogene zur Aussendung von Lichtquanten anregen. Dazu werden an verschiedene Oberflächenmoleküle der Zelle spezifische Antikörper gebunden, die mit verschiedenen Fluoreszenzstoffen markiert sind. Der hier verwendete FACSCalibur erlaubt durch einen zusätzlichen Argonlaser eine gleichzeitige Analyse von vier verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen.

Zur Analyse der Expression von Oberflächenmolekülen wurden pcDNA-AHCY und pcDNA-3.1 E transfizierte B95-8 Zellen (3.2.13) 5 Minuten bei 1.600 rpm (Labfuge, Heraeus Christ) durch Zentrifugation angereichert. Das Pellet wurde zweimal in je 1 ml sterilfiltriertem PBS gewaschen und in 850 µl sterilfiltriertem PBS aufgenommen. In FACS-Analyse-Röhrchen wurden die Antikörper vorgelegt (Mengenangaben erfolgten laut Hersteller). In die Röhrchen wurden nun jeweils 200 µl der in PBS suspendierten Zellen gegeben. Nach Mischen (Vortexer, Heidolph) wurden die Ansätze für 15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln zur Antikörperbindung inkubiert. Zum Entfernen ungebundener Antikörper wurde den Ansätzen schließlich je 2 ml sterilfiltriertes PBS zugesetzt und die Lösung bei 1.300 rpm (Labfuge, Heraeus Christ) zentrifugiert. Die Zellpellets wurden in 200 µl PBS aufgenommen und bis zur Messung bei 4 °C im Dunkeln gelagert. Die Messung im FACSCalibur (Becton Dickinson) erfolgte nach Einstellung der angegebenen Antikörperkombinationen bis zur Akkumulation von 50.000 Ereignissen.

Die Auswahl der zu untersuchenden Oberflächenantigene ergab sich aus Voruntersuchungen, bei denen normale B-Lymphozyten mit dem EBV infiziert worden waren und so eine Primärinfektion ausgelöst wurde [SCHAAD *et al.*, 1999]. Folgende Oberflächenantigene wiesen eine verstärkte Aktivität auf: CD11a, CD19, CD23, CD30, CD40, CD44, CD54 und CD58.

Tabelle 3.1: In der FACS-Analyse untersuchte Oberflächenantigene und ihre Funktion

Oberflächenantigen	Funktion
CD11a	- A ^L -Untereinheit von LFA-1 - bindet CD54, ICAM-2, ICAM-3
CD19	- bildet Komplex mit CD21 - Korezeptor für B-Zellen
CD23	- reguliert IgE-Synthese - Ligand für CD19, CD21, CD81
CD30	- Vernetzung von CD30 verstärkt die Proliferation von B- und T-Zellen
CD40	- fördert Wachstum, Differenzierung und Isotypenwechsel von B-Zellen
CD44	- bindet Hyaluronsäure - vermittelt die Adhäsion von Leukozyten
CD54	- Interzelluläres Adhäsionsmolekül - bindet CD11a/CD18 und CD11b/CD18
CD58	- Adhäsionsmolekül - bindet CD2

3.7 Western Blot

Mittels Western Blot-Analyse können gelelektrophoretisch aufgetrennte und auf eine Membran transferierte Proteine spezifisch nachgewiesen und dargestellt werden.

Die Proteinproben (3.7.1), die gegebenenfalls konzentriert worden waren (3.7.3), wurden entsprechend ihres Molekulargewichtes durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (3.7.4) aufgetrennt. Nach dieser Auftrennung fand eine Übertragung auf eine PVDF-Membran statt. Das Zielprotein konnte immunologisch durch Bindung eines Primärantikörpers nachgewiesen und detektiert werden.

3.7.1 Proteinisolierung aus eukaryontischen Zellen

Die Proteinisolierung aus Zellsuspensionen erfolgte durch das „M-PERTM Mammalian Protein Extraction Reagent“ (Pierce). Bei dieser Substanz handelt es sich um 25 mM Bicin-Puffer

(pH 7,6), der eine schnelle und effiziente Lyse unter schonenden Bedingungen durch Einsatz möglichst geringer Mengen an Detergenz erlaubt.

Die pcDNA-AHCY und pcDNA-3.1 E transfizierten Zellen (3.2.13) wurden in einem Eppendorf-Gefäß für 10 Minuten bei 2.500 x g abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Nach Waschen des Pellets mit 1 ml PBS wurden 250 µl „M-PER™ Mammalian Protein Extraction Reagent“ zugegeben. Die Lösung wurde nun für 10 Minuten leicht schüttelnd bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Zellreste durch Zentrifugation bei 27.000 x g 15 Minuten sedimentiert und der proteinhaltige Überstand in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt. Die Lösung wurde bei -20 °C aufbewahrt.

3.7.2 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Die Proteinkonzentration wurde mit Hilfe des „Bradford-Reagent“ (Sigma) bestimmt. Proteine bilden mit dem Reagenz einen Farbstoff-Komplex, der bei 565 bis 595 nm ein Absorptionsmaximum hat. Die Absorption ≤ 1 ist proportional zu der Konzentration der Proteine in der Lösung. Es wurde ein Micro-Assay durchgeführt, mit dem Proteinkonzentrationen von 1 – 10 µg/ml erfasst werden können. Aus einer Albuminlösung wurde eine Standardreihe mit den Proteinkonzentrationen von 1 – 10 µg/ml hergestellt. Dabei wurden 1 ml Lösung pro Standardverdünnung und 1 ml Wasser für den Referenzwert in eine Küvette gegeben. Die zu testenden Proben (3.7.1) wurden in Wasser verdünnt (10 µl in 1 ml Aqua bidest.) und ebenfalls in Küvetten überführt. In jede Küvette wurde anschließend 1 ml Bradford-Reagenz gegeben. Die Lösung wurde gründlich gemischt und bei Raumtemperatur 5 - 60 Minuten inkubiert. Abschließend wurden die Proben in einem Spektrophotometer (Ultrospec III, Pharmacia Biotech) bei 595 nm Wellenlänge gemessen. Die Proteinkonzentration wurde über die Kurve ermittelt.

3.7.3 Konzentrieren einer Proteinlösung

Lösungen mit einem Proteingehalt < 200 µg/ml wurden mittels „Microcon® Centrifugal Filter Devices“ (Amicon Bioseparations) konzentriert. Das System beruht auf einer leicht bindenden, anisotropen, hydrophilen Cellulose-Membran. Dazu wurde der Microcon®-Einsatz (YM-10; 10.000 NMWL), der die Membran enthält, in ein Eppendorf-Gefäß gegeben. Es wurden maximal 0,5 ml Proteinlösung (3.7.1) in den Einsatz gefüllt, das Eppendorf-Gefäß wurde verschlossen und 30 Minuten bei 14.000 x g abzentrifugiert. Anschließend wurde der Einsatz entnommen, umgedreht in ein neues Eppendorf-Gefäß gegeben und 3 Minuten bei

1.000 x g zentrifugiert. Nach diesem Schritt konnte das Residuum auf ein Endvolumen von 50 µl aufgefüllt werden.

3.7.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Polyacrylamid entsteht durch eine radikal-induzierte Polymerisation aus Acrylamid und N,N'-Methylenbisacrylamid. Die freien Radikale entstehen durch den chemischen Zerfall von Ammoniumpersulfat. Zur Stabilisierung der freien Radikale wurde N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) hinzugefügt. Die physikalischen Gegebenheiten des Gels und seine Porengröße werden durch das Mengenverhältnis der Komponenten zueinander bestimmt.

Ammoniumpersulfat wurde bei -20 °C gelagert und durfte erst kurz vor Gebrauch aufgetaut werden. Alle anderen Lösungen konnten sterilfiltriert bei 4 °C gelagert werden.

Acrylamid-Stammlösung:

Acrylamid (2x)	(w/v)	30 %
Bisacrylamid (2x)	(w/v)	0,8 %

Trenngel-Puffer:

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

Sammelgel-Puffer:

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

Ammoniumpersulfat:

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

Elektrophorese-Puffer:

Tris		0,25 M	60,55 g
Glycin		1,9 M	285,27 g
SDS	(w/v)	1,0 %	20 g
Aqua bidest.			ad 2.000 ml

Proben-Puffer (denaturiert, 2 x):

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

Für die Auftrennung der Proteinlösung wurde ein 13 %iges Polyacrylamidgel (PAA) verwendet.

Sammelgel (5 %):

Acrylamidstammlösung	2,5 ml
Sammelgel-Puffer	3,75 ml
TEMED	15 µl
1 % Bromphenolblau	100 µl
Aqua bidest.	8,7 ml
Ammoniumpersulfat	75 µl

Trenngel (13 %):

Acrylamidstammlösung	2,5 ml
Trenngel-Puffer	9,4 ml
TEMED	30 µl
1 % Bromphenolblau	50 µl
Aqua bidest.	11,64 ml
Ammoniumpersulfat	250 µl

Die Trenngelmischung wurde unter leichtem Schwenken 2 Minuten mit einer Wasserstrahlpumpe entgast, bis keine Luftbläschen mehr aufstiegen. Anschließend wurde durch Zugabe von Ammoniumpersulfat der Polymerisierungsprozeß gestartet. Das Gemisch wurde in die Gelkammer (Gelgröße 7 x 9 cm, Schichtdicke 0,75 mm) gegossen und danach die Oberfläche des Gels mit 1 ml Methanol überschichtet, um einen Luftabschluss zu erreichen und eine glatte Oberfläche zu erhalten. Nach etwa 30 Minuten war das Gel fest und das Methanol konnte abgegossen werden.

Die Sammelgellösung wurde ebenfalls entgast. Nach Zugabe des Ammoniumpersulfat wurde das Sammelgel auf das polymerisierte Trenngel gegossen. Der geeignete Gelkamm wurde eingesteckt. Nach 20 Minuten war die Polymerisation beendet und die fertigen Gele konnten aus dem Behälter genommen werden. Für eine längerfristige Aufbewahrung wurden die Gele in feuchtes Papier eingeschlagen, um eine Austrocknung zu verhindern, und bei 4 °C gelagert.

Die Gelplatten wurden vorsichtig mit Wasser abgewaschen, um Gelrückstände abzulösen und dann in die Elektrophoresekammer eingesetzt. Die Anoden- und Kathodenkammer wurden mit 1 x Elektrophorese-Puffer befüllt und die Kämme vorsichtig entfernt.

Die auf normierte Menge eingestellte Proteinlösung (3.7.2) wurde 1:1 mit Proben-Puffer (2 x) sowie 10 % Dithiothreitol (DTT) versetzt. Die Lösung wurde für 10 Minuten bei 95 °C denaturiert und mittels einer Hamilton-Spritze in die Probestaschen eingefüllt. Auf jedem Gel wurden 15 µl eines „RainbowTM coloured protein molecular weight marker” (Amersham Pharmacia Biotech) als Größenstandard aufgetragen. Der Marker wurde dabei genau wie die Proben mit Proben-Puffer (2 x) sowie DTT versetzt und denaturiert.

Die Elektrophorese lief 2 Stunden bei 18 mA/Gel, bis die Bromphenolblaufront aus dem unteren Rand des Gels austrat. Die Glasplatte wurde vorsichtig mit einem Skalpell abgelöst und die Abstandhalter entfernt. Das Gel konnte nun geblottet werden.

3.7.5 Elektro-Transfer

Nach der SDS-PAGE (3.7.4) wurden die Proteine mittels eines elektrophoretischen Transfers, dargestellt in Abbildung 3.5, auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF) überführt. Dazu wurde das Gel auf eine mit Methanol angefeuchtete „PVDF Western Blotting Membrane” (Roche) gelegt. Gel und Membran wurden auf beiden Seiten mit Whatman-Papier und einer grobporösen Schaumstoffmatte zum Schutz bedeckt und in eine Transferkassette eingespannt.

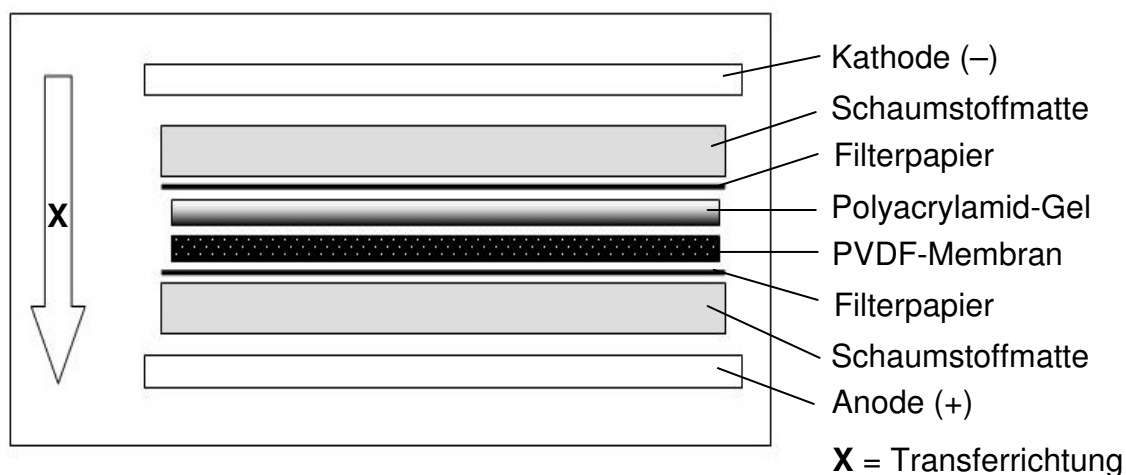


Abbildung 3.5: Schematische Darstellung einer Elektro-Blot-Apparatur

Die Kassette wurde in den mit Blot-Puffer gefüllten und auf 14 °C gekühlten Elektro-Blot-Tank gegeben. Dabei war darauf zu achten, dass die PVDF-Membran in Richtung Anode lag. Der Blot erfolgte für 16 Stunden bei 25 V.

3.7.6 Immun-Färbung

Um unspezifische Bindungsstellen auf der Membran zu blockieren, wurde die Membran für 30 Minuten in PBS + 10 % FKS leicht schwenkend inkubiert. Es folgte eine einstündige Inkubation mit dem Primärantikörper, der gegen das Zielprotein gerichtet war. Die Inkubation fand leicht schwenkend in einer Petrischale statt. Die Membran wurde nun zur Entfernung unspezifisch gebundener Antikörper 3 x 5 Minuten in Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurde der enzymgekoppelte (POD) Sekundärantikörper auf die Membran gegeben. Die Inkubation erfolgte wiederum leicht schwenkend für 1 Stunde. Nach zwei weiteren Waschschritten von je 5 Minuten wurde das POD-Substrat zugegeben. Die über Antikörper an das Protein gebundene Peroxidase (POD) spaltet das Substrat Diaminobenzidinhydrochlorid unter Bildung hochreaktiver Sauerstoffradikale, die ihrerseits bestimmte Chromogene oxidieren können. Die dabei auftretende Farbentwicklung ist sichtbar und quantifizierbar. Nach Visualisierung der Proteinbanden wurde die Reaktion durch 5-minütiges Waschen in Aqua bidest. gestoppt.

Dokumentation und digitale Speicherung der Membran erfolgte durch die „BioDoc Analyze Camera“ (Biometra). Die Bandenstärke (Dichte) konnte mit Hilfe des Programms „Quantity One“ (BIO RAD Laboratories) ermittelt werden.

Primärantikörper:

Anti-phospho-PKC α , Kaninchen polyclonal IgG	1:500 in PBS + 10 % FKS
--	-------------------------

Sekundärantikörper:

Schwein-anti-Kaninchen-IgG, HRP	1:1000 in PBS + 10 % FKS
---------------------------------	--------------------------

Waschpuffer:

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

PBS⁻:

KH ₂ PO ₄ (0,2 M)	2 mM (v/v)	
Na ₂ HPO ₄ (0,2 M)	9 mM (v/v)	
NaCl	180 mM (w/v)	
Aqua bidest.	ad 1000 ml	➔ pH auf 7,2 einstellen

POD-Substrat:

Diaminobenzidinhydrochlorid-Lösung	4 % (w/v)
Wasserstoffperoxid	3 % (v/v)
PBS ⁻	ad 100 ml

Bei 4 °C einige Tage haltbar.

Diaminobenzidinhydrochlorid-Lösung:

Diaminobenzidinhydrochlorid	4 g
PBS ⁻	ad 100 ml

In 1 ml Aliquots bei -20 °C gelagert.

4 Ergebnisse

Die Aktivität von s-Adenosylhomocystein-Hydrolase (SAH) war als wichtiger Faktor für die durch Makrophagen getriggerte LM1 induzierte Reaktivierung von EBV in Burkitt-Lymphom Zellen erkannt worden.

Im Folgenden wird die Transfektion von SAH und die Wirkung des Enzyms nach Überexpression in B95-8 Zellen beschrieben. In Abbildung 4.1 ist schematisch die Abfolge der Experimente und Ergebnisse dargestellt.

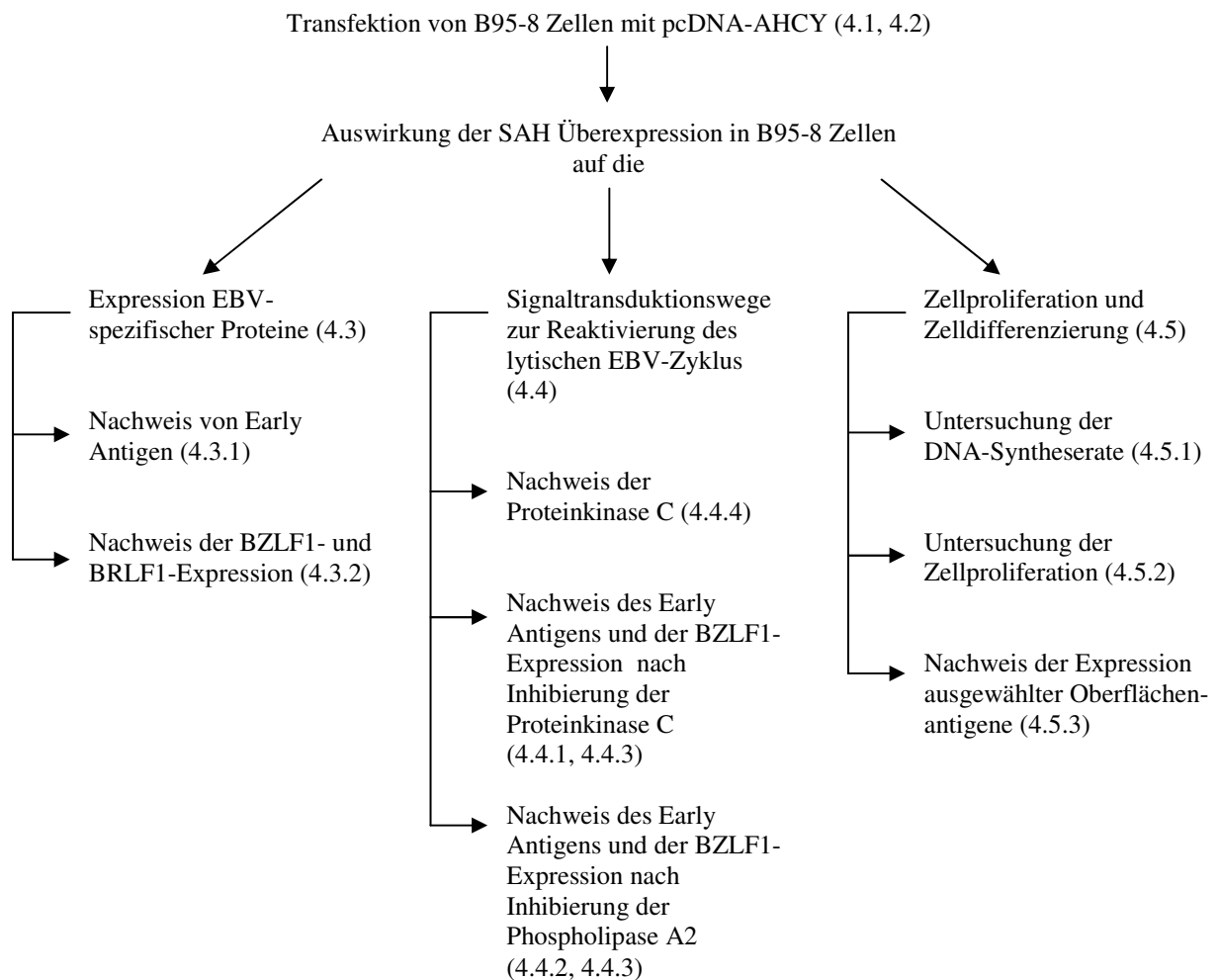


Abbildung 4.1: Übersicht über die Experimente und Ergebnisse

4.1 Identität des Vektors pcDNA-AHCY

Um die korrekte Insertion des Gens für die s-Adenosylhomocystein-Hydrolase (SAH) im Expressionsvektor pcDNA-AHCY nachzuweisen, wurde Plasmid-DNA mittels der Restriktionsendonukleasen Bam HI und Xho I gespalten (3.2.6). Die entsprechende Plasmid-DNA wurde durch eine Plasmid-Präparation rekombinanter *E. coli* Kulturen gewonnen (3.1.1; 3.2.1).

Bei ‚Sense‘-Orientierung des Inserts waren Fragmente in einer Größe von 575 bp und 3098 bp zu erwarten, bei ‚Antisense‘-Orientierung Fragmente in einer Größe von 869 bp und 2804 bp. Abbildung 4.2 zeigt den rekombinanten Klon nach Restriktion und Trennung in einem 1,5 %igen TBE-Agarosegel (3.2.11).

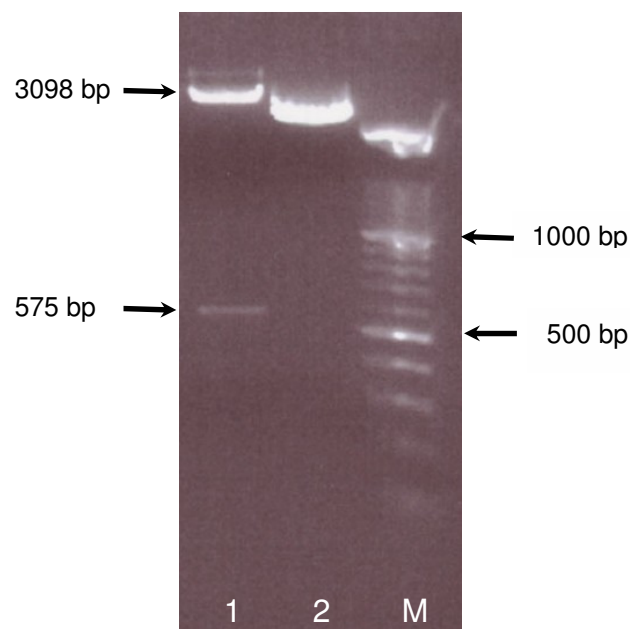


Abbildung 4.2: Agarose-Gelelektrophorese nach Spaltung von pcDNA-AHCY und pcDNA-3.1 E mit den Restriktionsenzymen Bam HI und Xho I. M: 100 bp Marker; 1: pcDNA-AHCY; 2: pcDNA-3.1 E

Wie in Abbildung 4.2 dargestellt, weist die Negativ-Kontrolle pcDNA-3.1 E (Spur 2) nach Restriktionsanalyse eine Bande bei ca. 3000 bp in der Agarose-Gelelektrophorese auf. Beim Vektor pcDNA-AHCY (Spur 1) sind zwei Banden bei etwa 575 bp und 3100 bp sichtbar. Dieses Bandenmuster entspricht den erwarteten Fragmenten des Gens für SAH in ‚Sense‘-Orientierung. Somit liegt das Gen für SAH im Vektor pcDNA-AHCY in ‚Sense‘-Orientierung vor.

4.2 Nachweis der erfolgreichen Transfektion von B95-8 Zellen mit pcDNA-AHCY und pcDNA-3.1 E

Die Transfektion von B95-8 Zellen mit dem Vektor pcDNA-AHCY erfolgte mit Hilfe von „SuperFect™ Transfection Reagent“ (Qiagen) (3.2.13). Als Kontrolle diente die Transfektion mit dem Vektor pcDNA-3.1 E.

Zum Nachweis der erfolgreichen Transfektion wurde ein und zwei Tage nach der Transfektion mit pcDNA-AHCY oder pcDNA-3.1 E (3.2.13) aus den B95-8 Zellen DNA isoliert (3.2.2). Nur erfolgreich transfizierte B95-8 Zellen enthalten das Gen der Ampicillin-Resistenz (β -Lactamase), welches auf dem Expressionsvektor kodiert ist.

Zur Kontrolle einer erfolgreichen Transfektion wurde eine PCR mit β -Lactamase spezifischen Primern (2.4.1) durchgeführt. Die Amplifikationsprodukte wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese dargestellt. Das erwartete Fragment des β -Lactamase Gens besitzt eine Größe von 420 bp. Als Positiv-Kontrolle wurde pcDNA-AHCY in die PCR eingesetzt.

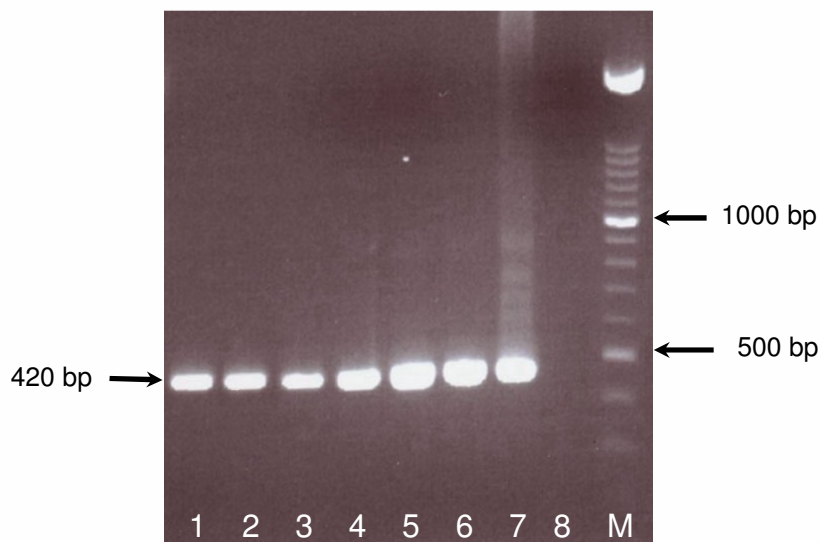


Abbildung 4.3: Agarose-Gelelektrophorese zum Nachweis des Ampicillin-Resistenzgens nach Amplifikation mittels PCR. M: 100 bp Marker; 1 + 3: pcDNA-AHCY transfizierte Zellen nach 1 Tag; 2 + 4: pcDNA-3.1 E transfizierte Zellen nach 1 Tag; 5: pcDNA-AHCY transfizierte Zellen nach 2 Tagen; 6: pcDNA-3.1 E transfizierte Zellen nach 2 Tagen; 7: Positiv-Kontrolle; 8: Negativ-Kontrolle

Abbildung 4.3 zeigt die Amplifikationsprodukte zum Nachweis des β -Lactamase Gens nach Auftrennung in einem 1,5 %igen TBE-Agarosegel (3.2.11). Die Bande der Amplifikate aus den pcDNA-AHCY und pcDNA-3.1 E transfizierten B95-8 Zellen (Spur 1-6) weist in der Agarose-Gelelektrophorese eine Größe von ca. 420 bp auf. Hierbei handelt es sich um das Gen der β -Lactamase. Damit ist die erfolgreiche Transfektion nachgewiesen.

4.3 SAH-Überexpression in B95-8 Zellen

Wie wirkt sich die Überexpression von s-Adenosylhomocystein-Hydrolase (SAH) in B95-8 Zellen auf die Expression EBV-spezifischer Proteine aus?

4.3.1 Nachweis von Early Antigen (EA-D) in pcDNA-AHCY transfizierten B95-8 Zellen

Das EA-D ist ein Produkt des lytischen EBV-Zyklus. Es ist eines der ersten viralen Proteine, die exprimiert werden. Seine Expression kann mittels Immunfluoreszenz nachgewiesen werden. Zellen der Zell-Linie B95-8 wurden mit 4 oder 8 µg pcDNA-AHCY transfiziert (3.2.13). Nach 12 Stunden, ein, zwei und vier Tagen wurde ein Immunfluoreszenz-Test zum Nachweis der EA-D-Expression durchgeführt (3.5). Als Kontrolle wurden pcDNA-3.1 E transfizierte Zellen verwendet. Unbehandelte B95-8 Zellen dienten als Positiv-Kontrolle und EBV Genom negative BJAB Zellen dienten als Negativ-Kontrolle. In Abbildung 4.4 ist der EA-D-Nachweis dargestellt. Zellen, die EA-D exprimieren, weisen eine gelb-grüne Fluoreszenz auf. Bei den Zellen stellt sich die typische Verteilung von EA-D an der Zelloberfläche dar.

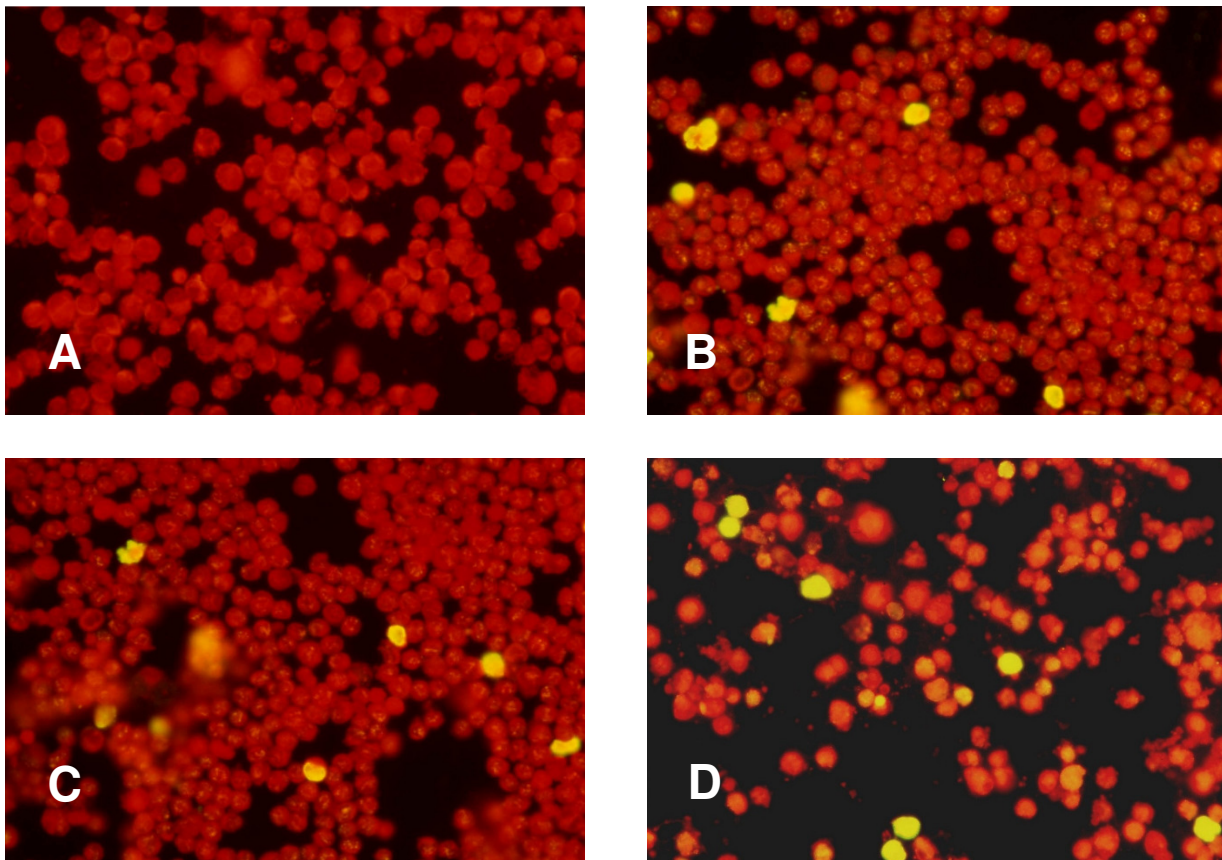


Abbildung 4.4: Nachweis von EA-D mittels indirekter Immunfluoreszenz in ca. 200-facher Vergrößerung A: Negativ-Kontrolle (BJAB-Zellen); B: Positiv-Kontrolle (B95-8 Zellen); C: pcDNA-3.1 E transfizierte B95-8 Zellen; D: pcDNA-AHCY transfizierte B95-8 Zellen

Abbildung 4.5 zeigt den Anstieg der EA-D-Expression in pcDNA-AHCY transfizierten B95-8 Zellen 12 Stunden sowie ein, zwei und vier Tage nach der Transfektion im Vergleich zu Kontrollzellen. Sowohl 12 Stunden als auch ein, zwei und vier Tage nach der Transfektion mit 8 µg pcDNA-AHCY war die Anzahl der positiven Zellen größer als in der Kontrolle mit pcDNA-3.1 E. Bei einer DNA-Menge von 4 µg wurde ein Unterschied in der Reaktivierung des lytischen Zyklus in Bezug auf die Kontrolle nicht festgestellt. Daraufhin wurden für die weiteren Untersuchungen nur noch 8 µg pcDNA-AHCY eingesetzt.

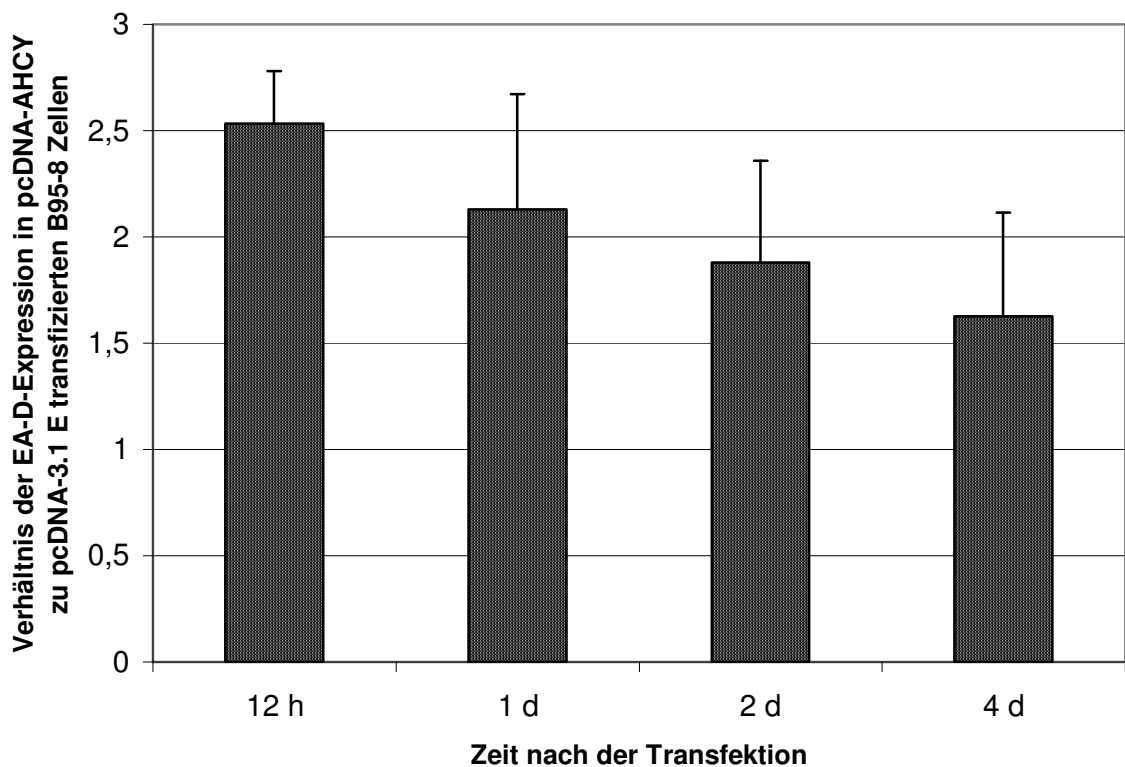


Abbildung 4.5: Relative Zunahme der Expression des EA-D in pcDNA-AHCY transfizierten B95-8 Zellen im Vergleich zu pcDNA-3.1 E transfizierten Kontrollzellen

Es wird deutlich, dass bei einer Transfektion von B95-8 Zellen mit 8 µg DNA pro Ansatz das Maximum der EA-D-Expression 12 Stunden nach der Transfektion erreicht wird. Es ist eine signifikante Erhöhung der Expression um den Faktor 2,5 messbar ($p < 0,05$). In den folgenden Tagen sinkt die Expression stetig ab und liegt am vierten Tag bei 1,6 ($p < 0,05$).

4.3.2 BZLF1- und BRLF1-Expression in pcDNA-AHCY transfizierten B95-8 Zellen

Mit einer durch die s-Adenosylhomocystein-Hydrolase ausgelösten Reaktivierung des lytischen Zyklus müsste auch eine Erhöhung der Transkription der Gene BZLF1 und BRLF1 einhergehen.

Um eine Aktivierung der beiden Gene nach Transfektion mit pcDNA-AHCY in B95-8 Zellen nachzuweisen, wurde zwei und acht Stunden sowie ein, zwei und vier Tage nach der Transfektion RNA aus den Zellen isoliert (3.2.3). Diese wurde in cDNA umgeschrieben (3.2.9) und anschließend in eine BZLF1 bzw. BRLF1 spezifische PCR mit dem LightCycler eingesetzt (3.2.12). Die BZLF1- und BRLF1-Produkte wurden durch Schmelzpunktanalyse identifiziert. In Abbildung 4.6 ist exemplarisch die Schmelzkurve von BZLF1 dargestellt. Der BZLF1 spezifische Schmelzpunkt liegt bei 90°C.

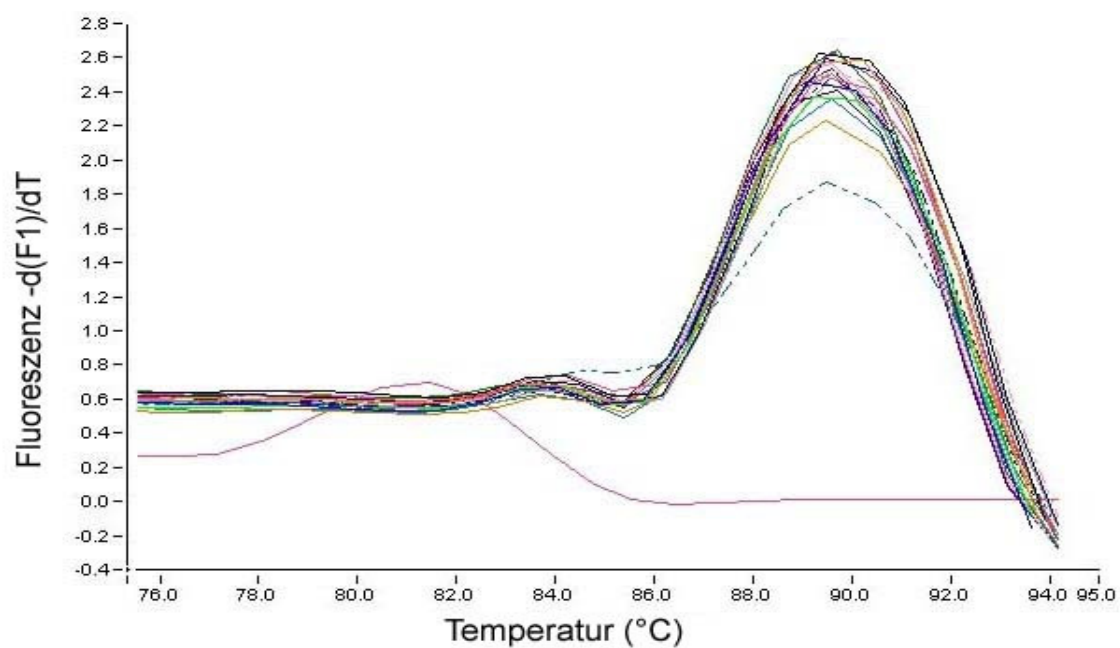


Abbildung 4.6: Schmelzpunktanalyse der BZLF1-Amplifikate mit dem LightCycler

In Abbildung 4.7 wird exemplarisch der Schmelzpunkt von BRLF1 gezeigt. Dieser liegt bei 65 °C.

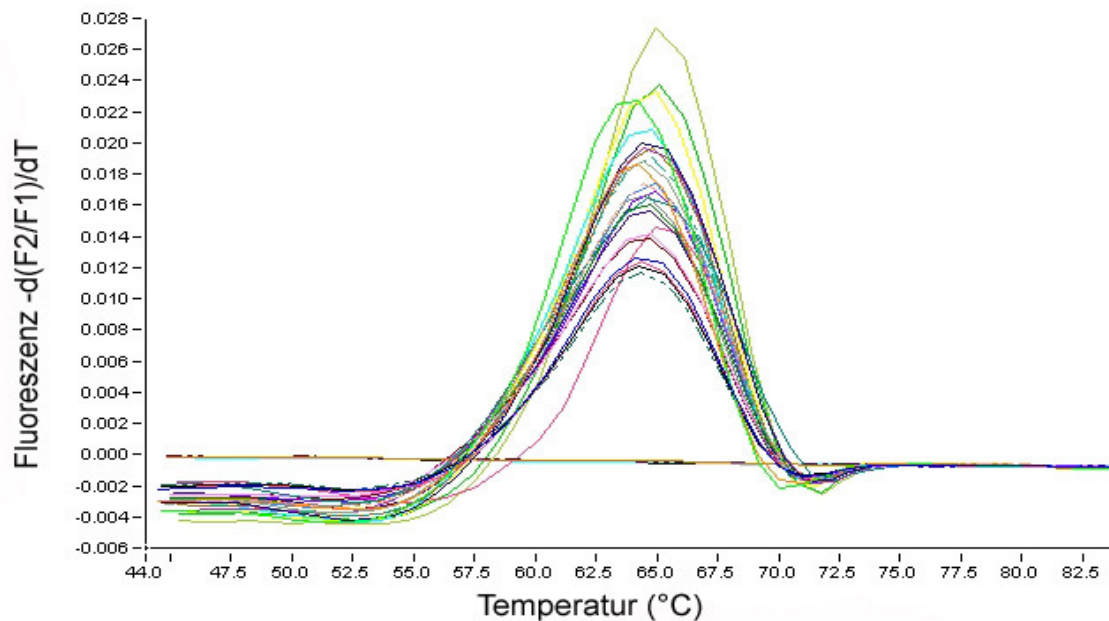


Abbildung 4.7: Schmelzpunktanalyse der BRLF1-Amplifikate mit dem LightCycler

Zur Normierung der Resultate der BZLF1- und der BRLF1-PCR wurde mit den identischen cDNA-Proben eine GAPDH-spezifische PCR im LightCycler durchgeführt (3.2.12). Mit dieser PCR wird die Expression des Haushaltsgens Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase quantitativ erfasst. Der Schmelzpunkt für die GAPDH spezifischen Produkte liegt bei 65 °C (Abbildung 4.8).

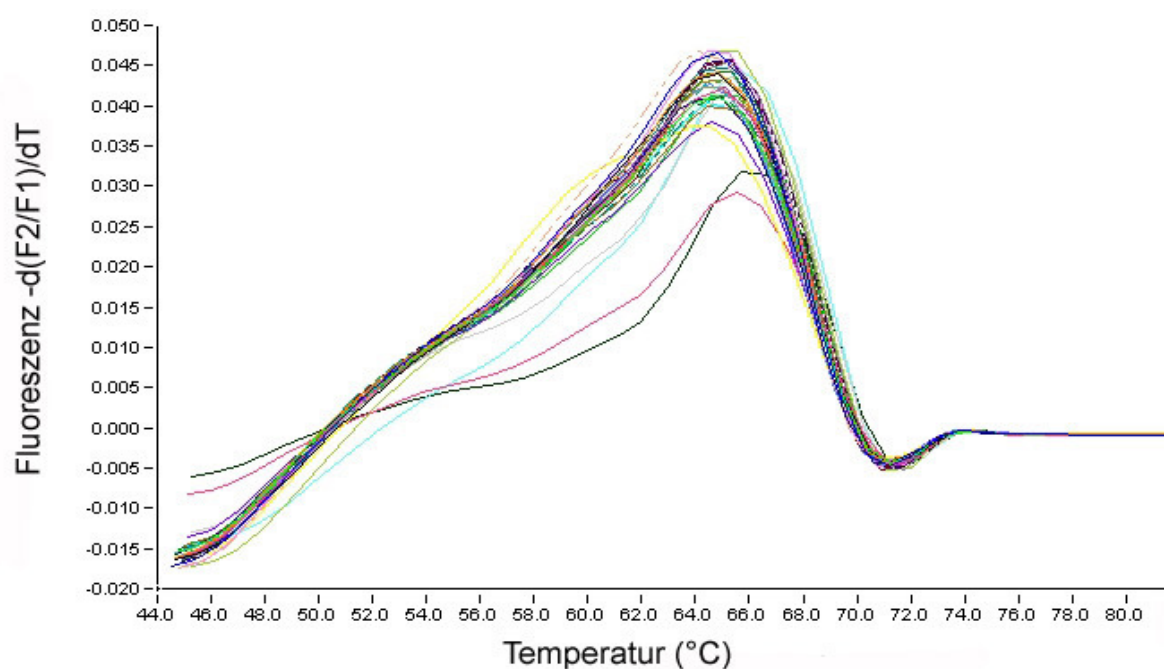


Abbildung 4.8: Schmelzpunktanalyse der GAPDH-Amplifikate mit dem LightCycler

In Abbildung 4.9 ist die Standard-Verdünnungsreihe von GAPDH dargestellt. Dabei ist der Korrelationskoeffizient r exakt bei -1 und der Fehler mit 0.0479 sehr klein.

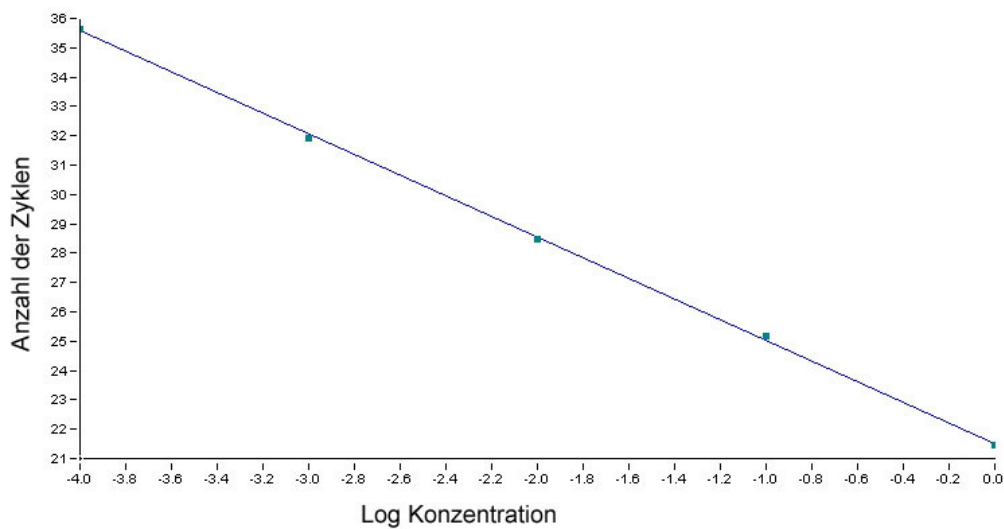


Abbildung 4.9: Verdünnungsreihe von GAPDH für die relative Quantifizierung des GAPDH-Gehaltes von cDNA-Proportionen unbekannter Konzentration. $r = -1.00$

Die erfolgreiche Amplifikation von GAPDH mit dem LightCycler ist in Abbildung 4.10 dargestellt. Dabei zeigen die unterschiedlichen Verdünnungen des Standards einen Übergang der Fluoreszenz in die logarithmische Phase in konstanten Zyklusabständen. Konzentrationen und Farben der Verdünnungsreihe aus B95-8-DNA: dunkelblau (unverdünnt), rot-braun (1:10), grün (1:100), braun (1:1000) und türkis (1:10000). Die konstanten Zeitabstände weisen auf eine exakte Verdünnung hin. Die DNA freie Negativ-Kontrolle (blau dargestellt) wies keinen Fluoreszenzanstieg auf.

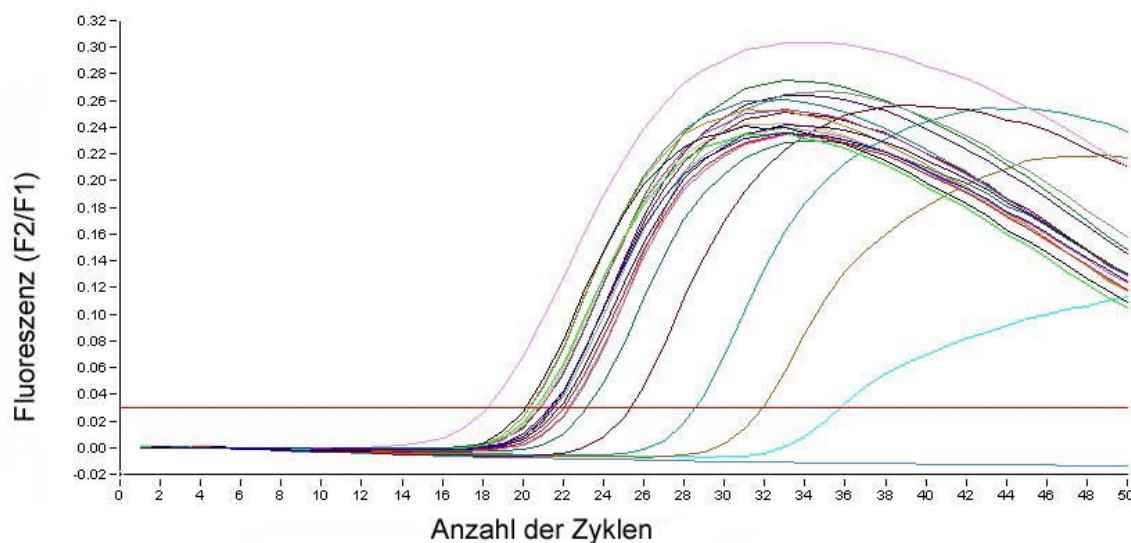


Abbildung 4.10: Zunahme der Fluoreszenzintensität während der Amplifikation von PCR-Produkten mit GAPDH spezifischen Primern

Die BZLF1-Expression normiert auf die GAPDH-Expression im Vergleich zwischen pcDNA-AHCY und pcDNA-3.1 E transfizierten B95-8 Zellen wurde anhand folgender Formel semiquantitativ bestimmt:

$$\text{Überexpressionsfaktor} = \frac{\text{BZLF1 (pcDNA-AHCY)} \times \text{GAPDH (pcDNA-3.1 E)}}{\text{GAPDH (pcDNA-AHCY)} \times \text{BZLF1 (pcDNA-3.1 E)}}$$

In gleicher Weise wurde die BRLF1-Überexpression berechnet. Die Schnittpunkte der Kurven mit der Basislinie als Korrelat der Matrizenkonzentration wurden hierbei von der Software des LightCyclers für alle PCR-Reaktionen ermittelt und die relative Konzentration mit Hilfe der Standardkurve berechnet.

In Abbildung 4.11 ist die Überexpression von BZLF1 und BRLF1 in B95-8 Zellen nach der Transfektion mit 8 µg pcDNA-AHCY zwei und acht Stunden sowie einen, zwei und vier Tage nach der Transfektion dargestellt.

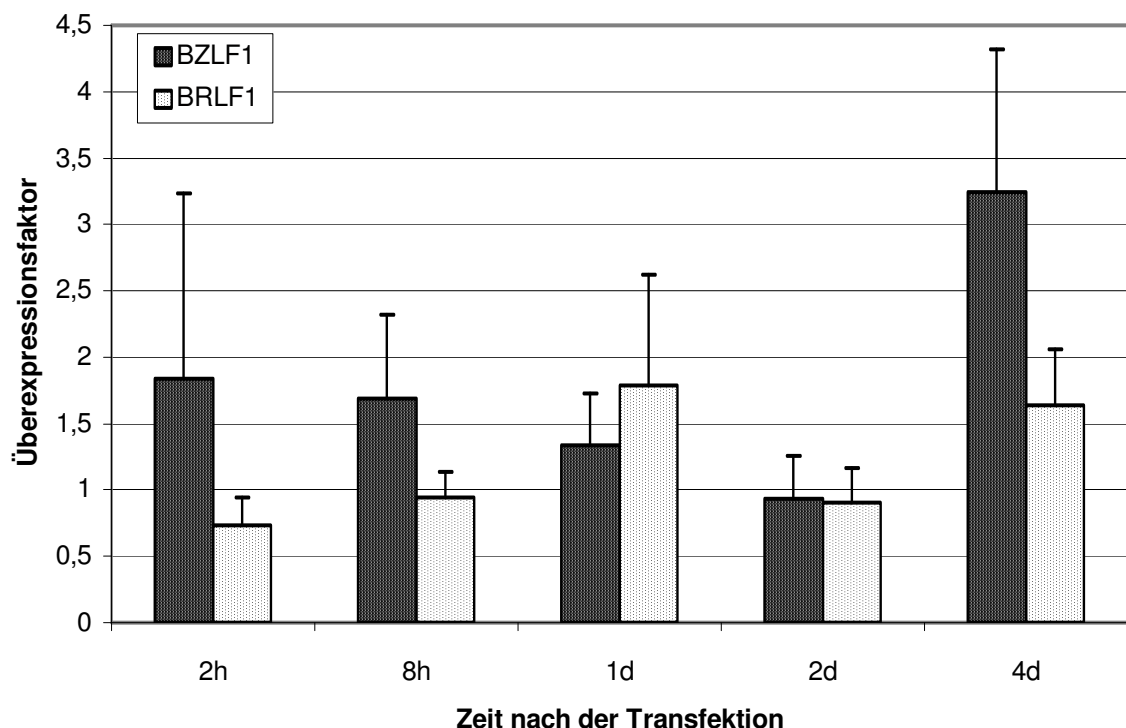


Abbildung 4.11: Überexpressionsfaktor der Gene BZLF1 und BRLF1 in pcDNA-AHCY transfizierten B95-8 Zellen (2h: n = 4; 8h und 4d: n = 5; 1d und 2d: n = 6; n = Anzahl der Versuche)

Die Expression von BZLF1 weist nach zwei Stunden ein erstes Maximum mit einem Anstieg der Expression um den Faktor 1,8 und ein zweites Maximum an Tag vier mit 3,2 auf. Nach

dem Maximum in Stunde zwei sinkt die Expression stetig ab, bis sie am Tag zwei nach der Transfektion ihr Minimum mit einem Faktor von 0,93 erreicht.

Die Expression des Gens BRLF1 zeigt einen biphasischen Verlauf mit einem ersten Maximum am Tag 1 und einem zweiten Maximum am Tag 4. Dabei ist der Faktor der Überexpression von BRLF1 am ersten Tag 1,78 und am vierten Tag bei 1,64.

Es wird deutlich, dass sowohl BZLF1 als auch BRLF1 in mit pcDNA-AHCY transfizierten B95-8 Zellen zu bestimmten Zeiten vermehrt exprimiert werden. Damit ist bestätigt, dass durch SAH eine Reaktivierung des lytischen EBV-Zyklus in B95-8 Zellen ausgelöst wird.

4.4 Signaltransduktion bei der SAH abhängigen Reaktivierung des lytischen Zyklus

Um Einblick in die Signaltransduktion bei der SAH getriggerten Reaktivierung des lytischen Zyklus zu erlangen, wurden zunächst spezifische Inhibitoren für die Proteinkinase C (PKC) und die Phospholipase A2 (PLA2) verwendet, um diese in transfizierten B95-8 Zellen zu hemmen. Der Effekt der Inhibitoren auf die SAH getriggerte EBV-Reaktivierung wurde zum einen durch die Analyse der veränderten Expression des Early Antigens mittels Immunfluoreszenz-Test untersucht, zum anderen durch die Analyse der veränderten Expression des Gens BZLF1 mittels Reversen Northern Blots. Desweiteren wurde geprüft, ob eine Veränderung in der Aktivierung der Proteinkinase C eintritt. Diese Analyse wurde mit Hilfe eines Phospho-PKC spezifischen Antikörpers durchgeführt.

4.4.1 Einfluss von spezifischen Inhibitoren der PKC auf die Expression des EA-D in pcDNA-AHCY transfizierten B95-8 Zellen

Inwieweit SAH auch bei einer Hemmung der PKC in der Lage ist den lytischen Zyklus in B95-8 Zellen zu reaktivieren, wurde mit spezifischen PKC-Inhibitoren geprüft. Bisidolylmaleimid I (GFX) oder H-7 Dihydrochloride (H7) wurden zwei Stunden vor der Transfektion mit pcDNA-AHCY und pcDNA-3.1 E den B95-8 Zellen zugegeben (3.2.14).

Die Expression von EA-D wurde nach 12 und 24 Stunden gemessen. Tabelle 4.1 zeigt die quantitative Auswertung der Expression des Early Antigens bei PKC-Inhibierung mit H-7 Dihydrochloride. Dabei wurden die Werte der Inhibitorversuche auf die Werte der Kontrollgruppe (nur pcDNA-3.1 E transfizierte B95-8 Zellen) normiert.

	Anzahl der EA-D positiven Zellen nach Transfektion	
	12 h	24 h
B95-8 / pcDNA-AHCY + H7	3,37 ± 0,44	1,9 ± 0,09
B95-8 / pcDNA-AHCY	2,53 ± 0,24	1,89 ± 0,14
B95-8 / pcDNA-3.1 E + H7	2,44 ± 0,41	1,27 ± 0,05
B95-8 / pcDNA-3.1 E	1 ± 0,08	1 ± 0,08

Tabelle 4.1: Expression des Early Antigens (EA-D) von transfizierten B95-8 Zellen nach Behandlung mit dem spezifischen PKC-Inhibitor H-7 Dihydrochloride

In pcDNA-AHCY transfizierten B95-8 Zellen wird nach 12 und 24 Stunden eine vermehrte Expression des EA-D induziert. Bei der Inhibierung der PKC mit H7 und Transfektion mit pcDNA-AHCY ist nach 12 Stunden eine gesteigerte Expression des EA-D um den Faktor 3,37 zu verzeichnen. Dieser sinkt nach 24 Stunden auf den Faktor 1,9. Damit entspricht dieser Wert etwa dem der mit pcDNA-AHCY transfizierten Zellen, welche nicht mit einem Inhibitor behandelt wurden. Die B95-8 Zellen, welche mit pcDNA-3.1 E transfiziert wurden und denen der Inhibitor H7 zugegeben wurde, zeigen nach 12 Stunden eine vermehrte Expression des EA-D um den Faktor 2,44 ($p < 0,05$). Diese sinkt nach 24 Stunden auf den Faktor 1,27 zurück. Überraschenderweise zeigt sich, dass der PKC-Inhibitor H7 ein Aktivator des lytischen Zyklus ist.

Die Expression des Early Antigens in B95-8 Zellen 12 und 24 Stunden nach Transfektion mit pcDNA-AHCY und pcDNA-3.1 E bei Inhibierung der PKC mit Bisindolylmaleimid (GFX) ist in Tabelle 4.2 dargestellt. Dabei wurde das Verhältnis der EA-D positiven Zellen auf die Kontrollzellen normiert, welche nur mit pcDNA-3.1 E behandelt worden waren.

	Anzahl der EA-D positiven Zellen nach Transfektion	
	12 h	24 h
B95-8 / pcDNA-AHCY + GFX	4,42 ± 0,51	1,62 ± 0,19
B95-8 / pcDNA-AHCY	2,53 ± 0,24	1,89 ± 0,14
B95-8 / pcDNA-3.1 E + GFX	3,05 ± 0,64	1,05 ± 0,08
B95-8 / pcDNA-3.1 E	1 ± 0,08	1 ± 0,08

Tabelle 4.2: Expression des Early Antigens (EA-D) von transfizierten B95-8 Zellen nach Behandlung mit dem spezifischen PKC-Inhibitor GFX

Bei der PKC-Inhibierung mit GFX kommt es wie bei der Inhibierung mit H7 (Tabelle 4.1) nach 12 Stunden zu einer verstärkten Expression des Early-Antigens in den mit pcDNA-AHCY und pcDNA-3.1 E transfizierten B95-8 Zellen. So ist bei den mit pcDNA-AHCY

transfizierten und GFX behandelten B95-8 Zellen eine vermehrte Expression des EA-D um den Faktor 4,42 ($p < 0,05$) zu verzeichnen, welche nach 24 Stunden auf den Faktor 1,62 absinkt. Die mit pcDNA-3.1 E transfizierten und GFX behandelten B95-8 Zellen weisen nach 12 Stunden eine vermehrte Expression des EA-D um den Faktor 3,05 ($p < 0,05$) auf. Diese sinkt jedoch nach 24 Stunden auf den Faktor 1,05 ab. Es wird deutlich gezeigt, dass der spezifische PKC-Inhibitor GFX in B95-8 Zellen nach 12 Stunden eine starke Reaktivierung des lytischen EBV-Zyklus induziert. Diese Reaktivierung sinkt nach 24 Stunden auf das Niveau der nur mit pcDNA-AHCY und pcDNA-3.1 E transfizierten B95-8 Zellen ab. Neben dem Inhibitor H7 ist auch GFX ein Aktivator des lytischen Zyklus.

4.4.2 Einfluss von spezifischen PLA2-Inhibitoren auf die Expression des EA-D in B95-8 Zellen

Arachidonyl-trifluoromethylketon und Quinacrine sind spezifische Inhibitoren der PLA2. Mit pcDNA-AHCY und pcDNA-3.1 E transfizierte B95-8 Zellen wurden vor der Transfektion (3.2.13) mit den Inhibitoren behandelt (3.2.14). Da PLA2 in die Reaktivierung des EBV involviert ist, war weiterhin zu prüfen, ob die spezifischen PLA2-Inhibitoren einen Einfluss auf die Rate der spontanen Virusreaktivierung in B95-8 Zellen haben. Dazu wurden die Inhibitoren den unbehandelten B95-8 Zellen zugefügt.

Die Expression von EA-D wurde nach 12 und 24 Stunden als Maß der Reaktivierung gemessen. Als Bezugspunkt wurde die Anzahl der EA-D positiven, unbehandelten B95-8 Zellen verwendet.

	Anzahl der EA-D positiven Zellen nach Transfektion	
	12 h	24 h
B95-8 / pcDNA-AHCY + Arachidonyl-trifluoromethylketon	3,48 ± 0,36	1,54 ± 0,13
B95-8 / pcDNA-AHCY	2,6 ± 0,24	1,92 ± 0,14
B95-8 / pcDNA-3.1 E + Arachidonyl-trifluoromethylketon	2,56 ± 0,39	1,38 ± 0,19
B95-8 / pcDNA-3.1 E	1,03 ± 0,08	1,02 ± 0,08
B95-8 + Arachidonyl-trifluoromethylketon	3,19 ± 0,78	2,5 ± 0,88
B95-8 Zellen unbehandelt	1 ± 0,04	1 ± 0,05

Tabelle 4.3: Expression des Early Antigens (EA-D) in transfizierten B95-8 Zellen nach Behandlung mit dem spezifischen PLA2-Inhibitor Arachidonyl-trifluoromethylketon

Die Überexpression des Early Antigens in transfizierten B95-8 Zellen unter der Wirkung von Arachidonyl-trifluoromethylketon ist in Tabelle 4.3 dargestellt. Es ist erkennbar, dass mit

diesem spezifischen PLA2-Inhibitor bei den pcDNA-AHCY transfizierten Zellen nach 12 Stunden eine Überexpression des EA-D um den Faktor 3,48 auftritt. Diese ist mit $p < 0,05$ sowohl gegenüber der Kontrolle als auch gegenüber den B95-8 Zellen, welche nur mit SAH transfiziert wurden, signifikant. Bei den pcDNA-3.1 E transfizierten Zellen ist eine Überexpression um den Faktor 2,56 zu verzeichnen ($p < 0,05$). Nach 24 Stunden geht bei den mit pcDNA-AHCY transfizierten und Arachidonyl-trifluoromethylketon behandelten B95-8 Zellen die Expression des Early Antigens im Vergleich zur Kontrolle auf den Faktor 1,54 zurück ($p < 0,05$). Bei den mit pcDNA-3.1 E transfizierten und Arachidonyl-trifluoromethylketon behandelten Zellen sinkt sie auf den Faktor 1,38.

Bei der Untersuchung der Spontanreaktivierungsrate wird erkennbar, dass Arachidonyl-trifluoromethylketon in B95-8 Zellen sowohl nach 12 als auch nach 24 Stunden eine Aktivierung des lytischen EBV-Zyklus induziert, welche deutlich stärker ausfällt, als bei unbehandelten B95-8 Zellen. Nach 12 Stunden liegt sie um den Faktor 3,19 und nach 24 Stunden um den Faktor 2,5 höher als der Bezugspunkt.

Die Expression des Early Antigens in transfizierten und nicht transfizierten B95-8 Zellen nach Inkubation mit dem Inhibitor Quinacrine ist in Tabelle 4.4 dargestellt. Die Expression von EA-D wurde nach 12 und 24 Stunden als Maß der Reaktivierung gemessen. Als Bezugspunkt wurde die Anzahl der EA-D positiven, unbehandelten B95-8 Zellen verwendet.

	Anzahl der EA-D positiven Zellen nach Transfektion	
	12 h	24 h
B95-8 / pcDNA-AHCY + Quinacrine	4,01 ± 0,41	3,09 ± 0,19
B95-8 / pcDNA-AHCY	2,6 ± 0,24	1,92 ± 0,14
B95-8 / pcDNA-3.1 E + Quinacrine	3,01 ± 0,21	2,31 ± 0,03
B95-8 / pcDNA-3.1 E	1,03 ± 0,08	1,02 ± 0,08
B95-8 + Quinacrine	2,63 ± 0,66	1,03 ± 0,07
B95-8 Zellen unbehandelt	1 ± 0,04	1 ± 0,05

Tabelle 4.4: Expression des Early Antigens (EA-D) in transfizierten B95-8 Zellen nach Behandlung mit dem spezifischen PLA2-Inhibitor Quinacrine

Die Zellen, die mit Quinacrine behandelt wurden, zeigen im Vergleich zu den nicht behandelten Zellen eine vermehrte Expression des EA-D. Der Überexpressionsfaktor der mit pcDNA-AHCY transfizierten und Quinacrine behandelten B95-8 Zellen liegt nach 12 Stunden bei 4,01 mit einer Signifikanz von $p < 0,05$ bezogen auf nur mit pcDNA-AHCY transfizierte B95-8 Zellen. Nach 24 Stunden liegt der Überexpressionsfaktor bei 3,09 und ist mit $p < 0,05$ ebenfalls signifikant gegenüber den nur mit pcDNA-AHCY behandelten B95-8

Zellen. Im Vergleich dazu weisen die mit pcDNA-3.1 E transfizierten und Quinacrine behandelten Zellen nach 12 Stunden eine Überexpression gegenüber der Kontrolle um den Faktor 3,01 ($p < 0,1$) auf. Nach 24 Stunden ist eine Überexpression um den Faktor 2,31 ($p < 0,05$) nachweisbar. Ähnliche Ergebnisse wurden bei der Spontanreaktivierung des lytischen EBV-Zyklus in unbehandelten B95-8 Zellen mit Quinacrine beobachtet. Hier wurde nach 12 Stunden eine gesteigerte Expression des EA-D im Vergleich zu unbehandelten B95-8 Zellen um den Faktor 2,63 und nach 24 Stunden um den Faktor 1,03 verzeichnet.

4.4.3 Expression von BZLF1 in pcDNA-AHCY transfizierten B95-8 Zellen nach Inhibierung von PKC oder PLA2

Mit Hilfe des Reversen Northern Blots wurde die Expression des Gens BZLF1 in pcDNA-AHCY und pcDNA-3.1 E transfizierten B95-8 Zellen nach Zugabe von PKC- bzw. PLA2-Inhibitoren gemessen. Dabei wurde die PKC mit den spezifischen Inhibitoren Bisidolylmaleimid I (GFX) und H-7 Dihydrochloride (H7) gehemmt. Die Inhibierung der PLA2 erfolgte mit Arachidonyl-trifluoromethylketon und Quinacrine. Zudem wurde die Wirkung von spezifischen PLA2-Inhibitoren auf die Rate der Spontanreaktivierung des lytischen EBV-Zyklus in unbehandelten B95-8 Zellen untersucht. Aus den behandelten B95-8 Zellen wurde 12 und 24 Stunden nach Transfektion mRNA gewonnen (3.2.8) und in *full-length* cDNA umgeschrieben (3.3.3). Die cDNA wurde in den Reversen Northern Blot eingesetzt. Mit einer BZLF1 spezifischen Sonde (3.3.1) wurde die Expression dieses Gens nachgewiesen. Zur Normierung der BZLF-Expression wurden Sonden gegen die Haushaltsgene GAPDH und β -Aktin verwendet (3.3.1).

Bei den RNA- bzw. cDNA-Proben, welche 12 Stunden nach der Transfektion gewonnen werden konnten, wurden 10 μ g cDNA auf das TAE-Gel zur elektrophoretischen Auftrennung gegeben. Nach dem Vakuumblot wurde die Hybridisierung und Immundetektion mit den Sonden für die Gene BZLF1, GAPDH und β -Aktin durchgeführt. Während nach der Verwendung der Hybridisierungssonden für GAPDH und β -Aktin autoradiographisch Banden sichtbar waren, war dieses im Fall der Hybridisierungssonde für BZLF1 nicht der Fall. Das zeigt, dass die Konzentration von BZLF1 12 Stunden nach der Transfektion zu gering ist, um mittels Hybridisierungssonden und der durchgeführten autoradiographischen Methode detektiert zu werden.

In Abbildung 4.12 sind die cDNA-Proben aus den PLA2 und PKC Inhibitionsversuchen, welche nach 24 Stunden gewonnen wurden, in einem 0,8 %igen TAE-Agarosegel

elektrophoretisch aufgetrennt. Dabei wurde nach einer photometrischen Konzentrationsbestimmung (3.2.4) eine cDNA-Menge von 10 µg je Probe auf das Gel aufgetragen.

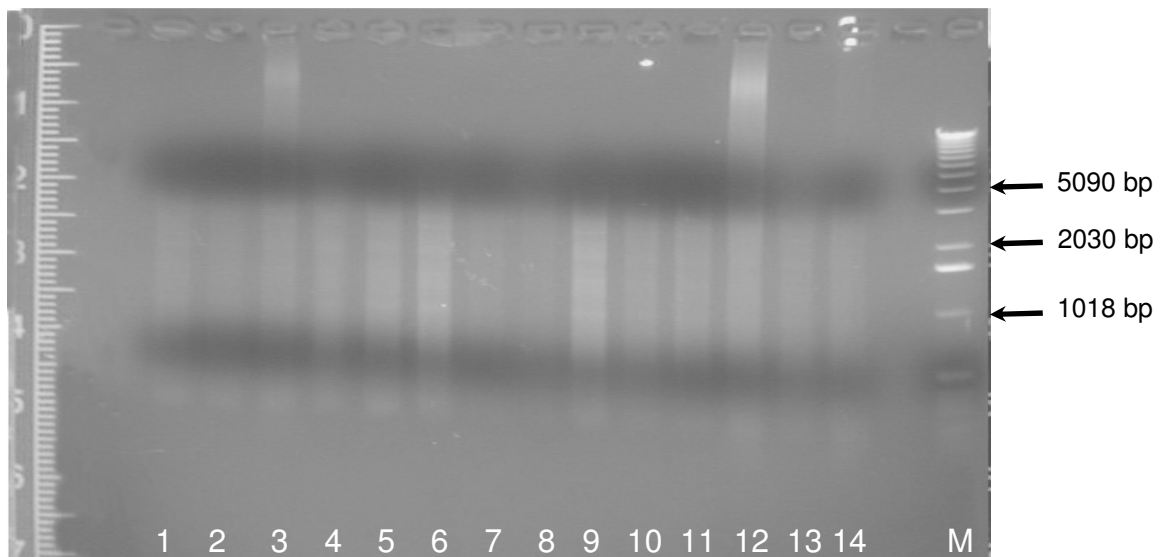


Abbildung 4.12: Gelelektrophoretische Auftrennung der *full-length* cDNA in einem 0,8 %igen TAE-Agarosegel. RNA-Isolierung 24 Stunden nach Transfektion der B95-8 Zellen

- 1: pcDNA-AHCY transfizierte B95-8 Zellen inhibiert mit H7
- 2: pcDNA-3.1 E transfizierte B95-8 Zellen inhibiert mit H7
- 3: pcDNA-AHCY transfizierte B95-8 Zellen inhibiert mit GFX
- 4: pcDNA-3.1 E transfizierte B95-8 Zellen inhibiert mit GFX
- 5: pcDNA-AHCY transfizierte B95-8 Zellen inhibiert mit Arachidonyl-trifluoromethylketon
- 6: pcDNA-3.1 E transfizierte B95-8 Zellen inhibiert mit Arachidonyl-trifluoromethylketon
- 7: pcDNA-AHCY transfizierte B95-8 Zellen inhibiert mit Quinacrine
- 8: pcDNA-3.1 E transfizierte B95-8 Zellen inhibiert mit Quinacrine
- 9: B95-8 Zellen behandelt mit Arachidonyl-trifluoromethylketon
- 10: B95-8 Zellen behandelt mit Quinacrine
- 11: unbehandelte B95-8 Zellen
- 12: B95-8 Zellen mit pcDNA-AHCY transfiziert
- 13: B95-8 Zellen mit pcDNA-3.1 E transfiziert
- 14: unbehandelte B95-8 Zellen
- M: 1 kb Marker

In jeder Spur sind kontinuierliche cDNA-Signale erkennbar, die verschiedene cDNA-Spezies repräsentieren. Die Signale der Spuren 7 und 8 sind schwächer ausgeprägt. Durch Orientierung an der Markerspurs kann die Größe von cDNA-Fragmenten abgelesen werden. Anschließend wurde der Reverse Northern Blot mit den Sonden BZLF1, GAPDH und β -Aktin durchgeführt.

Abbildung 4.13 zeigt exemplarisch Banden, die durch die spezifischen Hybridisierungssonden BZLF1, GAPDH und β -Aktin autoradiographisch nachgewiesen wurden. Dabei wurden die cDNA-Proben nach Inhibierung der PKC und PLA2 in transfizierten B95-8 Zellen sowie bei der Spontanreaktivierung des lytischen EBV-Zyklus in B95-8 Zellen 24 Stunden nach der Transfektion gewonnen.

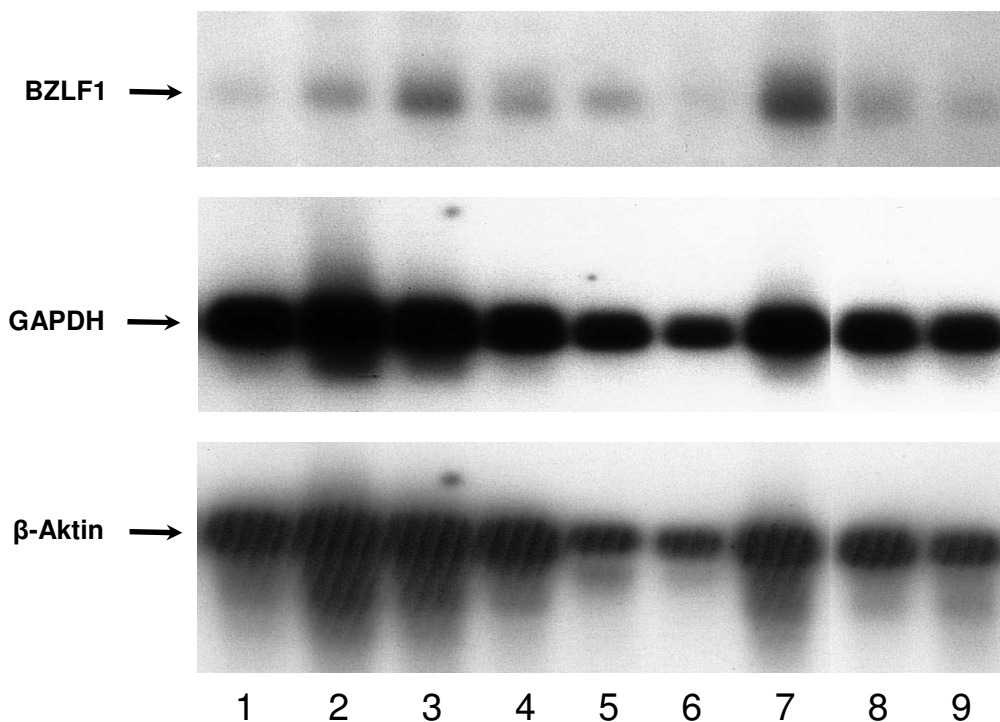


Abbildung 4.13: Detektion der Expression von BZLF1, GAPDH und β -Aktin nach der Inhibierung der PLA2 und PKC sowie nach der Spontanreaktivierung in B95-8 Zellen durch BZLF1, GAPDH und β -Aktin spezifische Sonden 24 Stunden nach der Transfektion

- 1: pcDNA-AHCY transfizierte B95-8 Zellen inhibiert mit GFX
- 2: pcDNA-3.1 E transfizierte B95-8 Zellen inhibiert mit GFX
- 3: pcDNA-AHCY transfizierte B95-8 Zellen inhibiert mit Arachidonyl-trifluoromethylketon
- 4: pcDNA-3.1 E transfizierte B95-8 Zellen inhibiert mit Arachidonyl-trifluoromethylketon
- 5: pcDNA-AHCY transfizierte B95-8 Zellen inhibiert mit Quinacrine
- 6: pcDNA-3.1 E transfizierte B95-8 Zellen inhibiert mit Quinacrine
- 7: B95-8 Zellen behandelt mit Arachidonyl-trifluoromethylketon
- 8: unbehandelte B95-8 Zellen
- 9: pcDNA-AHCY transfizierte B95-8 Zellen

Die Auswertung erfolgt durch Vergleich der Intensität von BZLF1-Banden mit Banden der Haushaltsgene GAPDH und β -Aktin.

Es zeigt sich, dass bei den unbehandelte B95-8 Zellen (Spur 8) sowie bei den mit pcDNA-AHCY (Spur 9) transfizierten B95-8 Zellen mit dieser Methode kein Unterschied in der Expression von BZLF1 nachgewiesen werden kann.

Inhibierung der PKC in transfizierten B95-8 Zellen 24 Stunden nach Transfektion

Bei der Inhibierung der PKC in transfizierten B95-8 Zellen mittels H7 ist keine BZLF1-Bande sichtbar. Da auch die Banden von GAPDH und β -Aktin nur schwach ausgeprägt sind, ist anzunehmen, dass die cDNA-Menge zu gering ist, um im Reversen Northern Blot ein Signal zu erzeugen.

In transfizierten und mit dem PKC-Inhibitor GFX behandelten B95-8 Zellen (Spur 1 und 2) kann bei der BZLF1-Bande im Vergleich zu den GAPDH- und β -Aktin-Banden sowie zu den Kontrollen keine veränderte Expression festgestellt werden. Das heißt, es kommt durch GFX mit dieser Methode zu keiner nachweisbaren veränderten Expression von BZLF1.

Inhibierung der PLA2 in transfizierten B95-8 Zellen 24 Stunden nach Transfektion

Nach der Behandlung von transfizierten B95-8 Zellen mit dem spezifischen PLA2-Inhibitor Arachidonyl-trifluoromethylketon kann kein Unterschied in der Expression von BZLF1 festgestellt werden. Dabei wurde zwischen den mit pcDNA-AHCY bzw. pcDNA-3.1 E transfizierten und mit Arachidonyl-trifluoromethylketon behandelten B95-8 Zellen (Spur 3 und 4) sowie den unbehandelten B95-8 Zellen verglichen (Spur 8).

Bei den mit Quinacrine behandelten und mit pcDNA-AHCY transfizierten B95-8 Zellen (Nr. 5) wird im Vergleich zu den pcDNA-3.1 E transfizierten B95-8 Zellen (Nr. 6) BZLF1 in gleichem Maße exprimiert.

Spontanreaktivierung des lytischen EBV-Zyklus in B95-8 Zellen nach 24 Stunden

Durch die Reaktivierung des lytischen EBV-Zyklus in B95-8 Zellen mittels Arachidonyl-trifluoromethylketon (Spur 7) wird im Vergleich zu unbehandelten B95-8 Zellen (Spur 8) eine deutlich gesteigerte Expression des BZLF1-Gens ausgelöst. Anhand dieses Resultats und anhand der Ergebnisse der EA-D-Expression bei den mit Arachidonyl-trifluoromethylketon behandelten B95-8 Zellen lässt sich postulieren, dass dieser Inhibitor zu einer Spontanreaktivierung des lytischen EBV-Zyklus führt.

Hingegen ist bei der Spontanreaktivierung des lytischen EBV-Zyklus durch Quinacrine kein Unterschied in der Expression von BZLF1 im Vergleich zur Kontrolle erkennbar.

4.4.4 Nachweis von PKC in pcDNA-AHCY transfizierten B95-8 Zellen

Das Vorkommen und die Phospho-Aktivierung von Proteinkinase C (PKC) in B95-8 Zellen wurde mittels Immunblot untersucht.

Abbildung 4.14 zeigt die nach einer elektrophoretischen Auftrennung immunologisch dargestellten Proteine. Dabei wurden in jeder Spur die identischen Proteinmengen aufgetragen. In Spur 2 ist bei ca. 14,3 kDa im Gegensatz zu Spur 1 eine deutlich stärkere Bande zu sehen. Dieses zeigt, dass bei der SAH getriggerten Reaktivierung des lytischen EBV-Zyklus eine verstärkte Phosphorylierung der Proteinkinase C induziert wird. Zusätzlich wurde noch die Bandenstärke (Dichte) der beiden PKC-Banden mit Hilfe des Programms „Quantity One“ (BIO RAD Laboratories) ermittelt. Dabei wird deutlich, dass die Dichte der PKC-Bande bei den mit pcDNA-3.1 E transfizierten B95-8 Zellen 1,1 Einheiten groß war und

bei den mit pcDNA-AHCY transfizierten B95-8 Zellen 1,7 Einheiten. Damit ist ein deutlicher Unterschied von 0,6 Einheiten erkennbar.

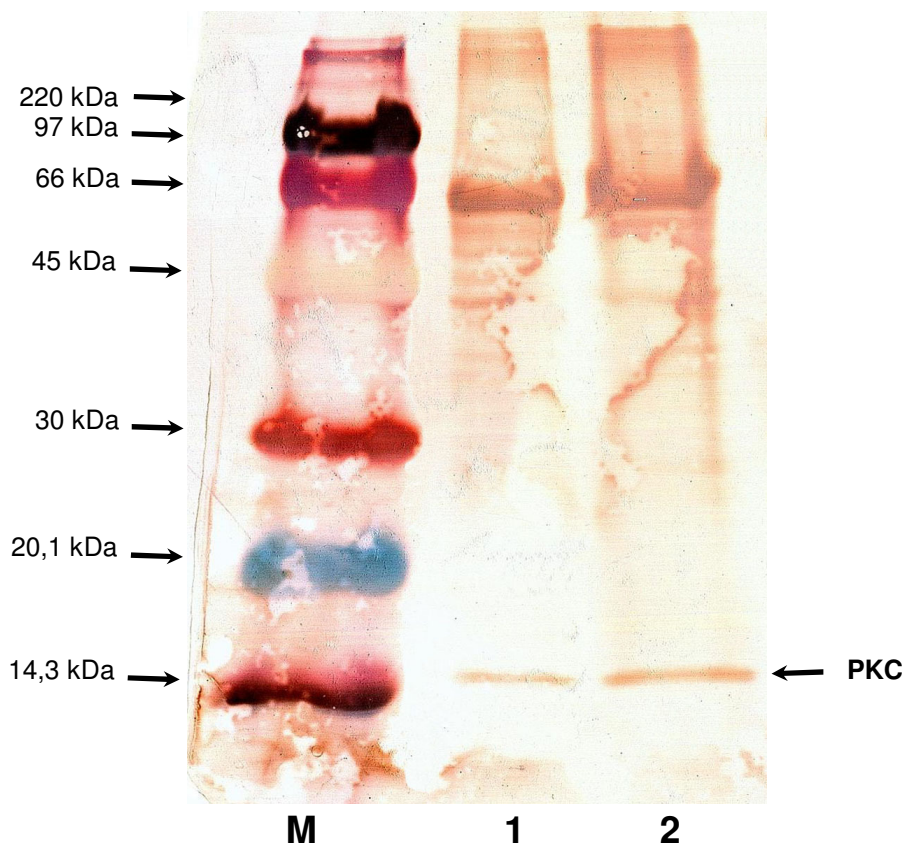


Abbildung 4.14: Western Blot: Nachweis phosphorylierter PKC α in pcDNA-AHCY und pcDNA-3.1 E transfizierten B95-8 Zellen. M: Rainbow Marker; 1: pcDNA-3.1 E transfizierte B95-8 Zellen; 2: pcDNA-AHCY transfizierte B95-8 Zellen

4.5 SAH-Überexpression in B95-8 Zellen

In den folgenden Untersuchungen sollte geklärt werden, welche Auswirkungen die Überexpression von SAH auf die Teilungsrate und die Differenzierung von B95-8 Zellen hat.

4.5.1 Modifizierte DNA-Syntheserate nach Transfektion von B95-8 Zellen mit pcDNA-AHCY

Zunächst wurde anhand eines Zellproliferationstests (3.4) am Tag eins, zwei, vier und acht nach Transfektion die DNA-Syntheserate der B95-8 Zellen bestimmt. Abbildung 4.15 zeigt die Ergebnisse als Verhältnis bezogen auf den niedrigsten Wert der jeweiligen Messung.

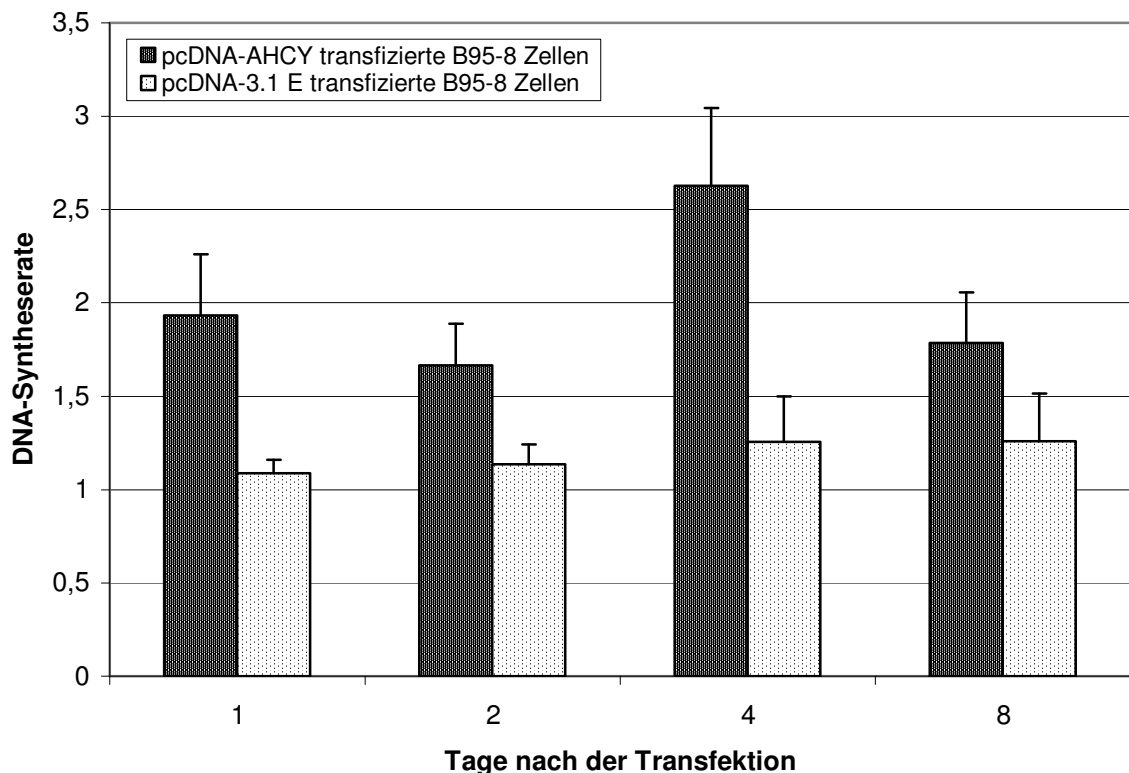


Abbildung 4.15: Verhältnis der DNA-Syntheserate in B95-8 Zellen nach Transfektion mit 8 µg pcDNA-AHCY

Die Abbildung verdeutlicht, dass es nach der Transfektion von B95-8 Zellen mit pcDNA-AHCY zu einer Steigerung der DNA-Syntheserate kommt. Diese hat ein Maximum am vierten Tag, das um den Faktor 2,6 größer ist als die Kontrolle ($p < 0,05$). Am Tag acht sinkt die DNA-Syntheserate auf den Faktor 1,8 ab ($p < 0,05$) und erreicht damit annähernd die Werte vom ersten und zweiten Tag.

4.5.2 Zellproliferation in pcDNA-AHCY transfizierten B95-8 Zellen

Hierzu wurde sowohl zum Zeitpunkt der Transfektion als auch am Tag eins, zwei, vier und acht nach der Transfektion die Zellzahl der transfizierten B95-8 Zellen bestimmt (3.1.4). Die Resultate sind in Abbildung 4.16 dargestellt.

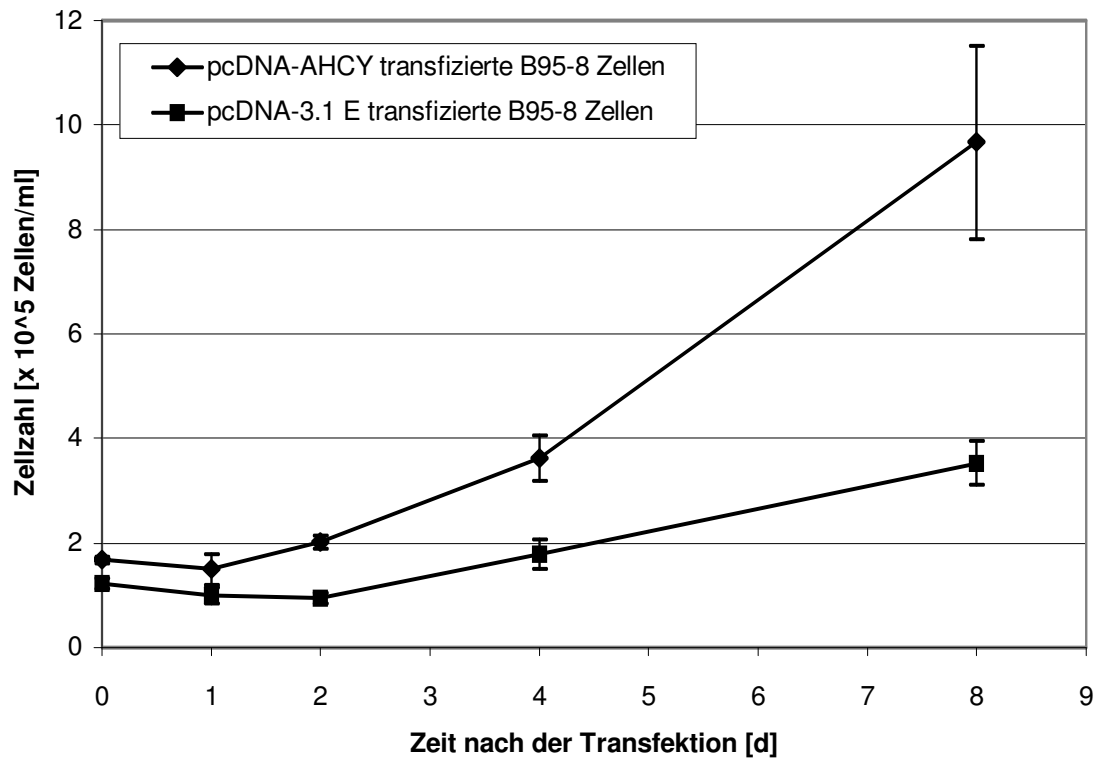


Abbildung 4.16: Zellzahlbestimmung der B95-8 Zellen nach Transfektion mit pcDNA-AHCY und pcDNA-3.1 E

Nach einer kurzen Lag-Phase steigt die Zahl der mit pcDNA-AHCY transfizierten Zellen stetig an. Sie liegt am zweiten Tag bei 2×10^5 Zellen/ml und am vierten Tag bei $3,6 \times 10^5$ Zellen/ml. Der deutlichste Anstieg zeigt sich zwischen dem vierten und achten Tag, an dem die Zellzahl $9,7 \times 10^5$ Zellen/ml erreicht. Im Vergleich dazu liegt die Zahl bei der Kontrolle am achten Tag bei $3,5 \times 10^5$ Zellen/ml. Damit ist Zahl der pcDNA-AHCY transfizierten B95-8 Zellen um den Faktor 2,7 ($p < 0,05$) höher als bei den Kontrollen. Es wird deutlich, dass die Überexpression von SAH eine gesteigerte Proliferation in B95-8 Zellen induziert.

4.5.3 Expression ausgewählter Oberflächenantigene in pcDNA-AHCY transfizierten B95-8 Zellen

Zum Nachweis einer veränderten Expression der Oberflächenantigene CD11a, CD19, CD23, CD30, CD40, CD44, CD54 und CD58 nach der Transfektion von B95-8 Zellen mit pcDNA-AHCY wurde eine FACS-Analyse durchgeführt (3.6). In Abbildung 4.17 sind exemplarisch die Ergebnisse für die Oberflächenantigene CD11a, CD30, CD44 und CD54 dargestellt. Dabei ist die Verteilung der pcDNA-3.1 E transfizierten B95-8 Zellen im Histogramm-Plot

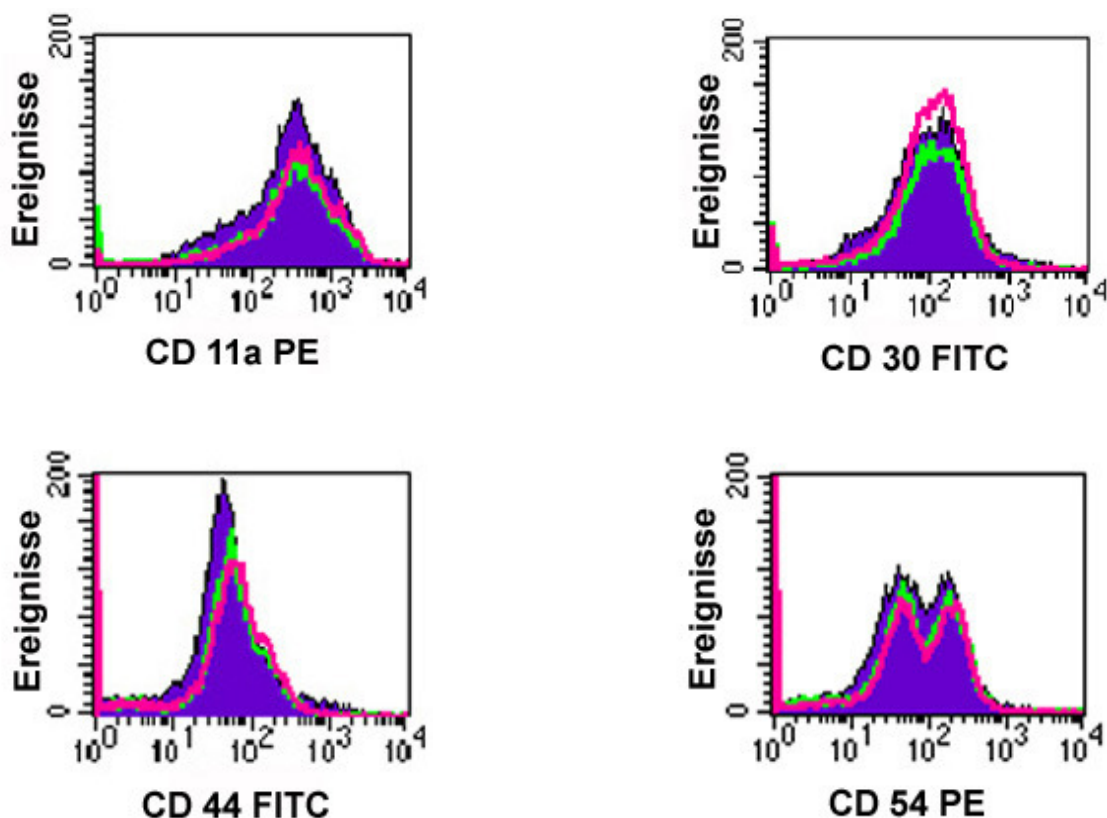


Abbildung 4.17: FACS-Analyse ausgewählter Oberflächenantigene nach Transfektion von B95-8 Zellen mit pcDNA-AHCY. Darstellung im Histogramm-Plot (lila = pcDNA-3.1 E transfizierte B95-8 Zellen, grün und pink = pcDNA-AHCY transfizierte B95-8 Zellen); jede Untersuchung wurde in einem 8-fachen Ansatz durchgeführt.

lila hinterlegt. Sie bilden die Vergleichswerte der mit pcDNA-AHCY transfizierten B95-8 Zellen. Diese Werte wurden im Histogramm-Plot mit einer grünen und einer pink Kurve dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die Kurvenverläufe annähernd identisch sind. In ähnlicher Weise stellten sich die Histogramm-Plots für die Oberflächenantigene CD19, CD23, CD40 und CD58 dar.

Die Überexpression von SAH hatte keinen Einfluss auf die differentielle Expression der ausgewählten Zelloberflächenantigene CD11a, CD19, CD23, CD30, CD40, CD44, CD54 und CD58 von B95-8 Zellen.

5 Diskussion

Das Epstein-Barr Virus (EBV), ein humanes Herpesvirus, verursacht die infektiöse Mononukleose. Hierbei handelt es sich um eine selbstlimitierende, lymphoproliferative Autoimmunerkrankung [RITTER *et al.*, 1994]. Das Virus ist an der Entstehung verschiedener Lymphome und epithelialer Malignome beteiligt [RICKINSON *et al.*, 1996], wie dem Burkitt-Lymphom oder dem Nasopharyngealkarzinom [PATHMANATHAN *et al.*, 1995].

In früheren Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass das Gangliosid VI³NeuAc-nLcOse₄Cer (LM1), ein Bestandteil der Zellmembran von Monozyten und Granulozyten, in Burkitt-Lymphom Zellen der Linie Raji sowie in P3HR-1K Zellen eine Reaktivierung des lytischen Zyklus mit Wachstumshemmung und Zelldifferenzierung verursacht [SCHAADE *et al.*, 1999].

Nach LM1-Behandlung von Raji Zellen konnten mittels ‚differential-display‘-RT-PCR und ‚suppression-subtractive-hybridisation‘-PCR (SSH-PCR) insgesamt 35 Gene identifiziert werden, deren Expression moduliert wird [SCHAADE *et al.*, 2000; KLEINES *et al.*, 2000]. Dazu gehört u. a. das Gen für die s-Adenosylhomocystein-Hydrolase (SAH). Die Überexpression von SAH führt zu einer Reaktivierung des lytischen EBV-Zyklus in Raji Zellen [MARET, 2003; MAAS, 2002]. Diese Reaktivierung durch SAH erfolgt durch Aktivierung von BZLF1 über die Proteinkinase C und Phospholipase A2.

Ziel dieser Arbeit ist es, den Einfluss einer SAH-Überexpression auf die Reaktivierung des lytischen Zyklus und auf Differenzierungsvorgänge in der Zell-Linie B95-8 zu analysieren.

5.1 Überprüfung der Identität des Vektors pcDNA-AHCY

In vorhergehenden Arbeiten wurde das Gen der SAH mittels des TOPOTMCloning System in einen Fusionsvektor gebracht. Das Konstrukt erhielt die Bezeichnung pcDNA-AHCY [MARET, 2003]. Da der Einbau des Inserts zufällig in ‚sense‘- oder ‚antisense‘- Orientierung erfolgen kann, war der Nachweis für die korrekte Orientierung zu erbringen. Das gelang nach Spaltung des Konstrukts mit den Restriktionsendonukleasen Bam HI und Xho I und anschließender Auftrennung des Produkts mittels Agarose-Gelelektrophorese. Die vorhandenen Fragmente in Größe von 575 bp und 3098 bp zeigten die ‚sense‘-Orientierung an.

Somit war die Vektoridentität gesichert und die Plasmidpräparationen von pcDNA-AHCY konnten für die Transfektion von B95-8 Zellen verwendet werden. Der Vektor pcDNA-3.1 E diente als Negativ-Kontrolle.

5.2 Expression von pcDNA-AHCY in B95-8 Zellen

B95-8 Zellen wurden durch Endozytose mit Hilfe der Substanz „SuperFect™ Transfection Reagent“ (Qiagen) mit der Vektor-DNA transfiziert. Dieses ist im Vergleich zur Elektroporation eine schonende Methode für den Transfer von DNA in eukaryontische Zellen [MANIATIS *et al.*, 1989]. Das Prinzip beruht auf dem Einschluss der DNA in Liposomen, deren Inhalt anschließend durch Endozytose von den Zellen aufgenommen wird [TANG *et al.*, 1996]. Die Effizienz der Transfektion wird mit 20 % der Gesamtzellzahl angegeben [SHAH *et al.*, 2000].

Der Erfolg der Transfektion wurde in einer PCR durch den Nachweis des Gens der Ampicillin-Resistenz (β -Lactamase), welches auf den Vektoren pcDNA-AHCY und pcDNA-3.1 E kodiert ist, überprüft. Da das Gen der β -Lactamase nicht im Genom der B95-8 Zellen kodiert ist, ist eine Amplifikation des β -Lactamase-Gens ein Beweis für die erfolgreiche Aufnahme des Expressionsvektors in die B95-8 Zellen. Die Aufnahme der Vektoren in die B95-8 Zellen konnte nachgewiesen werden.

5.3 Nachweis der Reaktivierung des lytischen EBV-Zyklus nach SAH-Überexpression

Nachdem die Expression von pcDNA-AHCY in B95-8 Zellen nachgewiesen war, galt es die Reaktivierung des lytischen EBV-Zyklus durch die Quantifizierung der spezifischen Gene Early Antigen D (EA-D), BZLF1 und BRLF1 nachzuweisen.

Dabei kodiert das ‚delayed early‘-Gen BMRF1, das nach der Reaktivierung des lytischen EBV-Zyklus durch die Expression der ‚immediate early‘-Gene transkribiert wird, für das Early Antigen diffuse component (EA-D) [KIEHL & DORSKY, 1991]. Das Early Antigen wird für die Replikation des Virus benötigt und ist eines der ersten Antigene, das im Reaktivierungsprozess aktiviert wird [EPSTEIN *et al.*, 1979]. Das EA-D zählt zu den ‚delayed early‘-Genprodukten. Es ist essentiell für die Aktivität der viralen DNA-Polymerase, mit der es einen Komplex zur Bindung der doppelsträngigen DNA bildet. Dieser Komplex ist für die virale Replikation verantwortlich [ZENG *et al.*, 1997; GERSHBURG & PAGANO, 2002]. Die Regulation des Promotors von BMRF1 kann durch die ‚immediate early‘-Gene BZLF1 und BRLF1 erfolgen [QUINLIVAN *et al.*, 1993]. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass BZLF1 und BRLF1 zusammen in lymphoiden Zellen einen starken stimulatorischen Effekt auf den Promotor haben. Einzeln ist der Effekt nur gering. Durch die Proteinkinase BGLF4 wird das EA-D hyperphosphoryliert und damit aktiviert. Der Phosphorylierungsgrad ist wichtig für die Aktivität des DNA-Polymerase-DNAse-EA-D-Komplexes [GERSHBURG & PAGANO, 2002].

Zur Untersuchung, ob die Überexpression von SAH in B95-8 Zellen zu einer Aktivierung des lytischen EBV-Zyklus führt, wurde ein Immunfluoreszenz-Test durchgeführt. Dabei wurden spezifische Antikörper gegen EA-D eingesetzt. Die Expression von EA-D in unbehandelten B95-8 Zellen diente als Kontrollwert. In der quantitativen Auswertung der EA-D positiven Zellen zeigte sich nach 12 Stunden, dass die Rate der EA-D exprimierenden Zellen der pcDNA-AHCY transfizierten Zellen um den Faktor 2,53 höher lag als die der mit pcDNA-3.1 E transfizierten Kontrollen.

Dieses bedeutet, dass eine SAH-Überexpression eine EBV-Reaktivierung 12 Stunden nach der Transfektion in den B95-8 Zellen induziert. Die EA-D-Expression ist nach einem, zwei und vier Tagen rückläufig. Dies könnte auf einen Verlust des Vektors durch Zellteilung der B95-8 Zellen und damit auf eine transiente Expression oder auf eine Gegenreaktion hinweisen.

Nachfolgend sollte untersucht werden, ob die Reaktivierung des lytischen EBV-Zyklus durch SAH Einfluss auf die Expression der EBV-kodierten ‚immediate early‘-Gene BZLF1 und BRLF1 hat. Ihre Aktivierung leitet den lytischen Zyklus ein und die Latenz des EBV endet [SINCLAIR *et al.*, 1992; SPECK *et al.*, 1997]. Es folgt die Expression der ‚delayed early‘-Gene sowie der Strukturproteine wie z. B. dem gp350 und gp220. Sowohl das BZLF1- als auch das BRLF1-Protein sind in der Lage eine Autoinduktion sowie die Expression des jeweils anderen Gens zu induzieren und damit eine Transkription zu aktivieren [ADAMSON *et al.*, 2000; FEEDERLE *et al.*, 2000; RAGOCZY *et al.*, 1998; SINCLAIR *et al.*, 1992; ZALANI *et al.*, 1996]. Dem BZLF1-kodierten Protein Zta, einem phosphorylierten Polypeptid, kommt als Transaktivator eine besondere Bedeutung zu. Seine Expression reicht aus, um in permissiven Zellen den lytischen EBV-Zyklus einzuleiten. Desweiteren hat das BZLF1-Protein Einfluss auf die meisten viralen Promotoren, u. a. auf seinen eigenen über eine CREB/AP1-Bindestelle oder auf die viralen Promotoren der BSLF2- und BMLF1-Gene [LIU *et al.*, 1997; KENNEY *et al.*, 1989; ROONEY *et al.*, 1989]. Zusätzlich bindet es an die Sequenz des Replikationsursprungs Ori_{Lyt} und induziert so vermutlich die Initiation der lytischen Genomreplikation [SINCLAIR *et al.*, 1992]. Das BRLF1-Produkt Rta spielt mit Zta zusammen und verstärkt seine transaktivierenden Eigenschaften. Die Aktivierung von BZLF1 ist über zwei verschiedene Promotoren möglich. Zum einen über den 445 bp großen proximalen Promotor Zp, der nur der BZLF1-Expression dient, und zum anderen über den 926 bp großen distalen Promotor Rp, der BZLF1 und BRLF1 als bicistronische mRNA exprimiert [MANET *et al.*, 1989; SPECK *et al.*, 1997]. Eine Aktivierung verschiedener EBV-Promotoren durch BRLF1 erfolgt über die direkte Bindung von BRLF1 an einen GC-reichen Abschnitt in einigen frühen viralen Promotoren wie z. B. DR/DL, BMLF1 und BMHRF1 [GRUFFAT & SERGEANT, 1994; QUINLIVAN *et al.*, 1993].

Für diese Arbeit wurde die differentielle Expression von BZLF1 und BRLF1 auf Transkriptebene in pcDNA-AHCY transfizierten B95-8 Zellen untersucht. Dabei war zwei

und acht Stunden nach der Transfektion eine gesteigerte Expression von BZLF1 erkennbar. Der Faktor der Überexpression lag nach zwei Stunden bei 1,8 und nach acht Stunden bei 1,7. Weiterhin konnte am vierten Tag nach der Transfektion der B95-8 Zellen mit pcDNA-AHCY eine signifikante Erhöhung der Expression von BZLF1 um den Faktor 3,2 ($p < 0,05$) festgestellt werden. Die Expression von BRLF1 zeigte einen biphasischen Verlauf mit einem ersten Maximum an Tag 1 (Faktor 1,8) und einem zweiten Maximum an Tag 4 (Faktor 1,6). Diese Werte, ebenso wie die Werte der veränderten Expression von BZLF1 bis zu Tag vier, waren jedoch nicht signifikant. Damit konnte keine endgültige Aussage über die Kinetik der Überexpression von SAH und der veränderten Expression von BZLF1 und BRLF1 gemacht werden. In vorherigen Versuchen konnte jedoch ein Zusammenhang zwischen der Überexpression von SAH und der Expression von EA-D, welches durch BZLF1 und BRLF1 getriggert wird, beobachtet werden. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Überexpression von SAH in B95-8 Zellen eine Reaktivierung des lytischen EBV-Zyklus induziert.

5.4 Untersuchung der Signaltransduktionswege bei der SAH getriggerten Reaktivierung des lytischen EBV-Zyklus

Ein neues Konzept in der Behandlung EBV assoziierter Tumoren zielt darauf ab, EBV positive Tumorzellen durch die Reaktivierung des lytischen Zyklus in Anwesenheit von antiviralen Chemotherapeutika zu eliminieren [GUTIERREZ *et al.*, 1996; WESTPHAL *et al.*, 1999]. Dieses Konzept wurde bereits in einer ersten klinischen Studie umgesetzt. Sechs Patienten, die nach einer Organtransplantation an einer EBV assoziierten lymphoproliferativen Erkrankung litten, erhielten Argininbutyrat als Induktor des lytischen EBV-Zyklus, in Kombination mit dem Virostatikum Ganciclovir. Durch diese Behandlung konnte bei vier Patienten eine komplette Remission und bei einem Patienten eine partielle Remission herbeigeführt werden [MENTZER *et al.*, 2001].

Um weitere Therapieoptionen zu haben, ist es jedoch von Bedeutung, die Signaltranswege zu charakterisieren, die zu einer Reaktivierung des lytischen EBV-Zyklus führen. Mit den Erkenntnissen, die in den Arbeiten zu SAH gewonnen werden konnten, könnten dann Therapeutika zur Behandlung EBV assoziierter Tumoren ausgewählt werden.

5.4.1 PKC abhängige Reaktivierung des lytischen EBV-Zyklus

Der Phorbol-12-*O*-Tetradecanoylphorbol-13-Acetate (TPA) stellt einen sehr effizienten Induktor des lytischen EBV-Zyklus dar [HECKER, 1971; ZUR HAUSEN *et al.*, 1978]. Dabei erfolgt die Aktivierung des lytischen EBV-Zyklus über eine direkte Aktivierung der Proteinkinase C (PKC), eine Serin/Threonin-Kinase [CASTAGNA *et al.*, 1982; NISHIZUKA, 1984; BISTER *et al.*, 1979]. Es wurde nachgewiesen, dass in TPA-behandelten Zellen, denen ein potenter PKC-Inhibitor zugesetzt worden war, der lytische EBV-Zyklus nicht induziert wird [HAYASHI, 1992]. Die Reaktivierung des lytischen EBV-Zyklus über TPA erfolgt zunächst über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP1 [GAO *et al.*, 2001]. Dieser Transkriptionsfaktor bindet daraufhin an das DNA-Motiv (TPA response element), das sich in Promotoren von Genen befindet, welche durch Phorbol-12-*O*-Tetradecanoylphorbol-13-Acetate wie TPA aktiviert werden können. Durch die Bindung des AP1-Transkriptionsfaktors an den BZLF1-Promotor Zp , welcher mehrere 'TPA response elements' enthält [GRADOVILLE *et al.*, 2002], kann die Expression von BZLF1 induziert werden. Außerdem ist eine Aktivierung des lytischen EBV-Zyklus durch TPA über den Transkriptionsfaktor NF- κ B möglich [GAO *et al.*, 2001]. Zusätzlich bindet der Phorbol-12-*O*-Tetradecanoylphorbol-13-Acetate mit hoher Affinität die PKC und aktiviert diese [DAVIES *et al.*, 1991]. Dadurch wird der PKC abhängige Signaltransduktionsweg zur Reaktivierung des lytischen EBV-Zyklus ausgelöst.

In vorherigen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von SAH in Raji Zellen zu einer gesteigerten Aktivierung der Proteinkinase C führt [MARET, 2003; MAAS, 2002]. In dieser Arbeit wurde untersucht, ob eine SAH-Überexpression in B95-8 Zellen ebenfalls Auswirkungen auf die Aktivierung der PKC hat.

Mittels Western Blot wurde bestätigt, dass es nach Überexpression von SAH in B95-8 Zellen zu einer höheren Dichte phosphorylierter und damit aktivierter PKC kommt. Um exaktere Aussagen über die unterschiedlich starke Aktivierung der PKC machen zu können, wurde die Bandenstärke (Dichte) der PKC-Banden bestimmt. Es zeigte sich, dass die Dichte der mit pcDNA-AHCY transfizierten B95-8 Zellen um den Faktor 0,6 (Dichte PKC Bande: 1,7) stärker war als bei den mit pcDNA-3.1 E transfizierten B95-8 Zellen (Dichte PKC Bande: 0,6).

5.4.2 Inhibierung der PKC und PLA2 zur Charakterisierung der Signaltransduktionswege

Bei der Analyse der Signaltransduktionswege in pcDNA-AHCY transfizierten Raji Zellen wurde das Schema in Abbildung 1.3 erarbeitet [MAAS, 2002]. Dabei konnte nachgewiesen

werden, dass sowohl bei der Verwendung der PKC-Inhibitoren GFX und H7 als auch bei der Verwendung der PLA2-Inhibitoren Quinacrine und Arachidonyl-trifluoromethylketon in mit SAH-transfizierten Raji Zellen die Expression des EA-D deutlich vermindert war. Nun sollte geprüft werden, ob die Signaltransduktionswege bei der Reaktivierung des lytischen EBV-Zyklus durch SAH in Raji Zellen zellspezifische Effekte sind oder ob sie auch für andere Zell-Linien gelten. Dazu wurden pcDNA-AHCY transfizierte B95-8 Zellen mit spezifischen PKC- und PLA2-Inhibitoren behandelt. Zusätzlich wurden nicht transfizierte B95-8 Zellen mit spezifischen PLA2-Inhibitoren versetzt und der Einfluss des Inhibitors auf die Rate der Spontanreaktivierung untersucht. Nach der Inkubation der B95-8 Zellen mit den Inhibitoren wurde untersucht, ob der lytische EBV-Zyklus in den B95-8 Zellen unterschiedlich aktiviert wird. Hierzu wurde zum einen die veränderte Expression des EA-D mittels Immunfluoreszenz-Test überprüft. Zum anderen wurde mit Hilfe des Reversen Northern Blots untersucht, ob eine veränderte Expression von BZLF1 induziert wird.

Bei der Verwendung der beiden spezifischen PKC-Inhibitoren H7 und GFX zeigt sich 12 Stunden nach der Transfektion eine vermehrte Expression des EA-D und somit eine gesteigerte Aktivierung des lytischen EBV-Zyklus im Vergleich zur Kontrolle. Die Tatsache, dass die spezifische Inhibierung der PKC durch H7 und GFX nicht zu einer Verminderung der lytischen Aktivität führt, steht im Widerspruch zur Aussage einiger Autoren. So konnte dort mit Hilfe des PKC-spezifischen Inhibitors H7 gezeigt werden, dass die Reaktivierung des lytischen EBV-Zyklus in B95-8 Zellen in jedem Fall PKC abhängig sein muss [GRADOVILLE *et al.*, 2002; DAVIES *et al.*, 1991]. In diesen Fällen erfolgte der Nachweis einer veränderten Aktivierung des lytischen EBV-Zyklus über die Analyse der modifizierten Expression des Virus-Kapsid-Antigens (VCA) mittels Immunfluoreszenz-Test.

In der Zell-Linie Raji weist das Gen für das VCA eine Deletion auf [HENLE *et al.*, 1970; MILLER *et al.*, 1974; MENEZES *et al.*, 1975b]. Deshalb wurde in den früheren Arbeiten mit Raji Zellen das EA-D als Marker der Reaktivierung des lytischen Zyklus ausgewählt [MAAS, 2002]. Zur besseren Vergleichbarkeit wurde in der vorliegenden Arbeit ebenfalls das EA-D nachgewiesen. Außerdem wird VCA erst in der späten Phase des lytischen Zyklus exprimiert. Bei diesen Untersuchungen hingegen ist die frühe Phase des lytischen Zyklus von entscheidender Bedeutung.

Obwohl die Inhibitoren in der Literatur als spezifisch gelten, verursachen sie in Gegenwart einer SAH-Überexpression keine Inhibierung. Stattdessen tritt eine gesteigerte Expression des EA-D auf. Eine Ursache hierfür könnte darin liegen, dass die Zellantwort durch die Inhibitoren verändert wird, so dass eine Aktivierung des lytischen Zyklus auf einem PKC unabhängigen Weg induziert wird. Außerdem stellt sich die Frage, ob die verwendeten Nachweismethoden sensitiv genug sind. Obwohl für den Nachweis des Gens BZLF1 mittels Reverser Northern Blot eine cDNA-Menge von 10 µg eingesetzt worden war, waren nach

24 Stunden keine Unterschiede in der Expression des Gens BZLF1 erkennbar. Möglicherweise war die für die Gelelektrophorese eingesetzte cDNA-Menge zu gering.

Zur Inhibierung der zytoplasmatischen Phospholipase A2 (cPLA2) wurden die Inhibitoren Quinacrine und Arachidonyl-trifluoromethylketon verwendet.

Sowohl bei der Inhibierung der Phospholipase A2 (PLA2) mit Quinacrine als auch mit Arachidonyl-trifluoromethylketon konnte in den mit pcDNA-AHCY und pcDNA-3.1 E transfizierten B95-8 Zellen eine deutlich gesteigerte Reaktivierung des lytischen EBV-Zyklus nachgewiesen werden. Auch bei diesen Untersuchungen kam es nicht zu einer Verminderung der lytischen Aktivität. Im Gegensatz dazu wurde durch eine Inhibierung der PLA2 mit Arachidonyl-trifluoromethylketon und Quinacrine bei Raji Zellen eine verminderte Expression des EA-D sowie von BZLF1 nachgewiesen [MAAS, 2002]. Eine Ursache hierfür könnte darin liegen, dass die Zellantwort durch die Inhibitoren verändert wird, so dass eine Aktivierung des lytischen Zyklus auf einem PLA2 unabhängigen Weg induziert wird.

Bei der Spontanreaktivierung wird der lytische EBV-Zyklus aus der Latenz heraus in einer bestimmten Zell-Linien spezifischen Rate reaktiviert. B95-8 Zellen besitzen eine hohe Rate der Spontanreaktivierung. Dabei kommt es zur Freisetzung von Virionen. Die PKC spielt eine zentrale Rolle bei der 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetat (TPA) getriggerten Reaktivierung des lytischen EBV-Zyklus. Dennoch konnte gezeigt werden, dass die PKC-Inhibierung nicht zu einer erniedrigten Rate der Spontanreaktivierung führt [DAVIES *et al.*, 1991]. In früheren Arbeiten wurde untersucht, ob der Mechanismus der Spontanreaktivierung in Raji Zellen durch die PLA2 vermittelt wird [MAAS, 2002]. Es wurde nachgewiesen, dass es bei der Verwendung spezifischer PLA2-Inhibitoren zu einer verminderten Rate der Spontanreaktivierung kommt. Nun sollte bestätigt werden, dass die PLA2 auch in B95-8 Zellen in den Mechanismus der Spontanreaktivierung involviert ist. Ist dabei die Rate der Spontanreaktivierung unter Inhibierung der PLA2 erniedrigt, so besteht ein Zusammenhang zwischen der PLA2 und den Signaltransduktionswegen, die zur Spontanreaktivierung des EBV in latent infizierten Zellen führen. Bei dem Inhibitor Quinacrine zeigt sich im Immunfluoreszenz-Test (EA-D-Expression) 24 Stunden nach der Behandlung mit dem Inhibitor kein Expressionsunterschied im Vergleich zu unbehandelten B95-8 Zellen. Dies widerspricht den Ergebnissen früherer Arbeiten. Dort konnte eine signifikant verminderte Expression des EA-D in B95-8 Zellen nach der Behandlung mit Quinacrine festgestellt werden [MAAS, 2002]. Bei der Behandlung der B95-8 Zellen mit Arachidonyl-trifluoromethylketon zeigte sich sowohl nach 12 als auch nach 24 Stunden im Immunfluoreszenz-Test eine deutlich gesteigerte Expression des EA-D. Möglicherweise induziert die Behandlung der B95-8 Zellen mit den Inhibitoren eine gesteigerte unspezifische Fluoreszenz, wodurch falsch positive Zellen gezählt werden. Der Inhibitor Arachidonyl-trifluoromethylketon verursacht eine spezifische Inhibierung der humanen cPLA2. Ob er

jedoch eine ähnliche Wirkung bei den von Affen stammenden B95-8 Zellen hat, steht in Frage. Dadurch kann hier nicht eindeutig gezeigt werden, dass die PLA2 in den Mechanismus der Spontanreaktivierung involviert ist. Um aussagekräftigere Ergebnisse zu erhalten, sollten sowohl noch weitere Inhibitoren verwendet werden als auch die Nachweismethode möglicherweise modifiziert werden.

5.5 Wirkung der SAH-Überexpression auf die Zelldifferenzierung

Raji Zellen werden durch das humane Gangliosid LM1 zu einer Reaktivierung des latent persistierenden EBV veranlasst. Parallel sistiert die Zellteilung und die Zellen beginnen zu differenzieren. Dabei wird die Expression der Oberflächenantigene CD21 und HLA-DR verringert [SCHAADÉ *et al.*, 1999]. Frühere Untersuchungen hatten gezeigt, dass die s-Adenosylhomocystein-Hydrolase in den Prozess der Gangliosid-getriggerten Differenzierung von Raji Zellen involviert ist [MARET, 2003; MAAS, 2002]. In dieser Arbeit wurden die DNA-Syntheserate, die Zellproliferation sowie die modifizierte Expression ausgewählter Oberflächenantigene untersucht und geprüft.

Dazu wurde ein, zwei, vier und acht Tage nach der Transfektion der B95-8 Zellen mit pcDNA-AHCY und pcDNA-3.1 E die DNA-Syntheserate bestimmt. Es konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von SAH in B95-8 Zellen eine signifikante Erhöhung der DNA-Syntheserate induziert. Sie erreichte vier Tage nach der Transfektion ein Maximum und war um den Faktor 2,6 größer als die Kontrolle. Dieses Ergebnis entsprach den Erwartungen, da in vorhergehenden Untersuchungen festgestellt wurde, dass die Überexpression von SAH in Raji Zellen ebenfalls zu einer gesteigerten DNA-Syntheserate führt [MARET, 2003]. Zusätzlich zu der Untersuchung der modifizierten DNA-Syntheserate wurde die veränderte Zellproliferation in den mit pcDNA-AHCY transfizierten B95-8 Zellen analysiert. Dazu wurde am Tag der Transfektion sowie ein, zwei, vier und acht Tage nach der Transfektion die Zellzahl bestimmt. Obwohl die Transfektion schonend erfolgte, blieb ein Anstieg der Zellzahl am ersten Tag aus. Dieses ist dadurch erklärbar, dass die Zellen aufgrund der Transfektion sowie der weiteren Behandlungen starkem Stress ausgesetzt waren. Ab dem zweiten Tag stieg die Zellzahl der mit pcDNA-AHCY transfizierten B95-8 Zellen jedoch im Vergleich zu den Kontrollzellen, welche mit pcDNA-3.1 E transfiziert waren, signifikant an und war am Tag vier um den Faktor 2 und am Tag acht um den Faktor 2,7 größer. Eine Überexpression von SAH in B95-8 Zellen führt somit zu einer gesteigerten Zellproliferation. Dieses steht im Gegensatz zu den Ergebnissen, welche bei der Überexpression von SAH in Raji Zellen beobachtet wurden. Dort konnte ein Einfluss der SAH-Überexpression auf das Zellwachstum

nicht festgestellt werden [MARET, 2003]. SAH scheint in B95-8 Zellen andere Effekte zu induzieren als in Raji Zellen. Es könnte auch sein, dass der Effekt der gesteigerten Zellproliferation in den Raji Zellen durch einen anderen Mechanismus kompensiert wird und dadurch nicht zu Tage tritt.

Der Einfluss einer SAH-Überexpression in B95-8 Zellen auf die Expression spezifischer Oberflächenantikörper wurde mittels Durchflusszytometrie untersucht. Das Expressionsmuster der Oberflächenantigene ist für verschiedene Zelltypen charakteristisch. Sie sind wichtig bei der Zell-Zell-Erkennung sowie als Kofaktoren bzw. Rezeptoren bei Signalübertragungen [BARCLAY *et al.*, 1997]. Die spezifischen Oberflächenantigene, welche auf differentielle Expression untersucht werden sollten, ergaben sich aus früheren Untersuchungen [SCHAADE *et al.*, 1999]. Die Oberflächenmarker stellen in erster Linie Aktivierungsmarker sowie Adhäsionsfaktoren dar. Ebenfalls konnte in früheren Untersuchungen festgestellt werden, dass bei der Überexpression von SAH in Raji Zellen eine veränderte Expression der Oberflächenantigene CD19, CD21, CD23, CD40, CD44 und CD58 induziert wird [MARET, 2003; MAAS, 2002]. In dieser Doktor Arbeit konnte bei einer SAH-Überexpression in B95-8 Zellen für keines der Oberflächenantigene eine veränderte Expression festgestellt werden. Somit sind die zelldifferenzierenden Effekte, die eine SAH-Überexpression in Raji Zellen induziert, nicht auf die Zell-Linie B95-8 zu übertragen.

Eine Erklärung für die unterschiedliche Wirkung von SAH auf Raji Zellen und B95-8 Zellen liegt im unterschiedlichen Differenzierungsgrad der beiden Zell-Linien. Bei den B95-8 Zellen handelt es sich um mit Epstein-Barr Virus infizierte B-Lymphozyten aus Marmosettaffen. Das Virus ist in der Lage einen kompletten lytischen Zyklus zu durchlaufen und infektiöse Virionen freizusetzen [MILLER & LIPMANN, 1973]. Bei der Zell-Linie Raji handelt es sich ebenfalls um EBV positive B-Lymphozyten. Diese konnten aus dem menschlichen Burkitt-Lymphom isoliert werden. Da die Raji Zellen eine Deletion im Gen für das Virus-Kapsid-Antigen (VCA) aufweisen, sind sie nicht in der Lage den kompletten lytischen Zyklus zu durchlaufen und intakte Virionen freizusetzen. Nach der Induktion des lytischen Zyklus werden jedoch frühe Genprodukte wie EA-D, BZLF1 und BHRF1 gebildet [PULVERTAFT, 1964]. Während der Entwicklung einer B-Zelle von der Stammzelle über die Pro-B-Zelle bis hin zur reifen Plasmazelle können die Lymphozyten erst ab einem bestimmten Differenzierungsgrad Immunglobuline produzieren. B95-8 Zellen sind in der Differenzierung weniger weit fortgeschritten und sind damit weder in der Lage Komplement-Rezeptoren zu exprimieren, noch Immunglobuline zu sezernieren [CALLARD *et al.*, 1988; ROBINSON *et al.*, 1977; POPE, 1979]. Die Differenzierung von Raji Zellen hingegen ist weiter fortgeschritten. So können Raji Zellen vor allem Komplement-Faktoren exprimieren und sind ebenfalls in der Lage Immunglobuline zu produzieren [ROBINSON *et al.*, 1977; POPE, 1979].

5.6 Ausblick

Die vorliegende Arbeit trägt dazu bei, die Signale der SAH getriggerten Reaktivierung des lytischen EBV-Zyklus in B95-8 Zellen aufzuzeigen.

Nachfolgende Untersuchungen müssen darauf abzielen, die Weiterleitung der Signale in den B95-8 Zellen detaillierter darzustellen. Auf diesem Wege könnte ein Angriffspunkt gefunden werden, der durch Aktivierung des lytischen Zyklus zu einer Selbstzerstörung EBV-positiver Tumorzellen führt.

6 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, die Reaktion von B95-8 Zellen nach Überexpression von s-Adenosylhomocystein-Hydrolase (SAH) zu analysieren. Ein Schwerpunkt war die Signaltransduktion, die zu einer Reaktivierung des lytischen EBV-Zyklus führt.

Als Vorarbeit wurde,

- das Gen der SAH in einen Fusionsvektor gebracht (pcDNA-AHCY),
- mittels Endozytose in B95-8 Zellen transfiziert,
- der Erfolg der Transfektion durch den Nachweis des β -Lactamase-Gens auf dem Vektor pcDNA-AHCY überprüft.

Im Einzelnen wurden folgende Ergebnisse erzielt:

1. Nach SAH-Überexpression war eine gesteigerte Expression des Early Antigens (EA-D) im Immunfluoreszenz-Test nachweisbar.
2. Die Expression von BZLF1 stieg zwei und acht Stunden sowie vier Tage nach der SAH-Überexpression an.
3. Bei dem Nachweis des Gens BRLF1 konnte nach der Überexpression mit SAH kein Unterschied in der veränderten Expression ausgemacht werden.
4. Die Transfektion mit SAH führte zu einer höheren Abundanz phosphorylierter und damit aktivierter Proteinkinase C.
5. Die Auswirkungen der Inhibierung von PKC und PLA2 waren nicht eindeutig zu bestimmen. Es ist zu vermuten, dass die Aktivierung des lytischen Zyklus zusätzlich auf einem PKC bzw. PLA2 unabhängigen Weg induziert wird.
6. Die DNA-Syntheserate in pcDNA-AHCY transfizierten B95-8 Zellen war im Vergleich zu Kontrollzellen um den Faktor 2,6 höher.
7. Die Zellproliferationsrate der B95-8 Zellen stieg nach SAH-Überexpression am achten Tag um den Faktor 2,7 an.
8. Die Überexpression von SAH führte nicht zu einer Vermehrung der Oberflächenantigene CD11a, CD19, CD23, CD30, CD40, CD44, CD54 und CD58.

Auf Basis der hier dargestellten Ergebnisse können folgende Mechanismen nach SAH-Überexpression in B95-8 Zellen angenommen werden:

- Eine gesteigerte Expression des Gens BZLF1 sowie des Early Antigens (EA-D) waren erkennbar.
- Der SAH getriggerte Signaltransduktionsweg ist PKC abhängig.

- Ein Zusammenhang zwischen der SAH und der LM1 getriggerten Zelldifferenzierung wurde nicht gefunden.
- Eine gesteigerte DNA-Synthese sowie eine erhöhte Zellproliferation waren messbar.

Die Charakterisierung von Signalen während der SAH getriggerten Aktivierung des lytischen EBV-Zyklus in B95-8 Zellen ist ein erster Schritt Reaktionsmechanismen aufzuklären, die bei der Aktivierung des latent persistierenden EBV eine Rolle spielen. Dies ist ein wichtiger Beitrag für die Entwicklung von Substanzen zur Therapie EBV assoziierter Tumoren.

7 Literaturverzeichnis

- Adamson AL, Darr D, Holly-Guthrie E, Johnson RA, Mauser A, Swenson J & Kenny S** (2000): Epstein-Barr virus immediate early proteins BZLF1 and BRLF1 activate the ATF2 transcription factor by increasing the levels of phosphorylated p38 and c-Jun N-terminal kinases. *J. Virology* 74 (3): 1224-1233.
- Baer R, Bankier AT, Biggin MD, Deininger PL, Farrell PJ, Gibson TJ, Hatfull G, Hudson GS, Satchwell SC, Séguin C, Tuffnell PS & Barrell BG** (1984): DNA sequence and expression of the B95-8 Epstein-Barr virus genome. *Nature* 310: 207-211.
- Barclay AN, Brown MH, Law SKA, McKnight AJ, Tomlinson MG & van der Merwe PA** (1997): *The Leucocyte Antigen Facts Book*. 2nd edn. Academic Press.
- Bister K, Yamamoto N & zur Hausen H** (1979): Differential inducibility of Epstein-Barr virus in cloned, non-producer Raji cells. *Int J Cancer* 23 (6): 818-825.
- Bray M, Driscoll J & Huggins JW** (2000): Treatment of lethal Ebola virus infection in mice with a single dose of an S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase inhibitor. *Antiviral Res.* 45 (2): 135-147.
- Callard RE, Lau YL, Shields JG, Smith SH, Cairns SJ, Flores-Romo L & Gordon J** (1988): The marmoset B-lymphoblastoid cell line (B95-8) produces and responds to B-cell growth and differentiation factors: role of shed CD23 (cCD23). *Immunology* 65: 379-384.
- Castagna M, Takai Y, Kaibuchi K, Sano K, Kikkawa U & Nishizuka Y** (1982): Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters. *J Biol Chem* 257 (13): 7847-7851.
- Chevallier-Greco A, Manet E, Chavrier P, Mosnier C, Daillie C & Sergeant A** (1986): Both Epstein-Barr virus (EBV)-encoded transacting factors, EB1 and EB2, are required to activate transcription from an EBV early promoter. *EMBO J.* 5 (12): 3243-3249.
- Chiang PK, Gordon RK, Tal J, Zeng GC, Doctor BP, Pardhasaradhi K & McCann PP** (1996): s-adenosylmethionin and methylation. *FASEB J.* 10 (4): 471-480.

- Coutryman J & Miller G** (1985): Activation of expression of latent Epstein-Barr herpesvirus after gene transfer with a small cloned subfragment of heterogeneous viral DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82: 4085-4089.
- Daibata M, Speck SH, Mulder C & Sairenji T** (1994): Regulation of the BZLF1 promotor of Epstein-Barr virus by second messengers in anti-immunglobulin-treated B cells. *Virology* 198: 446-454.
- Davies AH, Grand RJ, Evans FJ & Rickinson AB** (1991): Induction of Epstein-Barr virus lytic cycle by tumor-promoting and non-tumor-promoting phorbol esters requires active protein kinase C. *J Virology* 65: 6838-6844.
- Engelhard M, Trenn G & Brittinger G** (1998): Hochmaligne Non-Hodgkin-Lymphome. In: Seeber S & Schütte J (Hrsg.): Therapiekonzepte Onkologie. Berlin Springer Verlag: 333-372.
- Epstein MA & Achong BG** (1979): The Epstein-Barr virus. Berlin: Springer Verlag.
- Epstein MA, Achong BG & Barr YM** (1964): Virus particles in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. *Lancet* 1: 702-703.
- Faulkner GC, Krajewski AS & Crawford DH** (2000): The ins and outs of EBV infection. *Trends in Microbiology* 8 (4): 185-189.
- Feederle R, Kost M, Baumann M, Janz A, Drouet E, Hammerschmidt W & Delecluse HJ** (2000): The Epstein-Barr virus lytic program is controlled by the co-operative functions of two transactivators. *EMBO Journal* 19 (12): 3080-3089.
- Flemington E & Speck S** (1990): Autoregulation of Epstein-Barr virus putative lytic switch gene BZLF1. *J Virology* 64: 1227-1232.
- Fonteh AN** (2002): Differential effects of arachidonoyl trifluoromethyl ketone on arachidonic acid release and lipid mediator biosynthesis by human neutrophils. *Eur. J. Biochem.* 269: 3760-3770.
- Gao X, Ikuta K, Tajima M & Sairenji T** (2001): 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate induces Epstein-Barr virus reactivation via NF- κ B and AP-1 as regulated by protein kinase C and mitogen activated protein kinase. *Virology* 286: 91-99.

- Gassen HG & Schrimpf G** (1999): Gentechnische Methoden – Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg Berlin.
- Gerber P** (1972): Activation of Epstein-Barr virus by 5-bromodeoxyuridine in “virus free” human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69: 83-85.
- Gershburg E & Pagano JS** (2002): Phosphorylation of the Epstein-Barr virus (EBV) DNA polymerase processivity factor EA-D by the EBV-encoded protein kinase and effects of the L-riboside benzimidazole 1263W94. *J Virology* 76 (3): 998-1003.
- Gradoville L, Kwa D, El-Guindy A & Miller G** (2002): Protein kinase C independent activation of the Epstein-Barr virus lytic cycle. *J. Virology* 76 (11): 5612-5626.
- Gruffat H & Sergeant A** (1994): Characterization of the DNA-binding site repertoire for the Epstein-Barr virus transcription factor R. *Nucleic Acids Res.* 22 (7): 1172-1178.
- Gutiérrez MI, Judde JG, Margrath IT & Bhatia KG** (1996): Switching viral latency to viral lysis: a novel therapeutic approach for Epstein-Barr virus associated neoplasia. *Cancer Research* 56 (5): 969-972.
- Hallee TJ, Evans AS, Niederman JC, Brooks CM & Voegtly JH** (1974): Infectious mononucleosis at the United States Military Academy – A prospective study of a single class over four years. *Yale Journal of Biology and Medicine* 3: 182-195.
- Hampar B, Derge JG, Maetos LM & Walker JL** (1972): Synthesis of Epstein-Barr virus after activation of the viral genom in a “virus negativ” human lymphoblastoid cell (Raji) made resistant to 5-bromodeoxyuridine. *Proc. Natl. acad. Sci. USA* 69: 78-82.
- Hayashi K** (1992): Effect of protein kinase C inhibitors with different action mechanisms on Epstein-Barr virus replication. *Intervirology* 33: 217-224.
- Hecker E** (1971): Isolation and characterization of the cocarcinogenic principles from croton oil. *Methods Cancer Research* 6: 439-484.
- Henle W, Henle G, Zajac BA, Pearson G, Waubke R & Scriba M** (1970): Differential reactivity of human serums with early antigens induced by Epstein-Barr virus. *Science* 169: 188-190.

- Henle W & Henle G** (1968): Effect of arginine-deficient media on the herpes-type virus associated with cultured Burkitt tumor cells. *J Virology* 2: 182-191.
- Hu Y, Yang X, Yin DH, Mahadevan J, Kuczera K, Schowen RL & Borchardt RT** (2001): Computational characterization of substrate binding and catalysis in s-adenosylhomocysteine Hydrolase. *Biochemistry* 40: 15143-15152.
- Jarvis WD, Turner AJ, Povirk LF, Traylor RS & Grant S** (1994): Induction of apoptotic DNA fragmentation and cell death in HL-60 human promyelocytic leukemia cells by pharmacological inhibitors of protein kinase C. *Cancer Res.* 54 (7): 1707-1714.
- Kenney S, Kamine J, Holley-Guthrie E, Lin JC, Mar EC & Pagano J** (1989): The Epstein-Barr virus (EBV) BZLF1 immediate-early gene products differentially affects latent versus productive EBV promoters. *J Virology* 63: 1729-1736.
- Kiehl A & Dorsky DI** (1991): Cooperation of EBV DNA polymerase and EA-D (BMRF1) in vitro and colocalization in nuclei of infected cells. *Virology* 184: 330-340.
- Kleines M, Gärtner A, Ritter K & Schaade L** (2000): Early steps in termination of the immortalization state in Burkitt lymphoma: induction of genes involved in signal transduction, transcription, and trafficking by the ganglioside VI3 NeuAc-nLcOse4 Cer. *Biochemica et Biophysica Acta.* 1492: 139-144.
- Ku WC, Cheng AJ & Wang TC** (1997): Inhibition of telomerase activity by PKC inhibitors in human nasopharyngeal cancer cells in culture. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 241 (3): 730-736.
- Liebowitz D & Kieff E** (1993): Epstein-Barr virus. In: Roizman B, Whitley RJ & Lopez C (eds.) *The Human Herpesviruses*. NY Raven Press: 107-172.
- Liu S, Liu P, Borrás A, Chatila T & Speck SH** (1997): Cyclosporin A sensitive induction of the Epstein-Barr virus lytic switch is mediated via a novel pathway involving a MEF2 family member. *EMBO J.* 16 (1):143-153.
- Lu XR, Ong WY & Halliwell B** (2001): The phospholipase A₂ inhibitor quinacrine prevents increased immunoreactivity to cytoplasmic phospholipase A₂ (cPLA₂) and hydroxynonenal (HNE) in neurons of the lateral septum following fimbria-fornix transection. *Exp. Brain Research* 138: 500-508.

- Maas D** (2002): Untersuchungen zu Signaltransduktionsmechanismen bei der s-Adenosylhomocystein Hydrolase getriggerten Reaktivierung des Epstein-Barr Virus. Diplomarbeit am Institut für Medizinische Mikrobiologie, Fachbereich Virologie, RWTH Aachen.
- Manet E, Gruffat H, Trescol-Biemont MC, Moreno N, Chambard P, Giot JF & Sergeant A** (1989): Epstein-Barr virus bicistronic mRNAs generated by facultative splicing code for two transcriptional trans-activators. *EMBO J* 8 (6): 1819-1826.
- Maniatis T, Sambrook J & Fritsch EF** (1989): Molecular cloning: a laboratory handbook. NY Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Maret C** (2003): Überexpression von s-Adenosylhomocystein Hydrolase in Epstein-Barr Virus positiven Burkitt Lymphomzellen. Doktorarbeit am Institut für Medizinische Mikrobiologie, Fachbereich Virologie, RWTH Aachen.
- Menezes J, Leibold W, Klein G & Clements G** (1975a): Establishment and characterization of an Epstein-Barr virus negative lymphoblastoid B cell line (BJAB) from an exceptional, EBV genome negative African Burkitt's lymphoma. *Biomedicine* 22 (4): 276-284.
- Menezes J, Leibold W & Klein G** (1975b): Biological differences between Epstein-Barr virus strains with regard to lymphocyte transforming ability, superinfection and antigen induction. *Exp. Cell Res.* 92: 478-484.
- Mentzer SJ, Perrine SP & Faller DV** (2001): Epstein-Barr virus post-transplant lymphoproliferative disease and virus-specific therapy: pharmacological re-activation of viral target with arginine butyrate. *Transplant Infectious Disease* 3: 177-185.
- Metz S** (2002): Untersuchungen zu Signaltransduktionsmechanismen bei der Proteinkinase B getriggerten Reaktivierung des Epstein-Barr Virus. Diplomarbeit am Institut für Medizinische Mikrobiologie, Fachbereich Virologie, RWTH Aachen.
- Meuer S, Wittwer C & Nakagawara K** (2001): Rapid Cycle Real-Time PCR, Methods and Applications. Berlin: Springer Verlag.
- Miller G & Lipman M** (1973): Release of infectious Epstein-Barr virus by transformed marmoset leucocytes. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 70 (1): 190-194.

- Miller G, Robinson J, Heston L & Lipman M** (1974): Differences between laboratory strains of Epstein-Barr virus based on immortalization, abortive infection and interference. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 71: 4006-4010.
- Modrow S, Falke D & Truyen U** (2003): Molekulare Virologie. 2. Auflage. Heidelberg Berlin Spektrum Akademischer Verlag.
- Nemerow GR, Mold C, Schwend VK, Tollefson V & Cooper NR** (1987): Identification of gp350 as the viral glycoprotein mediating attachment of EBV to the EBV/C3d receptor of B cells: sequence homology of gp350 and C3 complement fragment C3d. *J Virology* 61 (5): 1416-1420.
- Nishizuka Y** (1984): The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumor promotion. *Nature* 308 (5961): 693-698.
- Ooka T** (1985): The molecular biology of Epstein-Barr virus. *Biomed. Pharmacother.* 39: 59-66.
- Pathmanathan R, Prasad U, Sadler R, Flynn K & Raab-Traub N** (1995): Clonal proliferations of cells infected with Epstein-Barr virus in preinvasive lesions related to nasopharyngeal carcinoma. *N. Engl. J. Med.* 333: 693-698.
- Pope JH** (1979): Transformation by the virus in vitro. In: Epstein MA & Achong BG (Hrsg.). *The Epstein-Barr Virus*, 206-223. Berlin: Springer Verlag
- Pulvertaft RJV** (1964): Cytology of Burkitt's tumor (African Lymphoma). *The Lancet* 1: 238-240.
- Quinlivan EB, Holley-Guthrie EA, Norris M, Gutsch D, Bachenheimer SL & Kenney SC** (1993): Direct BRLF1 binding is required for cooperative BZLF1/BRLF1 activation of the Epstein-Barr virus early promoter, BMRF1. *Nucleic Acids Res* 21 (8): 1999-2007.
- Ragoczy T, Heston L & Miller G** (1998): The Epstein-Barr virus Rta protein activates lytic cycle genes and can disrupt latency in B lymphocytes. *Journal of Virology* 72 (10): 7978-7984
- Rickinson AB, Lee SP & Steven NM** (1996): Cytotoxic T lymphocyte responses to Epstein-Barr virus. *Curr. Opin. Immunol.* 8: 492-497.

- Ritter K, Kühl RJ, Semrau F, Eiffert H, Kratzin HD & Thomssen R** (1994): Manganese superoxide dismutase as a target of autoantibodies in acute Epstein-Barr virus infection. *Journal of Experimental Medicine* 180 (5): 1995-1998.
- Robinson JE, Andiman WA, Henderson E & Miller G** (1977): Host-determined differences in expression of surface marker characteristics on human and simian lymphoblastoid cell lines transformed by Epstein-Barr virus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74 (2): 749-753.
- Roizman, B** (1990): Herpesviridae: a brief introduction. In: Fields BN & Knipe DM (eds.). *Virology* 2nd. NY Raven Press: 1787-1793.
- Rooney CM, Rowe DT, Ragot T & Farrell PJ** (1989): The spliced BZLF1 gene of Epstein-Barr virus (EBV) transactivates an early EBV Promoter and induces the virus productive cycle. *Journal of Virology* 63 (7): 3109-3116.
- Ryou C, Legname G, Peretz D, Craig JC, Baldwin MA & Prusiner SB** (2003): Differential inhibition of prion propagation by enantiomers of quinacrine. *Lab. invest.* 83 (6): 837-843.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB & Erlich HA** (1988): Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491.
- Sakuta H & Yoneda I** (1994): Inhibition by SKF 525A and quinacrine of endogenous glibenclamide sensitive K⁺ channels in follicle enclosed xenopus oocytes. *Eur J Pharmacol.* 252 (1): 117-121.
- Schaade L, Kleines M, Krone B, Hausding M, Walter R & Ritter K** (2000): Enhanced transcription of the s-adenosylhomocystein hydrolase gene precedes Epstein-Barr virus lytic gene activation in ganglioside-stimulated lymphoma cells. *Med. Microbiol. Immunol.* 189: 13-18.
- Schaade L, Kleines M, Walter R, Thomssen R & Ritter K** (1999): A membrane-located glycosphingolipid of monocyte/granulocyte lineage cells induces growth arrest and triggers lytic viral cycle in Epstein-Barr virus genome-positive Burkitt lymphoma lines. *Med. Microbiol. Immunol.* 188: 23-29.

- Shah DS, Sakthivel T, Toth I, Florence AT & Wilderspin AF** (2000): DNA transfection and transfected cell viability using amphipathic asymmetric dendrimers. *Int. J. Pharm.* 208 (1-2): 41-48.
- Sinclair AJ, Brimmell M & Farrell PJ** (1992): Reciprocal antagonism of steroid hormones and BZLF1 in switch between Epstein-Barr virus latent and productive cycle gene expression. *J Virology* 66 (1): 70-77.
- Sixbey JW, Nedrud JG, Raab-Traub N, Hanes RA & Pagano JS** (1984): Epstein-Barr virus replication in oropharyngeal epithelial cells. *N. Engl. J. Med.* 310: 1225-1230.
- Snoeck R, Andrei G, Neyts J, Schols D, Cools M, Balzarini J & De Clercq E** (1993): Inhibitory activity of s-adenosylhomocystein hydrolase inhibitors against human cytomegalovirus replication. *Antiviral Research* 21: 197-216.
- Speck SH, Chatila T & Flemington E** (1997): Reactivation of Epstein-Barr virus: regulation and function of the BZLF1 gene. *Trends in Microbiology* 5 (10): 399-405.
- Street IP, Lin HK, Laliberte F, Ghomashchi F, Wang Z, Perrier H, Tremblay NM, Huang Z, Weech PK & Gelb MH** (1993): Slow- and tight-binding inhibitors of the 85-kDa human Phospholipase A2. *Biochemistry* 32 (23): 5935-5940.
- Stupp R & Vokes EE** (1998): Kopf- und Halstumoren. In: Seeber S & Schütte J (Hrsg.). *Therapiekonzepte Onkologie*. Berlin Springer: 436-475.
- Takada K, Shimizu N, Sakuma S & Ono Y** (1986): Transactivation of the latent Epstein-Barr virus (EBV) genome after transfection of the EBV DNA fragment. *J Virology* 57: 1016-1022.
- Takahashi I, Kobayashi E, Nakano H, Murakata C, Saitoh H, Suzuki K & Tamaoki T** (1990): Potent selective inhibition of 7-O-methyl UCN-01 against protein kinase C. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 255 (3): 1218-1221.
- Tang MX, Redemann CT & Szoka FC** (1996): In vitro gene delivery by degraded polyamidoamine dendrimers. *Bioconjug. Chem.* 7 (6): 703-714.
- Tanner J, Weis J, Fearon D, Whang Y & Kieff E** (1987): Epstein-Barr virus gp350/220 binding to the B lymphocyte C3d receptor mediates adsorption, capping and endocytosis. *Cell* 50: 203-213.

- Toullec D, Pianetti P, Coste H, Bellevergue P, Grand-Perret T, Ajakane M, Baudet V, Boissin P, Boursier E & Loriolle F** (1991): The bisindolylmaleimide GF 109203X is a potent and selective inhibitor of protein kinase C. *J Biol Chem* 266 (24): 15771-15781.
- Turner MA, Yang X, Yin D, Kuczera K, Borchardt RT & Howell PL** (2000): Structure and function of s-adenosylhomocystein hydrolase. *Cell Biochem. Biophys.* 33: 101-125.
- Walling DM, Flaitz CM, Nichols CM, Hudnall SD & Adler-Storthz K** (2001): Persistent productive Epstein-Barr virus replication in normal epithelial cells in vivo. *Journal of Infectious Diseases* 184: 1499-1507.
- Westphal EM, Mauser A, Swenson J, Davis MG, Talarico CT & Kenny SC** (1999): Induction of lytic Epstein-Barr virus (EBV) infection in EBV-associated malignancies using adenovirus vectors in vitro and in vivo. *Cancer Research* 59: 1485-1491.
- Yajima Y & Nonoyama M** (1976): Mechanisms of infection with Epstein-Barr virus. I. Viral DNA replication and formation of noninfectious virus particles in superinfected Raji cells. *Journal of Virology* 19 (1): 187-194.
- Yin D, Yang X, Hu Y, Kuczera K, Schowen RL, Borchardt RT & Squier TC** (2000): Substrate binding stabilizes s-adenosylhomocysteine hydrolase in a closed conformation. *Biochemistry* 39: 9811-9818.
- Yoshiyama H, Shimizu N & Takada K** (1995): Persistent Epstein-Barr virus infection in a human T-cell line: unique program of latent virus expression. *The EMBO Journal* 14 (15): 3706-3711.
- Young LS** (1999): Epstein-Barr virus infection and persistence: a B-cell marriage in sickness and in health. *The Lancet* 354: 1141-1142.
- Yuan CS, Liu S, Wnuk SF, Robins MJ & Borchardt RT** (1996): Design and synthesis of s-adenosylhomocysteine hydrolase inhibitors as broad-spectrum antiviral agents. In: De Clercq E (ed.). *Advances in Antiviral Drug Design* vol 2. London UK JAI Press: 41-88.
- Zacharias U, Xu Y, Hagege J, Sraer JD, Brass LF & Rondeau E** (1995): Thrombin, phorbol ester and cAMP regulate thrombin receptor protein and mRNA expression by different pathways. *Journal of Biological Chemistry* 270 (2): 545-550.

- Zalani S, Holley-Guthrie E & Kenney S** (1996): Epstein-Barr virus latency is disrupted by the immediate early BRLF1 protein through a cell specific mechanism. *Microbiology* 93: 9194-9199.
- Zeng Y, Middeldrop J, Madjar JJ & Ooka T** (1997): A major DNA binding protein encoded by BALF2 open reading frame of Epstein-Barr virus (EBV) forms a complex with other EBV DNA-binding proteins: DNase, EA-D and DNA polymerase. *Virology* 239: 285-295.
- zur Hausen H, O'Neill FJ & Freese UK** (1978): Persisting oncogenic herpesvirus induced by the tumour promotor TPA. *Nature* 272: 373-375.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. K. Ritter danke ich für die Vergabe des Themas sowie für die Bereitstellung sehr guter Arbeitsbedingungen.

Für die gute Betreuung und die konstruktive Durchsicht dieser Arbeit möchte ich mich bei Herrn Dr. Michael Kleines bedanken.

Ebenso bedanke ich mich ganz herzlich bei Dr. Michele Peters und Kirsten Kallinna aber auch bei allen anderen Diplomanden, Doktoranden und Mitarbeitern des Instituts für die freundliche Aufnahme, die gute Zusammenarbeit und das angenehme Arbeitsklima.

Mein besonderer Dank gilt meiner Freundin Christina für die vielen aufmunternden Worte und die konstruktive Kritik an dieser Arbeit.

Zu guter Letzt bedanke ich mich bei meinen Eltern, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, indem sie mir ein sorgenfreies und schönes Studium ermöglichten.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Georg Werth
Geburtsdatum	22. März 1977
Geburtsort	Bedburg

Schulbildung

1983 – 1987	Grundschule, Bedburg
1987 – 1997	Norbert Gymnasium Knechtsteden, Dormagen
	Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Zivildienst

08/1997 – 08/1998	Intensivstation, Krankenhaus St. Hubertusstift, Bedburg
-------------------	--

Studium

10/1998 – 05/2005	Studium der Humanmedizin Rheinisch-Westfälisch Technische Hochschule Aachen
08/2000	Physikum
08/2001	1. Staatsexamen
04/2004	2. Staatsexamen
05/2005	3. Staatsexamen