

**"Generierung von Transposonmutanten des Epstein-Barr Virus
zur Charakterisierung von Genfunktionen für die lytische
Virusvermehrung und die virale Latenz"**

Von der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen zur Erlangung des
akademischen Grades einer Doktorin der Naturwissenschaften genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Diplom-Biopharmakologin

Michele Peters

aus Greven

Berichter: Universitätsprofessor Dr. rer. nat. Fritz Kreuzaler
Universitätsprofessor Dr. med. Klaus Ritter

Tag der mündlichen Prüfung: 29.10.2004

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online
verfügbar.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
1.1. Aufbau und Genetik des EBV	1
1.2. Virus und Wirt	4
1.2.1. Infektionsverlauf	4
1.2.2. Immunabwehr und Immunüberwachung	6
1.3. Strategien zur Charakterisierung von EBV-Genfunktionen	7
1.4. Ziel der Arbeit	10
1.5. Arbeitsplan	10
 2. Material	 11
2.1. Zell-Linien	11
2.2. Bakterienstämme	12
2.3. Plasmide	12
2.4. Primer und Hybridisierungssonden	15
2.5. Chemikalien	18
2.6. Enzyme	19
2.7. Antikörper	19
2.8. Zellkulturmedien	20
2.9. Lösungen	20
 3. Methoden	 23
3.1. Kultivierung, Vermehrung und Aufbewahrung von Bakterien	23
3.2. Kultivierung, Vermehrung und Aufbewahrung von Mammalia-Zellen	23
3.3. <i>In-vitro</i> -Transposonmutagenese	24
3.4. Klonierung von PCR-Produkten	24
3.5. Hitzeschocktransformation	25
3.6. Transfektion von eukaryotischen Zellen durch Endozytose	25
3.6.1. Transiente Transfektion	25
3.6.2. Stabile Transfektion	27
3.7. Superinfektion von Raji-Zellen	27
3.8. Isolierung von B-Lymphozyten aus Vollblut	28
3.9. Infizieren von EBV-negativen Zellen	29
3.10. DNA-Minipräparation	30
3.11. DNA-Maxipräparation	30

3.12. Präparation von DNA aus Zellkulturen und Zellkulturüberständen	30
3.13. Verdau mit Restriktionsendonukleasen	30
3.14. Präparation von RNA aus Zellkulturen	31
3.15. Reverse Transkription (RT)	31
3.16. PCR (<i>polymerase chain reaction</i>)	31
3.16.1. Konventionelle PCR	32
3.16.2. <i>Realtime</i> PCR mit dem <i>LightCycler</i>	37
3.17. Herstellung DIG markierter DNA-Sonden	39
3.18. DNA-Sequenzierung	40
3.19. Immunfluoreszenztest (IFT)	40
3.20. Durchflußzytometrie (FACS = <i>Fluorescence activated cell sorter</i>)	41
3.21. Southern Blot	42
3.22. Reverser Northern Blot	43
3.23. <i>In situ</i> Hybridisierung	43
 4. Ergebnisse	 45
4.1. Entwicklung einer Strategie zur Absättigung von EBV-Subklonen	46
4.1.1. Komplettierung der Mutagenese von Klon 219	46
4.1.2. Bestimmung des Insertionsortes des Transposons	47
4.2. Nachweis der singulären Transposonintegration in Mutanten-Klone	49
4.3. Generierung rekombinanter Virionen am Beispiel einer BGLF-2-Mutante	52
4.4. Nachweis der Infektiosität von rekombinanten Virionen	53
4.5. Charakterisierung der EBV-BGLF-5-Mutante	54
4.5.1. Nachweis viraler Genexpression auf Transkriptebeine	55
4.5.2. Sequenzierung des EBNA-2 Gens	58
4.5.3. Nachweis viraler Genexpression auf Proteinebene	60
4.5.4. Morphologie infizierter B-Lymphozyten	62
4.5.5. Nachweis der Expression relevanter Oberflächenantigene	63
4.5.6. Expressionskinetik des BGLF-5 Gens in Wildtyp-EBV-infizierten BJAB-Zellen	65
4.5.6.1. Nachweis der Expression von BGLF-5 durch Reversen Northern Blot	65
4.5.6.2. Nachweis der Expression von BGLF-5 mittels <i>Realtime</i> PCR	66
4.6. Reversion der Mutation im BGLF-5 Gen	68
4.6.1. Kompensation der BGLF-5-Mutation	69
4.6.1.1. Konstruktion eines BGLF-5-Überexpressionsvektors	69
4.6.1.2. Etablierung einer stabil mit pGlowDNase transfizierten Zell-Linie	70
4.6.1.3. Expression von BGLF-5 in BJAB-DNase Zellen nach Wildtyp-EBV-Infektion	71

4.6.1.4. Infektion von BJAB-DNase Zellen mit EBV-BGLF-5 ⁻	72
4.6.2. Rekombination von EBV-BGLF-5 ⁻ zu Wildtyp-Virionen	73
4.7. Charakterisierung der BDLF-2-Mutante	74
4.7.1. Nachweis viraler Genexpression auf Transkriptebeine	75
4.7.2. Nachweis viraler Genexpression auf Proteinebene	77
4.7.3. Morphologie infizierter B-Lymphozyten	79
4.7.4. Nachweis der Expression relevanter Oberflächenantigene	79
4.7.5. Expressionskinetik von BDLF-2 in Wildtyp-EBV-infizierten BJAB-Zellen	80
4.8. Reversion der Mutation im BDLF-2 Gen	82
4.8.1. Kompensation der BDLF-2-Mutation	82
4.8.1.1. Konstruktion eines BDLF-2-Überexpressionsvektors	82
4.8.1.2. Etablierung einer stabil mit pGlowBDLF-2 transfizierten Zell-Linie	82
4.8.1.3. BDLF-2-Expression in BJAB-BDLF-2 Zellen nach Wildtyp-EBV-Infektion ...	83
4.8.1.4. Infektion von BJAB-BDLF-2 Zellen mit EBV-BDLF-2 ⁻	84
4.8.2. Rekombination von EBV-BDLF-2 ⁻ zu Wildtyp-Virionen	84
4.9. Analyse von Wildtyp-EBV-infizierten B-Lymphozyten, Akata- und BJAB-Zellen	84
4.9.1. Nachweis viraler Genexpression auf Proteinebene	85
4.9.2. Nachweis von EBV in infizierten Zellkulturen	87
4.9.3. Nachweis der Expression lytischer Gene	88
4.9.4. Nachweis der Expression von Latenzgenen	88
4.9.5. Infektion von B-Lymphozyten mit Zellkulturüberständen EBV-positiver Zellen	90
5. Diskussion	92
5.1. Absättigung von EBV-Subklonen mit Transposoninsertionen	92
5.2. Generierung rekombinanter Virionen	93
5.3. Charakterisierung der BGLF-2-Mutante	95
5.4. Charakterisierung der BGLF-5-Mutante	96
5.5. Reversion der BGLF-5-Mutation	104
5.6. Charakterisierung der BDLF-2-Mutante	105
5.7. Reversion der BDLF-2-Mutation	109
5.8. Infektion primärer B-Zellen und EBV-negativer Zell-Linien mit Wildtyp-EBV ...	109
5.9. Ausblick	112
6. Zusammenfassung	114
7. Literaturverzeichnis	116

Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>complementary DNA, copy DNA</i>
CTL	cytotoxische T-Zelle
DIG	Digoxigenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
EA	<i>early antigen</i>
EBNA	EBV nucleäres Antigen
EBV	Epstein-Barr Virus
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorter</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	Fetales Kälberserum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
gp	Glykoprotein
HSV	Herpes Simplex Virus
IFT	Immunfluoreszenztest
Ig	Immunglobulin
IR	<i>internal repeat</i>
kb	Kilobase
LB	Luria Bertani
LMP	Latentes Membranprotein
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
NEA	<i>non essential aminoacids</i>
NPC	Nasopharynxkarzinom
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerasekettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure

rpm	<i>rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RT	Reverse Transkription
SDS	Natriumdodecylsulfat
Smp	Schmelzpunkt
TAE	Tris Acetat EDTA
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TBE	Tris Borat EDTA
TE	Tris EDTA
TR	<i>terminal repeat</i>
U	<i>unit</i>
U _L	<i>unit long</i> ; lange einheitliche Sequenz
U _S	<i>unit short</i> ; kurze einheitliche Sequenz

1. Einleitung

Das Epstein-Barr Virus (EBV), synonym Humanes Herpesvirus 4 (HHV-4), gehört zur Familie der *Herpesviridae* und wird dort der Unterfamilie γ -*Herpesviridae* dem Genus *Lymphocryptoviren* zugeordnet.

Erstmals wurde das Virus in Zellen eines Burkitt-Lymphoms, ein von DENNIS BURKITT 1958 beschriebenes Lymphosarkom, durch Anthony Epstein und Yvonne Barr nachgewiesen und in die Gruppe der Herpesviren eingeordnet [EPSTEIN ET AL., 1964]. Gertrude und Werner Henle klassifizierten das Virus als Mitglied einer neuen Gattung, da es sich serologisch von anderen Herpesviren unterschied. Sie stellten durch den Nachweis spezifischer Antikörper fest, daß das EBV weltweit verbreitet ist und mehr als 90 % der Erwachsenen Virusträger sind. Volker Diehl, ein Mitarbeiter von Henle, entdeckte 1968, daß das EBV Ursache der infektiösen Mononukleose (Pfeiffersches Drüsenfieber) ist [HENLE ET AL., 1968]. Nach der Primärinfektion persistiert das Virus lebenslang in B-Lymphozyten im Stadium der viralen Latenz. In regelmäßigen Abständen reaktiviert das Virus und wird im Speichel ausgeschieden. Infizierte B-Zellen aus dem peripheren Blut infizierter Patienten können in Kultur zu immortalen Zell-Linien heranwachsen [OOKA, 1985], ebenso können B-Zellen *in vitro* mit EBV infiziert und immortalisiert werden [TAKADA ET AL., 1979]. Aufgrund der Fähigkeit zur Transformation wird das EBV als Kofaktor für die Entstehung von Tumoren wie dem Burkitt-Lymphom, dem Nasopharynxkarzinom und dem Hodgkin-Lymphom angesehen [CRUCHLEY ET AL., 1997].

1.1. Aufbau und Genetik des EBV

Das EBV mißt im Durchmesser 180 nm und besteht aus einer äußeren Hüllmembran, dem Tegument, einem ikosaedrischen Capsid und einem Virus-Core, mit dem die lineare, doppelsträngige DNA verbunden ist (Abb. 1.1).

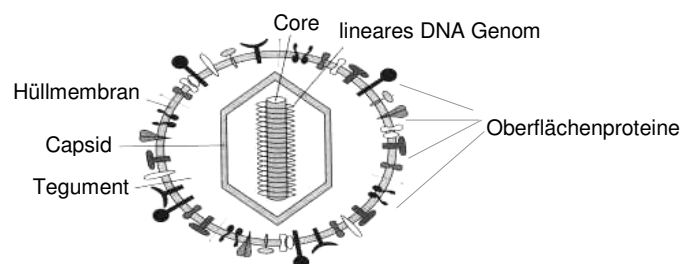


Abb. 1.1: Aufbau eines Herpesvirus, Schema nach MODROW ET AL., 2003

Im EBV-Genom werden etwa 100 offene Leseraster postuliert, jedoch sind nur die Funktionen von ca. 30 Genprodukten bekannt [BAER ET AL., 1984; OOKA, 1985]. Von den identifizierten Genen ist die überwiegende Zahl für den lytischen Zyklus relevant. Elf näher charakterisierte Gene werden während der viralen Latenz exprimiert. Zu diesen zählen EBNA-1, EBNA-2, EBNA-3A-C, EBNA-LP, LMP-1, LMP-2A-B und EBER-1-2 [RING, 1994]. Für die Immortalisierung von Zellen *in vitro* sind jedoch nur vier dieser Gene essentiell: EBNA-2, -3A, -3C und LMP-1 [HUMME ET AL., 2003]. In Abhängigkeit vom Expressionsmuster der Latenzgene werden drei Formen der Latenz unterschieden [OUDEJANS ET AL., 1995] (Tab. 1.1).

Tab. 1.1: Formen der Latenz

Latenz	exprimierte Gene	Vorkommen
I	EBER-1, EBER-2, EBNA-1	Burkitt-Lymphom
II	EBER-1, EBER-2, EBNA-1, LMP-1, oft auch LMP-2A und/oder LMP-2B	Nasopharynxkarzinom, T-Zell-Lymphome
III	alle 11 Latenzgene	Lymphoide Zell-Linien

Aus der Latenz können Epstein-Barr Viren in den lytischen Vermehrungszyklus übergehen. Dabei werden zunächst die *immediate early* Gene (BZLF-1, BRLF-1) exprimiert. Sie induzieren die Expression der *early* (z. B. BALF-5, BGLF-5, BMRF-1) und *late* Gene (Strukturproteine) [LIEBOWITZ ET AL., 1993]. ZEBRA, das Genprodukt von BZLF-1, ist der Aktivator für den lytischen Zyklus und Auslöser der lytischen Replikation [DAIBATA ET AL., 1994; ZETTERBERG ET AL., 2002]. Es handelt sich hierbei um ein bZIP-Protein, welches als Homodimer direkt an AP-1-ähnlichen Bindestellen, wie das *BZLF-1-response element* (ZREs) bindet [ZHANG ET AL., 1996]. Die Replikation der viralen DNA markiert den Übergang zwischen der frühen und der späten Genexpression, denn durch Inhibition der DNA-Synthese wird auch die Expression der späten Proteine inhibiert [OOKA, 1985; SERIO ET AL., 1997]. Das Genom wird im Zellkern nach dem *rolling circle* Prinzip vom lytischen Replikationsursprung (Ori_{lyt}) aus repliziert, so daß viele virale Genome in konkatemener Anordnung entstehen. Die Konkatemere werden in Einzel-Genome fragmentiert und in Nukleocapside verpackt [SATO ET AL., 1990]. Strukturproteine werden spät exprimiert. Hierzu gehören Nukleocapsid- und Tegumentproteine, sowie die Oberflächenproteine gp350/220, gp85 und gp42. Capsid- und Tegumentproteine werden in den Zellkern transportiert, wo der Zusammenbau der Nukleocapside stattfindet. Die Nukleocapside werden aus dem Zellkern über das endoplasmatische Retikulum ins Zytoplasma transportiert. Einerseits können die Virionen ihre endgültigen Hüllmembran durch Knospung durch die Plasmamembran, in die im Golgi-Apparat modifizierte virale Glykoproteine wie gp350/220 und gp85 eingelagert sind, erhalten. Andererseits kann die Knospung der Virionen in Golgi Vesikel erfolgen, in die ebenfalls Oberflächenproteine eingelagert sind. Hier erfolgt dann die Freisetzung der reifen Virionen über Exozytose durch die Plasmamembran [GONG ET AL., 1990; LIEBOWITZ ET AL., 1993].

Da für das EBV bisher kein permissives Zellkultursystem zur Untersuchung des lytischen Zyklus zur Verfügung steht, erfolgen die Untersuchungen an latent infizierten B-Zellen, in denen das Virus durch Phorbol ester, Butyrate, Ganglioside oder anti-IgM-Antikörper reaktiviert werden kann [OOKA, 1985; SPECK ET AL., 1997; SCHAADE ET AL., 1999].

1.2. Virus und Wirt

Durch eine EBV-Infektion kommt es zu diversen Interaktionen zwischen dem Virus und dem Wirt. Es werden einerseits Immunantworten ausgelöst, andererseits hat das EBV Strategien entwickelt dem Immunsystem zu entkommen und in B-Lymphozyten zu persistieren.

1.2.1. Infektionsverlauf

Bei der Primärinfektion gelangt das EBV über den Speichel auf die Schleimhaut des Oropharynx und kann die dort befindlichen B-Lymphozyten infizieren [FAULKNER ET AL., 2000]. In der Regel wird durch die Bindung des viralen Glykoproteinkomplexes gp350/220 (BLLF-1) an das Oberflächenprotein CD21 (C3d-Rezeptor) der B-Zellen die Aufnahme des Virus in die Zellen vermittelt [NIEDOBITEK ET AL., 2001]. Jedoch scheint eine effiziente Infektion zusätzlich von dem Glykoproteinkomplex gp85/gp25/gp42 abhängig zu sein. [MARUO ET AL., 2001]. Während in der akuten Infektionsphase in vielen B-Zellen die lytische Replikation mit der Freisetzung neuer Virionen erfolgt, gehen die Viren in anderen B-Zellen in die Latenzphase über [THORLEY-LAWSON ET AL., 1996].

Der lytische Zyklus wird durch das *immediate early* Genprodukt des BZLF-1 Gens ausgelöst; EBNA-1 dagegen fördert die Umwandlung des linearen viralen Genoms zum Episom und dessen Replikation, so daß die Viren in den Latenzzustand übergehen können [STRAUS ET AL., 1993]. Die Immortalisierung der B-Zellen geht mit der Expression von neun Latenzproteinen (EBNA-1, -2, -3A, -3B, -3C, -LP, LMP-1, -2A und -2B) und zwei RNA-Molekülen einher. Diese Proteine, wie auch die viralen Proteine des lytischen Zyklus, induzieren die Produktion neutralisierender Antikörper und lösen die Zerstörung der infizierten B-Zellen durch spezifische zytotoxische T-Zellen (CTL) aus [LIEBOWITZ ET AL., 1993; STEVEN ET AL., 1997]. Einige infizierte B-Lymphozyten können der Immunantwort entgehen, indem sie keine Antigene mehr auf der Zelloberfläche exprimieren und als ruhende B-Zellen persistieren, die aber wieder reaktiviert werden können. Das Verhalten von B-Lymphozyten nach einer EBV-Infektion hat Ähnlichkeit mit einer durch ein Antigen hervorgerufenen B-Zell-Antwort. Hierbei durchlaufen EBV-infizierte B-Zellen Differenzierungsstadien, wie sie sonst durch Antigenkontakt ausgelöst werden, und können so einer Immunantwort entgehen [DOLCETTI ET AL., 2003 (Abb.1.3)].

Im peripheren Blut können EBV-infizierte Zellen der Immunantwort entgehen, da die virale Proteinexpression nach Etablierung der Latenz auf LMP-2A und eventuell auch EBNA-1 reduziert ist [TIERNEY ET AL., 1994]. Obwohl LMP-2 ein potentiell Antigen für CTLs ist, wird

es dennoch nicht erkannt, da die infizierten B-Zellen ruhen und das kostimulierende B7-Molekül fehlt. B7 wird nur in aktivierten, antigenpräsentierenden B-Zellen exprimiert und ist zur Aktivierung der Gedächtnis-CTL notwendig [THORLEY-LAWSON ET AL., 1996]. Auch EBNA-1 wird nicht von den CTLs erkannt, da dieses Protein durch eine Glycin-Alanin-Wiederholung nicht prozessiert und MHC-Klasse I präsentiert werden kann [KLEIN, 1996].

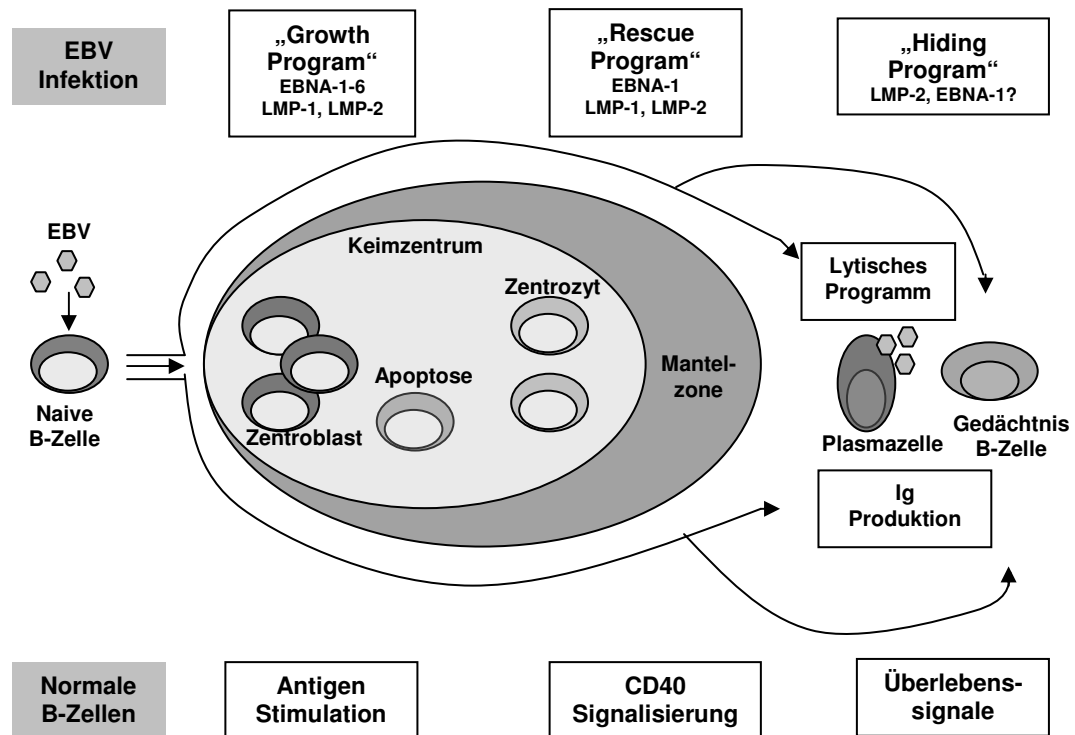


Abb. 1.3: Ähnlichkeit zwischen der EBV-Infektion und der durch Antigen hervorgerufene B-Zell Antwort. In Abhängigkeit von der Lokalisierung und des Differenzierungsstatus EBV-infizierter B-Lymphozyten können *in vivo* vier verschiedene Programme der viralen Genexpression beobachtet werden. Das „Growth Program“ wird nach einer EBV-Infektion von B-Zellen aktiviert und ist für die Generierung von proliferierenden B-Lymphoblasten verantwortlich. Dieser Prozeß findet in ähnlicher Weise statt, wenn eine naive B-Zelle mit ihrem entsprechenden Antigen interagiert. Sind die Lymphoblasten im Keimzentrum, ist ihr Überleben von Stimuli der Mikroumgebung abhängig (hauptsächlich durch CD40 ausgelöst), die mit follikulären dendritischen Zellen und antigenspezifischen T-Helferlymphozyten versehen ist. Diese Signale werden durch das „Rescue Program“ der viralen Genexpression in EBV-infizierten Zellen ersetzt. Die Entwicklung zu einer Plasmazelle kann möglicherweise zur Aktivierung des „Lytischen Programms“ und somit zur Ausbreitung des Virus führen. Alternativ können die Zellen den Follikel als ruhende B-Gedächtniszelle verlassen. Diese sind aufgrund einer limitierten bzw. nicht vorhandenen viralen Genexpression für das Immunsystem unsichtbar („Hiding Program“). (Abb. nach DOLCETTI ET AL., 2003)

Erfolgt die Reaktivierung der ruhenden B-Lymphozyten bzw. des lytischen Zyklus, sind die Zellen aufgrund der Expression viraler Proteine wieder für die CTLs erkennbar, und freigesetzte Virionen können durch Antikörper neutralisiert werden [THORLEY-LAWSON ET AL., 1999]. Der Mechanismus der Reaktivierung des lytischen Zyklus *in vivo* ist bisher noch nicht aufgeklärt. Wahrscheinlich wird bei der Rezirkulation der Gedächtnis-B-Zellen durch lymphoides Gewebe des Oropharynx das lytische Programm ausgelöst [INMAN ET AL.,

2001]. So werden Virionen freigesetzt und einerseits mit dem Speichel sezerniert, andererseits können diese Viren weitere B-Lymphozyten infizieren [FAULKNER ET AL., 2000].

1.2.2. Immunabwehr und Immunüberwachung

Durch die Primärinfektion mit EBV wird eine intensive Immunantwort ausgelöst. Es werden unter anderem cytotoxische T-Zellen (CTL) und NK-Zellen aktiviert, Cytokine (Interferone) werden freigesetzt und Antikörper gegen viele virale Proteine werden gebildet [KAWA, 2000]. Diese Immunantworten, wie auch die lytische Infektion der B-Lymphozyten sind für das Krankheitsbild der infektiösen Mononukleose verantwortlich, die in der Kindheit meistens nicht erfolgt, bei Jugendlichen und Erwachsene jedoch häufig zu manifestierten Symptomen führt. Typische Symptome sind beispielsweise starke Halsschmerzen, Fieber, Lymphadenopathien und Splenomegalie [MILLER, 1990]. Aber auch Autoantikörper, die während der Primärinfektion gegen die Triosephosphatisomerase und die Mangan-Superoxid-Dismutase gebildet werden, sind maßgeblich am Krankheitsbild beteiligt. Werden diese Enzyme blockiert, können Ödeme und eine hämolytische Anämie auftreten, wodurch die Ursachen einiger Symptome erklärbar sind [RITTER ET AL., 1994].

Das EBV wird mit mehreren lymphoproliferativen Erkrankungen, wie dem Burkitt-Lymphom, Hodgkin Lymphomen, lymphoproliferativen Erkrankungen Organ- und Knochenmarkstransplantierter und dem Nasopharynxkarzinom in Verbindung gebracht [CRUCHLEY ET AL., 1997]. Jedoch löst EBV nicht in allen seropositiven Personen Tumoren aus. Warum EBV in einigen Fällen eine unkontrollierte Zellteilung hervorruft, ist nur bei Lymphomen in immunsupprimierten Patienten nach Transplantationen und bei AIDS-Patienten geklärt. Hier verhalten sich die EBV-infizierten Zellen wie lymphoblastoide Zell-Linien *in vitro*, in denen die Proteine der Latenz III exprimiert werden. Aufgrund des Verlustes der CTLs durch Immunsuppression kann das Zellwachstum ungehindert fortschreiten [FARREL ET AL., 1997]. Bei anderen EBV-assoziierten Tumoren sind die initialen Schritte der malignen Entartung nicht eindeutig geklärt. So werden in endemischen Burkitt-Lymphomen nur die Latenzgene EBNA-1, EBER-1 und -2 exprimiert. Das unkontrollierte Zellwachstum wird jedoch auf Translokationen des *c-myc* Onkogens von Chromosom 8 auf Chromosom 2, 14 oder 22 in die stark exprimierten Bereiche für Immunglobulin Gene zurückgeführt. Durch die Translokation gerät der Transaktivator *c-myc* unter die Kontrolle dieser häufig abgelesenen Gene und wird überexprimiert [NIEDOBITEK ET AL., 2001]. Das Zusammenspiel von EBV, *c-myc* Translokation und vor allem der Malaria bzw. genetischer Anpassungen an die Malaria, die in Endemiegebieten des Burkitt-Lymphoms vorkommt, ist noch nicht geklärt [MILLER, 1990].

In Nasopharynxkarzinomen (NPC), in denen wie in allen endemischen Burkitt-Lymphomen EBV nachgewiesen wurde, werden zusätzlich zu EBNA-1 und EBER die Latenzgene LMP-1 und LMP-2A exprimiert (Latenz II). Dieses Karzinom kommt endemisch in Südostasien vor und wird neben EBV auch mit genetischen Faktoren und Umwelteinflüssen in Zusammenhang gebracht [LIEBOWITZ ET AL., 1993]. Die Latenz vom Typ II wurde auch in einigen Hodgkin- und Non-Hodgkin-Lymphomen nachgewiesen. Da in vielen Tumoren dieses Typs EBV nicht nachgewiesen wurde, ist es fraglich, ob EBV in jenen Tumoren das auslösende Agens ist oder nur ein Kofaktor, der das Tumorwachstum fördert [ANAGNOSTOPOULOS ET AL., 1996].

1.3. Strategien zur Charakterisierung von EBV-Genfunktionen

Die initialen Schritte der Tumorentstehung und Tumorprogression sind für die EBV-assoziierten Malignome noch weitgehend unverstanden.

Maligne Entartung ist die Konsequenz genetischer Änderungen, welche einerseits durch Aufhebung von Kontrollmechanismen, andererseits durch einen permanent aktivierten Signaltransduktionsprozeß ausgelöst werden [BORNKAMM ET AL., 2001]. Einige zelluläre Zielgene bzw. -proteine des EBV, die an Zellproliferation, -differenzierung und Apoptosemechanismen beteiligt sind, sind unter anderem *c-myc*, *bcl-2*, *N-ras*, p53, PKR und JAK [ANAGNOSTOPOULOS ET AL., 1996; YAMAMOTO ET AL., 2000; LONGNECKER ET AL., 1996]. Obwohl die viralen Latenzgene für die *in-vitro*-Immortalisierung von B-Zellen bekannt sind, sind die genauen molekularen Mechanismen und weitere mögliche Faktoren, die zu einer kontinuierlichen Zellproliferation führen, bisher noch nicht hinreichend charakterisiert [RING, 1994].

Zur Überprüfung von EBV-Genen, die an der Immortalisierung und Transformation der Wirtszellen sowie an der Auslösung der lytischen Replikation beteiligt sind, wurden bisher ausschließlich Mutationsexperimente an offenen Leserastern durchgeführt, deren Funktion bekannt war bzw. postuliert wurde [LEE ET AL., 1992; KEMPKE ET AL., 1995A]. Hierzu wurden die Mutanten entweder in eukaryotischen oder prokaryotischen Systemen generiert. In eukaryotischen Zellen wurden virale Mutanten durch homologe Rekombination von Wildtyp-Virionen mit Plasmiden konstruiert. Es wurden zunächst Plasmide konstruiert, die den zu mutierenden Bereich des EBV enthielten. In diese Sequenzen wurden dann gezielt Mutationen durch Insertion von Resistenzgenen oder durch Deletionen eingebracht. Die mutierten Plasmide wurden in Wildtyp-Virionen produzierende Zell-Linien transfiziert, in denen dann mutierte Virionen durch homologe Rekombination entstanden [WANG ET AL., 1991; MARCHINI ET AL., 1992; ROBERTSON ET AL., 1995].

Zur Generierung von Mutantenvirionen in prokaryotischen Systemen wurden sogenannte „künstliche“ EBVs („Mini-“ und „Maxi-EBVs“) konstruiert [DELECLUSE ET AL., 2000].

„Mini-EBVs“ bestehen aus einem F-Plasmid, den elf Latenzgenen des EBV, dem lytischen und latenten Replikationsursprung und einem Hygromycinresistenzgen. Nach Generierung und Mutagenisierung der „Mini-EBVs“ in *E. coli*, wurden sie in die EBV-positive Verpackungs-Zell-Linie HH514, einem Subklon der Labor-Zell-Linie P3HR1, transfiziert. Die Virionen in HH514 sind aufgrund einer Deletion in EBNA-2 nicht transformationsfähig, durchlaufen aber den lytischen Zyklus und setzen Virionen frei. „Mini-EBVs“ wurden in HH514 verpackt und mit den Wildtyp-Virionen freigesetzt. Dieses Gemisch wurde zur Infektion von B-Lymphozyten verwendet. Es wurden dann B-Zell-Klone isoliert, die nur „Mini-EBVs“ enthalten. Mutierte „Mini-EBVs“ können in den B-Zellen hinsichtlich der Immortalisierungskapazität untersucht werden [KEMPKE ET AL., 1995B].

„Maxi-EBVs“ bestehen aus dem prokaryotischen F-Faktor-Plasmid, einem Chloramphenicol- und einem Hygromycinresistenzgen, dem Gen für das GFP (*Green Fluorescent Protein*) und dem B95-8 EBV-Genom. Das F-Plasmid mit den Resistenzgenen und dem GFP-Gen wird von zwei Regionen aus dem EBV-Genom, nämlich den Sequenzen links und rechts des in B95-8 Zellen deletierten Bereichs des EBV-Genoms, flankiert. Das F-Plasmid wurde in linearisierter Form in B95-8 Zellen transfiziert. Dort erfolgte homologe Rekombination zwischen den entsprechenden EBV-Sequenzen, so daß das F-Plasmid an der B95-8 EBV-spezifischen Deletionsstelle in das EBV-Genom integriert wurde. Das B95-8/F-Plasmid-Konstrukt wurde aus den Zellen isoliert, in *E. coli* transformiert, dort mutiert und in EBV-negativen Zellen mittels Hygromycin selektiert. Überstände dieser Zellen wurden dann zur Infektion von B-Lymphozyten verwendet, und diese wurden charakterisiert [DELECLUSE ET AL., 1998].

Methodisch beschränken sich alle erwähnten Ansätze auf die gezielte Analyse bekannter EBV-Gene, so daß weite Bereiche des Genoms nicht berücksichtigt werden. Darüber hinaus ist die gezielte Mutagenese großer Bereiche des EBV-Genoms durch homologe Rekombination sehr arbeitsaufwändig, da für jede Mutation ein entsprechendes Plasmid konstruiert werden muß. Auch wenn sich die Manipulation von EBV in *E. coli* einfacher gestaltet als in eukaryotischen Zell-Linien, erscheint hinsichtlich der Größe der „Maxi-EBVs“ deren Handhabung dennoch nicht unproblematisch.

Die Arbeitsgruppe PAVIAN (Pathogenese viral induzierter Autoimmunerkrankungen und Neoplasien) am Lehr- und Forschungsgebiet Virologie der RWTH Aachen hat daher ein Konzept entwickelt, das durch Transposonmutagenese ungezielte Mutationen im EBV-Genom ermöglicht. Die Methode erlaubt es, das komplette EBV-Genom mit Mutationen abzusättigen. So können nach Bestimmen des Mutationsortes durch Sequenzanalyse auch

Funktionen unbekannter Gene und nicht charakterisierte Bereiche untersucht werden. Bei diesem Versuchsansatz werden einzelne Klone einer EBV-Bank mutiert, die aus EBV-Genomfragmenten von ca. 30 kb in Cosmiden besteht. Da die EBV-Sequenzen von zahlreichen Regionen mit Wiederholungseinheiten gekennzeichnet sind, kann hier bei der ungezielten Mutagenese das Problem der sogenannten *Hotspots* auftreten. Diese Sequenzwiederholungen sind das bevorzugte Ziel von transponierbaren Elementen. Würde das komplette EBV-Genom, beispielsweise in „Maxi-EBVs“, ungezielt mutagenisiert, käme es zur Anhäufung von Mutationen in den Wiederholungssequenzen, so daß eine effiziente Absättigung des gesamten EBV-Genoms mit Mutationen unmöglich wäre. Subgenomische EBV-Fragmente bieten die Möglichkeit Wiederholungseinheiten auszuschließen, so daß das komplette Genom gleichmäßig und ungezielt mit Mutationsereignissen abgedeckt werden kann.

Das Vorgehen zum Umsetzen des skizzierten Konzepts ist in Abb. 1.4 dargestellt.

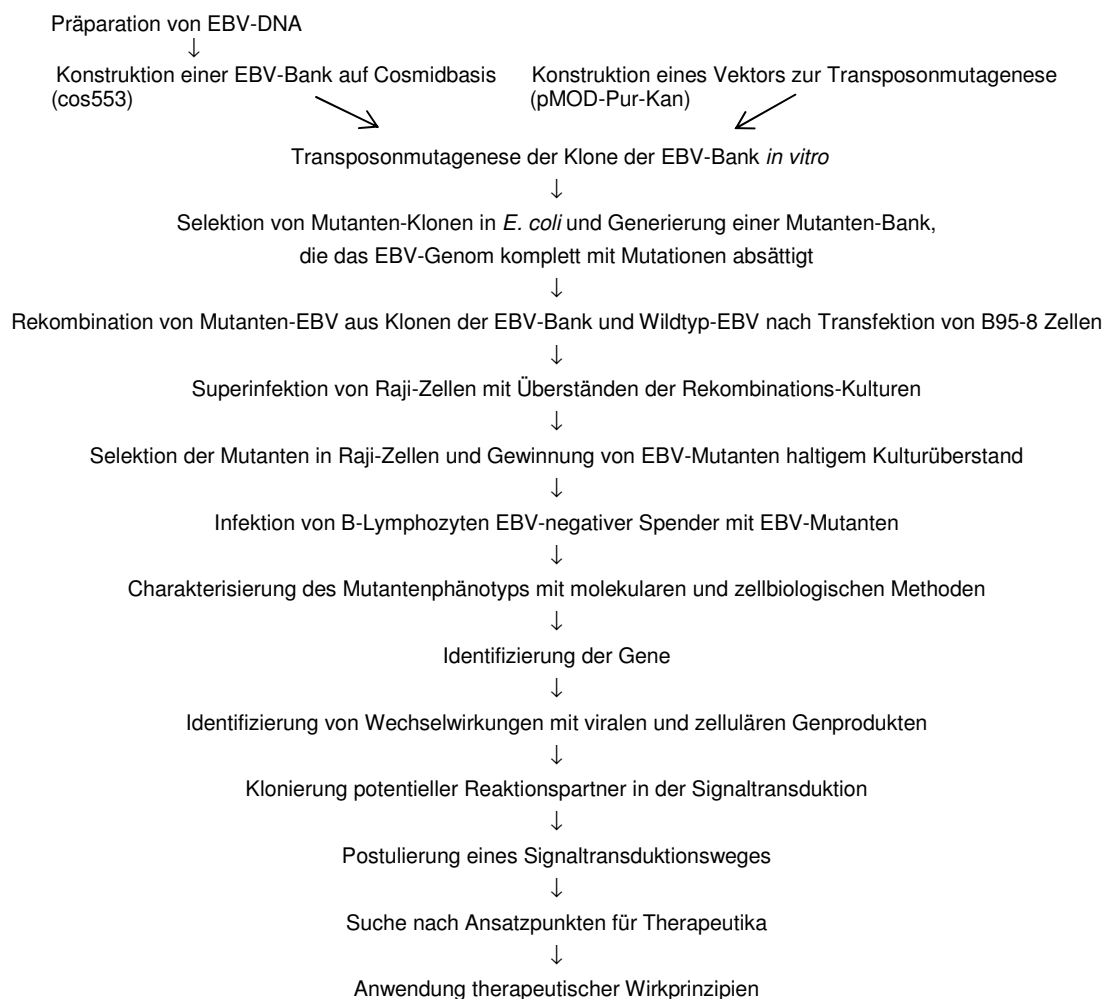


Abb. 1.4: Charakterisierung von Genfunktionen des EBV

1.4. Ziel der Arbeit

Die akute EBV-Infektion äußert sich meistens als infektiöse Mononukleose, die als schweres Krankheitsbild verlaufen kann und durch zahlreiche Komplikationen protrahiert wird. Darüber hinaus ist das Virus an der Entstehung zahlreicher Tumorerkrankungen beteiligt. Bisher sind die initialen Schritte von Immortalisierung und Tumorentstehung nicht verstanden. Es ist das Ziel der vorliegenden Arbeit mittels Transposonmutagenese EBV-Mutanten zu generieren und sie hinsichtlich ihres Phänotyps auf präonkogene Potenz zu untersuchen.

1.5. Arbeitsplan

- Etablieren einer Methode zur Absättigung von EBV-Bank-Klonen durch Transposonmutagenese in 500-1000 bp Abständen
- Generieren von EBV-Mutanten aus mutierten Bank-Klonen mit Wildtyp-EBV-Virionen
- Selektion der EBV-Mutanten
- Charakterisieren des Mutanten-Phänotyps ausgewählter EBV-Mutanten in B-Lymphozyten EBV-negativer Spender und in der permanenten B-Zell-Linie BJAB mittels RT-PCR, Immunfluoreszenztest und FACS-Analyse
- Untersuchen des Expressionsmusters ausgewählter Gene nach der Infektion von BJAB-Zellen mit Wildtyp-Virionen.

2. Material

Für die Versuchsdurchführung wurden die im folgenden aufgeführten Materialien sowie gebräuchliche Chemikalien (nicht im einzelnen aufgeführt) verwendet. Die kommerziellen Kits und Geräte werden mit Hinweis auf die Herstellerfirmen im Rahmen der Methodenbeschreibung angegeben.

2.1. Zell-Linien

B95-8 [MILLER AND LIPMAN, 1973]

Diese Zell-Linie entstand aus Affen-Lymphozyten, die mit EBV infiziert wurden. Der komplette lytische Zyklus und die Freisetzung von Virionen ist in diesen Zellen möglich.

Die hier verwendeten B95-8 Zellen wurden in der Abteilung für die Routinediagnostik vermehrt.

Raji [PULVERTAFT, 1964]

Die aus humanem Burkitt-Lymphom stammende Zell-Linie ist mit EBV infiziert. Aufgrund einer Deletion im viralen Capsidantigen sind die Viren dieser Zellen nicht mehr in der Lage den kompletten lytischen Zyklus zu durchlaufen und Virionen freizusetzen.

Die Raji-Zellen wurden in der Abteilung für die Routinediagnostik vermehrt.

BJAB

Diese Zellen stammen aus einem EBV-negativen Burkitt-Lymphom eines afrikanischen Patienten und sind EBV empfänglich [KLEIN ET AL., 1974].

Die BJAB-Zellen wurden freundlicherweise vom Institut für Medizinische Mikrobiologie und Virologie der Universität Regensburg zur Verfügung gestellt.

Akata

Die Akata-Zellen stammen aus dem EBV-positiven Burkitt-Lymphom eines japanischen Patienten [SHIMIZU ET AL., 1996]. Im Verlauf der Subkultivierung haben einige Klone (hier Akata 2A8) die Viren wieder verloren.

Diese Zell-Linie wurde freundlicherweise vom Institut für Medizinische Mikrobiologie und Virologie der Universität Regensburg zur Verfügung gestellt.

2.2. Bakterienstämme

E. coli Epicurian Coli[®] XL10 Gold[®] Ultracompetent Cells (Stratagene)

Tet^R $\Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCB-hsdSMR-mmr) 173 \text{ endA1 } supE44 \text{ thi-1 } recA1 \text{ gyrA96 } relA1 \text{ lac}$
Hte [F' *proAB lacIqZ* Δ M15 Tn10 (Tet^R) Amy Cam^R]^σ

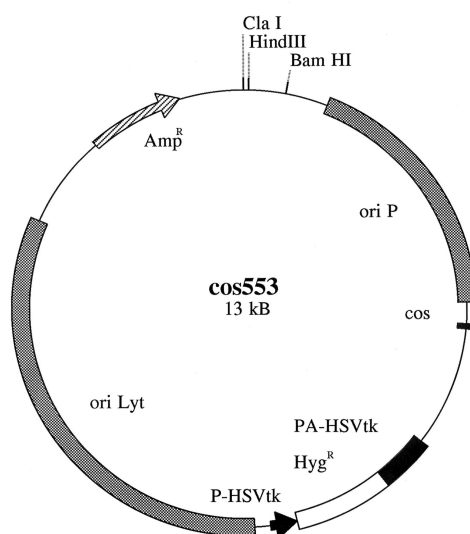
E. coli One Shot[®] TOP 10 Competent Cells (Invitrogen)

F' *mcr* $\Delta\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)\Phi 80/lacZ\Delta$ M15 $\Delta lacX74 \text{ deoR } recA1 \text{ araD139}\Delta(ara-leu)7697$
galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG

2.3. Plasmide

cos553 [LEE ET AL., 1992]

Das Cosmid cos553 (Abb. 2.1) ist ein 13 kb großer Shuttlevektor, der es erlaubt große Fremd-DNA-Fragmente (25-38 kb) einzuklonieren sowie in Prokaryoten und in Mammalia-Wirtszellen zu vermehren. Aus dem EBV-Genom stammt der Replikationsursprung für die virale Latenz (oriP) und der vegetative Replikationsursprung oriLyt. Zu den prokaryotisch wirksamen Sequenzen gehören der bakterielle Replikationsursprung (ori), die *cos site* aus dem Phagen λ und die Gene für die Ampicillin- und Hygromycinresistenz.



- Amp: Resistenzgen für Ampicillin
- oriP: Replikationsursprung des EBV für die virale Latenz
- cos: *cos site* aus dem Phagen λ
- Hyg: Hygromycinresistenzgen (eukaryotisch)
- HSVtk: 5'- und 3'-flankierende Regionen des HSV Thymidinkinasegens zur Expression des Hygromycinresistenzgens
- oriLyt: Replikationsursprung des EBV für den viralen lytischen Zyklus

Abb. 2.1: Schematische Darstellung des Cosmids cos553

Dcos219 [SÖZER, 1999]

Hierbei handelt es sich um ein 46 kb großes cos553-Derivat, welches einen Abschnitt des EBV-Genoms (Position 103740-136688) enthält.

pModPurKan [DE GRAAF, 2000]

Die Basis dieses 5,1 kb großen Plasmids (Abb. 2.2) ist der Vektor pMOD. In dem Basisvektor sind ein eukaryotisch reguliertes Puromycin- und ein prokaryotisch reguliertes Kanamycinresistenzgen mit Hilfe der pMOD *multi cloning site* (MCS) einkloniert. Diese Resistenzgene bilden mit den flankierenden *outer ends* (Erkennungssequenzen für das Enzym Transposase) ein transponierbares Element, das auf eine Zuführung von Transposaseaktivität von außen angewiesen ist [REZNIKOFF ET AL., 2000].

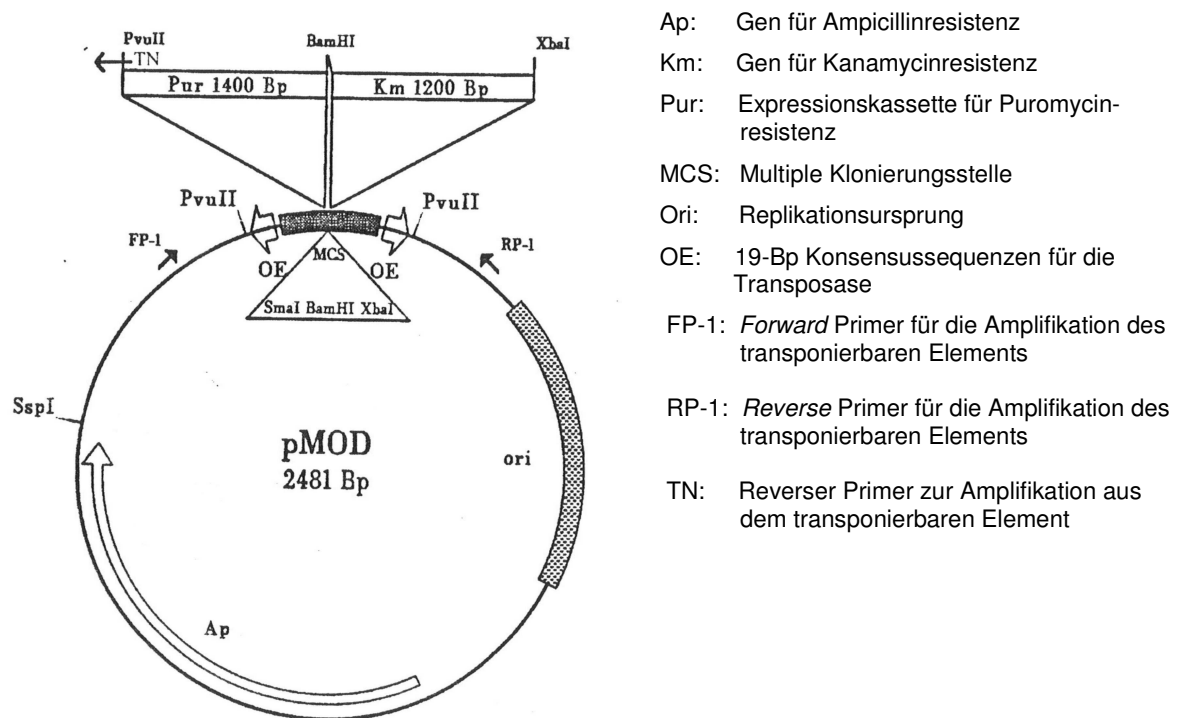


Abb. 2.2: Schematische Darstellung des Vektors pModPurKan

pGlow-TOPO (Invitrogen)

Dieser Reporter-Vektor wurde zur Klonierung der EBV-Gene BGLF-5 (virale DNase) und BDLF-2 eingesetzt. Da dieser Vektor keine eukaryotische Promotorsequenz aufweist, können die Gene erst nach Autoaktivierung durch das EBV abgelesen werden. Zur Selektion

enthält der Vektor die Resistenzgene gegen Neomycin und Ampicillin. Der Vektor *pGlow-TOPO* ist in Abb. 2.3 dargestellt.

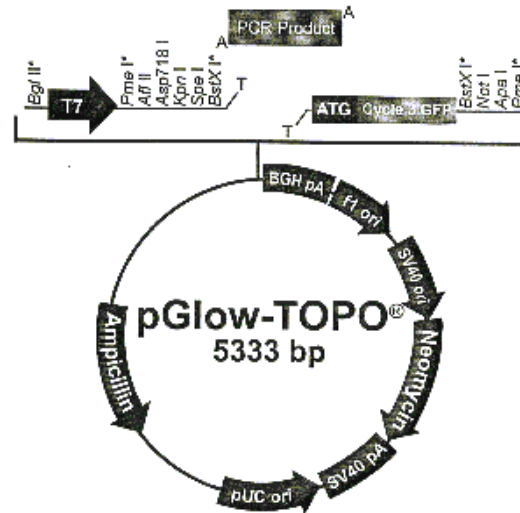


Abb. 2.3: Schematisch Darstellung des *pGlow-TOPO* Vektors (Invitrogen)

pcDNA3.1/V5-His[®]-TOPO[®] (Invitrogen)

Der Vektor pcDNA3.1/V5-His-TOPO ist ein eukaryotischer Expressionsvektor, in den ein PCR-Produkt von Interesse kloniert werden kann.

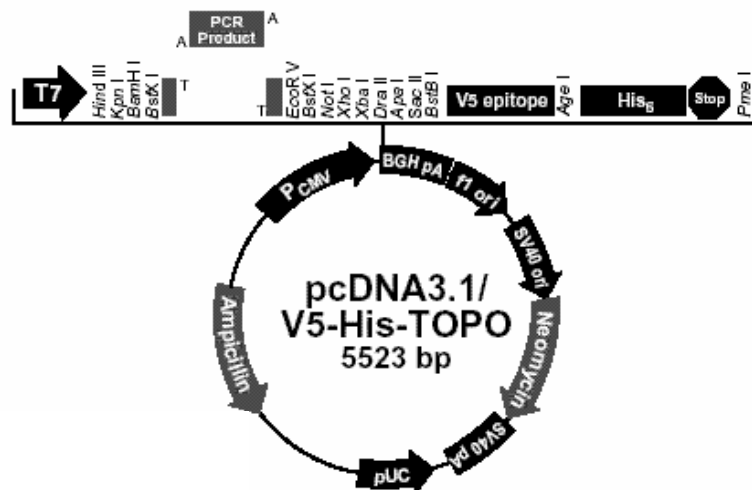


Abb. 2.4: Schematische Darstellung des Vektors *pcDNA3.1/V5-His[®]-TOPO[®]* (Invitrogen)

2.4. Primer und Hybridisierungssonden

Die Primer wurden von der Firma Sigma ARK in entsalzter Form bezogen. Hybridisierungssonden für die *Realtime* PCR mit dem *LightCycler* stammten von der Firma TIB Molbiol.

Gen/ Fragment	Primer	Primer- Länge	Sequenz (5'-3')	Schmelz- temperatur
BDLF-2 Ausschluß außen (507 bp)	MP1 3' a MP1 5' a	20 bp 20 bp	CTCTCCTCGTTAACTGGTAG GGCTCTGGTGACGTTAAATG	60 °C 60 °C
BDLF-2 Ausschluß innen (349 bp)	MP1 3' i MP1 5' i	19 bp 18 bp	GGATGAAGAGCGAGGTATG CCATGGCTGTCCGTGTTG	58 °C 58 °C
BDLF-2 Expand (2249 bp)	BDLF-2 Exp 3' BDLF-2 Exp 5'	19 bp 18 bp	CTCACCAAGATTGTTCCAG CAGTGAATGTCACCGTGG	56 °C 56 °C
BDLF-2 Rec außen (335 bp)	Tn MP1 5' a	20 bp	CTCGAATTCATCGATGATGG GGCTCTGGTGACGTTAAATG	58 °C 60 °C
BDLF-2 Rec innen (220 bp)	Tn MP1 5' i	20 bp	CTCGAATTCATCGATGATGG CCATGGCTGTCCGTGTTG	58 °C 58 °C
BGLF-2 Ausschluß außen (312 bp)	MP2 3' a MP2 5' a	19 bp 17 bp	GTACATGAGAGTCAGGGCTG GCATCCGCCGCGAACAG	58 °C 58 °C
BGLF-2 Ausschluß innen (259 bp)	MP2 3' i MP2 5' i	19 bp 19 bp	GGACTGCCTTAGTGAAGAG GAACAGCTTCGCAAGTTCC	58 °C 58 °C
BGLF-2 Rec außen (222 bp)	Tn MP2 3' a	20 bp 18 bp	CTCGAATTCATCGATGATGG GTACATGAGAGTCAGGCTG	58 °C 58 °C
BGLF-2 Rec innen (193 bp)	Tn MP2 3' i	20 bp 19 bp	CTCGAATTCATCGATGATGG GGACTGCCTTAGTGAAGAG	58 °C 58 °C
BHRF-1 außen (467 bp)	BHRF-1 3' a BHRF-1 5' a	20 bp 20 bp	CTGGACAGGCCTTCGCTGTG GAGATACTGTTAGCCCTGTG	58 °C 60 °C
BHRF-1 innen (247 bp)	BHRF-1 3' i BHRF-1 5' i	20 bp 19 bp	CATAGTAAGGAGTAGACTGG GAGGACACTGTAGTTCTGC	58 °C 58 °C
BMRF-1 außen (367 bp)	BMRF-1 3' a BMRF-1 5' a	19 bp 19 bp	GAGTGTCACCTTAACGCCG CGAGTGGCAGAATCACCAG	60 °C 60 °C
BMRF-1 innen (137 bp)	BMRF-1 3' i BMRF-1 5' i	19 bp 20 bp	CACTTCTGCAACGAGGAAG GATGATAAGGTGTCCAAGAG	58 °C 58 °C
BRLF-1 außen (542 bp)	BRLF-1 3' a BRLF-1 5' a	19 bp 19 bp	GTTCCAGACTATGGTCTCG CTGCTATCCAAGGCTGTTC	58 °C 58 °C
BRLF-1 innen (205 bp)	BRLF-1 3' i BRLF-1 5' i	19 bp 19 bp	GATGGACGAGGAGCTCATG CTGCTCGGTGTCACTGTTG	60 °C 60 °C

BZLF-1 außen (384 bp)	BZLF-1 3' a BZLF-1 5' a	20 bp 20 bp	CAGTCTCCGACATAACCCAG GGCACATCTGCTTCAACAGG	62 °C 62 °C
BZLF-1 innen (229 bp)	BZLF-1 3' i BZLF-1 5' i	19 bp 20 bp	CAAACAGCAGCAGCAGTGG GCTGCAGCAGTTGCTTAAAC	60 °C 60 °C
DNase Ausschluß außen (368 bp)	T6 P6	18 bp 19 bp	CTGCTCGTACGTGGAGTC CATAAATGCAGCTCCGGTC	58 °C 58 °C
DNase Ausschluß innen (208 bp)	X6 3' X6 5'	19 bp 20 bp	CCAAGGTGTTTGAGCCAGC GACTCCACATTGACGCAAAG	60 °C 60 °C
DNase Expand K (3786 bp)	DNase Exp 3' a DNase Exp2 5'	18 bp 21 bp	GGTCGAGCCGGATGGAGC GCCGCTATTAGCTTAGTAGTC	62 °C 62 °C
DNase Rec außen (242 bp)	T6 Tn	18 bp 20 bp	CTGCTCGTACGTGGAGTC CTCGAATTCATCGATGATGG	58 °C 58 °C
DNase Rec innen (149 bp)	T6 nesti Tn	20 bp 20 bp	CTCCACCATTAAGAATGGAC CTCGAATTCATCGATGATGG	58 °C 58 °C
DNase Sonden- und LC-PCR (293 bp)	DNase A 3' DNase A i 5'	21 bp 20 bp	CACGGCACAACACTTCTACC GTACGCTTTCCAGGACCCAG	64 °C 64 °C
EBNA-1 Latenz I u. II außen (286 bp)	K2 3' Q 5'	19 bp 18 bp	GCCTTCTGGTCCAGATGTG GTGCGTTACCGGATGGCG	60 °C 60 °C
EBNA-1 Latenz I u. II innen (143 bp)	K 3' U 5'	20 bp 20 bp	AGAGAGTAGTCTCAGGGCAT CATTTCCAGGTCCTGTACCT	60 °C 60 °C
EBNA-1 Latenz III außen (296 bp)	K2 3' Y3 5'	19 bp 20 bp	GCCTTCTGGTCCAGATGTG TGCGTGTGACGTGGTGTA	60 °C 62 °C
EBNA-1 Latenz III innen (143 bp)	K 3' U 5'	20 bp 20 bp	AGAGAGTAGTCTCAGGGCAT CATTTCCAGGTCCTGTACCT	60 °C 60 °C
EBNA-2 außen (610 bp o. Intron)	EBNA-2 3' a EBNA-2 5' a	20 bp 20 bp	CATTAGAGACCACTTTGAGC CATAGCAGATGCTAGAGGTC	58 °C 58 °C
EBNA-2 innen (351 bp)	EBNA-2 3' i EBNA-2 5' i	19 bp 21 bp	CTAGCGGATCCCTATCAAG CTACATTCTATCTTGCGTTAC	58 °C 58 °C
EBNA-3A außen (676 bp m. 588 bp o. Intron)	EBNA-3A 3' a EBNA-3A 5' a	19 bp 20 bp	CATAGAGTTATCAGATAGC CTCTGAACATAACAACACTG	58 °C 58 °C
EBNA-3A innen (358 bp m. 291 bp o. Intron)	EBNA-3A 3' i EBNA-3A 5' i	18 bp 19 bp	GCGAGAAGCCATTCTCCG CTGCTGTATGCCTGGTAAC	58 °C 58 °C

EBNA-3B außen (601 bp m. 523 bp o. Intron)	EBNA-3B 3' a	18 bp	GAAAGCGTGGCTCAGCAG	58 °C
	EBNA-3B 5' a	19 bp	CCAGGATCTGCAAGATGAC	58 °C
EBNA-3B innen (302 bp m. 224 bp o. Intron)	EBNA-3B 3' i	19 bp	CATGAGCAGGAGCACAATG	58 °C
	EBNA-3B 5' i	18 bp	CATCTGTGACGCACGGTC	58 °C
EBNA-3C außen (659 bp m. 585 bp o. Intron)	EBNA-3C 3' a	20 bp	GTTAACATGATGCTGTCAGC	58 °C
	EBNA-3C 5' a	18 bp	GTCACCCGACAATGAGCG	58 °C
EBNA-3C innen (334 bp m. 260 bp o. Intron)	EBNA-3C 3' i	20 bp	GATGTTAGAAGCCAATGTGCG	58 °C
	EBNA-3C 5' i	19 bp	GACACGGAAGACAATGTGC	58 °C
GAPDH (307 bp)	GAPDH A	24 bp	CGGAGTCAACGGATTTGGTCGTAT	72 °C
	GAPDH B	24 bp	AGCCTTCTCCATGGTGGTGAAGAC	74 °C
Hygromycin (247 bp)	Hygro 3'	21 bp	CAGTCAATGACCGCTGTTATG	62 °C
	Hygro 5'	20 bp	CATTCCGACCGCAAGGAATC	62 °C
LMP-1 außen (384 bp o. Intron)	LMP-1 3' a	20 bp	CAACCAATAGAGTCCACCAG	60 °C
	LMP-1 5' a	20 bp	CGTTATGAGTGACTGGACTG	60 °C
LMP-1 innen (218 bp)	LMP-1 3' i	20 bp	GCAATAATGAGCAGGATGAG	58 °C
	LMP-1 5' i	20 bp	CTACTCCTACTGATGATCAC	58 °C
LMP-2 außen (253 bp)	LMP-2 3' a	19 bp	GGACGATGGCGGAAACAAC	60 °C
	LMP-2 5' a	19 bp	GTCATCCCGTGAGAGTAG	60 °C
LMP-2 innen (153 bp)	LMP-2 3' i	19 bp	CACCGAACGATGAGGAACG	60 °C
	LMP-2 5' i	19 bp	CGTCATTCCCGTCGTGTTG	60 °C
Mutantenlücke 108 (1553 bp)	108 3'	19 bp	GCTGCACACAGTCACCCTG	62 °C
	108 5'	19 bp	TGCAAAGGGACCCACGGTG	62 °C
Mutantenlücke 110 (1380 bp)	110 3'	19 bp	CGTGTGCTGCCTGGAACAC	62 °C
	110 5'	20 bp	TGCTACTCAACACCATCCTG	60 °C
Mutantenlücke 115 (1870 bp)	115 3'	20 bp	CCGAAACAGGTTTTGGGCTC	62 °C
	115 5'	19 bp	GGTCACGGACGTGGTGGAG	64 °C
Mutantenlücke 118 (1032 bp)	118 3'	19 bp	CTGGGCCTTGACCAACCCAC	64 °C
	118 5'	20 bp	TGGAAGATGAGGCCCTGCTC	64 °C
Mutantenlücke 120 (1195 bp)	120 3'	20 bp	ATGTCCGTAAGCGCAAACCTG	60 °C
	120 5'	19 bp	GGTCAACCAGGAGACAGAG	60 °C
Mutantenlücke 125 (1388 bp)	125 3'	19 bp	GGTTGGGGCTGCTTCCAG	64 °C
	125 5'	20 bp	GCAAGACCTGGATAGTCGTG	62 °C
Neomycin (187 bp)	Neo 3'	20 bp	GCTTCAGTGACAACGTCGAG	62 °C
	Neo 5'	20 bp	CACAACAGACAATCGGCTGC	62 °C
Puromycin (197 bp)	Puro 3'	18 bp	CAGGAGGCCTTCCATCTG	58 °C
	Puro 5'	19 bp	GCAAGAACTCTTCCTCACG	58 °C

Transposon aus pMOD-Pur-Kan (~2600 bp)	FP RP	19 bp 23 bp	ATTCAGGCTGCGCAACTGT GTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAG	58 °C 74 °C
BDLF-2 Hybridisierungs-sonden	BDLF-2 F (3' Fluorescein)	20 bp	GCTCAGCTAGGGTCTCTGCC-X	66 °C
	BDLF-2 R (5' LC Red640)	24 bp	LC Red640-CATCATAGACATCTTCCTTGAATC	66 °C
BRLF-1 Hybridisierungs-sonden	BRLF-1 F (3' Fluorescein)	21 bp	CATGAACTGTCCGGACTCCG-X	66 °C
	BRLF-1 R (5' LC Red640)	19 bp	LC Red640-GCGGGCCTCGGTGTGAGAG	66 °C
DNase Hybridisierungs-sonden	DNase F (3' Fluorescein)	20 bp	CCGAGGCGTCCAGAAGCAGG-X	68 °C
	DNase R (5' LC Red640)	20 bp	LC Red640-TGAGCCGAGCGTGCAGGTCG	68 °C
GAPDH Hybridisierungs-sonden	GAPDH-Hyb F (3' Fluorescein)	25 bp	GAAATCCCATCACCATCTTCCAGGAG-X	76 °C
	GAPDH-Hyb R (5' LCRed640)	26 bp	LC Red640-GAGATCCCTCCAAAATCAAGTGGGC	78 °C

2.5. Chemikalien

Ampicillin

DETACHaBEAD (M-450 Pan-B; CD19)

DNA-Molecular Weight Marker X (0,07-12,2 kbp)

DNA-Molecular Weight Marker XIV (100 bp)

Deoxynucleosid Triphosphate Set

Dynabeads (M-450 CD19 (Pan B))

Eindeckmedium

Ethidiumbromid (10 mg/ml)

Fetales Kälberserum (FKS)

G418

Kanamycin

L-Glutamin (Stammlösung 200 mM)

Nicht essentielle Aminosäuren 100x (NEA)

Penicillin (200 mM)-Streptomycin (1 mg/ml)-Lösung

Puromycin

RNAlater

Roche, Mannheim

Dynal, Norway

Roche, Mannheim

Roche, Mannheim

Roche, Mannheim

Dynal, Norway

BAG, Lich

Sigma, Steinheim

Biochrom KG, Berlin

PAA, Cölbe

Sigma, Steinheim

Sigma, Taufkirchen

Biochrom KG, Berlin

Sigma, Taufkirchen

Clontech, California USA

Ambion, England

RPMI 1640 Medium	Sigma, Taufkirchen
Tryptosephosphat	Oxoid, England

2.6. Enzyme

Bam HI	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
DNase I	Roche, Mannheim
Eco RI	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Hind III	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Protease	Qiagen, Hilden
RNase Inhibitor	Roche, Mannheim
Xho I	MBI Fermentas, St. Leon-Rot

2.7. Antikörper

Kaninchen anti EBV-DNase (1F)	Dr. Ooka, Lyon Frankreich
Kaninchen anti Maus FITC	DAKO, Denmark
Maus anti EA-D	ABI Advanced Biotechnologies, Maryland USA
Maus anti Epstein-Barr Virus LMP	DAKO, Denmark
Maus anti EBV EBNA-1	ABI Advanced Biotechnologies, Maryland USA
Maus anti human CD11a PE	BD Biosciences, California USA
Maus anti human CD19 PerCP	BD Biosciences, California USA
Maus anti human CD23 APC	BD Biosciences, California USA
Maus anti human CD30 FITC	BD Biosciences, California USA
Maus anti human CD40 FITC	BD Biosciences, California USA
Maus anti human CD44 FITC	BD Biosciences, California USA
Maus anti human CD54 PE	BD Biosciences, California USA
Maus anti human CD58 PE	BD Biosciences, California USA
Meerschweinchen C3 Komplement	Meridian Bioscience, Ohio USA
Schwein anti Kaninchen FITC	DAKO, Denmark
Ziege anti Kaninchen FITC	DAKO, Denmark
Ziege anti Meerschweinchen Komplement C3 FITC	Cappel/ICN Biomedicals, Ohio USA

2.8. Zellkulturmedien

Kulturmedium für Akata, BJAB, B95-8 und Raji

RPML-1640 supplementiert mit:

- 10 % FKS
- 2 % L-Glutamin
- 2 % Penicillin-Streptomycin
- 0,2 % Nicht essentielle Aminosäuren (NEA)

Kulturmedium für B-Lymphozyten

RPML-1640 supplementiert mit:

- 10 % FKS
- 10 % Tryptosephosphatlösung (29,5 g/l)
- 2 % L-Glutamin
- 2 % Penicillin-Streptomycin
- 0,2 % Nicht essentielle Aminosäuren (NEA)

2.9. Lösungen

1x PBS (pH 7,2)

NaCl	140 mM
KCl	3 mM
Na ₂ HPO ₄	10 mM
K ₂ HPO ₄	2 mM

1x Lymphozyten-PBS (pH 7,4)

NaCl	140 mM
NaH ₂ PO ₄ xH ₂ O	1,2 mM
Na ₂ HPO ₄ x12 H ₂ O	5,5 mM

1x TAE

Tris	40 mM
Essigsäure	40 mM
EDTA (pH 8,0)	1 mM

0,5x TBE

Tris	45 mM
Borsäure	45 mM
EDTA (pH 8,0)	1 mM

1x TE (pH 8,0)

Tris	10 mM
EDTA	1 mM

LB-Medium (pH 7,0)

NaCl	1,0 %
Pepton	1,0 %
Hefeextrakt	0,5 %

NZY⁺ broth

NZY (pH 7,5) NZ Amine	1,0 %
Hefeextrakt	0,5 %
NaCl	90,0 mM
Glukose	0,4 %
MgCl ₂	12,5 mM
MgSO ₄	12,5 mM

SOC-Medium

Bactotrypton	2,0 %
Hefeextrakt	0,5 %
NaCl	10 mM
KCl	25 mM
MgCl ₂	10 mM
MgSO ₄	10 mM
Glukose	20 mM

20x SSC (pH 7,0)

NaCl	3,0 M
Natriumcitrat x 2H ₂ O	0,3 M

Paraformaldehydlösung 4 %

Paraformaldehyd 4 %
in 1x PBS pH 7,6

Hybridisierungslösung

Formamid 50 %
NaCl 300 mM
Tris-HCl 20 mM
Na-EDTA 5 mM
Natriumphosphatpuffer pH 8,0 10 mM
Dextransulfat 10 %
100x Denhardt Lösung 1x

100x Denhardt Lösung

Ficoll 400 2 %
Polyvinylpyrrolidon 2 %
BSA 2 %

3. Methoden

3.1. Kultivierung, Vermehrung und Aufbewahrung von Bakterien

Bakteriensuspensionen wurden über Nacht bei ca. 150 rpm und 37 °C in LB-Medium mit Antibiotikazusatz (Ampicillin 100 µg/ml bzw. Kanamycin 25 µg/ml) unter Schütteln kultiviert oder auf mit 1,5 % Agar-Agar verfestigtem LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikazusatz angezüchtet.

Die dauerhafte Aufbewahrung der Bakterien-Kulturen erfolgte in Form von „Glycerin-Stabs“. Hierzu wurden 800 µl der Bakteriensuspension mit 200 µl Glycerin gemischt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70 °C gelagert.

3.2. Kultivierung, Vermehrung und Aufbewahrung von Mammalia-Zellen

Die Zell-Linien B95-8, Raji und BJAB wurden in supplementiertem RPMI-1640 (2.8.) bei 37 °C in einer Atmosphäre mit 5 % CO₂-Gehalt und 90 % Luftfeuchtigkeit inkubiert und zweimal wöchentlich 1:5 subkultiviert.

Primäre B-Lymphozyten wurden unter gleichen Bedingungen wie permanente Zell-Linien kultiviert. Zusätzlich wurde dem supplementierten RPMI-1640 noch Tryptosephosphat zugesetzt (2.8.). Infizierte Lymphozyten wurden 1-2 mal wöchentlich 1:3-1:5 subkultiviert.

Für eine längere Lagerung wurden 15 ml einer 3-4 Tage alten Zellkultur pelletiert, das Pellet in 1 ml Lösung A (7,5 ml RPMI-1640; 2,5 ml FKS) resuspendiert, mit 1 ml Lösung B (5,5 ml RPMI-1640; FKS 2,5 ml; DMSO 2,0 ml) vermischt und in Kryoröhrchen bei -70 °C in Styroporboxen eingefroren. Nach 24 Stunden wurden die Röhrchen in flüssigen Stickstoff überführt.

Zum Auftauen der Kulturen wurden die Kryoröhrchen im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut, die Zellen in 20 ml vorgewärmtes supplementiertes RPMI-Medium mit 20 % FKS gegeben und pelletiert. Das Pellet wurde in 10 ml vorgewärmtem supplementiertem Medium (20 % FKS) resuspendiert und die Zellen kultiviert. Nach der zweiten Subkultivierung wurde Medium mit 10 % FKS verwendet.

3.3. *In-vitro*-Transposonmutagenese

Das Prinzip der *in-vitro*-Transposonmutagenese besteht darin, Ziel-DNA außerhalb von Zellen durch Integration eines transponierbaren Elements zu mutagenisieren.

Das transponierbare Element wurde aus dem Vektor pMod-Pur-Kan durch PCR (Pur-Kan-PCR 3.16.1.) amplifiziert, auf einem Agarosegel von der Matrize getrennt, aus dem Gel mit dem *QIAEX2* Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben aufgereinigt und in die Transpositionsreaktion mit dem Klon Dcos219 aus der EBV-Bank eingesetzt. Hierzu wurde die *EZ::Transposase* (Epicentre) nach Herstellerprotokoll verwendet.

Transpositionsansatz

10x <i>EZ::TNReaction Buffer</i>	1 µl
0,6 µg Cosmid-DNA Klon 219	x µl
60 ng Transposon-DNA	y µl
<i>EZ::Transposase</i> (1 U/µl)	1 µl
Aqua bidest.	ad 10 µl

Eine Hitzeschocktransformation (3.5.) von kompetenten *E. coli Epicurian Coli[®] XL10 Gold[®] Ultracompetent Cells* wurde mit 2 µl des Transpositionsansatzes durchgeführt. Die Transformanten wurden auf LB-Agar mit Kanamycin selektiert (2.9., 3.1.).

3.4. Klonierung von PCR-Produkten

Zur Klonierung von PCR-Produkten wurden diese zunächst gelelektrophoretisch auf Agarosegelen aufgetrennt und das gewünschte Fragment mit dem *QIAEX2 Kit* (Qiagen) nach Herstellerangaben extrahiert.

Die aufgereinigten Amplifikate wurden nach Herstellerangaben in den Vektor *pcDNA3.1/V5-His[®]-TOPO[®]* (Invitrogen) bzw. in den *pGlow-TOPO*-Vektor (Invitrogen) ligiert und durch Hitzeschocktransformation (3.5.) in *One Shot[®] TOP10 Competent Cells* (Invitrogen) transfert. Die Selektion der transformierten Bakterien erfolgte auf LB-Agar mit Ampicillin (100 µg/ml).

3.5. Hitzeschocktransformation

Zur Transformation wurden kompetente *E. coli Epicurian Coll[®] XL10 Gold[®] Ultracompetent Cells* oder *One Shot[®] TOP10 Competent Cells* verwendet.

Die kompetenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut. *E. coli XL10Gold[®]* wurden mit 4 µl β-Mercaptoethanol versetzt, 10 Minuten auf Eis inkubiert und im 2 Minuten-Abstand durchmischt. Dann wurde DNA (ca. 50 ng) zugefügt und weitere 30 Minuten auf Eis inkubiert. Es folgte die Hitzeschocktransformation für 30 Sekunden bei 42 °C im Wasserbad und eine erneute zweiminütige Inkubation auf Eis. Nach Zusatz von 900 µl NZY⁺ broth zu *XL10Gold[®] E. coli* bzw. 250 µl SOC-Medium zu *TOP10 E. coli* wurde der Ansatz eine Stunde bei 37 °C unter Schütteln bei 225 rpm regeneriert.

Aliquots von 50-200 µl Bakteriensuspension wurden auf LB-Agar-Platten mit Ampicillin (100 µg/ml) bzw. Kanamycin (25 µg/ml) aufgetragen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Die selektierten Kolonien wurden in LB-Medium mit Ampicillin bzw. Kanamycin für DNA-Minipräparationen angeimpft.

3.6. Transfektion von eukaryotischen Zellen durch Endozytose

Zur Transfektion von B95-8 Zellen mit den mutierten Klonen bzw. von BJAB-Zellen mit Vektoren wurde das Reagenz *SuperFectTM* (Qiagen) verwendet. Hierbei handelt es sich um ein aktiviertes Dendrimer, welches DNA bindet und durch unspezifische Endozytose in die Zelle aufgenommen wird. Indem das Dendrimer den Lysosomeninhalt abpuffert und somit Nukleasen inhibiert, kann der Transport der DNA bis in den Zellkern erfolgen.

3.6.1. Transiente Transfektion

Die Übertragung der Mutationen der Bank-Klone in Wildtyp-EBV-Genome in B95-8 Zellen erfolgte nach dem Prinzip der homologen Rekombination [LEE ET AL., 1992]. Hierzu wurden die mutierten Klone mittels *SuperFectTM* in B95-8 Zellen transfiziert, in denen das EBV-Genom als Episom im Zellkern vorliegt. Dort konnte dann homologe Rekombination zwischen dem EBV-Fragment des Mutanten-Klons mit dem entsprechenden Bereich der Wildtyp-EBV-Genoms stattfinden (Abb. 3.1). Die so entstandenen EBV-Mutanten wiesen dann die vorher charakterisierte Mutation auf.

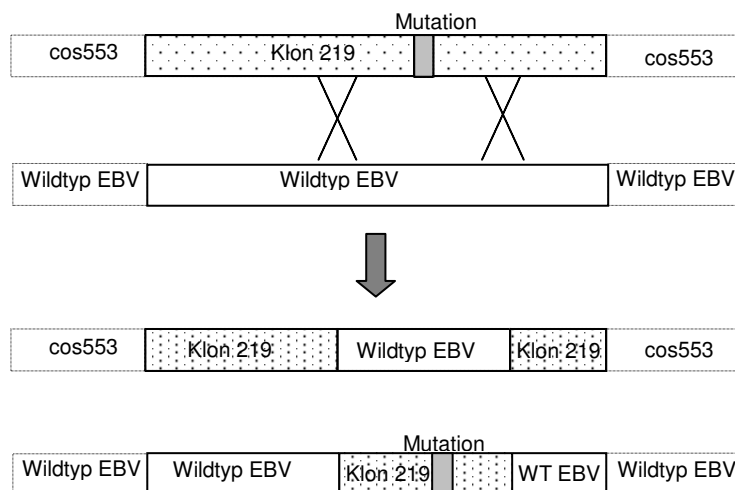


Abb. 3.1: Homologe Rekombination zwischen dem mutierten EBV-Bank-Klon und der Wildtyp-EBV-DNA

Der Transfektionsansatz erfolgte in 6-Loch-Platten (Falcon), in die je Kavität 1×10^6 B95-8 Zellen in 1,6 ml Medium (2.8.) eingesetzt wurden.

Zunächst erfolgte die Transfektion von neun Ansätzen mit zwei verschiedenen Negativkontrollen, um durch Kombination unterschiedlicher Konzentrationen von DNA und *SuperFect* eine möglichst hohe Transfektionseffizienz zu erreichen. Folgende Ansätze wurden hergestellt:

Ansatz A: 4 µg Cosmid-DNA in 400 µl RPMI 1640

Ansatz B: 8 µg Cosmid-DNA in 400 µl RPMI 1640

Ansatz C: 16 µg Cosmid-DNA in 400 µl RPMI 1640

Die Ansätze A-C wurden á 100 µl auf je 3 Reaktionsgefäße aufgeteilt und diese und die Negativkontrollen mit folgenden Mengen an *SuperFect* versetzt:

- | | |
|---|---|
| 1. 100 µl Ansatz A + 2 µl <i>SuperFect</i> | 7. 100 µl Ansatz C + 8 µl <i>SuperFect</i> |
| 2. 100 µl Ansatz A + 5 µl <i>SuperFect</i> | 8. 100 µl Ansatz C + 20 µl <i>SuperFect</i> |
| 3. 100 µl Ansatz A + 10 µl <i>SuperFect</i> | 9. 100 µl Ansatz C + 40 µl <i>SuperFect</i> |
| 4. 100 µl Ansatz B + 4 µl <i>SuperFect</i> | 10. 100 µl RPMI-1640 + 10 µl <i>SuperFect</i> |
| 5. 100 µl Ansatz B + 10 µl <i>SuperFect</i> | 11. 100 µl RPMI-1640 |
| 6. 100 µl Ansatz B + 20 µl <i>SuperFect</i> | |

Die *SuperFect*-Ansätze wurden 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, mit je 1 ml Vollmedium (2.8.) versetzt und sofort tropfenweise zu den Zellsuspensionen gegeben. Nach 12 Stunden wurden die Kavitäten bis zum Rand mit Vollmedium aufgefüllt und die Zellen unter Kulturbedingungen (3.2.) für 2-3 Tage inkubiert.

3.6.2. Stabile Transfektion

Zur Etablierung einer stabil mit einem DNase- bzw. einem BDLF-2-Vektor transfizierten BJAB-Zell-Linie wurden zunächst die Vektoren generiert. Mittels *Expand-PCR* (3.16.1.) wurden nach Herstellerangaben die gewünschten Gene inklusive Promotorregion amplifiziert, in den Vektor *pGlow-TOPO* kloniert (3.4.) und in *E. coli One Shot® TOP10 Competent Cells* transformiert. Die auf das korrekte Insert überprüften Vektoren wurden dann mittels *SuperFect™* in BJAB-Zellen transfiziert.

Pro Ansatz wurden 3×10^5 Zellen, 5 µg Plasmid-DNA und 10 µl *SuperFect™* eingesetzt. Die Durchführung erfolgte wie in 3.6.1. beschrieben in 6-Loch-Platten. Einen Tag nach der Transfektion wurden die Ansätze mit 0,8 mg G418/ml zur Selektion der vektortragenden Zellen versetzt. Nach der ersten Gelbfärbung des Kulturmediums wurden die Überstände komplett entfernt und durch neues Medium mit entsprechender Antibiotikakonzentration ersetzt. Der Nachweis des Vektors in den Zellen erfolgte über die Neomycin-PCR (2.4; 3.16.1). Stabil transfizierte Zell-Linien wurden durch weitere Kultivierung mit Steigerung der Antibiotikakonzentration bis zu 1,5 mg G418/ml nach ca. 1-2 Monaten generiert. Transfizierte Zellen wurden mittels PCR und *in situ* Hybridisierung auf das Vorhandensein der Vektoren überprüft.

3.7. Superinfektion von Raji-Zellen

Zur Selektion der durch Rekombination entstandenen Mutanten-Virionen wurden Raji-Zellen mit den Überständen von B95-8 Zellen superinfiziert, die mit Mutanten-Klonen transfiziert worden waren (3.6.1.). Um die EBV-Mutanten von den Wildtyp-Virionen zu trennen, erfolgte während der anschließenden Kulturperiode der Zusatz von Puromycin. So konnten mit Mutanten-Virionen infizierte Zellen, welche das Transposon mit einer eukaryotisch regulierten Puromycinresistenz besitzen, überleben.

Der Ansatz erfolgte in 6-Loch-Platten mit je 2×10^5 Raji-Zellen in 2 ml Vollmedium pro Kavität.

Die Überstände der B95-8 Kulturen wurden sterilfiltriert (*Sartolab P-Filter*; 0,2 µm Porengröße; Sartorius). Davon wurden je 5 ml pro Kavität zu den Zellen gegeben. Nach 24 Stunden wurden die Ansätze mit 0,15 µg Puromycin pro ml Zellsuspension versetzt.

Erfolgte eine Gelbfärbung der Zellkultur, wurde das verbrauchte Medium komplett verworfen und gegen frisches Medium mit der entsprechenden Puromycinkonzentration ersetzt. Nach ca. einer Woche konnten die Überstände mittels PCR auf die Anwesenheit von EBV-Mutanten überprüft werden. DNA aus Überständen selektierter Raji-Kulturen wurde mittels einer PCR (Rekombinations-PCR (3.16.1.)) auf mutierte Virionen untersucht, wobei der erste Primer im transponierbaren Element direkt hinter den *outer ends*, der andere im Bereich hinter dem transponierbaren Element in der EBV-Sequenz bindet. Weiterhin wurde durch PCR überprüft, ob die Überstände mit Mutanten-Klonen kontaminiert waren, die ebenso wie rekombinante Virionen als Matrize für eine Rekombinations-PCR dienen können. Hierzu wurde eine Sequenz des Hygromycinresistenzgens amplifiziert, das nur auf den Bank- bzw. Mutanten-Klonen kodiert ist (Hygromycin-PCR). Konnten Mutanten-Virionen nachgewiesen und Kontaminationen durch Mutanten-Klone ausgeschlossen werden, wurden die Überstände für weitere Infektionen verwendet.

Die Zellen wurden wiederum bis zur Gelbfärbung des Mediums kultiviert. Die Überstände wurden gesammelt und auf vorhandene EBV-Mutanten überprüft. Mutantenfreie Zellkulturen wurden verworfen.

3.8. Isolierung von B-Lymphozyten aus Vollblut

Zur Isolation von B-Lymphozyten wurden 100 ml heparinisiertes Vollblut eines EBV-negativen Spenders benötigt. Dieses wurde mit 150 ml kaltem Lymphozyten-PBS (2.9.) verdünnt, zu 8 ml aliquotiert, mit je 50 µl *Dynabeads[®] M-450* versetzt und 30 Minuten auf Eis schüttelnd inkubiert. Die an die Beads über CD19 gebundenen B-Zellen wurden mit dem *Dynal MPC* Magneten pelletiert. Nach Entfernen der Blutreste wurden die gebundenen B-Zellen in 1-2 ml Lymphozyten-PBS mit 2 % FKS je Röhrchen aufgenommen. Dabei wurden die B-Lymphozyten nach der Aufnahme in PBS in sechs Röhrchen vereinigt. Zum Entfernen weiterer Blutzellen wurden die B-Zellen 3-4 mal mit 2 ml PBS/2 % FKS gewaschen. Danach wurden die B-Zell-*Dynabead*-Komplexe in je 2 ml RPMI 1640 (mit 1 % FKS) resuspendiert und zur Ablösung der Beads je Ansatz 100 µl *DETACHaBEADs* zugesetzt und die Ansätze eine Stunde bei Raumtemperatur geschüttelt. Die *Dynabead-DETACHaBEAD*-Komplexe wurden über den *Dynal MPC* von der B-Zell-Suspension in 3 Waschschritten mit je 2 ml RPMI mit FKS getrennt, indem die Dynabeads durch den Magneten zu-

rückgehalten und die B-Lymphozyten mit den Überständen gesammelt wurden. Anschließend wurde die komplette B-Zell-Suspension für 10 Minuten bei 1700 rpm (*Heraeus Christ Labofuge® GL, Rotor 2150*) pelletiert, in 8 ml Lymphozyten-Medium (2.8.) resuspendiert und davon je 2 ml in eine Kavität in einer 6-Loch-Platte überführt.

3.9. Infizieren von EBV-negativen Zellen

Die Infektion von BJAB-Zellen und primären B-Lymphozyten erfolgte mit dialysierten, sterilfiltrierten Überständen von Raji-Zellen (3.7.) bzw. mit sterilfiltrierten B95-8 Überständen als Positivkontrolle nach dem in Tabelle 3.1 aufgeführten Schema.

Überstände der Raji-Zellen (3.7.) wurden ca. 4 Stunden gegen 500 ml des entsprechenden Zellkulturmediums in Membranschläuchen (*Zellu Trans 25 mm*; Roth) dialysiert, um das enthaltene Puromycin zu entfernen, welches das Zellwachstum beeinträchtigen würde.

Die BJAB-Zellen wurden vor der Infektion 3-4 Tage kultiviert.

Tab. 3.1: Infektionsansätze

Ansatz	Zusammensetzung
Infektion mit EBV-Mutanten	2 ml Suspension von B-Lymphozyten oder BJAB-Zellen; 4-5 ml dialysierte, sterilfiltrierte Überstände superinfizierter Raji-Zellen (3.7.)
Positivkontrolle (B95-8)	2 ml Suspension von B-Lymphozyten oder BJAB-Zellen; 4-5 ml sterilfiltrierter Überstand von B95-8 Zellkulturen
Negativkontrolle	2 ml Suspension von B-Lymphozyten oder BJAB-Zellen; 4 ml Vollmedium

Die Zellen wurden unter den in 3.2. aufgeführten Bedingungen kultiviert. Nach verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben für weitere Untersuchungen entnommen.

Für einige Aufgabenstellungen wurden größere Infektionsansätze benötigt. Beispielsweise zur Untersuchung der Expressionskinetik der EBV-DNase und von BDLF-2.

Hierzu wurden ca. 50 ml BJAB-Zellsuspension (zwei Tage nach Subkultivierung) für 10 Minuten bei 1500 rpm abzentrifugiert (*Heraeus Christ Labofuge® GL, Rotor 2150*), in 25 ml Vollmedium resuspendiert und mit ca. 30 ml sterilfiltrierten Überständen einer für ca. 7 Tage kultivierten B95-8 Zellkultur infiziert. Nach 1, 2, 4, 8, 19, 28, 48 und 168 Stunden wurden je 4 ml Zellsuspension entnommen und die Zellen bis zur RNA-Isolation in *RNAlater* bei 4 °C gelagert. Die Zellen wurden pelletiert, in 100 µl PBS resuspendiert und mit 700 µl

RNAlater versetzt. Vor der RNA-Isolation wurden die Proben mit 1 ml PBS aufgefüllt, 10 Minuten bei 5000 rpm zentrifugiert (*Centrifuge 5415C*, Eppendorf) und einmal mit PBS bei 2000 rpm gewaschen.

3.10. DNA-Minipräparation

Die Plasmid-Mini-Präparation erfolgte mit 2-4 ml einer über Nacht gewachsenen Bakterien-suspension mit dem *EasyPrep Plasmid Mini Prep Kit* (Biozym) nach Herstellerangaben. Für die Sequenzierung wurde die Plasmid-DNA in Wasser eluiert.

3.11. DNA-Maxipräparation

Für die DNA-Maxipräparation wurden 200 ml einer über Nacht gewachsenen Bakteriensuspension verwendet. Die Plasmidisolation erfolgte mit dem *HiSpeed™ Plasmid Maxi Kit* (Qiagen) nach Herstellerangaben. Es folgte eine Fällung mit 2,5 Volumen eiskaltem, absolutem Ethanol und 0,1 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,2) für 20 Minuten bei 4 °C und 15000 rpm (*Centrifuge 5403*; Eppendorf). Das DNA-Pellet wurde mit 70 %igem Ethanol für 10 Minuten bei 4 °C und 15000 rpm gewaschen, dann vollständig getrocknet und in 100 µl Aqua bidest. resuspendiert.

3.12. Präparation von DNA aus Zellkulturen und Zellkulturüberständen

Die Isolation der DNA erfolgte aus 1-2 ml Zellsuspension (pelletiert und in 200 µl PBS resuspendiert) bzw. aus 200 µl Zellkulturüberständen nach Anleitung des *QIAamp Blood DNA Mini Kits* (Qiagen). Eluiert wurde die DNA in 50 µl AE Puffer; die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

3.13. Verdau mit Restriktionsendonukleasen

Der Verdau von DNA erfolgte mit unterschiedlichen Restriktionsenzymen und den jeweils vom Hersteller empfohlenen Puffern bei 37 °C für 1-2 Stunden. Eingesetzt wurden 0,2 bis 10 µg DNA und entsprechend 1 U Enzym pro µg DNA.

Die Restriktion wurde auf einem 0,8 %igem Agarosegel unter Mitführung eines 1 kb-DNA-Längenstandards kontrolliert.

3.14. Präparation von RNA aus Zellkulturen

Für die Gesamt-RNA Präparation wurden 1-4 ml Suspensionszellen pelletiert und durch *Qiashrepper*-Säulen (Qiagen) homogenisiert. Die RNA-Isolation erfolgte mit dem *RNeasy Mini Kit* (Qiagen) nach Herstellerprotokoll. Eluiert wurde die RNA in 30 µl RNase-freiem Wasser. Anschließend wurde für 45 Minuten mit DNase I nach folgendem Ansatz bei 37 °C verdaut:

RNA-Lösung	30,0 µl
10x DNase-Puffer	4,0 µl
DNase (10 U/µl)	2,0 µl
RNase Inhibitor (40 U/µl)	0,5 µl
RNase-freies Wasser	10,0 µl

Die Reaktion wurde für 10 Minuten bei 95 °C gestoppt und die RNA bei -70 °C gelagert.

3.15. Reverse Transkription (RT)

Die Umschreibung von RNA in cDNA erfolgte mit dem *Omniscript Reverse Transcriptase Kit* (Qiagen) nach dem dort angegebenen Protokoll. In einem Reaktionsansatz wurden 50 ng bis 2 µg Gesamt-RNA umgeschrieben. Als Primer wurde ein Oligo-dT-Primer (*Primer p(dT)₁₅ for cDNA synthesis*; Roche) verwendet.

3.16. PCR (*polymerase chain reaction*)

Zur Amplifikation gewünschter DNA-Abschnitte, wurde entweder die konventionelle Polymerase-Ketten-Reaktion (3.16.1.) oder eine *Realtime* PCR durchgeführt. Für die jeweilige PCR wurden spezifische Primer (2.4.), benannt nach den amplifizierten Regionen eingesetzt.

3.16.1. Konventionelle PCR

Für die konventionelle PCR wurde die *Taq DNA Polymerase* von Qiagen verwendet.

Der Standard-PCR-Ansatz setzt sich folgendermaßen zusammen:

- cDNA bzw. genomische DNA 1 pg-1 µg
- 10x Reaktionspuffer 5,0 µl
- dNTPs (je 2,5 mM) 5,0 µl
- 5'-Primer (10 pmol/µl) 2,0 µl
- 3'-Primer (10 pmol/µl) 2,0 µl
- Taq-Polymerase (5 U/µl) 0,5 µl
- Aqua bidest. ad 50,0 µl

Alternativ wurde der PCR-Ansatz mit *Ready-Mix* (Sigma) durchgeführt:

- cDNA bzw. genomische DNA 1 pg-1 µg
- 2x *Red Taq Ready Mix* 25,0 µl
- 5'-Primer (10 pmol/µl) 2,0 µl
- 3'-Primer (10 pmol/µl) 2,0 µl
- Aqua bidest. ad 50,0 µl

Die PCR wurde im Thermocycler *UNO II* (Biometra) mit beheizbarem Deckel durchgeführt. Zur Identifizierung der PCR-Produkte wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Es wurden je nach Fragmentgröße 1,5 %ige TBE-Gele (bis 1 kb) oder 0,8 %ige TAE-Gele (> 1 kb) mit Ethidiumbromid verwendet. Dabei wurde die Fragmentgröße mit DNA-Größenstandards (100 bp- und 1 kb-Leiter) verglichen.

Wurden Fragmente von mehr als 3 kb amplifiziert, wurde das *Expand High Fidelity PCR System* (Roche) nach Herstellerangaben eingesetzt.

PCR-Bedingungen (Primer 2.4.; Primernamen entsprechen der PCR-Benennung)

BDLF-2-Ausschluß außen und innen und -Rekombination außen

2 min	94 °C	
1 min	94 °C	
1 min	54 °C	
1 min	72 °C	
7 min	72 °C	
∞	4 °C	

BDLF-2 Rekombination innen

2 min	94 °C	
1 min	94 °C	
45 s	54 °C	
45 s	72 °C	
7 min	72 °C	
∞	4 °C	

BDLF-2-Expand

2 min	94 °C	 10x
15 s	94 °C	
30 s	52 °C	
2 min	68 °C	 20x
15 s	94 °C	
30 s	52 °C	
2 min	68 °C	je Zyklus + 5 s
7 min	68 °C	
∞	4 °C	

BGLF-2-Ausschluß und Rekombination außen und innen

2 min	94 °C	 35x
1 min	94 °C	
45 s	52 °C	
45 s	72 °C	
7 min	72 °C	
∞	4 °C	

BHRF-1 außen

2 min	94 °C	 35x
1 min	94 °C	
1 min	55 °C	
1 min	72 °C	
7 min	72 °C	
∞	4 °C	

BHRF-1 innen

2 min	94 °C	 35x
1 min	94 °C	
45 s	53 °C	
1 min	72 °C	
7 min	72 °C	
∞	4 °C	

BMRF-1 außen

2 min	94 °C	 35x
1 min	94 °C	
1 min	55 °C	
1 min	72 °C	
7 min	72 °C	
∞	4 °C	

BMRF-1 innen

2 min	94 °C	 35x
1 min	94 °C	
1 min	53 °C	
1 min	72 °C	
7 min	72 °C	
∞	4 °C	

BRLF-1 außen

2 min	94 °C	 35x
1 min	94 °C	
1 min	53 °C	
1 min	72 °C	
7 min	72 °C	
∞	4 °C	

BRLF-1 innen

2 min	94 °C	 35x
1 min	94 °C	
1 min	55 °C	
1 min	72 °C	
7 min	72 °C	
∞	4 °C	

BZLF-1 außen

2 min	94 °C
1 min	94 °C
1 min	58 °C
1 min	72 °C
7 min	72 °C
∞	4 °C


BZLF-1 innen

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


**DNase-Rekombination außen
und -Ausschluß außen und innen**

2 min	94 °C
1 min	94 °C
1 min	54 °C
1 min	72 °C
7 min	72 °C
∞	4 °C


DNase-Rekombination innen

2 min	94 °C
1 min	94 °C
45 s	52 °C
45 s	72 °C
7 min	72 °C
∞	4 °C


DNase-Expand

2 min	94 °C
15 s	94 °C
30 s	55 °C
4 min	68 °C
15 s	94 °C
30 s	55 °C
4 min	68 °C
7 min	68 °C
∞	4 °C




je Zyklus + 5 s

EBNA-1 (Latenz I, II, III) außen und innen

2 min	94 °C
1 min	94 °C
1 min	55 °C
1 min	72 °C
7 min	72 °C
∞	4 °C



EBNA-2 außen und innen
EBNA-3A, -3B, -3C außen

2 min	94 °C
1 min	94 °C
1 min	53 °C
1 min	72 °C
7 min	72 °C
∞	4 °C


EBNA-3A, -3B, 3C innen

2 min	94 °C
1 min	94 °C
1 min	54 °C
1 min	72 °C
7 min	72 °C
∞	4 °C


Hygromycin

2 min	94 °C
1 min	94 °C
1 min	54 °C
1 min	72 °C
7 min	72 °C
∞	4 °C


LMP-1 außen und innen

2 min	94 °C
1 min	94 °C
1 min	53 °C
1 min	72 °C
7 min	72 °C
∞	4 °C


LMP-2 außen und innen

2 min	94 °C
1 min	94 °C
1 min	55 °C
1 min	72 °C
7 min	72 °C
∞	4 °C


Mutantenlücke 108, 115, 118, 125

2 min	94 °C
1 min	94 °C
1 min	57 °C
1,5 min	72 °C
7 min	72 °C
∞	4 °C


Mutantenlücke 110, 120

2 min	94 °C
1 min	94 °C
1 min	55 °C
1,5 min	72 °C
7 min	72 °C
∞	4 °C


Neomycin

2 min	94 °C
45 s	94 °C
45 s	57 °C
45 s	72 °C
7 min	72 °C
∞	4 °C



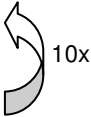
Transposon Pur-Kan (FP1/RP1)

2 min	94 °C	
45 s	94 °C	
1 min	58 °C	
2,5 min	72 °C	
7 min	72 °C	
∞	4 °C	

Puromycin

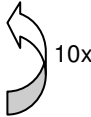
2 min	94 °C	
1 min	94 °C	
1 min	54 °C	
1 min	72 °C	
7 min	72 °C	
∞	4 °C	

BDLF-2 DIG Sonde innen

2 min	95 °C	
10 s	94 °C	
30 s	54 °C	
1 min	72 °C	
10 s	95 °C	
45 s	54 °C	
1 min	72 °C	
7 min	72 °C	
∞	4 °C	

je Zyklus + 20 s

DNase DIG Sonde innen

2 min	95 °C	
10 s	95 °C	
30 s	54 °C	
1 min	72 °C	
10 s	95 °C	
45 s	54 °C	
1 min	72 °C	
7 min	72 °C	
∞	4 °C	

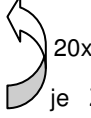
je Zyklus + 20 s

GAPDH DIG Sonde

2 min	95 °C	
10 s	95 °C	
30 s	56 °C	
1 min	72 °C	
10 s	95 °C	
30 s	56 °C	
1 min	72 °C	
7 min	72 °C	
∞	4 °C	

je Zyklus + 20 s

Puromycin DIG Sonde

2 min	95 °C	
10 s	95 °C	
30 s	54 °C	
1 min	72 °C	
10 s	95 °C	
30 s	54 °C	
1 min	72 °C	
7 min	72 °C	
∞	4 °C	

je Zyklus + 20 s

BZLF-1 DIG Sonde

2 min	95 °C	
10 s	95 °C	 10x
30 s	58 °C	
1 min	72 °C	
10 s	95 °C	 20x
30 s	58 °C	
1 min	72 °C	
7 min	72 °C	je Zyklus + 20 s
∞	4 °C	

3.16.2. Realtime PCR mit dem *LightCycler*

Die *Realtime* PCR mit dem *LightCycler* (Roche) kann zur Produktanalyse, Quantifizierung und Mutationsanalyse durchgeführt werden.

Für die Detektion der PCR-Produkte wurde entweder der Fluoreszenz-Farbstoff *SYBR Green* oder sequenzspezifische Hybridisierungssonden verwendet.

Der Farbstoff *SYBR Green* interkaliert unspezifisch in doppelsträngige DNA und sendet nach Anregung durch UV-Licht Lichtquanten aus, die bei 530 nm gemessen werden können. Detektiert werden die PCR-Produkte in der Elongationsphase, in der doppelsträngige DNA-Moleküle gebildet werden. Diese können dann anhand der Fluoreszenzintensität quantifiziert werden.

Als Hybridisierungssonden dienen zwei unterschiedliche Oligonukleotide, die spezifisch in einem Abstand von 1-5 Basenpaaren zueinander an die Zielsequenz binden. Eine Sonde (*upstream*-Sonde) ist am 3'-Ende mit Fluorescein markiert, die andere (*downstream*-Sonde) ist am 5'-Ende mit LC Red 640 gekoppelt. Gelangen die Sonden während der *Annealing*-Phase der PCR in räumliche Nähe, findet ein Fluoreszenz-Resonanz Energie-Transfer zwischen dem Fluorescein und dem LC Red 640 statt. Hierbei wird LC Red 640 durch das aktivierte Fluorescein angeregt und emittiert rotes Fluoreszenz-Licht (640 nm), welches vom *LightCycler* detektiert wird. Auch hier kann eine Quantifizierung über die Fluoreszenzintensität stattfinden.

Zur Quantifizierung wurden 2 µl eines definierten Standards mit einer Kopienzahl von 10^3 - 10^{10} pro ml des jeweils zu amplifizierenden Gens eingesetzt.

Für die BZLF-1-*Realtime*-PCR wurde der *FastStart DNA Master SYBR Green I Kit* (Roche) verwendet. Die Amplifikate der PCR für die Gene BDLF-2, BRLF-1, GAPDH und der EBV-DNase wurden mit Hybridisierungssonden (TIB MOLBIOL) und dem *FastStart DNA Master Hybridisation Probes Kit* (Roche) detektiert.

Standardansatz *FastStart DNA Master Hybridization Probes*:

- cDNA bzw. genomische DNA 2,0 µl
- FastStart Reaktionsmix 2,0 µl
- MgCl₂ (Endkonzentration 3 mM) 1,6 µl
- 5'-Primer (10 pmol/µl) 1,0 µl
- 3'-Primer (10 pmol/µl) 1,0 µl
- 3'-Fluorescein-markierte Sonde (3 µM) 1,0 µl
- 5'-LC Red640-markierte Sonde (3 µM) 1,0 µl
- Aqua bidest. ad 20,0 µl

Standardansatz *FastStart DNA Master SYBR Green I*:

- cDNA bzw. genomische DNA 2,0 µl
- FastStart Reaktions Mix 2,0 µl
- MgCl₂ (Endkonzentration 3 mM) 1,6 µl
- 5'-Primer (10 pmol/µl) 1,0 µl
- 3'-Primer (10 pmol/µl) 1,0 µl
- Aqua bidest. ad 20,0 µl

Bedingungen für die *Realtime PCR***innere BDLF-2-PCR**

Denaturierung	10 min	95 °C	 45x
Amplifikation	0 s	95 °C	
	10 s	54 °C	
	16 s	72 °C	
Schmelzkurve	50 °C bis	85 °C	
Kühlung	1 min	40 °C	

innere BRLF-1-PCR

Denaturierung	10 min	95 °C	 45x
Amplifikation	0 s	95 °C	
	10 s	55 °C	
	15 s	72 °C	
Schmelzkurve	50 °C bis	85 °C	
Kühlung	1 min	40 °C	

Innere BZLF-1-PCR

Denaturierung	10 min	95 °C	
Amplifikation	0 s	95 °C	 40x
	10 s	58 °C	
	16 s	72 °C	
	1 s	87 °C	
Schmelzkurve	65 °C bis	99 °C	
Kühlung	1 min	40 °C	

DNase-PCR

Denaturierung	10 min	95 °C	
Amplifikation	0 s	95 °C	 50x
	10 s	60 °C	
	15 s	72 °C	
Schmelzkurve	60 °C bis	95 °C	
Kühlung	1 min	40 °C	

GAPDH-PCR

Denaturierung	10 min	95 °C	
Amplifikation	0 s	95 °C	 50x
	10 s	56 °C	
	15 s	72 °C	
Schmelzkurve	45 °C bis	80 °C	
Kühlung	1 min	40 °C	

3.17. Herstellung von DIG-markierten DNA-Sonden

Mit Hilfe des *PCR DIG Probe Synthesis Kit* (Roche) können DIG-markierte DNA-Sonden mittels PCR hergestellt werden. Hierbei wird in bestimmten Abständen DIG-dUTP zufällig anstatt von dTTP in das PCR-Produkt eingebaut.

Die Markierung wurde nach Herstellerprotokoll unter den in 3.16.1. beschriebenen PCR-Bedingungen für die DNase-, GAPDH- und Puromycinsonde durchgeführt.

Nach der PCR wurden die Sonden mit 3 Volumen eiskaltem absolutem Ethanol und 0,1 Volumen 4 N LiCl versetzt, 30 Minuten bei -70 °C inkubiert und 15 Minuten bei 4 °C und 13000 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde 5 Minuten mit eiskaltem 70 %igem Ethanol bei 4 °C und 13000 x g gewaschen, für 10 Minuten bei 30 °C in der *Speed Vac-Zentrifuge* (*Speed Vac concentrator 5301*; Eppendorf) getrocknet und in 50 µl TE-Puffer resuspendiert.

3.18. DNA-Sequenzierung

Zur Ermittlung der Insertionsstelle des transponierbaren Elements in die EBV-Bank-Klone wurde eine DNA-Sequenzierung durchgeführt.

Das Prinzip der Sequenzierung erfolgte nach der Kettenabbruchmethode nach SANGER ET AL. (1977) unter Verwendung des *ABI Prism dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit* (ABI Prism™). Die Sequenzierungsreaktion wurde im *ABI Prism™310 Genetic Analyser* (Applied Biosystems) durch das *Performance Optimized Polymer 6'* (Pop™-6, ABI Prism) aufgetrennt.

Standard-Sequenzierungsansatz

DNA (0,5-1,0 µg)	x µl
Terminator Ready Reaction Mix	8 µl
Primer (3,2 pmol/µl)	1 µl
Aqua bidest.	ad 20 µl

Thermocycler-Bedingungen

2 min	96 °C	
30 s	96 °C	 25x
15 s	50 °C	
4 min	60 °C	
∞	4 °C	

Die Reaktionsprodukte wurden wie unter 3.11. beschrieben mit Ethanol gefällt, allerdings wurden die Proben vor der 20-minütigen Zentrifugation 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach dem Waschen mit 70 %igem Ethanol wurde das Pellet für 5 Minuten bei 30 °C in der *Speed Vac-Zentrifuge* (*Speed Vac concentrator 5301*; Eppendorf) getrocknet. Das Pellet wurde in 23 µl *Template Suppression Reagent* (Applied Biosystems) resuspendiert, 2 Minuten bei 95 °C denaturiert, auf Eis gekühlt und sequenziert.

3.19. Immunfluoreszenztest (IFT)

Zum Nachweis und zur Identifizierung von EBV-Antigenen in infizierten Zell-Linien wurde ein IFT durchgeführt.

Hierzu wurden jeweils 10^4 - 10^5 infizierte Zellen verwendet. B95-8 Zellen dienten als Positivkontrolle und BJAB-Zellen als Negativkontrolle. Die Zellen wurden zentrifugiert und je 10 μ l eines in 50-100 μ l PBS (2.9.) resuspendierten Zellpellets wurden pro Feld eines 10-Loch-Objektträgers (Roth) aufgetragen. Nachdem die Zellsuspension vollständig getrocknet war, folgte eine 10-minütige Fixierung in eiskaltem Aceton bei -20 °C. Die Inkubation mit dem Primärantikörper gegen EA-D (1:500 in PBS), LMP-1 (1:20 in PBS) bzw. gegen die EBV-DNase (1:100 in PBS) erfolgte für 40 Minuten bei 37 °C in einer feuchten Kammer. Nach Entfernen von Antikörperresten (3 x 5 Minuten Waschen in PBS) wurde mit dem entsprechenden FITC-konjugierten Sekundärantikörper (Kaninchen anti Maus bei EA-D und LMP-1, Ziege anti Kaninchen bei EBV-DNase, je 1:20) unter gleichen Bedingungen inkubiert. Die Zellen wurden erneut 3 x 5 Minuten in PBS gewaschen, wobei beim letzten Waschschrift 50 μ l *Evans Blue Counterstain* (Sigma) zur Gegenfärbung der Zellen zugesetzt wurden. Zur Erhaltung der Fluoreszenz wurden die Präparate in *Eindeckmedium* eingebettet und bis zur Auswertung unter dem Fluoreszenzmikroskop (Zeiss-Mikroskop, Axioskop) bei -20 °C gelagert.

Zum Nachweis von EBNA-1 wurde ein Anti-Komplement-Immunfluoreszenztest (ACIF) durchgeführt. Der Primärantikörper gegen EBNA-1 wurde 1:100 verdünnt. Im nächsten Schritt wurden 10 μ l Meerschweinchen Serum als Komplementquelle (10 μ l + 400 μ l Komplementverdünnungspuffer; Meridian Bioscience) zugesetzt und die Detektion erfolgte über einen FITC-markierten anti Meerschweinchen Komplement C3 Antikörper (1:2000 in PBS). Die Inkubationszeiten mit den Antikörpern und die Waschschriffe entsprechen denen der oben genannten IFTs, jedoch wurde hier nicht gegengefärbt.

3.20. Durchflußzytometrie (FACS=*Fluorescence activated cell sorter*)

Die Zelldifferenzierung und -proliferation wurde mittels FACS-Analyse (*FACS-Calibur*, Becton Dickinson) durchgeführt.

Es wurden Zellgröße im *forward scatter* (FSC) und Granularität im *side scatter* (SSC) sowie spezifische Oberflächenantigene mittels Fluoreszenzfarbstoff-markierter Antikörper bestimmt.

Eine Zellsuspension der zu untersuchenden Zellen (1-2 ml) wurde pelletiert und in 600 μ l sterilfiltriertem PBS resuspendiert. Je 200 μ l der Zellsuspension wurde mit den in Tab. 3.2 aufgeführten Antikörpern inkubiert. Für jeden Ansatz wurden 20 μ l des jeweiligen Antikörpers verwendet (APC-gekoppelte Antikörper 5 μ l). Ungebundene Antikörper wurden nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln durch Waschen mit

2 ml sterilfiltriertem PBS (5 Minuten bei 1300 rpm Zentrifugation; *Heraeus Septatech Megafuge 1.0*; Rotor BS4402/A) entfernt. Das in 200 µl sterilfiltriertem PBS resuspendierte Zellpellet wurde im *FACS-Calibur* analysiert.

Tab. 3.2: Antikörperkombinationen für die FACS-Analyse

Ansatz	Antikörperkombination
1	CD44 FITC, CD11a PE, CD19 PerCP, CD23 APC
2	CD30 FITC, CD54 PE, CD19 PerCP
3	CD40 FITC, CD58 PE, CD19 PerCP

Die Ergebnisse der FACS-Analyse wurden mit Hilfe des Programms CellQuest entweder vergleichend im HistogrammPlot oder einzeln im DotPlot ausgewertet.

3.21. Southern Blot

Für den Southern Blot wurden ca. 10 µg DNA aus superinfizierten Raji-Zellen (3.7.) mit Bam HI (1 U/µg DNA) gespalten und auf einem 0,8 %igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Mutierte EBV-Bank-Klone (1 µg) wurden ebenfalls gespalten und als Positivkontrolle auf dem Gel mitgeführt. Nach der Elektrophorese wurde das Gel 15 Minuten in Fragmentierlösung (0,25 M HCl), 45 Minuten in Denaturierlösung (0,5 M NaOH; 1,5 M NaCl) und 45 Minuten in Neutralisierlösung (1 M Tris; 1,5 M NaCl) inkubiert. Anschließend erfolgte eine 20-minütige Äquilibration in 20x SSC. Durch Vakuumblot (90 Minuten bei 55 mbar; *VacuGene XL Vacuum Blotting System*, Pharmacia) mit 20x SSC wurde die DNA auf eine Nitrozellulosemembran (*Hybond N⁺*; Amersham Biosciences) transferiert. Die Fixierung der DNA erfolgte durch *UV-Crosslinking* (*UV StratalinkerTM 2400*; Stratagene) und Backen der Membran für 30 Minuten bei 80 °C.

Zur Blockade unspezifischer Bindungen wurde die Membran mindestens 90 Minuten bei 42 °C in *DIG Easy Hyb* Hybridisierungslösung (Roche) prähybridisiert. Die Hybridisierung mit der DIG-markierten Puromycinsonde (20 µl Sonden-PCR-Produkt (3.17.) in 10 ml *DIG Easy Hyb*; laut Herstellerangaben) erfolgte für 12-16 Stunden bei 42 °C. Bei erstmaliger Verwendung der Sonde wurde diese in 1 ml *DIG Easy Hyb* für 5 Minuten bei 95 °C denaturiert und in 9 ml auf 42 °C vorgewärmtem Hybridisierungspuffer aufgenommen. Bei Wiederverwendung der Sonde, wurde der bei -20 °C gelagerte Hybridisierungsansatz aufgetaut und 10 Minuten im Wasserbad bei 68 °C denaturiert.

Nach der Hybridisierung wurde die Membran zum Entfernen der ungebundenen Sonde zweimal 5 Minuten mit 2x SSC/0,1 % SDS bei Raumtemperatur, dann zweimal 20 Minuten mit 0,5x SSC/0,1 % SDS bei 63-65 °C gewaschen. Die Immundetektion erfolgte mit dem *DIG Wash and Block Buffer Set* (Roche) und dem *DIG Luminescent Detection Kit for Nucleic Acids* (Roche) nach Herstellerangaben. Die Membran wurde mit dem Chemilumineszenzsubstrat CSPD in einer Plastikfolie für 5 Minuten inkubiert, das Substrat entfernt, die Membran in der Folie verschweißt, 10 Minuten bei 37 °C inkubiert und auf einen Röntgenfilm (*X-OMAT UV Film*; Kodak) aufgelegt. Nach einer Exposition von 30-90 Minuten wurde der Film mit dem Röntgenfilmentwickler T-6 Processor (Cronex) entwickelt.

Zur Wiederverwendung der Membran wurde diese zweimal 15 Minuten bei 37 °C in Waschpuffer (0,2 N NaOH; 0,1% SDS) gewaschen und 5 Minuten in 2x SSC äquilibriert. Mit 2x SSC in einer Plastikfolie eingeschweißt erfolgte die Lagerung der Membran bei 4 °C.

3.22. Reverser Northern Blot

Durch den Northern Blot können RNA-Moleküle nachgewiesen werden. Um geringe Mengen der zu untersuchenden mRNA zu vermehren ohne die quantitativen Verhältnisse aller RNA-Spezies untereinander zu verändern, wurde Gesamt- bzw. mRNA mit dem *SMARTTM PCR cDNA Synthesis Kit* (BD Biosciences) in cDNA umgeschrieben und amplifiziert.

Es wurden 0,05-1 µg Gesamt-RNA bzw. 0,025-1 µg mRNA in die Erst-Strang-Synthese eingesetzt und damit eine dem Ausgangsmaterial entsprechenden cDNA-Menge amplifiziert. Die Reaktionen wurden nach Herstellerprotokoll durchgeführt, die Amplifikation jedoch nicht gemäß Herstellerangaben mit EDTA gestoppt. Der PCR-Ansatz wurde mit Ethanol gefällt (3.11.) und in 50 µl Aqua bidest. aufgenommen. Für den Reversen Northern Blot wurden 5 µg amplifizierter cDNA eingesetzt.

Gelelektrophoretische Auftrennung, Blot, Hybridisierung und Immundetektion der cDNA erfolgten analog zum Southern Blot (3.21.).

Verwendet wurden DNase- und GAPDH-Sonden ((3.17.) je 20 µl in 10 ml *DIG Easy Hyb*).

3.23. In-situ-Hybridisierung

Die *In-situ*-Hybridisierung ermöglicht den Nachweis von DNA und RNA in Zellen und Geweben. Es wurde ein modifiziertes Protokoll nach CHARDONNET ET AL. (1995) verwendet.

Nach jedem Inkubations- und bei jedem Waschschrift wurde für 5 Minuten bei 1700 rpm (*Heraeus Christ Labofuge[®] GL, Rotor 2150* bzw. *Centrifuge 5415C*, Eppendorf) zentrifugiert. Fehlen Volumenangaben bei den verwendeten Lösungen, wurden ca. 500 -1000 µl eingesetzt.

Je Ansatz wurden 3×10^6 Zellen eingesetzt. Diese wurden 20 Minuten in 4 %igem Paraformaldehyd (2.9.) (1 ml pro 10^6 Zellen) fixiert, in PBS pH 7,2 gewaschen, 15 Minuten in 0,2 N HCl denaturiert und 10 Minuten in 2x SSC bei 50 °C inkubiert. Danach erfolgte eine 10-minütige Inkubation bei 37 °C mit 30 µl Proteinase K Lösung (Qiagen). Die Ansätze wurden mit 1 ml 4 %igem Paraformaldehyd aufgefüllt und für 5 Minuten inkubiert.

Die Hybridisierungslösung (2.9.) wurde mit Lachssperma-DNA (Invitrogen) (1:100) und mit der DIG-markierten Sonde (1:10) versetzt und 10 Minuten bei 70 °C inkubiert. Als Negativkontrolle wurde Hybridisierungslösung ohne Sonde verwendet. Die in Paraformaldehyd fixierten Zellen wurden in 50 µl denaturierter Hybridisierungslösung, mit bzw. ohne Sonde, resuspendiert, für 10 Minuten bei 90 °C denaturiert und über Nacht bei 42 °C inkubiert.

Für die Immundetektion wurden die Ansätze mit 1 ml 2x SSC aufgefüllt, abzentrifugiert, in 2x SSC gewaschen und 5 Minuten in 4x SSC/0,2 % Tween 20 inkubiert. Der Anti DIG Anti-körper (*Roche*) wurde 1:40 in BSA-Lösung (5 % BSA in 4x SSC/0,2% Tween 20) verdünnt und davon 100 µl zu den Zellen gegeben. Die Inkubation erfolgte für 1 Stunde bei 37 °C. Dann wurde mit 1 ml 4x SSC/0,2 % Tween 20 aufgefüllt, zentrifugiert und mit PBS gewaschen. Nach der Gegenfärbung für 1 Minute mit 100 µl Propidiumjodid (5 µg/ml) wurde die Zellsuspension auf 2×10^6 Zellen pro ml mit PBS eingestellt und 200 µl der Verdünnung für 5 Minuten bei 1000 rpm (*Varifuge K*; Heraeus Christ) auf Objektträger zentrifugiert und mit *Vectashield[®]* (Vector Laboratories) eingedeckt.

4. Ergebnisse

Das erste Ziel dieser Arbeit bestand darin, eine Methode zur kompletten Absättigung von EBV-Klonen mit Insertionsmutationen zu entwickeln. Es schloß sich die Entwicklung einer Methode zur Generierung von EBV-Mutanten durch homologe Rekombination an, die am Beispiel der BGLF-2-Mutante dargestellt wird. Anschließend wurden die beiden nach der neuen Methode generierten Mutanten EBV-BGLF-5⁻ und EBV-BDLF-2⁻ phänotypisch charakterisiert.

Die Abb. 4.1 zeigt die Abfolge der Ergebnisse als Übersicht.

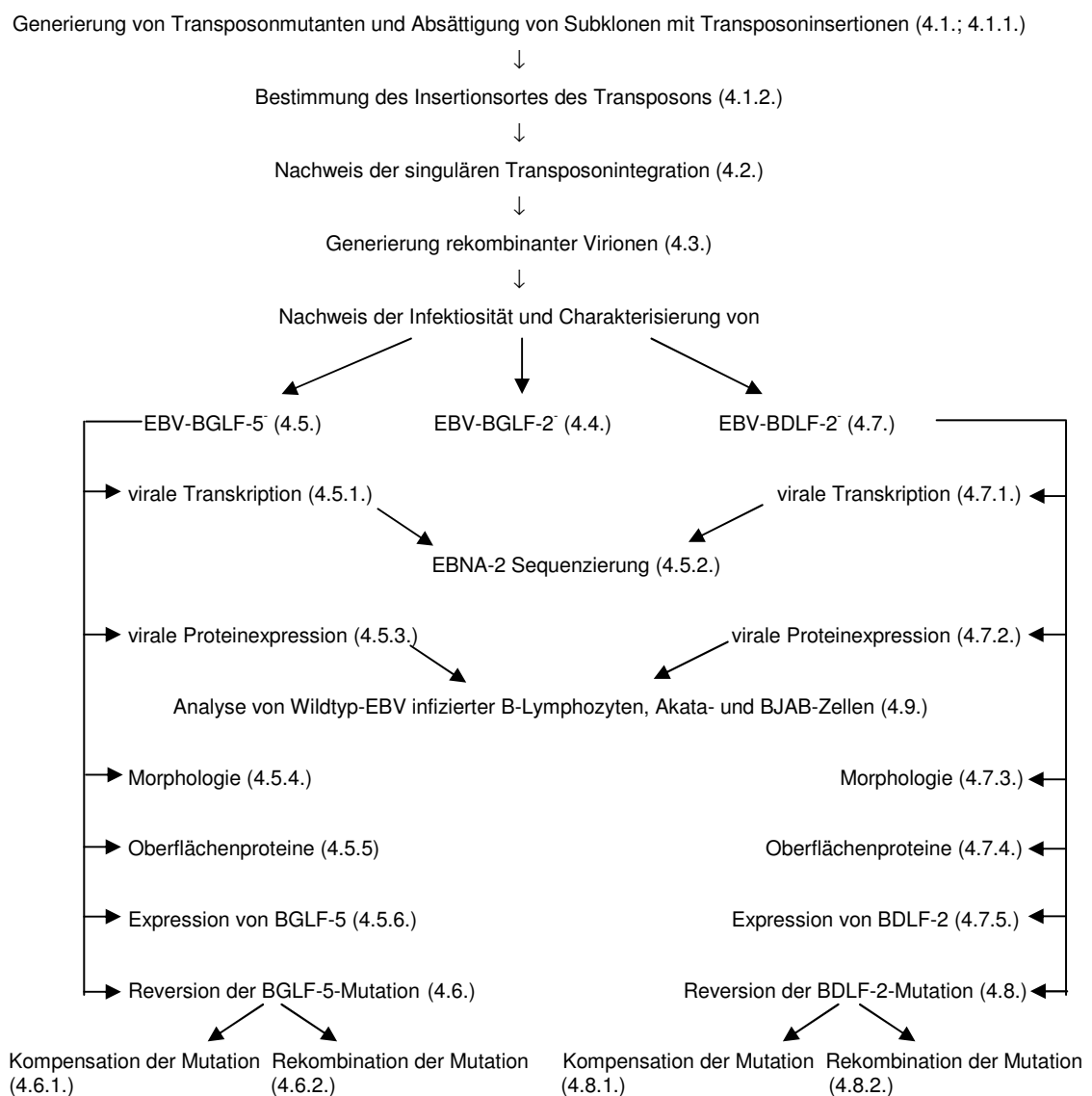


Abb. 4.1: Aufbau und Abfolge des Kapitels „Ergebnisse“

4.1. Entwicklung einer Strategie zur Absättigung von EBV-Subklonen mit Transposoninsertionen

Grundlage für die Generierung von Transposonintegrationsmutanten des EBV ist eine genomische EBV-Bank aus 17 verschiedenen *E. coli* DH5 α Klonen. Die Klone enthalten jeweils ein Cosmid auf der Basis von cos553 mit einem ca. 25-35 kb großen Insert aus EBV-DNA [SÖZER, 1999; Abb. 4.2].

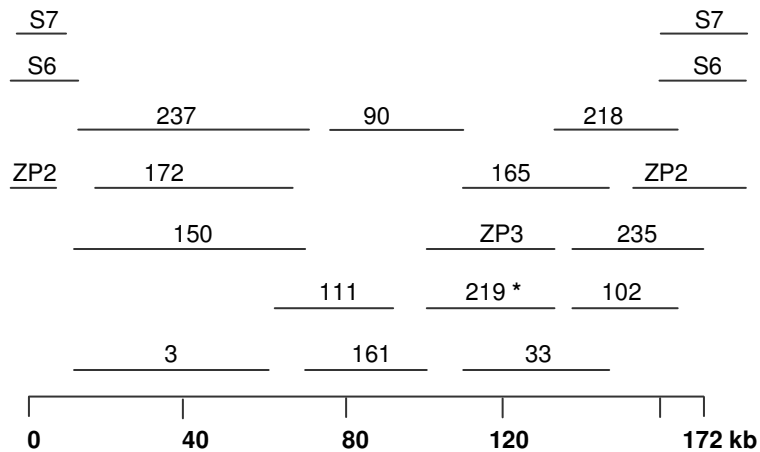


Abb. 4.2: Lage der Bank-Klone im EBV-Genom; * Gegenstand dieser Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit dem Klon 219 der EBV-Bank gearbeitet. Dieser Klon beinhaltet die Sequenz von Position 103740 bis Position 136688 im EBV-Genom. Abgesehen von Randsequenzen ist er bis auf sechs Bereiche komplett durch Insertionsmutationen mit einem transponierbaren Element auf Basis des Transposons Tn5 abgesättigt [DE GRAAF, 2000] (Tab. 4.1).

Tab. 4.1: Bereiche des Genoms, die noch durch Transposonintegration abgesättigt werden müssen

Bereich	von Position	bis Position
1	108122	109723
2	110809	112146
3	115210	117033
4	118680	119669
5	120283	121426
6	125655	127001

4.1.1. Komplettierung der Mutagenese von Klon 219

Durch Transposonmutagenese (3.3., 3.4.) wird das transponierbare Element zufällig in den Klon 219 inseriert. Zur Bestimmung der Insertionsorte, müssen die mutierten Klone sequen-

ziert werden. Sind nur noch wenige Bereiche im Bank-Klon nicht mutagenisiert, liegt die Masse der Insertionsorte nicht in den Zielarealen. Somit gestaltet es sich sehr arbeitsaufwändig die Klone von Interesse zu finden, da jeder mutierte Klon sequenziert werden müßte. Daher wurde hier eine Methode entwickelt, die eine effiziente Vorauswahl möglicher Insertionsmutationen in den gewünschten Bereichen des Bank-Klons erlaubt.

Zur Mutagenese von Regionen des Klons 219, für die es noch keine Insertionsmutanten gab, wurde die Plasmid-DNA aus den neu generierten Transposonintegrationsmutanten gewonnen und in Amplifikationsreaktionen (Mutantenlücken-PCRs, 3.16.1.) eingesetzt. Hierzu wurden Primer verwendet, die die in Tab. 4.1 aufgeführten Bereiche umgaben. Entstanden bei diesen PCRs Produkte, die um die Größe des transponierbaren Elements (ca. 2600 bp) länger waren als die Zielregion oder waren Amplifikate nicht nachweisbar, konnte auf die Insertion des Transposons in die entsprechende Region geschlossen werden (Abb. 4.3).

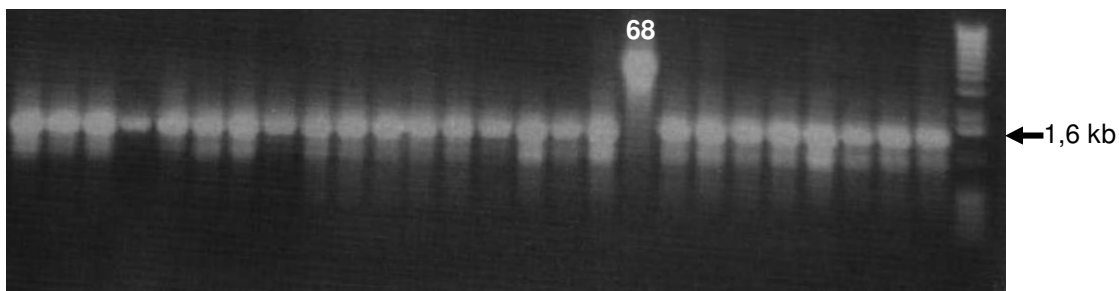


Abb. 4.3: Agarosegelelektrophorese der Mutantenlücken-PCR-Produkte in der Region von Position 125655 bis Position 127001 mit DNA neu generierter Transposoninsertionsmutanten des Klons 219. 68: Klon mit PCR-Produkt abweichender Größe

Die Mutantenlücken-PCR ist hier am Beispiel der Region von Position 125655 bis Position 127001 (Bereich 6 aus Tab. 4.1) dargestellt. Das Amplifikat für Klon 68 ist in der PCR mit diesem Bereich umschließenden Primern (Primerpaar 125 (2.4.)) um ca. 2600 bp größer als die entsprechende Zielregion (1388 bp = Bereich 6 + Primersequenzen). Somit ist davon auszugehen, daß das Transposon in den Sequenzbereich von 125655-127001 integriert wurde. Vergleichbare Ergebnisse konnten für drei weitere Klone aus der Transpositionsreaktion (3.3., 3.5.) erhalten werden.

4.1.2. Bestimmung des Insertionsortes des Transposons

Klon 68 und drei weitere Klone, die entsprechend vergrößerte Amplifikate in den Mutantenlücken-PCRs aufwiesen, wurden mit dem Tn-Primer sequenziert (3.17.), der mit dem 5'-En-

de des transponierbaren Elements hybridisiert. Somit konnte der Insertionsort des Transposons in den EBV-Bank-Klon ermittelt werden.

In Abb. 4.4 ist exemplarisch ein Ausschnitt aus der Sequenzierung des Klons 68 dargestellt. Die Sequenz wurde mit Hilfe des Blast-Programms und der EMBL-DNA-Datenbank ausgewertet (Abb. 4.5).

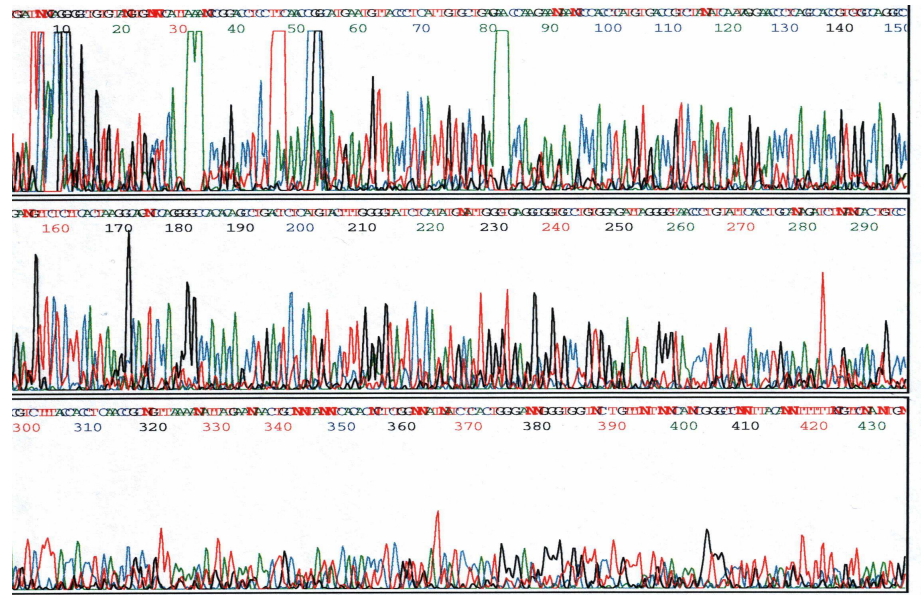


Abb. 4.4: Sequenzierung des Klons 68, Ausschnitt aus dem Chromatogramm

```
>gi|59074|emb|V01555.1|EBV   Epstein-Barr virus (EBV) genome, strain B95-8
      Length = 172281
      Score = 555 bits (280), Expect = e-155
      Identities = 286/288 (99%)
      Strand = Plus / Minus
Query: 36      ccggacctcctaaaacctacatgaatgttaccctcattgtgctgaagcccaagaagaagc 95
      |||||
Sbjct: 126725 ccggacctcctaaaacctacatgaatgttaccctcattgtgctgaagcccaagaagaagc 126666

Query: 96      ccacctatgtgaccgtctacatcaatggaaccctagccaccgtggccaggcccgaggttc 155
      |||||
Sbjct: 126665 ccacctatgtgaccgtctacatcaatggaaccctagccaccgtggccaggcccgaggttc 126606

Query: 156     tcttactaaggcagtcaggggccacacagcctgactctcatgtactttggggatttct 215
      |||||
Sbjct: 126605 tcttactaaggcagtcaggggccacacagcctgactctcatgtactttggggatttct 126546

Query: 216     cagatgcagtggtgaggcggcctgtggagattaggggtaaccctgtattcacctgca 275
      |||||
Sbjct: 126545 cagatgcagtggtgaggcggcctgtggagattaggggtaaccctgtattcacctgca 126486

Query: 276     cagatctgaccactgcccacgtctttaccacctaaccgccgttaaaa 323
      |||||
Sbjct: 126485 cagatctgaccacggcccacgtctttaccacctaaccgccgttaaaa 126438
```

Abb. 4.5: Vergleich der Nukleotidsequenz von Klon 68 einer Sequenz aus der EMBL-Datenbank

Nach dem Sequenzvergleich mit Daten der EMBL-Datenbank wurde eine 99 %ige Homologie zwischen dem sequenzierten Fragment und einem Abschnitt des EBV-Genom aus der Zell-Linie B95-8 gefunden. Das transponierbare Element wurde somit in die EBV-Sequenz des Bank-Klons inseriert und der exakte Insertionsort konnte nun bestimmt werden.

Die analysierte Sequenz beginnt bei Nukleotid 36 am aufsteigenden Ende des Sequenzbereichs der Datenbank (126725). Somit müssen die 36 Basen zur Datenbanksequenz addiert werden. Da der Tn-Primer im transponierbaren Element bindet, müßten die 20 bp der Transposonsequenz wieder subtrahiert werden. Da aber die Sequenzierung in der Regel ca. 20 bp hinter dem Primer beginnt, kann dieses vernachlässigt werden. Daraus ergibt sich der Insertionsort des Transposons an Position 126761 im EBV-Genom. Damit ist das offene Leseraster BGLF-2 des EBV betroffen. Weitere Bereiche im Klon 219, die mit Insertionsmutationen abgesättigt wurden, und die betroffenen Gene sind in Tab. 4.2 dargestellt.

Tab. 4.2: Neue Klone der Mutatenbank des Klons 219

Klon	Insertionsort	Lücke	restlicher nicht abgesättigter Bereich	Mutation im Gen
19	119377	118680-119669	697 bp	BBRF-3
51	110919	110809-112146	1227 bp	BKRF-3
61	115273	115210-117033	1760 bp	BBRF-1
68	126761	125655-127001	1106 bp	BGLF-2

Die generierten und sequenzierten Insertionsmutationen zeigen, daß die hier etablierte Methode funktioniert, so daß prinzipiell alle Lücken mit vertretbarem Aufwand gefüllt werden können und nicht alle Klone sequenziert werden müssen. Somit könnten unter Verwendung dieser Strategie die verbleibenden mutationsfreien Regionen in den Bereichen 1, 2, 3 und 5 (Tab. 4.1) mit Insertionsmutationen aufgefüllt werden.

4.2. Nachweis der singulären Transposonintegration in Mutanten-Klone

Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei Klone ausgewählt, in denen EBV-Gene unterschiedlichster Funktion mutiert waren.

Die Klone der Mutanten-Bank von Klon 219 (Bank-Klone), in denen das transponierbare Element im Bereich der alkalische DNase (BGLF-5) und in einem möglichen Homologen zu Cyclin B1 (BDLF-2) inserierte, wurden bereits von DE GRAAF (2000) konstruiert. Die Mutation im offenen Leseraster BGLF-2 (Capsidprotein; Klon 68) wurde bei der erweiterten Mutagenese des Klons 219 im Rahmen dieser Arbeit generiert.

In Abb. 4.6 sind die veränderten Bandenmuster der drei Mutanten nach der Restriktion mit Bam HI (3.16.) im Vergleich zum Klon 219 dargestellt.

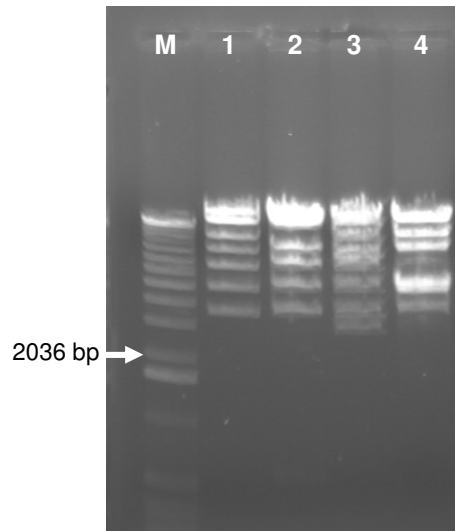


Abb. 4.6: Agarosegelelektrophorese des Bam HI Verdau aus ausgewählten Klone im Vergleich zum Klon 219 der genomischen EBV-Bank. M = Marker, 1 = Klon 219, 2 = BGLF-5-Mutante, 3 = BDLF-2-Mutante, 4 = BGLF-2-Mutante

Die Mutanten-Klone weisen ein ähnliches Restriktionsmuster auf wie der ursprüngliche Klon 219. Zusätzliche und/oder vergrößerte Banden kommen hierbei durch die Integration des Transposons in die DNA des Bank-Klons zustande. Da die Bam HI-Schnittstelle im transponierbaren Element peripher liegt, kommt es bei dessen Integration in die Nähe von Bam HI-Schnittstellen des Klons zur Vergrößerung des Ursprungsfragments und zur Entstehung eines sehr kleinen Fragments, welches auf dem Gel nicht mehr sichtbar ist. Erfolgt die Integration des Transposons in größerer Entfernung zu den Bam HI-Restriktionsstellen, entstehen zwei neue Fragmente.

In Tab. 4.3 ist die Lokalisation der untersuchten Gene auf dem EBV-Genom und der Insertionsort des Transposons dargestellt.

Tab. 4.3: Lokalisation der mutierten Gene und Insertionsort des Transposon

Gen	Lokalisation des Gens	Insertionsort des Transposons
BDLF-2	Position 131127-132389	Position 131761
BGLF-2	Position 125863-126873	Position 126741
BGLF-5	Position 120929-122341	Position 121834

Anhand des Sequenzierungsergebnisses und der Restriktionsanalyse konnte jedoch nicht festgestellt werden, wie oft das transponierbare Element in den Mutanten-Klon inseriert wurde. Mittels Southern Blot (3.21.) wurde die singuläre Integration des Transposons in Mutanten-Klone bzw. die Rekombination zwischen dem Mutanten-Klon mit den Wildtyp-Vi-

rionen überprüft. Anhand des Bandenmusters konnte die Häufigkeit der Insertion des transponierbaren Elements ermittelt werden (Abb. 4.7 und 4.8).

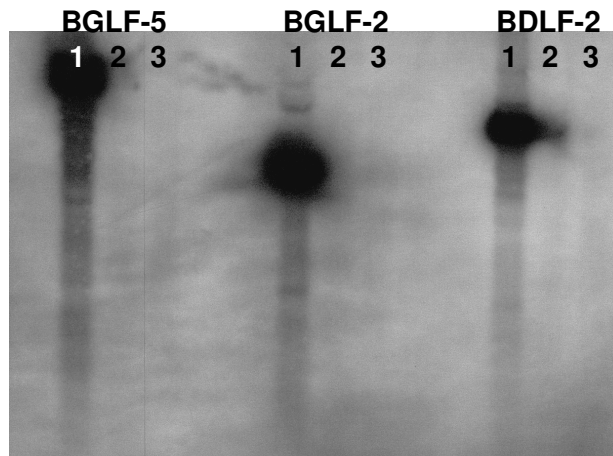


Abb. 4.7: Southern Blot zum Nachweis der singulären Integration des transponierbaren Elements in Mutanten-Klone mit einer DIG-markierten Puromycinsonde. 1 = 1 µg Bam HI-verdautes Cosmid mit entsprechender Mutation, 2 = 10 µg Bam HI-verdaute zelluläre DNA aus Superinfektionen mit entsprechender Mutante, 3 = 25 µg Bam HI-verdaute DNA aus Superinfektionen mit entsprechender Mutante; Belichtungszeit 60 Minuten

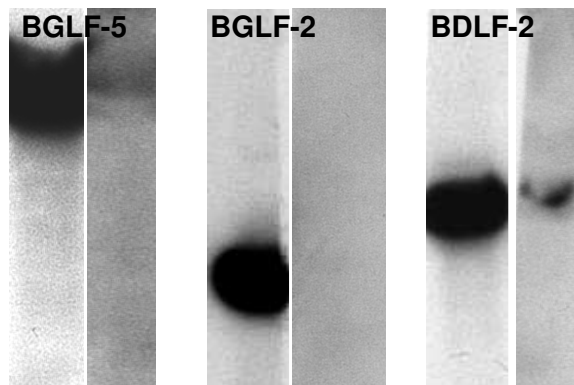


Abb. 4.8: Southern Blot zum Nachweis der singulären Integration des transponierbaren Elements in Mutanten-Klone mit einer DIG-markierten Puromycinsonde; Ausschnitte aus Abb. 4.6. rechts: Bam HI-verdautes Cosmid mit entsprechender Mutation (1 µg); 30 Minuten Belichtungszeit, links: Bam HI-verdaute zelluläre DNA aus Superinfektionsansätzen mit der entsprechenden Mutante (10 µg); 60 Minuten Belichtungszeit

Der in Abb. 4.7 dargestellte Blot weist je eine sehr starke Bande bei den drei mit Bam HI gespaltenen Mutanten-Klonen auf, so daß mögliche Banden bei den Superinfektionsansätzen verdeckt sein könnten. Die gebundene Sonde wurde entfernt (3.21) und die Membran in Streifen geschnitten, so daß jede Spur separat detektiert werden konnte. Nach erneuter Hybridisierung mit der Puromycinsonde und Immundetektion wurden die Streifen unterschiedlich lang belichtet.

In der Southern Blot Analyse mit der DNA der Mutanten-Klone wurde jeweils nur eine Bande nachgewiesen, welches die einmalige Integration des transponierbaren Elements zeigt.

Auch mit DNA aus dem Zellpellet superinfizierter Raji-Zellen zur Herstellung von EBV-BGLF-5- (4.5.) und EBV-BDLF-2-Mutanten (4.7.) wurde jeweils nur eine Bande nachgewiesen, die auf gleicher Höhe mit der entsprechenden Bande für den jeweiligen Mutanten-Klon liegt. Das transponierbare Element befindet sich somit nur an einer Stelle in der Mutanten-Klone und der rekombinanten Virionen. In der DNA aus dem Zellpellet superinfizierter Raji-Zellen zur Generierung der BGLF-2-Mutante (4.3.) wurde das transponierbare Element im Southern Blot nicht nachgewiesen. Möglicherweise war die DNA-Menge der Mutanten-Virionen nicht ausreichend.

4.3. Generierung rekombinanter Virionen am Beispiel einer BGLF-2-Mutante

Die Entwicklung eines Systems zur Generierung von rekombinanten Virionen wird im folgenden am Beispiel der BGLF-2-Mutante erläutert.

Rekombinante EBV-BGLF-2⁻ wurden in B95-8-Zellen generiert (3.6.1.) und in Raji-Zellen durch Zusatz von Puromycin selektioniert (3.7.). DNA aus Überständen selektionierter Raji-Kulturen wurde mittels PCR auf mutierte Virionen und Kontaminationen durch Mutanten-Klone untersucht. In Abb. 4.9 sind am Beispiel der BGLF-2-Mutante die Rekombinations- und Hygromycin-PCR (3.16.1.) mit DNA aus Kulturüberständen superinfizierter Raji-Zellen als Matrize dargestellt.

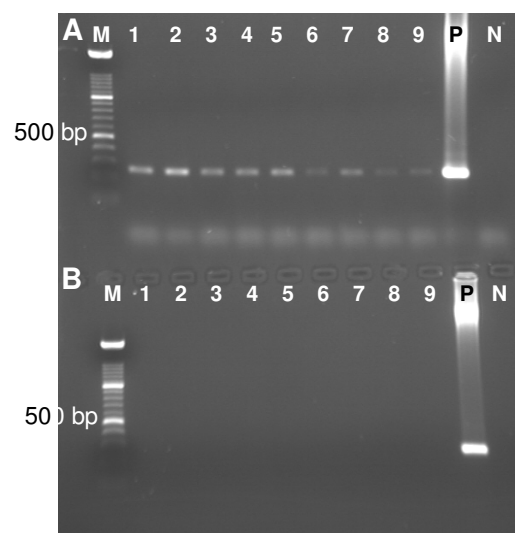


Abb. 4.9: Agarosegelelektrophorese von PCR-Produkten. A) Untersuchung von Kulturüberständen superinfizierter Raji-Zellen auf EBV-BGLF-2⁻-Mutanten (Rekombinations-PCR mit Tn-MP2 3'i Primern, 3.16.1.). B) Überprüfung von Kulturüberständen superinfizierter Raji-Zellen auf Kontaminationen mit Mutanten-Klonen (Hygromycin-PCR). M = 100 bp Marker, 1-9 = DNA aus Superinfektionsüberständen, P = Positivkontrolle, N = Negativkontrolle

Mit DNA aus allen Superinfektionsüberständen wurde das ca. 250 bp große Amplifikat der Rekombinations-PCR nachgewiesen. Da zusätzlich die Hygromycin-PCR in allen Proben negativ war, konnte die Kontamination mit Mutanten-Klonen ausgeschlossen werden. Die Überstände der Raji-Kulturen enthielten also EBV-BGLF-2⁻-Mutanten und konnten für weitere Infektionsversuche eingesetzt werden. Der Versuchsablauf zur Gewinnung von Mutanten-Virionen war erfolgreich.

Um eine möglichst hohe Transfektionseffizienz bzw. eine maximale Rekombinationseffizienz zu erzielen, sollte das Verhältnis von DNA zu *SuperFect*[®] bei der Transfektion optimiert werden. Es konnte jedoch kein reproduzierbares Optimum gefunden werden, so daß für jeden Transfektionsansatz unterschiedliche Verhältnisse von DNA zu *SuperFect*[®] eingesetzt wurden (3.6.1.).

Die DNA aus den Zellpellets der superinfizierten Raji-Zellen wurde auch auf ein singuläres Rekombinationsereignis zwischen den Mutanten-Klonen und den Wildtyp-Virionen mittels Southern Blot untersucht (4.2.). Hierbei wurde bei EBV-BGLF-5⁻- und EBV-BDLF-2⁻-Mutanten jeweils nur eine Bande nachgewiesen, die auf gleicher Höhe mit der entsprechenden Bande für den jeweiligen Mutanten-Klon lag. Dieses ist ein weiterer Beweis für eine einfache Rekombination.

4.4. Nachweis der Infektiosität von rekombinanten Virionen

Nach der Generierung durch homologe Rekombination und Selektion wurden die Mutanten-Virionen zur Charakterisierung ihres Phänotyps in Infektionsexperimente eingesetzt. Hierzu wurden B-Lymphozyten EBV-negativer Spender und Zellen der EBV-negativen B-Zell-Linie BJAB mit Mutanten-Virionen infiziert. Als Kontrolle dienten Wildtyp-EBV-infizierte und nicht-infizierte B-Lymphozyten bzw. BJAB-Zellen. Nach einer Inkubation von zwei bis sieben Tagen wurden die Mutantenphänotypen molekular- und zellbiologisch analysiert.

Der Nachweis einer Infektion mit Mutanten-EBV erfolgte durch die Rekombinations-PCR. Kontaminationen mit dem entsprechenden Mutanten-Klon wurden durch die Hygromycin-PCR ausgeschlossen. Wildtyp-EBV Kontaminationen wurden durch eine RT-PCR, in der das mutierte Gen der jeweiligen Mutante amplifiziert wurde, nachgewiesen (Ausschluß-PCR; 3.16.1.). Die Ausschluß-PCR war so angelegt, daß nur bei den Wildtyp-EBV-infizierten B-Zellen Amplifikate entstehen. Amplifikate in EBV-Mutanten-infizierten Zellen deuten auf eine Wildtyp-EBV Kontamination hin. Bei nicht-infizierten B-Zellen entsteht ebenfalls kein PCR-Produkt. In Abb. 4.10 sind die PCR-Ergebnisse für die EBV-BGLF-2⁻-Mutanten dargestellt.

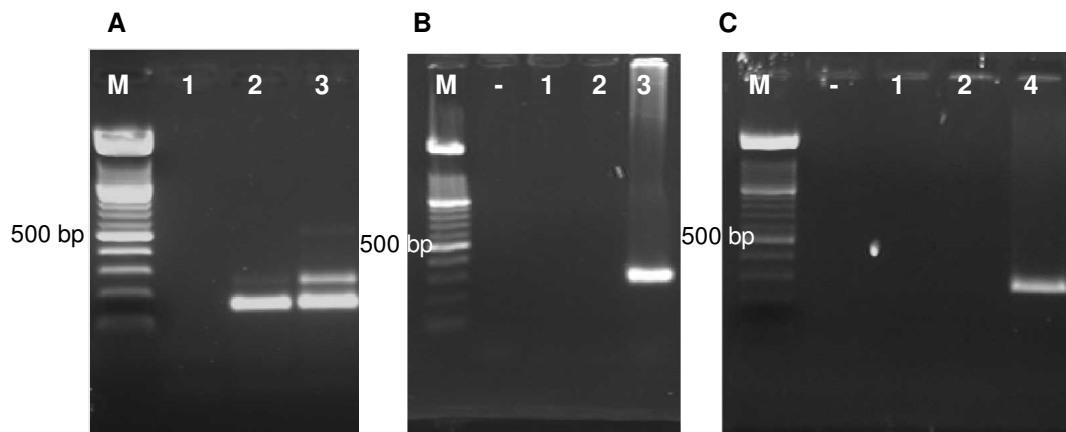


Abb. 4.10: Agarosegelelektrophorese von PCR-Produkten zum Nachweis von BGLF-2-Mutanten-Virionen (A), Ausschluß einer Mutanten-Klon-Kontamination (B) und Ausschluß von Wildtyp-EBV-Kontaminationen (C) in EBV-BGLF-2⁻ infizierten B-Lymphozyten. M = 100 bp Marker, 1 = Negativkontrolle, 2 = BGLF-2-Mutante, 3 = BGLF-2-Mutanten-Klon, 4 = Wildtyp-EBV-infizierte B-Lymphozyten

In Ansätzen mit EBV-BGLF-2⁻ infizierten B-Lymphozyten wurden Mutanten-Virionen nachgewiesen. Kontaminationen mit Mutanten-Klonen und Wildtyp-Virionen traten nicht auf. Daraufhin konnten die mit BGLF-2-Mutanten-infizierten B-Zellen weiter charakterisiert werden. Eine Infektion von B-Lymphozyten mit der BGLF-2-Mutante war nicht nachweisbar, da weder auf RNA- noch auf Proteinebene eine virale Genexpression meßbar war. Die BGLF-2⁻ Mutante ist offensichtlich nicht mehr in der Lage, B-Lymphozyten zu infizieren. Es wurden daher in dieser Arbeit nur noch die BGLF-5- und die BDLF-2-Mutanten näher charakterisiert, für die eine erfolgreiche Infektion nachgewiesen wurde (4.5., 4.7.).

4.5. Charakterisierung der EBV-BGLF-5⁻-Mutante

Nachdem EBV-BGLF-5⁻ Virionen geschaffen und selektioniert worden waren (4.2.), wurde ihre Infektiosität für B-Lymphozyten EBV-negativer Spender und BJAB-Zellen bestimmt und ihr Phänotyp charakterisiert. Zur Kontrolle dienten mit Wildtyp-EBV-infizierte und nicht-infizierte B-Lymphozyten bzw. BJAB-Zellen.

In Abb. 4.11 ist der Nachweis von EBV-BGLF-5⁻ in infizierten B-Lymphozyten sowie der Ausschluß einer Kontamination mit dem Mutanten-Klon und Wildtyp-EBV analog zu 4.4. dargestellt.

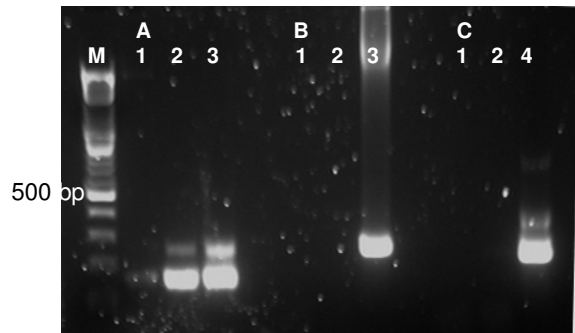


Abb. 4.11: Agarosegelelektrophorese von PCR-Produkten zum Nachweis von BGLF-5-Mutanten-Virionen (A), Ausschuß einer Mutanten-Klon-Kontamination (B), Ausschuß von Wildtyp-Kontaminationen (C) in EBV-BGLF-5⁻ infizierten B-Lymphozyten. M = 100 bp-Marker, 1 = Negativkontrolle, 2 = BGLF-5-Mutante, 3 = Positivkontrolle, 4 = mit Wildtyp-EBV-infizierte B-Lymphozyten

In EBV-BGLF-5⁻ infizierten B-Lymphozyten wurden Mutanten-Virionen nachgewiesen. Kontaminationen mit dem BGLF-5-Mutanten-Klon und Wildtyp-Virionen traten nicht auf. Es folgte der Nachweis viraler Genexpression auf Transkript- und Proteinebene. Weiterhin wurden die infizierten Zellen morphologisch untersucht und ihre Oberflächenproteine analysiert und mit Wildtyp-EBV-infizierten Zellen verglichen. Zusätzlich wurde die Expressionskinetik der EBV-DNase nach der Infektion vom BJAB-Zellen mit Wildtyp-EBV untersucht.

4.5.1. Nachweis viraler Genexpression auf Transkriptebeine

Mittels *nested* RT-PCR (3.14.) wurden in EBV-BGLF-5⁻ infizierten B-Lymphozyten die Genprodukte BZLF-1, BRLF-1, BMRF-1 und BHRF-1, deren Expression typisch für den lytischen Zyklus des EBV ist sowie die Produkte der viralen Latenz LMP-1 und -2, EBNA-1 (Latenz I und II, Latenz III), -2 und -3 A-C untersucht (Abb. 4.12-4.14).

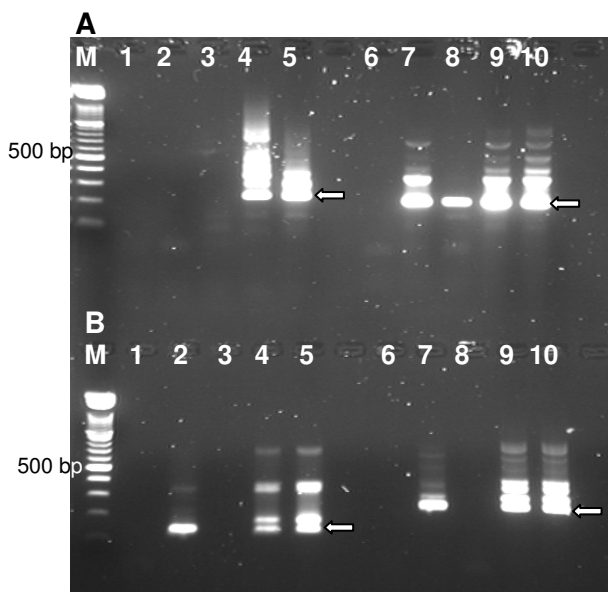


Abb. 4.12: Agarosegelelektrophorese von PCR-Produkten. A) Nachweis der Expression von BZLF-1 (229 bp (1-5)) und BRLF-1 (205 bp (6-10)) in EBV-BGLF-5⁻ und Wildtyp-EBV-infizierten B-Lymphozyten sowie in nicht-infizierten B-Lymphozyten. B) Nachweis der Expression von BMRF-1 (137 bp(1-5)) und BHRF-1 (247 bp (6-10)) in EBV-BGLF-5⁻ und Wildtyp-EBV-infizierten B-Lymphozyten sowie in nicht-infizierten B-Lymphozyten. M = 100 bp-Marker, 1 und 6 = nicht-infizierte B-Lymphozyten, 2 und 7 = BGLF-5-Mutante 2 Tage nach der Infektion, 3 und 8 = BGLF-5-Mutante 7 Tage nach der Infektion, 4 und 9 = Wildtyp 2 Tage nach der Infektion, 5 und 10 = Wildtyp 7 Tage nach der Infektion; Pfeile markieren die entsprechenden Fragmente

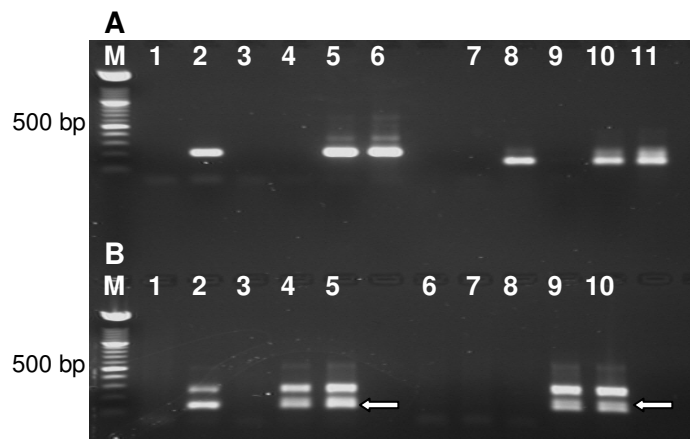


Abb. 4.13: Agarosegelelektrophorese von PCR-Produkten. A) Nachweis der Expression von LMP-1 (218 bp (1-6)) und LMP-2 (153 bp (7-11)) in EBV-BGLF-5⁻ und Wildtyp-EBV-infizierten B-Lymphozyten sowie in nicht-infizierten B-Lymphozyten. B) Nachweis der Expression von EBNA-1 Latenz I und II (143 bp (1-5)), EBNA-1 Latenz III (143 bp (6-10)) in EBV-BGLF-5⁻ und Wildtyp-EBV-infizierten B-Lymphozyten sowie in nicht-infizierten B-Lymphozyten. M = 100 bp-Marker, 1 und 6 = nicht-infizierte B-Lymphozyten, 2 und 7 = BGLF-5-Mutante 2 Tage nach Infektion, 3 und 8 = BGLF-5-Mutante 7 Tage nach Infektion, 4 und 9 = Wildtyp 2 Tage nach Infektion, 5 und 10 = Wildtyp 7 Tage nach Infektion; Pfeile markieren die entsprechenden Fragmente

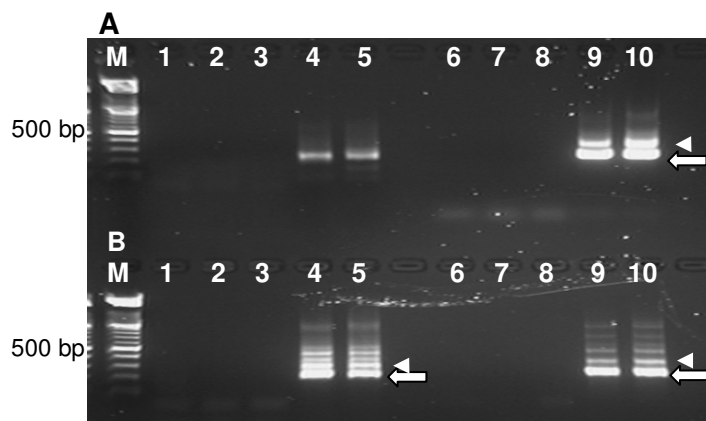


Abb. 4.14: Agarosegelelektrophorese von PCR-Produkten. A) Nachweis der Expression von EBNA-2 (eigentlich 351 bp (1-5)) und EBNA-3A (291 bp (6-10)) in EBV-BGLF-5⁻ und Wildtyp-EBV-infizierten B-Lymphozyten sowie in nicht-infizierten B-Lymphozyten. B) Nachweis der Expression von EBNA-3B (224 bp (1-5)) und EBNA-3C (260 bp (6-10)) in EBV-BGLF-5⁻ und Wildtyp-EBV-infizierten B-Lymphozyten sowie in nicht-infizierten B-Lymphozyten. M = 100 bp-Marker, 1 und 6 = nicht-infizierte B-Lymphozyten, 2 und 7 = BGLF-5-Mutante 2 Tage nach Infektion, 3 und 8 = BGLF-5-Mutante 7 Tage nach Infektion, 4 und 9 = Wildtyp 2 Tage nach Infektion, 5 und 10 = Wildtyp 7 Tage nach Infektion; Pfeile markieren die entsprechenden Fragmente, Pfeilspitzen markieren ungespleißte Fragmente

Im Vergleich zu Wildtyp-EBV-infizierten B-Lymphozyten sind die EBV-BGLF-5⁻-infizierte B-Zellen nicht mehr fähig alle untersuchten viralen Gene zu exprimieren. Die Expression von BRLF-1 wurde nach 2 und nach 7 Tagen nachgewiesen. Dagegen wurde die Expression von BMRF-1, BHRF-1, LMP-1, LMP-2 und EBNA-1 (Latenz I und II) nur bis zu 2 Tagen

nach der Infektion nachgewiesen. Nach 7 Tagen war keine Expression mehr feststellbar. Die Genexpression von BZLF-1, EBNA-2 und EBNA-3 A-C wurde weder nach 2 noch nach 7 Tagen nachgewiesen. In Folgeversuchen wurde die Expression von BZLF-1 mittels *Real-time* PCR 24 Stunden nach der Infektion von B-Lymphozyten mit der BGLF-5-Mutante nachgewiesen, jedoch zu keinem anderen Zeitpunkt nach der Infektion (1 h, 2 h und 4 h; nicht dargestellt). In nicht-infizierten B-Zellen wurde wie erwartet keine virale Genexpression nachgewiesen.

Neben B-Lymphozyten wurden auch Zellen der Zell-Linie BJAB mit EBV-BGLF-5⁻ und Wildtyp-EBV infiziert. Als Kontrolle dienten nicht-infizierte BJAB-Zellen.

Hier kam es allerdings zu einem abweichenden viralen Genexpressionsmuster. Nach der Infektion von BJAB-Zellen mit BGLF-5-Mutanten war die virale Genexpression auf BRLF-1 beschränkt. Andere lytische Gene oder latente Gene wurden nicht exprimiert. Die Wildtyp-EBV-infizierten BJAB-Zellen wiesen das gleiche virale Genexpressionsmuster auf wie Wildtyp-EBV-infizierte B-Lymphozyten, während wie erwartet in nicht-infizierten BJAB-Zellen keine viral exprimierten Gene nachgewiesen wurden.

Zusammenfassend sind die Ergebnisse der viralen Expression auf Transkriptebeine in Tab. 4.4 und 4.5 dargestellt.

Tab. 4.4: Expression von lytischen viralen Genen in Wildtyp-EBV und EBV-BGLF-5⁻ infizierten B-Lymphozyten und BJAB-Zellen

	Zeit nach Infektion [Tage]	BHRF-1	BMRF-1	BRLF-1	BZLF-1
B-Zellen mit Wildtyp	2	+	+	+	+
	7	+	+	+	+
B-Zellen mit BGLF-5-Mutante	2	+	+	+	-
	7	-	-	+	-
BJAB-Zellen mit Wildtyp	2	+	+	+	+
	7	+	+	+	+
BJAB-Zellen mit BGLF-5-Mutante	2	-	-	+	-
	7	-	-	+	-

Tab. 4.5: Expression von latenten viralen Genen in mit Wildtyp und BGLF-5-Mutanten-infizierten B-Lymphozyten und BJAB-Zellen

	Zeit nach Infek- tion [Tage]	LMP-1	LMP2	EBNA-1 (Latenz I und II)	EBNA-1 (Latenz III)	EBNA-2	EBNA- 3A	EBNA- 3B	EBNA- 3C
B-Zellen mit Wildtyp	2	+	+	+	+	+	+	+	+
	7	+	+	+	+	+	+	+	+
B-Zellen mit BGLF-5- Mutante	2	+	+	+	-	-	-	-	-
	7	-	-	-	-	-	-	-	-
BJAB- Zellen mit Wildtyp	2	+	+	+	+	+	+	+	+
	7	+	+	+	+	+	+	+	+
BJAB- Zellen mit BGLF-5- Mutanten	2	-	-	-	-	-	-	-	-
	7	-	-	-	-	-	-	-	-

Bei den PCR Ergebnissen (Abb. 4.14) fällt auf, daß die Amplifikate für EBNA-2 um ca. 100 bp kleiner sind als die mit 351 bp erwartete Größe (Tab. 2.14). Um herauszufinden, ob in dem hier verwendeten EBV der Zell-Linie B95-8 eine Mutation im EBNA-2 Gen vorliegt, wurde dieses im folgenden untersucht (4.5.2.).

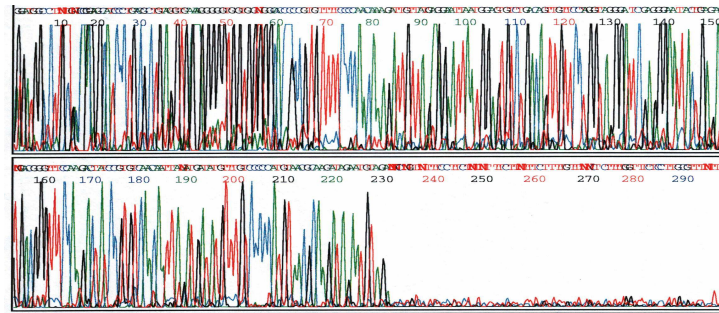
Beim Nachweis von EBNA-3A, -3B und 3C (Abb. 4.14) waren unterschiedlich große Amplifikate entstanden: EBNA-3A 358 bp und 291 bp, EBNA-3B 302 bp und 224 bp, EBNA-3C 334 bp und 260 bp. Neben den erwarteten, gespleißten sind auch die größeren ungepleißten Fragmente nachweisbar. Dieses von KIENZLE ET AL. (1999) beschriebene Phänomen der Intron-Retention war auch bei der Charakterisierung der BDLF-2-Mutante zu beobachten (4.7.1.).

Bevor die Genexpression auf Proteinebene in EBV-BGLF-5⁻ infizierten B-Lymphozyten beschrieben wird, soll erst auf die Untersuchung der EBNA-2 Sequenz eingegangen werden.

4.5.2. Sequenzierung des EBNA-2 Gens

Das Amplifikationsprodukt des EBNA-2 Gens (3.16.1) war kleiner als erwartet. Nach Aufreinigung mit dem *QIAEX2* Kit (Qiagen) wurde es mit den Primern (EBNA-2 3'i und EBNA-2

5'i; 2.4.) für die innerer PCR sequenziert. Das Ergebnis der Sequenzierung wurde mit Hilfe des Blast-Programms und der EMBL-DNA-Datenbank ausgewertet (Abb. 4.15 und 4.16).

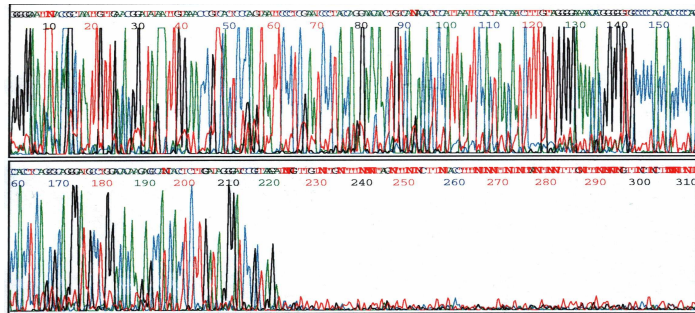


```
>gi|59074|emb|V01555.1|EBV   Epstein-Barr virus (EBV) genome, strain B95-8
      Length = 172281
      Score = 321 bits (162), Expect = 7e-85
      Identities = 179/182 (98%), Gaps = 2/182 (1%)
      Strand = Plus / Minus
Query: 49      gtggtgggggcacccccgtgttttccccaacaagattgttatgaggaattaatggagtg 108
            |||
Sbjct: 48687  gtggtgggggcacccccgtgttttccccaacaagattgtta-gtgggaattaatggagtg 48629

Query: 109     tctgacagttgttcctaggtagggttcgaggggaattactgagagtgacgggtttccaag 168
            |||
Sbjct: 48628  tctgacagttgttcct-ggtagggttcgaggggaattactgagagtgacgggtttccaag 48570

Query: 169     actatccgtgtcaacaattagatgatatgtttgtcccccataacgcaagatagaatgt 228
            |||
Sbjct: 48569  actatccgtgtcaacaattagatgatatgtttgtcccccataacgcaagatagaatgt 48510
```

Abb. 4.15: Sequenzierung des EBNA-2 Amplifikats mit dem EBNA-2 3'i Primer. oben: Ausschnitt aus dem Chromatogramm, unten: Nukleotidsequenzvergleich mit Sequenzen aus der EMBL-Datenbank



```
>gi|59074|emb|V01555.1|EBV   Epstein-Barr virus (EBV) genome, strain B95-8
      Length = 172281
      Score = 200 bits (101), Expect = 2e-48
      Identities = 116/120 (96%), Gaps = 1/120 (0%)
      Strand = Plus / Plus
Query: 44      ccgtcactcccagtaattccctcgaatccctaccaggaacaactgtcanacactccatta 103
            |||
Sbjct: 48579  ccgtcactctcagtaattccctcgaatccctaccaggaacaactgtcagacactccatta 48638

Query: 104     attccactaacaatctttgttaggggaaacacgggggtgccccaccacccccaccacc 163
            |||
Sbjct: 48639  attccactaacaatctttgtt-ggggaaacacgggggtgccccaccactccaccacc 48697
```

```

Score = 131 bits (66), Expect = 1e-27
Identities = 75/77 (97%), Gaps = 1/77 (1%)
Strand = Plus / Plus
Query: 143  gccccaccacccccaccacctcagcgagggatgcctggacacaagagccancacctct 202
          |||
Sbjct: 48782 gccccaccacccccaccacctcagcgagggatgcctggacacaagagccatcacctct 48841

Query: 203  tggatagggatccgcta 219
          | |||
Sbjct: 48842 t-gatagggatccgcta 48857

Score = 44.1 bits (22), Expect = 0.23
Identities = 22/22 (100%)
Strand = Plus / Plus
Query: 144  cccccaccacccccaccacctc 165
          |||
Sbjct: 48738 cccccaccacccccaccacctc 48759

Score = 40.1 bits (20), Expect = 3.6
Identities = 20/20 (100%)
Strand = Plus / Plus
Query: 144  cccccaccacccccaccacc 163
          |||
Sbjct: 48720 cccccaccacccccaccacc 48739

Score = 40.1 bits (20), Expect = 3.6
Identities = 20/20 (100%)
Strand = Plus / Plus
Query: 144  cccccaccacccccaccacc 163
          |||
Sbjct: 48729 cccccaccacccccaccacc 48748

Score = 40.1 bits (20), Expect = 3.6
Identities = 20/20 (100%)
Strand = Plus / Plus
Query: 144  cccccaccacccccaccacc 163
          |||
Sbjct: 48711 cccccaccacccccaccacc 48730

```

Abb. 4.16: Sequenzierung des EBNA-2 Amplifikats mit dem EBNA-2 5'i Primer. oben: Ausschnitt aus dem Chromatogramm, unten: Nukleotidsequenzvergleich mit Sequenzen aus der EMBL-Datenbank

Es stellte sich heraus, daß bei dem EBV-Stamm aus der hier verwendeten Zell-Linie B95-8 Deletionen in den Wiederholungssequenzen des EBNA-2 Gens vorliegen. Der Sequenzvergleich erfolgte mit dem Programm Blast und die Auswertung wurde anhand einer von BAER ET AL. (1984) veröffentlichten Sequenzanalyse des EBV in der EMBL-Datenbank durchgeführt. Betrachtet man die Lokalisation des 3' Primers (48840), subtrahiert die nicht erkannten Nukleotide (49 bp) sowie die ca. 20 bp hinter dem Primer, die in der Regel nicht mit sequenziert werden und berechnet dann die Differenz zum ersten erkannten Nukleotid (48687), erhält man eine Deletion von 84 bp. Dieses Ergebnis wird durch die Sequenzierung mit dem 5' Primer bestätigt. Mit diesem Primer erfolgt die Sequenzierung bis in Bereiche von Sequenzwiederholungen. Bei den letzten vier aufgelisteten Sequenzvergleichen wird immer das gleiche Fragment mit unterschiedlichen Bereichen der DNA-Datenbank verglichen. Dieses Fragment ist 100 % homolog zu Sequenzwiederholungen in verschiedenen Bereichen des EBNA-2 Gens. Dementsprechend müssen Deletionen im Bereich der Sequenzwiederholungen im kodierenden Abschnitt des EBNA-2 Gens vorliegen. In wie fern sich die Deletion auf weitere Funktionen der Virionen auswirkt, wurde nicht untersucht.

4.5.3. Nachweis viraler Genexpression auf Proteinebene

Der Nachweis viraler Genexpression in EBV-BGLF-5⁻ und Wildtyp-EBV-infizierten B-Lymphozyten auf Proteinebene, wurde mittels Immunfluoreszenztest (IFT; 3.19.) durchgeführt.

Es wurden die viralen Proteine Early Antigen D (EA-D, kodiert durch BMRF-1) und LMP-1 nachgewiesen. Als Kontrolle dienten nicht-infizierte B-Zellen. In Abb. 4.17 und 4.18. sind die Ergebnisse der IFT dargestellt.

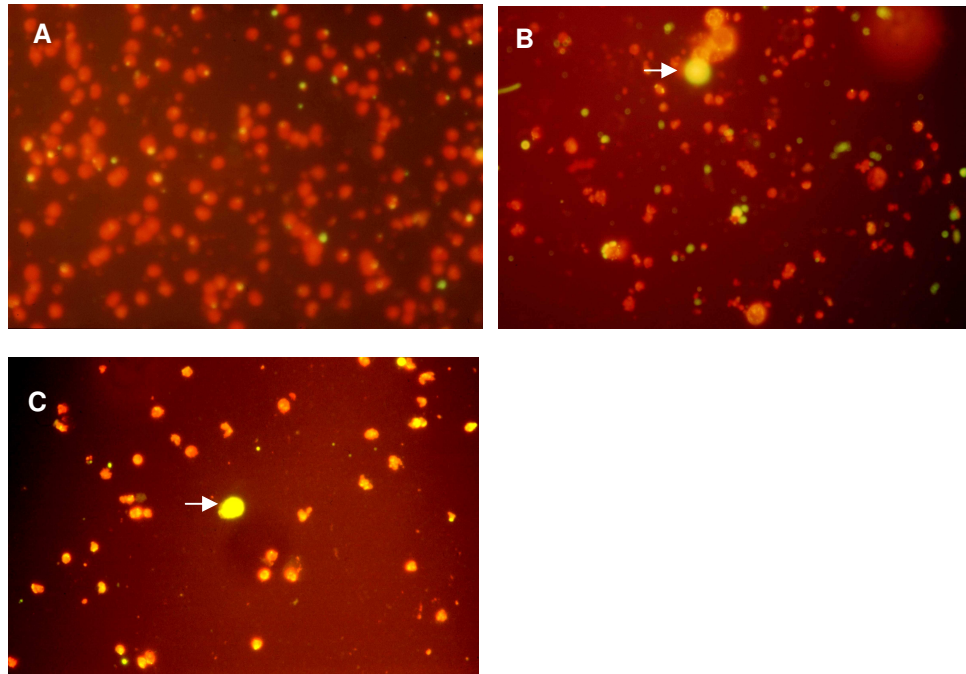


Abb. 4.17: IFT zum Nachweis von EA-D in EBV-BGLF-5⁻ und Wildtyp-EBV-infizierten B-Lymphozyten sowie in nicht-infizierten B-Zellen 3 Tage nach der Infektion in 400-facher Vergrößerung. A: nicht-infizierte B-Lymphozyten, B: Wildtyp-EBV-infizierte B-Lymphozyten, C: EBV-BGLF-5⁻ infizierte B-Lymphozyten; Pfeile markieren positive Zellen

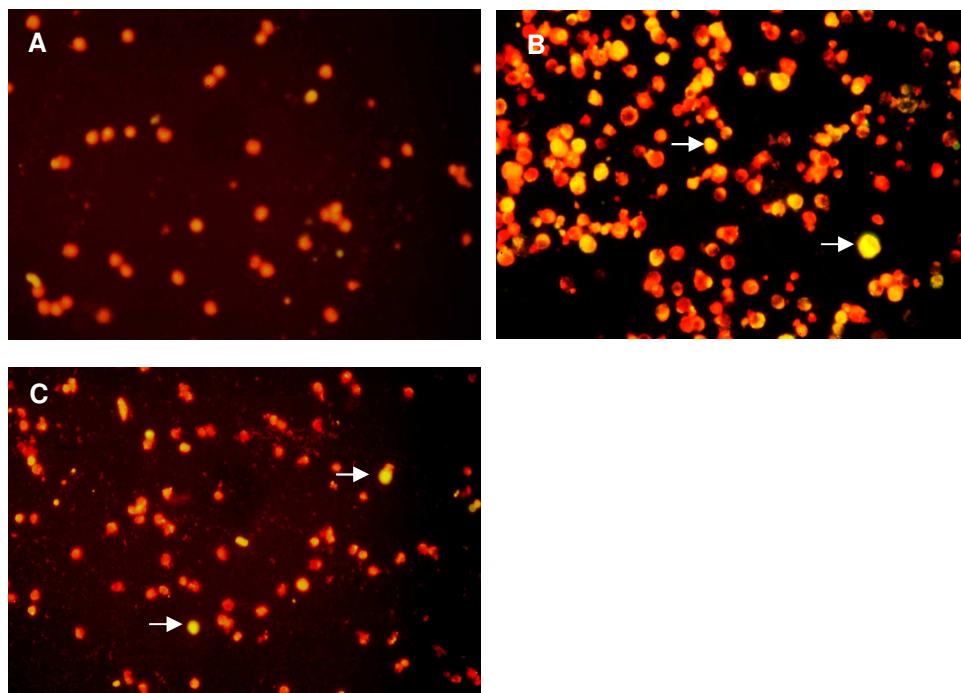


Abb. 4.18: IFT zum Nachweis von LMP-1 in EBV-BGLF-5⁻ und Wildtyp-EBV-infizierten B-Lymphozyten sowie in nicht-infizierten B-Zellen 3 Tage nach der Infektion in 400-facher Vergrößerung. A: nicht-infizierte B-Lymphozyten, B: Wildtyp-EBV-infizierte B-Lymphozyten, C: EBV-BGLF-5⁻ infizierte B-Lymphozyten; Pfeile markieren positive Zellen

Die viralen Proteine EA-D und LMP-1 wurden sowohl nach Wildtyp-Infektion als auch nach Infektion mit BGLF-5-Mutanten nachgewiesen. Somit ist bewiesen, daß nicht nur virale mRNA, sondern auch virale Proteine nach der Infektion mit BGLF-5-Mutanten-Virionen gebildet werden. Nicht-infizierten B-Zellen zeigen keine spezifische Fluoreszenz.

Nach der Infektion von BJAB-Zellen mit BGLF-5-Mutanten und Wildtyp-EBV wurde ebenfalls der Nachweis von EA-D und LMP-1 mittels IFT durchgeführt. Mit EBV-BGLF-5⁻ infizierten BJAB-Zellen zeigten keine Fluoreszenz. Aber auch Wildtyp-EBV-infizierte BJAB-Zellen waren im IFT negativ, obwohl hier Transkripte aller untersuchten viralen Gene nachgewiesen wurden. Dieses Phänomen wurde im weiteren Verlauf der Arbeit untersucht (4.9.).

4.5.4. Morphologie infizierter B-Lymphozyten

Nach der Infektion von B-Lymphozyten EBV-negativer Spender mit EBV-BGLF-5⁻ wurde die Morphologie dieser Zellen mit der von Wildtyp-EBV-infizierten und nicht-infizierten B-Zellen verglichen (Abb. 4.19).

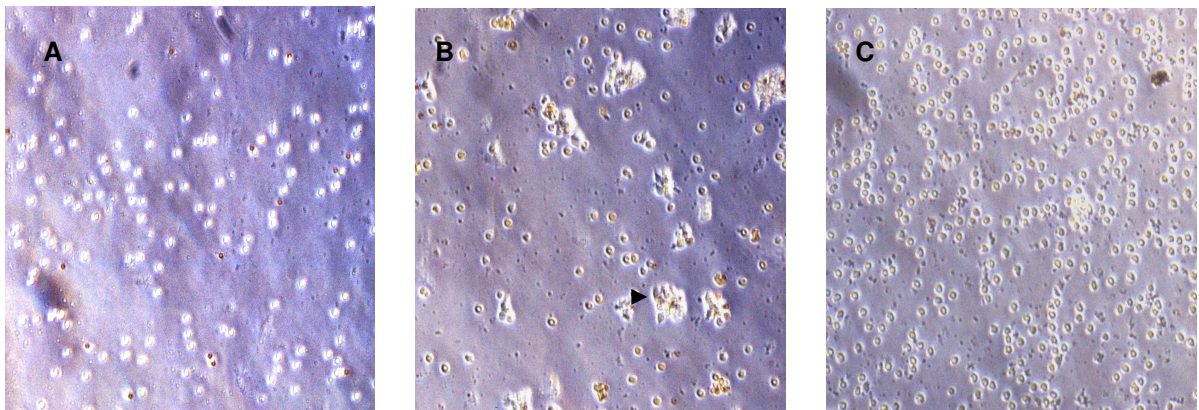


Abb. 4.19: Vergleich von A: nicht-infizierten B-Lymphozyten, B: Wildtyp-EBV-infizierten B-Lymphozyten mit Zellaggregaten (Pfeil) und C: EBV-BGLF-5⁻ infizierten B-Lymphozyten 3 Tage nach der Infektion (200-fache Vergrößerung).

Die EBV-BGLF-5⁻ infizierten B-Zellen verhalten sich morphologisch wie nicht-infizierten B-Zellen. Sie bilden im Gegensatz zu Wildtyp-EBV-infizierten B-Lymphozyten keine Zellaggregate und sterben nach ca. 14 Tagen ab. Eine Expression des Haushaltsgens GAPDH kann zu diesem Zeitpunkt nicht mehr nachgewiesen werden.

4.5.5. Nachweis der Expression relevanter Oberflächenantigene

EBV-BGLF-5⁻ infizierte B-Zellen gleichen morphologisch nicht-infizierten B-Zellen. Die Analyse von Größe und Granularität der Zellen sowie die Adhäsionsmoleküle CD11a, CD54, CD58 und B-Lymphozyten Aktivierungsmarker CD23, CD30, CD40 und CD44 (Tab. 3.2), die typischerweise nach einer EBV-Infektion von B-Zellen verstärkt exprimiert werden, erfolgte mittels FACS.

In Abb. 4.20 sind Größe und Granularität der B-Zellen nach der Infektion mit der BGLF-5-Mutante und Wildtyp-EBV sowie nicht-infizierte B-Zellen in DotPlots dargestellt.

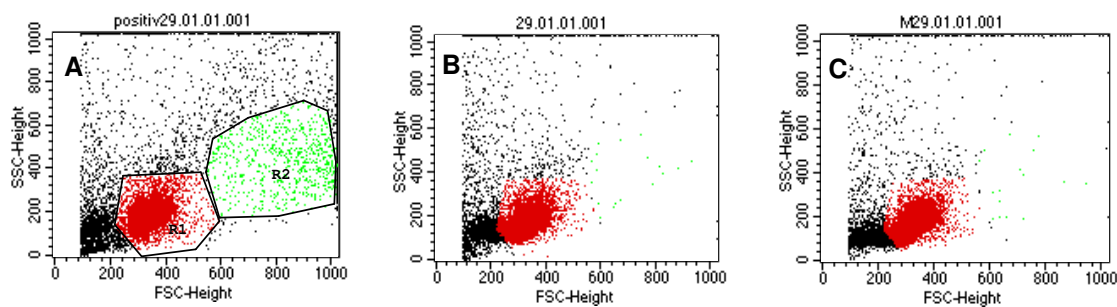


Abb. 4.20: FACS-Analyse von Wildtyp-EBV und EBV-BGLF-5⁻ infizierten B-Lymphozyten sowie nicht-infizierten B-Lymphozyten in der DotPlot Darstellung. A = Wildtyp-EBV-infizierte B-Lymphozyten, B = nicht-infizierte B-Lymphozyten, C = EBV-BGLF-5⁻ infizierte B-Lymphozyten; FSC = Größe der Zellen, SSC = Granularität, rot = nicht-infizierte Zellen, grün = Wildtyp-EBV-infizierte B-Zellen

Bei den Wildtyp-EBV-infizierten B-Zellen (4.20 A) sind zwei Subpopulationen zu erkennen. Subpopulation R1 besteht aus kleinen und wenig granulierten Zellen, die nicht-infizierten Zellen (4.20 B) entsprechen. Die infizierten Zellen (Subpopulation R2) sind größer und stärker granuliert. Mit BGLF-5-Mutanten-infizierte Zellen (4.20 C) entsprechen in ihrer Morphologie nicht-infizierten Zellen.

In Abb. 4.21 ist die Analyse der Zellmembranantigene in HistogrammPlots dargestellt.

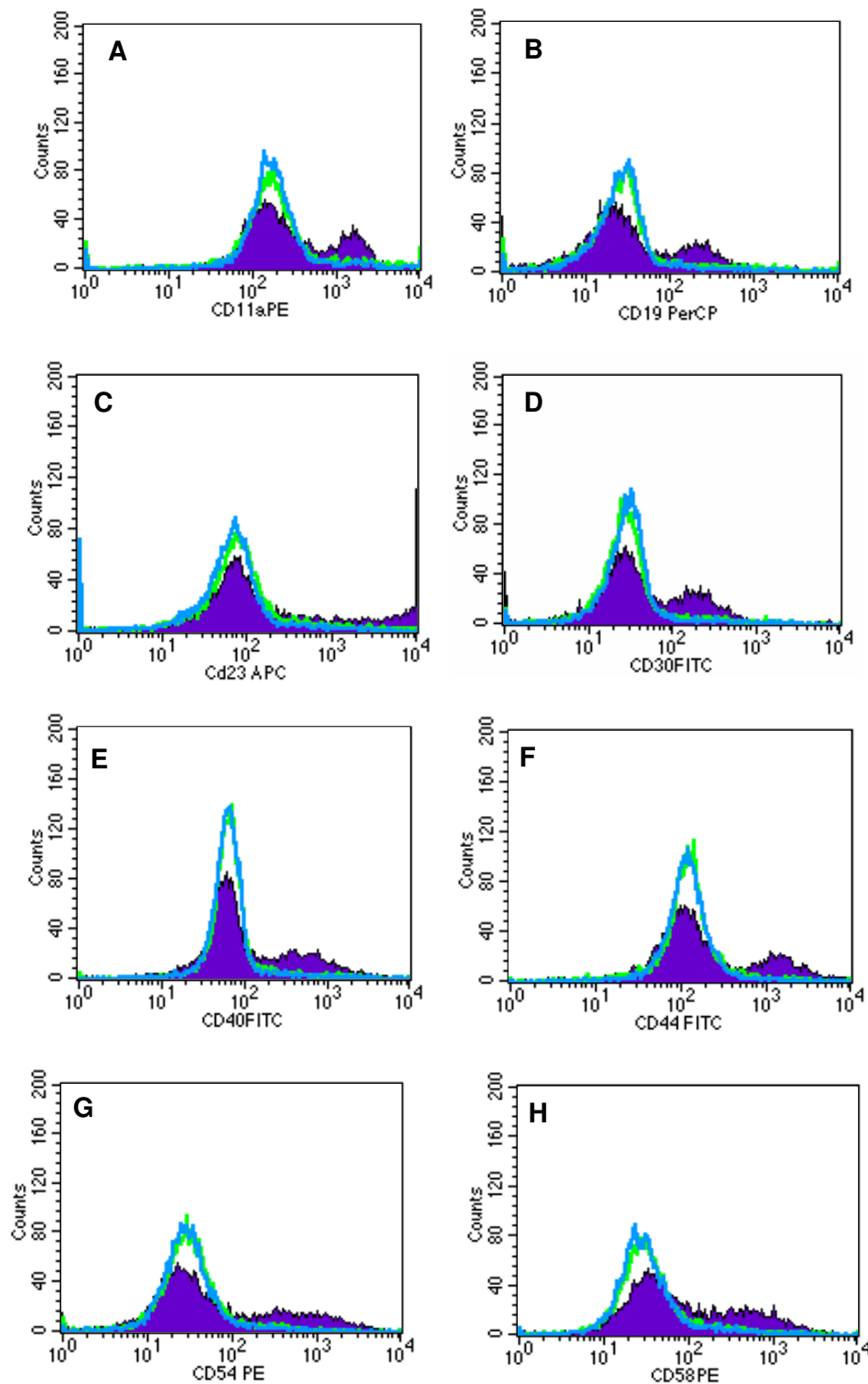


Abb. 4.21: FACS-Analyse von Oberflächenproteinen in Wildtyp-EBV und EBV-BGLF-5⁻ infizierten B-Lymphozyten sowie nicht-infizierten B-Lymphozyten im HistogrammPlot. A = CD11a PE, B = CD19 PerCP, C = CD23 APC, D = CD30 FITC, E = CD40 FITC, F = CD44 FITC, G = CD54 PE, H = CD58 PE; violett: Wildtyp-EBV-infizierte B-Zellen, grün: nicht-infizierte B-Zellen, blau: EBV-BGLF-5⁻ infizierte B-Zellen; die X-Achse gibt die Fluoreszenzintensität an, die Y-Achse die Zellzahl

Beim Nachweis der Oberflächenproteine in Wildtyp-EBV-infizierten B-Lymphozyten sind zwei Subpopulationen erkennbar. Die Population mit der größeren Fluoreszenzintensität re-

präsentiert die infizierten Zellen. Die Oberflächenproteinexpression in BGLF-5-Mutanten-infizierten B-Zellen ist mit der von nicht-infizierten B-Lymphozyten identisch. Beide weisen keine zweite Subpopulation auf und exprimieren somit auch nicht vermehrt Oberflächenproteine wie Wildtyp-EBV-infizierte B-Zellen. Das Expressionsmuster der Oberflächenantigene spiegelt die Morphologie der B-Zellen wieder. Nicht-infizierte B-Zellen und EBV-BGLF-5-infizierte B-Zellen bilden keine Zellaggregate, proliferieren nicht und exprimieren nicht vermehrt die hier untersuchten Oberflächenproteine. Wildtyp-EBV-infizierte B-Zellen bilden Zellaggregate, proliferieren und exprimieren vermehrt Oberflächenantigene, die typisch für eine EBV-Infektion von B-Zellen sind.

4.5.6. Expressionskinetik des BGLF-5 Gens in Wildtyp-EBV-infizierten BJAB-Zellen

Das Expressionsverhalten des BGLF-5 Gens (EBV-DNase) wurde im Reversen Northern Blot und mittels *Realtime* PCR charakterisiert. Die Proben wurden 1, 2, 4, 8, 19, 28, 48 und 168 Stunden nach der Infektion von BJAB-Zellen mit Wildtyp-EBV entnommen.

4.5.6.1. Nachweis der Expression von BGLF-5 durch Reversen Northern Blot

Für den Reversen Northern Blot wurden je 5 µg aus mRNA amplifizierte cDNA (3.22.) eingesetzt und die Expression des BGLF-5 Gens mit einer spezifischen DIG-markierten Sonde (DNase-Sonde) untersucht (Abb. 4.22). Als Vergleich wurde die Expression des Haushaltsgens GAPDH mit einer DIG-markierten Sonde, die mit GAPDH hybridisiert (GAPDH-Sonde), analysiert (Abb. 4.23).

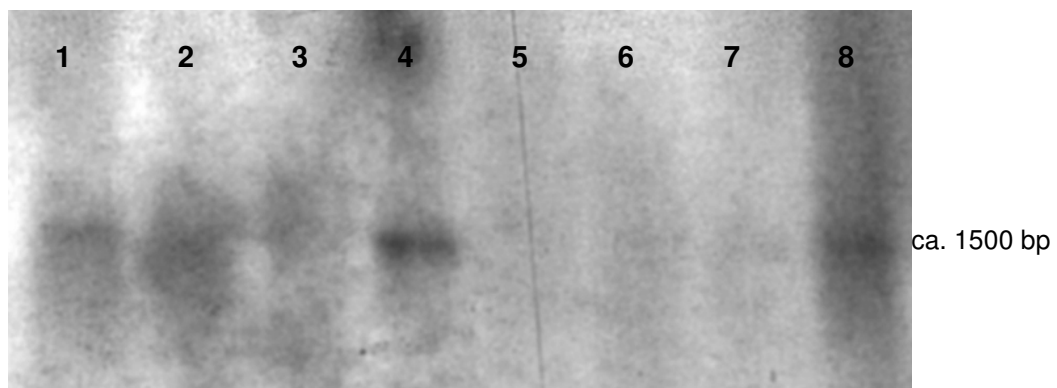


Abb. 4.22: Reverser Northern Blot zum Nachweis der BGLF-5-Expression in Wildtyp-EBV-infizierten BJAB-Zellen mit einer DIG-markierten EBV-DNase-Sonde. 1 = 1 h, 2 = 2 h, 3 = 4 h, 4 = 8 h, 5 = 19 h, 6 = 28 h, 7 = 48 h, 8 = 168 h nach der Infektion; Belichtungszeit 60 Minuten

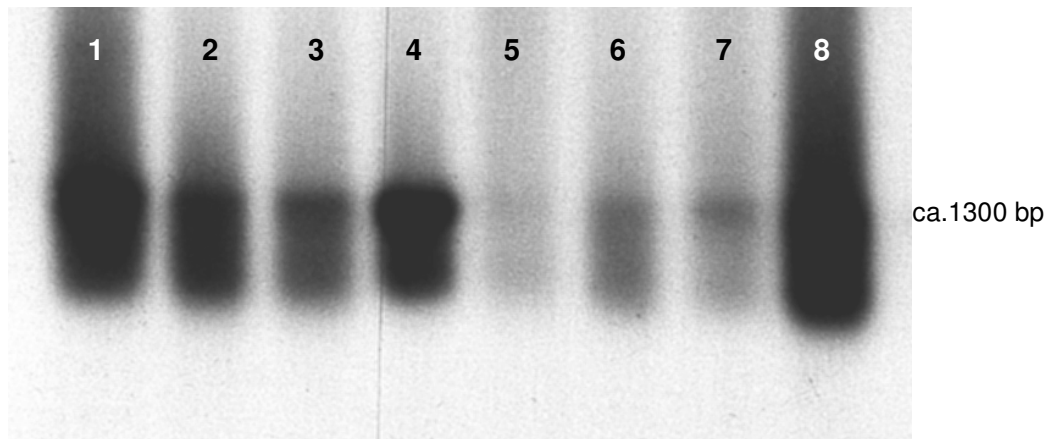


Abb. 4.23: Reverser Northern Blot zum Nachweis der GAPDH-Expression in Wildtyp-EBV-infizierten BJAB-Zellen mit einer DIG-markierten GAPDH-Sonde. 1 = 1 h, 2 = 2 h, 3 = 4 h, 4 = 8 h, 5 = 19 h, 6 = 28 h, 7 = 48 h, 8 = 168 h nach der Infektion; Belichtungszeit 10 Minuten

Die Expression der EBV-DNase wurde im Reversen Northern Blot nachgewiesen. Eine Quantifizierung war jedoch nicht möglich, da beim Nachweis von GAPDH die Bandenintensitäten unterschiedlich stark waren. Diese sollten bei GAPDH annähernd gleich intensiv sein, da jeweils 5 µg cDNA aufgetragen wurden und die Expression von GAPDH in den Zellen nicht stark variiert. Aufgrund dieser Intensitätsunterschiede von GAPDH konnten keine Rückschlüsse auf die Expressionsquantität der DNase im Reversen Northern Blot erfolgen.

Die Expression von BGLF-5 im Vergleich zu GAPDH wurde daraufhin mittels *Realtime* PCR untersucht.

4.5.6.2. Nachweis der Expression von BGLF-5 mittels *Realtime* PCR

Für den Nachweis der Expression von BGLF-5, BZLF-1, BGLF-1 und GAPDH wurden jeweils 2 µl cDNA (3.15.) in die *Realtime* PCR (3.16.2.) eingesetzt. Für die Quantifizierung wurde ein Vektor mit dem BGLF-5 Gen (pGlowDNase) (3.4), der Vektor pCMVZ (enthält die BZLF-1 Sequenz) [PRANG ET AL., 1995] bzw. Vektoren mit dem BRLF-1- (pHis-TOPO-BRLF-1) und GAPDH-PCR-Fragment (pHis-TOPO-GAPDH) (3.4) als Positivkontrolle eingesetzt.

In Abb. 4.24 ist exemplarisch der Verlauf der Fluoreszenzemissionen durch den Farbstoff LC Red640 während der Amplifikation des DNase-Produkts ausschnittsweise dargestellt.

Insgesamt wurde eine neunfache Bestimmung durchgeführt.

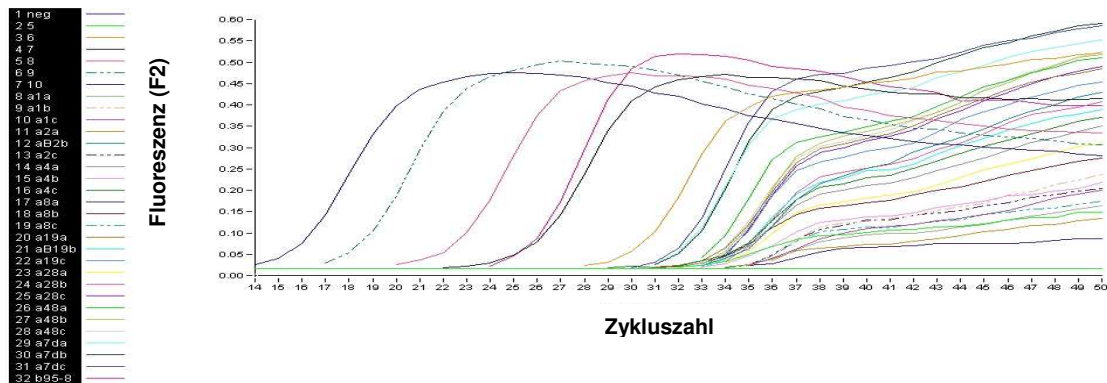


Abb. 4.24: *Realtime* PCR zur Analyse der Expression von BGLF-5 in Wildtyp-EBV-infizierten BJAB-Zellen. 1 = Negativkontrolle (Wasser), 2-7 = Standards, 8-31 = infizierte BJAB-Zellen, 32 = Positivkontrolle B95-8

Abhängig von der Menge der isolierten DNase-mRNA erfolgt der Fluoreszenzanstieg nach unterschiedlichen Zykluszahlen. Je früher der Anstieg erfolgte, desto mehr Ausgangsmaterial war vorhanden. Mit Hilfe der Software des *LightCyclers* wurden durch Vorgabe definierter Standards die Konzentrationen in den zu analysierenden Proben errechnet.

Zur Analyse der DNase-Expression wurden die vom *LightCycler* bestimmten Konzentrationen der DNase auf die von GAPDH normiert. Die Expressionsquotienten aus BGLF-5/GAPDH (BGLF-5 kodiert für die EBV-DNase) wurden für jede Versuchsreihe in relative Einheiten umgerechnet und dann die Mittelwerte aus den verschiedenen Ansätzen gebildet. Diese wurde mit den entsprechenden Quotienten der *immediate early* Gene BZLF-1 und BRLF-1 verglichen. In Tab. 4.5 und Abb. 4.25 sind die Expressionsmuster sowohl als relative Einheiten als auch graphisch dargestellt.

Tab. 4.5: Expressionsquotienten der DNase, BZLF-1 und BRLF-1 gegen GAPDH in rel. Einheiten. Grau unterlegte Zahlen markieren die ersten Expressionsmaxima

Zeit [h]	1	2	4	8	19	28	48	168
DNase/GAPDH	11,32	37,78	65,00	70,96	60,88	77,90	22,63	45,74
BZLF-1/GAPDH	16,94	80,59	42,13	50,7	24,39	24,46	31,5	29,49
BRLF-1/GAPDH	5,56	76,04	76,09	56,63	52,42	44,34	20,04	40,94

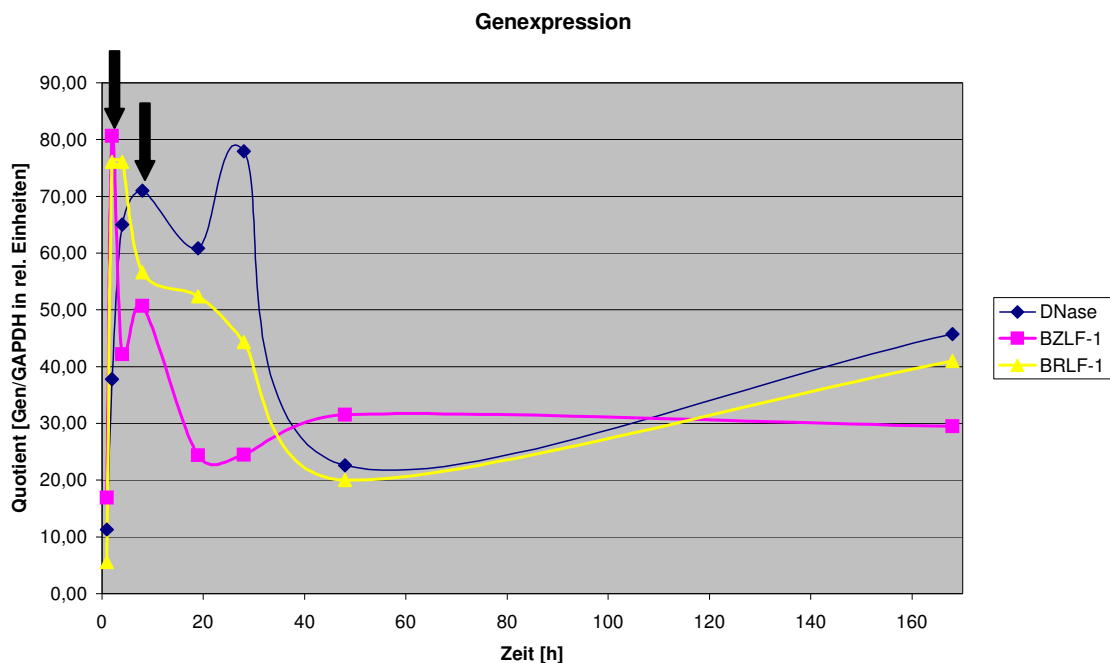


Abb. 4.25: Graphische Darstellung der Quotienten der Expression der DNase, BZLF-1 und BRLF-1 Wildtyp-EBV-infizierten BJAB-Zellen in relativen Einheiten. Schwarze Pfeile markieren die ersten Expressionsmaxima der untersuchten Gene

Bereits eine Stunde nach der Infektion von BJAB-Zellen mit Wildtyp-EBV wurden die Transkripte aller hier untersuchten Gene nachgewiesen werden. In Folgeversuchen wurde die Expression von BZLF-1 bereits 30 Minuten nach der Infektion festgestellt. Es zeigte sich, daß die Expression von BGLF-5 (DNase) nach ca. acht Stunden ihr Maximum erreichte und dann absank. Nach 48 Stunden erfolgte eine annähernd konstante Expression. BZLF-1 und BRLF-1 erreichten das Expressionsmaximum nach zwei Stunden. Dann erfolgte ein Abfall der Expression bis 48 Stunden nach der Infektion, worauf jeweils eine kontinuierliche Expression, ähnlich wie bei der DNase, erfolgte. Hier muß berücksichtigt werden, daß es sich um relative Einheiten aus Mittelwerten der einzelnen Ansätze handelt, um die Expressionsquotienten direkt miteinander vergleichen zu können. Vergleicht man die absoluten Werte, ist die Expression von BZLF-1 wesentlich stärker als die von BRLF-1 und BGLF-5. Letztere sind in der gleichen Größenordnung.

4.6. Reversion der Mutation im BGLF-5 Gen

Es sollte gezeigt werden, daß die Mutation im BGLF-5 Gen revertiert werden kann, um zu beweisen, daß der Phänotyp dieser Mutante nur auf das Fehlen der DNase zurückzuführen ist. Hierzu sollte der Verlust des Gens durch einen Vektor, der das offene Leseraster in-

klusive der Promotorregion aufweist, kompensiert werden (4.6.1.). Eine weitere Möglichkeit die Mutationen zu revertieren besteht in der Rekombination der mutierten Sequenz mit der Wildtypsequenz (4.6.2.).

4.6.1. Kompensation der BGLF-5- Mutation

Um die Mutation im BGLF-5 Gen zu kompensieren, mußte ein Vektor konstruiert werden, der das komplette Gen und die Promotorregion enthält. BJAB-Zellen wurden stabil mit diesem Vektor transfiziert. Nach Infektion der transfizierten Zellen mit Wildtyp-EBV wurde überprüft, ob das BGLF-5 Gen exprimiert wird. Im Vergleich zu Wildtyp-EBV-infizierten BJAB-Zellen wurde eine Überexpression in den infizierten, transfizierten BJAB-Zellen erwartet. Nach der Infektion der transfizierten Zellen mit EBV-BGLF-5⁻ sollte es dann zur Unterdrückung des Mutantenphänotyps kommen, so daß ein virales Genexpressionsmuster entsprechend dem in Wildtyp-EBV-infizierten Zellen nachweisbar wäre.

4.6.1.1. Konstruktion eines BGLF-5-Überexpressionsvektors

Es wurde ein Vektor (*pGlow-TOPO*) ausgewählt, dessen *multiple cloning site* kein Promotor vorgeschaltet war, so daß das inserierte BGLF-5 Gen nicht konstitutiv exprimiert werden konnte. Da jedoch dieses offene Leseraster nach der Infektion mit EBV-BGLF-5⁻ aktiviert werden sollte, wurde die Promotorregion von BGLF-5 mit in den Vektor kloniert.

Mittels DNase *Expand*-PCR (3.16.1) wurde das offene Leseraster des BGLF-5 Gens gemeinsam mit dem Bereich der potentiellen Promotorsequenz amplifiziert.

Das 3786 bp große Fragment von BGLF-5 wurde aus dem Gel isoliert und in den Vektor *pGlow-TOPO* ligiert (3.4.). *One Shot[®] Top 10 E. coli* wurden mit dem Ligationsprodukt transfiziert (3.5.). Nach einer Minipräparation (3.10.) wurden die Plasmide mit Hind III verdaut, um die Vektoren auf das gewünschte Insert zu überprüfen.

Alle untersuchten Klone zeigten nach dem Verdau die entsprechenden Fragmente von 3983 bp (EBV-Sequenz) und 5136 bp (Vektor *pGlow-TOPO*). Von einigen Klonen mit dem entsprechenden Bandenmuster wurden Maxi-plasmidpräparationen durchgeführt und die so erhaltenen Plasmide, die mit *pGlowDNase* bezeichnet wurden, wurden zur stabilen Transfektion von BJAB-Zellen verwendet.

4.6.1.2. Etablierung einer stabil mit pGlowDNase transfizierten Zell-Linie

BJAB-Zellen wurden mit dem unter 4.6.1.1. beschriebenen Vektor pGlowDNase transfiziert (3.6.2.) und daraus durch Selektion mittels G418 eine stabile Zell-Linie, im folgenden als BJAB-DNase bezeichnet, generiert.

Die Vektoren pGlowDNase wurden in den transfizierten Zellen einerseits über das Neomycinresistenzgen mittels PCR (3.16.2. Neomycin-PCR) nachgewiesen (Abb. 4.26), andererseits durch *in situ* Hybridisierung (3.23.) mit spezifischen DIG-markierten Sonden (3.16.2.) gegen das BGLF-5 Gen (Abb. 4.27).

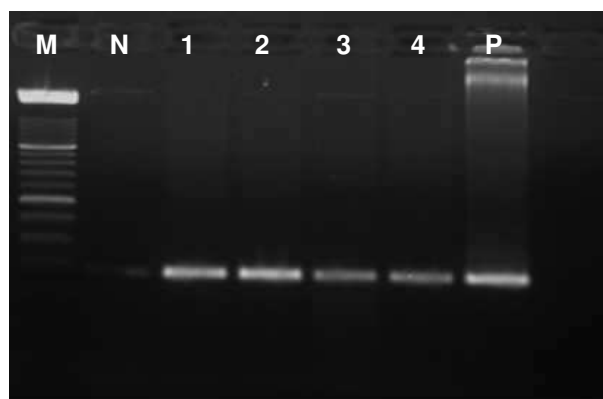


Abb. 4.26: Agarosegelelektrophorese der PCR-Produkte des Neomycinresistenzgens zum Nachweis von pGlowDNase in BJAB-DNase Zellen. M = 100 bp Marker, N = Negativkontrolle, 1-4 = BJAB-DNase Zellen, P = Positivkontrolle

In allen BJAB-DNase Zellen konnte das Amplifikat der Neomycin-PCR nachgewiesen werden.

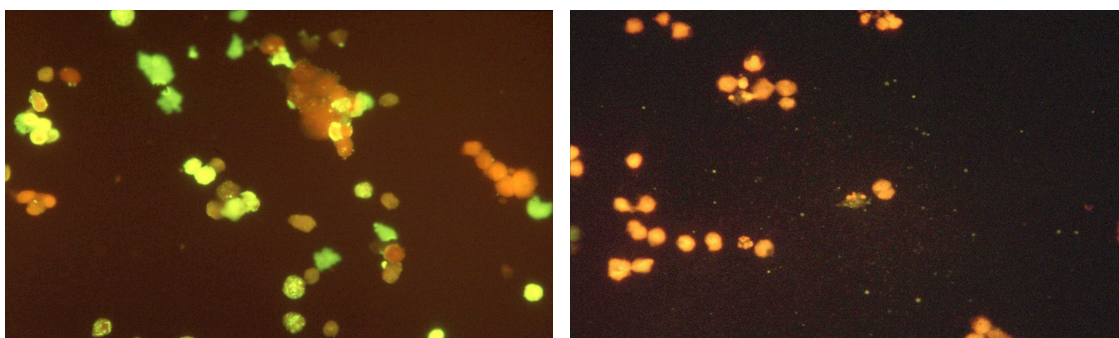


Abb. 4.27: *In situ* Hybridisierung zum Nachweis von pGlowDNase in BJAB-DNase Zellen (400-fache Vergrößerung). links: BJAB-DNase Zellen mit DIG markierter DNase-Sonde; rechts: BJAB-Zellen mit DIG markierter DNase-Sonde

In den BJAB-DNase Zellen wurde der Vektor mittels *in situ* Hybridisierung direkt nachgewiesen. Dieses bestätigt das Ergebnis der Neomycin-PCR. Somit ist die Zell-Linie BJAB-DNase stabil und kann für weitere Infektionsexperimente genutzt werden.

4.6.1.3. Expression von BGLF-5 in BJAB-DNase Zellen nach Wildtyp-EBV-Infektion

BJAB-DNase Zellen wurden mit Wildtyp-EBV infiziert und die Expression des transfizierten Gens BGLF-5 mittels *Realtime* PCR überprüft (3.16.2.). Ein Vergleich der Expression erfolgte mit Wildtyp-EBV-infizierten BJAB-Zellen. In Abb. 4.28 ist die Expression der EBV-DNase graphisch in relativen Einheiten dargestellt.



Abb. 4.28: Graphische Darstellung des DNase-Expressionsquotienten in Wildtyp-EBV-infizierten BJAB-DNase Zellen (blau) und Wildtyp-EBV-infizierte BJAB-Zellen (rot) 4, 8, 24 und 48 Stunden nach der Infektion

In Wildtyp-EBV-infizierten BJAB-Zellen erreichte die DNase nach 8 Stunden ihr Expressionsmaximum (Abb. 4.28), in Wildtyp-EBV-infizierten BJAB-DNase Zellen bereits nach 4 Stunden. Nach Erreichen der Maxima sank die jeweilige Expression wieder ab. Der Vektor pGlowDNase überexprimiert demnach das DNase Gen.

Es stellte sich jedoch heraus, daß BJAB-DNase Zellen die DNase auch ohne Infektion mit Wildtyp-EBV exprimieren. Die Grundexpression wurde mittels *Realtime* RT-PCR analysiert und die PCR-Produkte zur Kontrolle auf ein Agarosegel aufgetragen (Abb. 4.29).

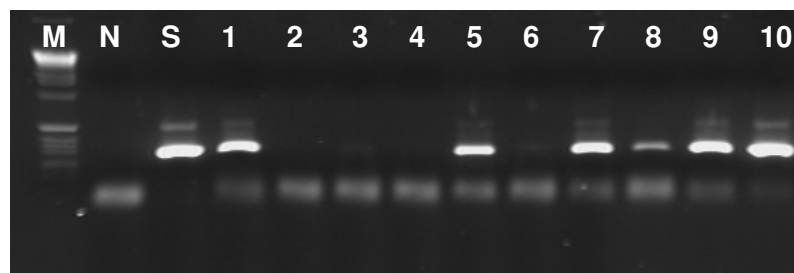


Abb. 4.29: Agarosegelelektrophorese der DNase Produkte aus der *Realtime* PCR. M = 100 bp Marker, N = Negativkontrolle, S = pGlowDNase Standard, 1-10 = verschiedene Kulturen von BJAB-DNase Zellen

Es stellte sich bei wiederholten Untersuchungen der DNase-Expression heraus, daß dieses Gen häufig, aber nicht permanent transkribiert wird. Somit kann ohne Testung keine Vor-

hersage über die aktuelle Expression gemacht werden. Zur Untersuchung der DNase-Expression in BJAB-DNase Zellen auf Proteinebene wurde ein IFT durchgeführt. Die DNase wurde jedoch in keiner der BJAB-DNase Kulturen nachgewiesen (nicht dargestellt).

Die Grundexpression der EBV-DNase in BJAB-DNase Zellen kann die Ergebnisse nach der Infektion mit Wildtyp-EBV verfälschen. Daher wurden aus den absoluten Werten der *Real-time* PCR zum Nachweis der DNase- und GAPDH-Expression die Expressionsquotienten gebildet und die Werte von Wildtyp-EBV-infizierten BJAB- und BJAB-DNase Zellen mit denen der nicht-infizierten BJAB-DNase Zellen verglichen. Hierbei zeigte sich, daß die absoluten Werte nicht sehr stark voneinander abweichen (Tab. 4.6 und 4.7). Somit wurde keine eindeutige Überexpression der EBV-DNase nach der Infektion von BJAB-DNase mit Wildtyp-EBV nachgewiesen. Da jedoch das BGLF-5 Gen prinzipiell auf dem Vektor pGlowDNase initiiert wird, wurden BJAB-DNase Zellen mit EBV-BGLF-5⁻ infiziert.

Tab. 4.6: Expressionsquotient DNase/GAPDH in Wildtyp-EBV-infizierten BJAB-DNase und BJAB-Zellen

inf. BJAB-DNase Zellen	4h	8h	24h	48h	inf. BJAB-Zellen	4h	8h	24h	48h
ak1	1,832E-03	5,090E-03		1,405E-05	a1	7,383E-05	3,299E-04	6,105E-05	3,690E-05
ak2	3,124E-04	3,535E-05	4,868E-06	2,548E-05	a2	4,194E-02	6,104E-05	7,672E-05	4,706E-05
ak3	1,456E-02		8,278E-03	3,490E-04	a3	6,037E-06	7,704E-05	7,886E-05	3,434E-05
bk1	2,340E-04	2,226E-04	5,578E-05	9,793E-05	b1	4,468E-06	1,264E-05	5,213E-06	3,752E-05
bk2	2,549E-04	2,500E-04	1,310E-04	1,397E-04	b2	6,003E-06	1,803E-05	3,021E-06	8,270E-06
bk3	9,326E-05	1,393E-03	5,267E-05	2,479E-05	b3	7,719E-06	9,623E-06	1,880E-05	2,379E-06
ck1	3,422E-04	5,659E-04	1,423E-04	2,880E-04	c1	2,633E-04	3,618E-04	2,935E-05	3,827E-06
ck2	1,581E-02	4,992E-04	1,601E-03	1,702E-04	c2	3,800E-05	2,934E-05	1,745E-05	4,772E-06
ck3	1,243E-03	3,891E-04	3,776E-04	2,000E-04	c3	9,918E-04	1,027E-04	2,066E-05	6,055E-06
Mittelwert	3,854E-03	1,056E-03	1,330E-03	1,455E-04		4,814E-03	1,113E-04	3,457E-05	2,013E-05

Tab. 4.7: Expressionsquotient DNase/GAPDH in BJAB-DNase Zellen

nicht-inf. BJAB-DNase Zellen	
1	3,81E-05
2	-
3	-
4	-
5	2,51E-04
6	-
7	3,12E-04
8	8,20E-05
9	4,08E-04
10	4,22E-03
Mittelwert	8,85E-04

4.6.1.4. Infektion von BJAB-DNase Zellen mit EBV-BGLF-5⁻

BJAB-DNase Zellen und BJAB-Zellen wurden mit EBV-BGLF-5⁻ und zur Kontrolle mit Wildtyp-EBV infiziert. Nach zwei und fünf Tagen wurde die Expression viraler Gene untersucht. Exemplarisch sind einige PCR-Ergebnisse in Abb. 4.30 dargestellt.

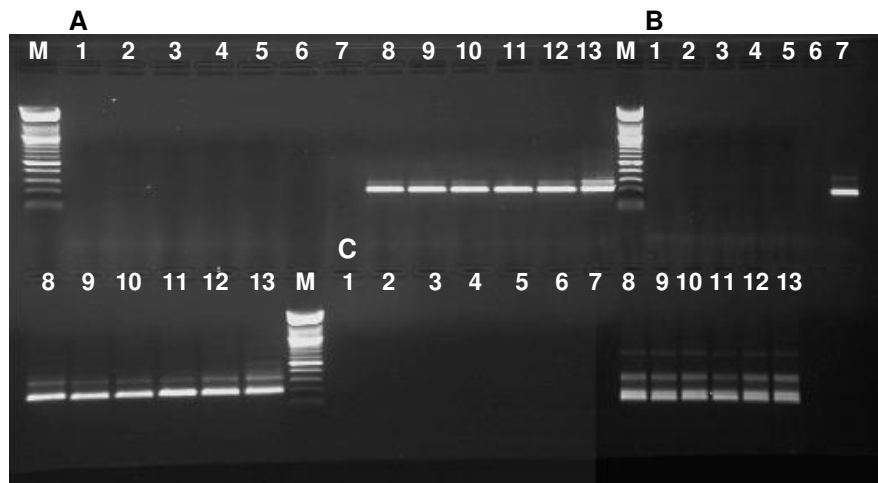


Abb. 4.30: Agarosegelelektrophorese der PCR-Produkte zum Nachweis der Expression von BZLF-1 (A), BRLF-1 (B) und BMRF-1 (C) in EBV-BGLF-5⁻ und Wildtyp-EBV-infizierten BJAB-Zellen und BJAB-DNase Zellen sowie nicht-infizierten BJAB- und BJAB-DNase Zellen. M = 100 bp Marker, 1 = Negativkontrolle, 2 = BJAB-Zellen, 3-6 = EBV-BGLF-5⁻ infizierte BJAB-DNase Zellen, 7 = EBV-BGLF-5⁻ infizierte BJAB-Zellen, 8-11 = Wildtyp-EBV-infizierte BJAB-DNase Zellen, 12 = Wildtyp-EBV-infizierte BJAB-Zellen, 13 = Positivkontrolle

Alle untersuchten viralen Gene wurden in Wildtyp-EBV-infizierten BJAB-, wie auch in BJAB-DNase Zellen nachgewiesen. In EBV-BGLF-5⁻ infizierten BJAB-DNase Zellen wurde jedoch keine virale Expression festgestellt, nicht einmal die Expression von BRLF-1, während in EBV-BGLF-5⁻ infizierten BJAB-Zellen wie erwartet BRLF-1 exprimiert wurde. Der Vektor pGlowDNase eignete sich somit nicht zur Kompensation der Mutation in EBV-BGLF-5⁻.

4.6.2. Rekombination von EBV-BGLF-5⁻ zu Wildtyp-Virionen

Da die Aufhebung der BGLF-5-Mutationen mit dem Vektor pGlowDNase nicht möglich war, wurde versucht die Mutation durch homologe Rekombination von EBV-BGLF-5⁻ mit Wildtyp-EBV-Sequenzen aufzuheben.

Hierzu wurden Raji-Zellen mit EBV-BGLF-5⁻ infiziert bzw. vor der Infektion mit Klon 219, aus dem der Mutanten-Klon von BGLF-5 generiert wurde, transfiziert, so daß das mutierte Gen in EBV-BGLF-5⁻ mit der entsprechenden Sequenz im Raji-Genom oder im Klon 219, rekombiniert werden konnte und es somit zu einer Aufhebung der Mutation kommen sollte (3.6.).

Die mit EBV-BGLF-5⁻ infizierte bzw. die infizierten und mit Klon 219 transfizierten Raji-Zellen wurden für zwei bis sieben Tage kultiviert und die Kulturüberstände (Rek-BGLF-5⁻ genannt) steriltriftriert. Damit wurden primäre B-Zellen von EBV-negativen Spendern infiziert.

Rek-BGLF-5⁻ infizierte B-Lymphozyten wurden eine Woche kultiviert und dann auf virale Genexpression untersucht. Es zeigte sich jedoch, daß keine viralen Gene exprimiert wurden. Folglich hat keine Rekombination zwischen den Mutanten-Virionen und dem Raji-Genom bzw. dem Klon 219 stattgefunden und eine Reversion der Mutation im Leseraster BGLF-5 erfolgte nicht.

4.7. Charakterisierung der BDLF-2-Mutante

Nach der Generierung von EBV-BDLF-2⁻ Virionen und deren Selektion (4.2.) wurden diese zur Charakterisierung des Phänotyps der Mutante in Infektionsexperimente eingesetzt. Hierzu wurden B-Lymphozyten EBV-negativer Spender und Zellen der EBV-negativen B-Zell-Linie BJAB (3.9.) mit Mutanten-Virionen infiziert. Zur Kontrolle dienten mit Wildtyp-EBV-infizierte und nicht-infizierte B-Lymphozyten bzw. BJAB-Zellen.

Zunächst erfolgte der Nachweis von EBV-BDLF-2⁻ in infizierten B-Lymphozyten mittels Rekombinations-PCR, der Ausschluß einer Kontamination mit dem Mutanten-Klon mittels Hygromycin-PCR und der Ausschluß von Wildtyp-EBV mittels BDLF-2-Ausschluß PCR analog zu 4.4.. In Abb. 4.31 sind die Ergebnisse der PCRs dargestellt.

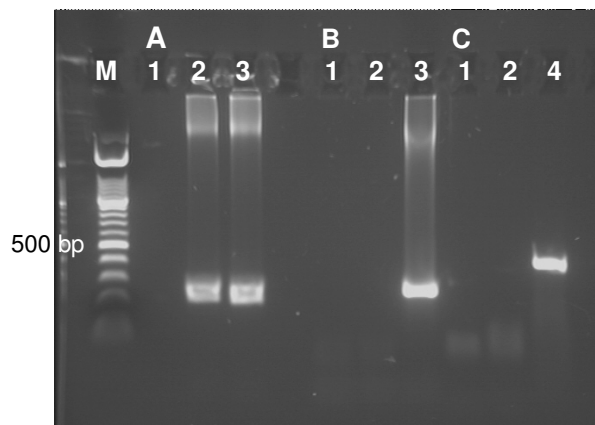


Abb. 4.31: Agarosegelelektrophorese von PCR-Produkten zum Nachweis von EBV-BDLF-2⁻ (A), Ausschluß einer Mutanten-Klon-Kontamination (B) und Ausschluß von Wildtyp-Kontaminationen (C) in EBV-BDLF-2⁻ infizierten B-Lymphozyten M = 100 bp-Marker, 1 = Negativkontrolle, 2 = EBV-BDLF-2⁻ infizierte B-Zellen, 3 = Positivkontrolle 4 = mit Wildtyp-EBV-infizierte B-Lymphozyten

EBV-BDLF-2⁻ wurden in infizierten B-Lymphozyten nachgewiesen sowie eine Mutanten-Klon- und eine Wildtyp-Kontamination ausgeschlossen. Daraufhin wurden infizierte B-Zellen EBV-negativer Spender und BJAB-Zellen hinsichtlich viraler Genexpression auf Transkript- und Proteinebene analysiert. Weiterhin wurden die Zellen morphologisch und auf eine veränderte Oberflächenproteinexpression untersucht und mit Wildtyp-EBV-infizierten Zellen

verglichen. Zusätzlich wurde die Expressionskinetik von BDLF-2 nach der Infektion vom BJAB-Zellen mit Wildtyp-EBV untersucht.

4.7.1. Nachweis viraler Genexpression auf Transkriptebeene

Mittels *nested* RT-PCR (3.14.) wurden in EBV-BDLF-2⁺ infizierten B-Lymphozyten die Genprodukte BZLF-1, BRLF-1, BMRF-1 und BHRF-1, deren Expression typisch für den lytischen Zyklus des EBV ist sowie die Produkte der viralen Latenz LMP-1 und -2, EBNA-1 (Latenz I und II, Latenz III), -2 und -3 A-C untersucht. Exemplarisch sind einige Nachweise in Abb. 4.32 und 4.33 dargestellt.

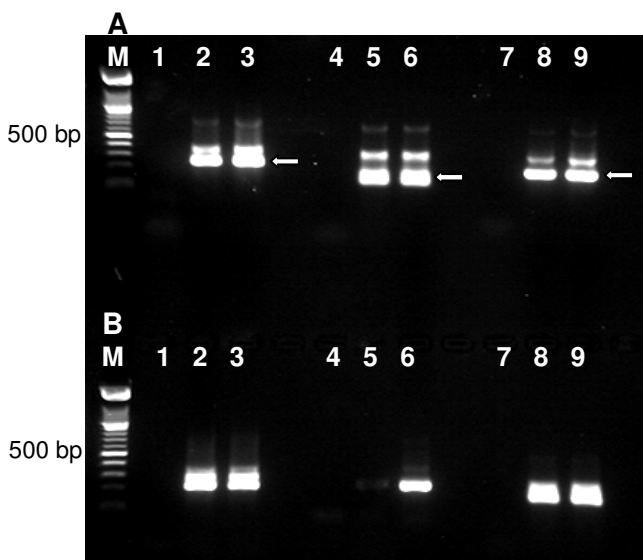


Abb. 4.32: Agarosegelelektrophorese von PCR-Produkten. A) Nachweis der Expression von BHRF-1 (247 bp (1-3)), BMRF-1 (137 bp (4-6)) und BRLF-1 (205 bp (7-9)) in EBV-BDLF-2⁺ und Wildtyp-EBV-infizierten B-Lymphozyten sowie in nicht-infizierten B-Zellen. B) Nachweis der Expression von BZLF-1 (229 bp (1-3)), LMP-1 (218 bp (4-6)) und LMP-2 (153 bp (7-9)) in EBV-BDLF-2⁺ und Wildtyp-EBV-infizierten B-Lymphozyten sowie in nicht-infizierten B-Zellen. M = 100 bp Marker; 1, 4 und 7 = nicht-infizierte B-Lymphozyten; 2, 5 und 8 = BDLF-2-Mutante 2 Tage nach Infektion; 3, 6 und 9 = Wildtyp 2 Tage nach Infektion; Pfeile markieren die entsprechenden Fragmente



Abb. 4.33: Agarosegelelektrophorese von PCR-Produkten. Nachweis der Expression von EBNA-1 Latenz I und II (143 bp (1-3)), EBNA-1 Latenz III (143 bp (4-6)), EBNA-2 (eigentlich 351 bp (7-9)), EBNA-3A (eigentlich 291 bp (10-12)), EBNA-3B (eigentlich 224 bp (13-15)), EBNA-3C (eigentlich 260 bp (16-18)) in EBV-BDLF-2⁺ und Wildtyp-EBV-infizierten B-Lymphozyten sowie nicht-infizierten B-Zellen. M = 100 bp-Marker; 1, 4, 7, 10, 13 und 16 = nicht-infizierte B-Lymphozyten; 2, 5, 8, 11, 14 und 17 = BDLF-2-Mutante; 3, 6, 9, 12, 15 und 18 = Wildtyp; Pfeile markieren die entsprechenden Fragmente

In den BDLF-2-Mutanten-infizierten B-Zellen wurden im Vergleich zu Wildtyp-EBV-infizierten Zellen nicht alle viralen Gene exprimiert. Alle untersuchten lytischen Gene (BHRF-1, BMRF-1, BRLF-1, BZLF-1) sowie die Latenzgene LMP-2 und EBNA-3 A-C wurden zwei Tage nach der Infektion exprimiert. Die Expression von LMP-1, EBNA-1 und EBNA-2 wurde nicht nachgewiesen. Sieben Tage nach der Infektion war nur noch BZLF-1 nachweisbar. In Wildtyp-EBV-infizierten B-Lymphozyten wurden alle untersuchten viralen Gene sowohl nach zwei als auch nach sieben Tagen exprimiert.

Neben primären B-Zellen wurden auch BJAB-Zellen mit EBV-BDLF-2⁻ infiziert und die viralen Expressionsmuster mit dem von Wildtyp-EBV-infizierten BJAB-Zellen und nicht-infizierten BJAB-Zellen verglichen. In BJAB-Zellen wurden nach der Infektion mit BDLF-2-Mutanten nur noch lytische virale Gene exprimiert. BHRF-1 und BRLF-1 wurden an Tag 2 und 7 nach der Infektion nachgewiesen, während BMRF-1 erst nach 7 Tagen exprimiert wurde und die Expression von BZLF-1 nach 2 Tagen abgebrochen wurde. Die Expression von Latenzgenen wurde in EBV-BDLF-2⁻ infizierten BJAB-Zellen nicht nachgewiesen. In Wildtyp-EBV-infizierten BJAB-Zellen wurden, ebenso wie in infizierten B-Lymphozyten, alle untersuchten viralen Gene auf Transkriptebeine nachgewiesen.

Für einen besseren Vergleich der Expressionsmuster der EBV-BDLF-2⁻ und Wildtyp-EBV-infizierten B-Lymphozyten und BJAB-Zellen sind die PCR-Ergebnisse in Tab. 4.8 und 4.9 zusammengestellt.

Tab. 4.8: Expression von lytischen viralen Genen in Wildtyp-EBV und EBV-BDLF-2⁻ infizierten B-Lymphozyten und BJAB-Zellen

	Zeit nach Infektion [Tage]	BHRF-1	BMRF-1	BRLF-1	BZLF-1
B-Zellen mit Wildtyp	2	+	+	+	+
	7	+	+	+	+
B-Zellen mit BDLF-2-Mutante	2	+	+	+	+
	7	-	-	-	+
BJAB-Zellen mit Wildtyp	2	+	+	+	+
	7	+	+	+	+
BJAB-Zellen mit BDLF-2-Mutante	2	+	-	+	+
	7	+	+	+	-

Tab. 4.9: Expression von latent viralen Genen in Wildtyp-EBV und EBV-BDLF-2⁻ infizierten B-Lymphozyten und BJAB-Zellen

	Zeit nach Infek- tion [Tage]	LMP-1	LMP2	EBNA-1 (Latenz I und II)	EBNA-1 (Latenz III)	EBNA-2	EBNA- 3A	EBNA- 3B	EBNA- 3C
B-Zellen mit Wildtyp	2	+	+	+	+	+	+	+	+
	7	+	+	+	+	+	+	+	+
B-Zellen mit BDLF-2- Mutante	2	-	+	-	-	-	+	+	+
	7	-	-	-	-	-	-	-	-
BJAB- Zellen mit Wildtyp	2	+	+	+	+	+	+	+	+
	7	+	+	+	+	+	+	+	+
BJAB- Zellen mit BDLF-2- Mutante	2	-	-	-	-	-	-	-	-
	7	-	-	-	-	-	-	-	-

Genau wie bei der Untersuchung der Genexpression der BGLF-5-Mutante (4.5.1.) trat auch hier das Phänomen der Intronretention bei EBNA-3A-3C auf. Hier wurden in den mit BDLF-2-Mutanten, wie auch in den Wildtyp-EBV-infizierten B-Zellen jeweils nur das unge-spleißte Fragment nachgewiesen. Auch das EBNA-2-Amplifikat war hier um 100 bp kürzer, als aufgrund des Datenbankeintrags bewertet (2.4.). Dieses ist auf eine Mutation des hier verwendeten EBV-Stamms zurückzuführen (4.5.2.).

4.7.2. Nachweis viraler Genexpression auf Proteinebene

Nachdem virale Genexpression auf Transkripte-bene in EBV-BDLF-2⁻ infizierten B-Lympho-zyten nachgewiesen wurde, sollte dieses auf Proteinebene bestätigt werden.

Mittels Immunfluoreszenztest (IFT; 3.19.) wurde die Expression viraler Proteine wie Early Antigen D (EA-D) und LMP-1 in EBV-BDLF-2⁻ infizierten B-Zellen nachgewiesen. Als Kon-trolle dienten mit Wildtyp-EBV-infizierte B-Zellen und nicht-infizierte B-Zellen. Die Ergeb-nisse der IFT sind in Abb. 4.34 und 4.35 dargestellt.

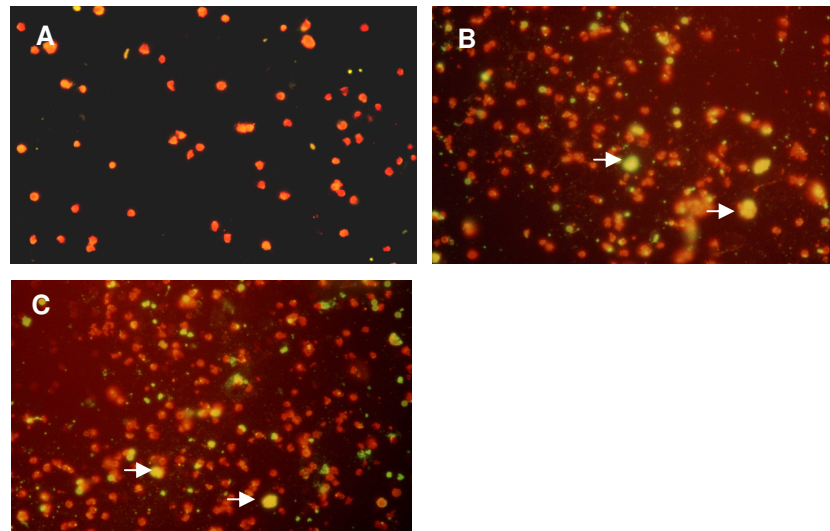


Abb. 4.34: IFT zum Nachweis von EA-D in EBV-BDLF-2⁻ und Wildtyp-EBV-infizierten B-Lymphozyten sowie in nicht-infizierten B-Zellen 3 Tage nach der Infektion in 400-facher Vergrößerung. A = nicht-infizierte B-Lymphozyten, B = Wildtyp-EBV-infizierte B-Lymphozyten, C = EBV-BDLF-2⁻ infizierte B-Lymphozyten; Pfeile markieren positive Zellen

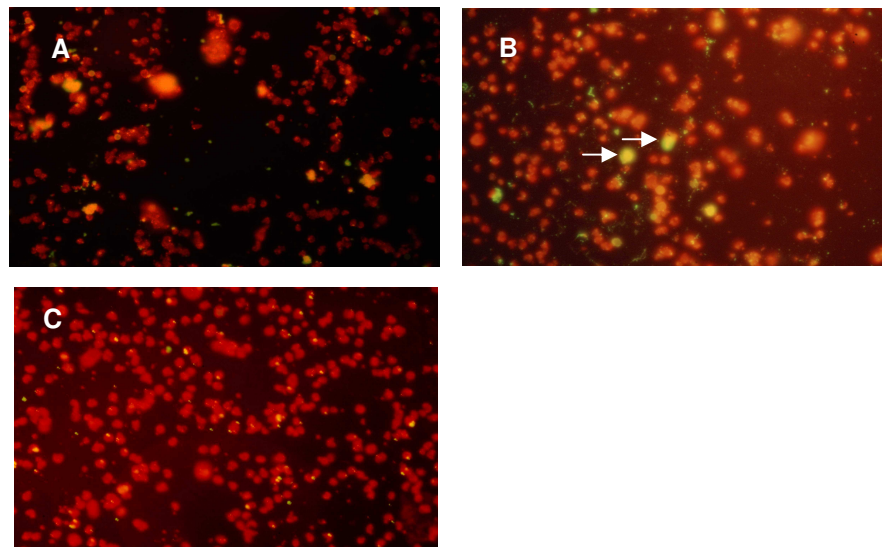


Abb. 4.35: IFT zum Nachweis von LMP-1 in EBV-BDLF-2⁻ und Wildtyp-EBV-infizierten B-Lymphozyten sowie in nicht-infizierten B-Zellen 3 Tage nach der Infektion in 400-facher Vergrößerung. A = nicht-infizierte B-Lymphozyten, B = Wildtyp-EBV-infizierte B-Lymphozyten, C = EBV-BDLF-2⁻ infizierte B-Lymphozyten; Pfeile markieren positive Zellen

Das virale Protein EA-D (kodiert durch BMRF-1) wurde sowohl nach Wildtyp-Infektion als auch nach Infektion mit BDLF-2-Mutanten nachgewiesen, während die Expression von LMP-1 nur nach Wildtyp-EBV-Infektion erfolgte. Somit ist bewiesen, daß nicht nur virale mRNA, sondern auch das virale Protein EA-D nach der Infektion mit BDLF-2-Mutanten-Virionen gebildet wird.

IFT wurden auch mit EBV-BDLF-2⁻ und Wildtyp-EBV-infizierten BJAB-Zellen durchgeführt. EA-D wurde hier aber weder nach der Infektion mit BDLF-2-Mutanten noch mit Wildtyp-Vi-

tionen nachgewiesen, obwohl dieses Gen auf Transkriptebene mittels PCR nachweisbar war. Dieses Phänomen wurde bereits unter 4.5.3. erwähnt und wird unter 4.9. charakterisiert.

4.7.3. Morphologie infizierter B-Lymphozyten

Nach der Infektion von B-Lymphozyten EBV-negativer Spender mit EBV-BGLF-2⁻ wurde die Morphologie dieser Zellen mit der von Wildtyp-EBV-infizierten und nicht-infizierten B-Zellen verglichen (Abb. 4.36).

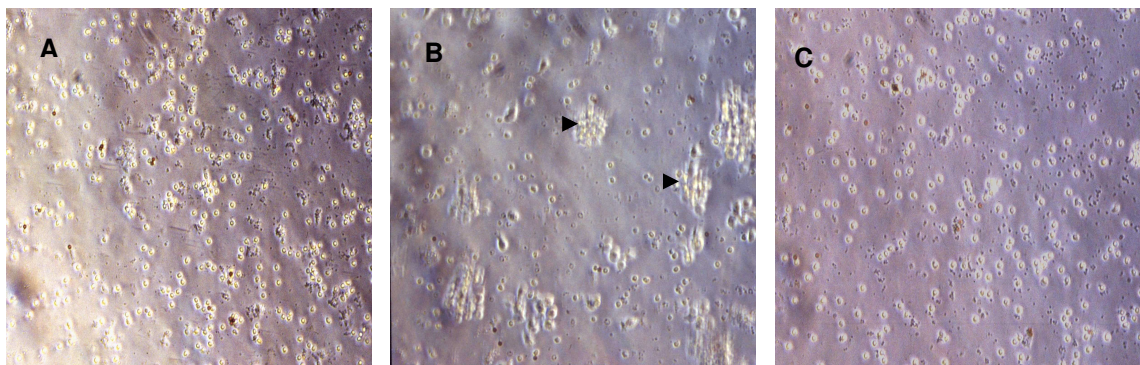


Abb. 4.36: Vergleich von A: nicht-infizierten B-Lymphozyten, B: Wildtyp-EBV-infizierten B-Lymphozyten mit Zellaggregaten (Pfeile) und C: EBV-BDLF-2⁻ infizierten B-Lymphozyten 3 Tage nach der Infektion (200-fache Vergrößerung).

Die EBV-BDLF-2⁻ infizierten B-Zellen verhalten sich morphologisch wie nicht-infizierte B-Zellen. Sie bilden im Gegensatz zu Wildtyp-EBV-infizierten B-Lymphozyten keine Zellaggregate, proliferieren nicht und sterben nach ca. 14 Tagen ab.

4.7.4. Nachweis der Expression relevanter Oberflächenantigene

Die EBV-BDLF-2⁻ infizierten B-Lymphozyten wurden wie die mit EBV-BGLF-5⁻ infizierten B-Zellen auf eine veränderte Oberflächenproteinexpression mittels FACS-Analyse (3.20.) untersucht. Als Kontrollen dienten mit Wildtyp-EBV-infizierte B-Lymphozyten und nicht-infizierte B-Zellen. Untersucht wurden, wie in 4.5.5. beschrieben, die Adhäsionsmoleküle CD11a, CD54 und CD58 sowie B-Lymphozyten Aktivierungsmarker CD23, CD30, CD40 und CD44. Weiterhin wurden Größe und Granularität der Zellen bestimmt. Beispielhaft ist hier die Expression des Oberflächenantigens CD40 im HistogrammPlot dargestellt (Abb. 4.37).

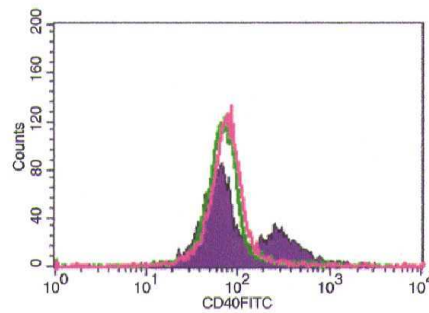


Abb. 4.37: FACS-Analyse der Expression des Oberflächenproteins CD40 in Wildtyp-EBV und EBV-BDLF-2⁻ infizierten B-Lymphozyten sowie nicht-infizierten B-Lymphozyten im HistogrammPlot dargestellt. violett: Wildtyp-EBV-infizierte B-Zellen, grün: nicht-infizierte B-Zellen, rosa: EBV-BDLF2⁻ infizierte B-Zellen; die X-Achse gibt die Fluoreszenzintensität an, die Y-Achse die Zellzahl

Wildtyp-EBV-infizierte B-Zellen weisen zwei Populationen auf. Dabei entspricht die erste, größere Population der der nicht-infizierten B-Zellen, die zweite den infizierten, die vermehrt das Oberflächenantigen exprimieren. EBV-BDLF-2⁻ infizierte B-Lymphozyten und nicht-infizierte B-Zellen bestehen aus nur einer Population und weisen keine vermehrte Oberflächenproteinexpression auf. Die hier dargestellten Ergebnisse gelten entsprechend auch für die weiteren untersuchten Oberflächenproteine.

EBV-BDLF-2⁻ infizierte B-Zellen exprimieren nicht vermehrt Oberflächenproteine, die für eine EBV-Infektion typisch sind. Dieses entspricht auch der Morphologie (4.7.3.) der Zellen: sie aggregieren nicht und auch Zellteilung ist nicht zu beobachten.

4.7.5. Expressionskinetik von BDLF-2 in Wildtyp-EBV-infizierten BJAB-Zellen

Das Expressionsverhalten des BDLF-2 Gens wurde mittels *Realtime* PCR charakterisiert. Hierzu wurden BJAB-Zellen mit Wildtyp-EBV infiziert und Proben nach 1, 2, 4, 8, 24 und 168 Stunden entnommen. Neben BDLF-2 wurde auch die Expression von BZLF-1, BRLF-1 und GAPDH analysiert und die jeweiligen Expressionsquotienten, wie unter 4.5.6.2. beschrieben, ermittelt. Als Standard wurden die Vektoren His-TOPO-GAPDH, pCMVZ und His-TOPO-BRLF-1 verwendet sowie ein Vektor, der das Gen und die Promotorregion von BDLF-2 enthält (pGlowBDLF-2). Insgesamt wurde ein sechsfacher Ansatz durchgeführt. In Tab. 4.10 und Abb. 4.38 sind die Expressionsmuster sowohl in relativen Einheiten als auch graphisch dargestellt.

Tab. 4.10: Expressionsquotienten von BDLF-2, BZLF-1 und BRLF-1 gegen GAPDH in rel. Einheiten; Grau unterlegte Zahlen markieren die ersten Expressionsmaxima

Zeit [h]	1	2	4	8	24	168
BDLF-2/GAPDH	68,16	82,11	83,2	64,53	42,79	9,39
BZLF-1/GAPDH	52,81	36,97	74,91	90,60	69,55	53,67
BRLF-1/GAPDH	26,35	69,18	37,14	56,56	66,26	31,17

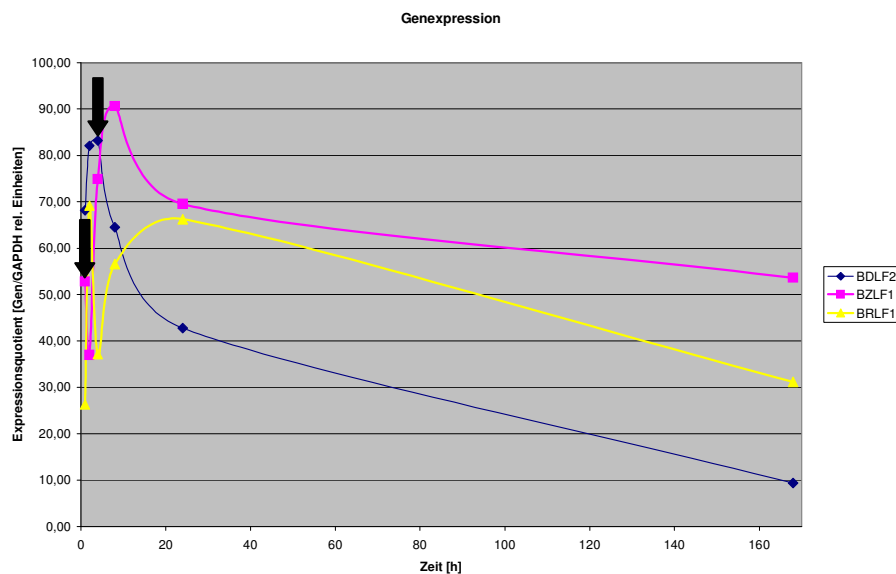


Abb. 4.38: Graphische Darstellung der Quotienten der Expression von BDLF-2, BZLF-1 und BRLF-1 in Wildtyp-EBV-infizierten BJAB-Zellen in relativen Einheiten. Schwarze Pfeile markieren die ersten Expressionsmaxima der untersuchten Gene

Die Expression von BDLF-2 erfolgt bereits eine Stunde nach der Infektion von BJAB-Zellen mit Wildtyp-EBV. Das Expressionsmaximum wurde vier Stunden nach der Infektion erreicht, danach sank die Expression kontinuierlich ab. Auch die Expression von BZLF-1 und BRLF-1 wurde eine Stunde nach der Infektion nachgewiesen und erreichte ihr erstes Maximum nach 1 bzw. 2 Stunden. Ein zweites Expressionsmaximum wurden bei BZLF-1 nach 8 Stunden erreicht. Nach Erreichen der Maxima sank die Expression von BZLF-1 und BRLF-1 kontinuierlich ab. Somit variieren die Expressionsverläufe von BZLF-1 und BRLF-1 verglichen mit Abb. 4.25. Auch hier muß berücksichtigt werden, daß die Ergebnisse in relativen Einheiten aus den Mittelwerten der einzelnen Ansätze angegeben sind. Die absolute Genexpression von BZLF-1 ist wesentlich höher als die von BRLF-1 und BDLF-2, so daß rein rechnerisch Unterschiede im Expressionsverlauf auftreten können.

4.8. Reversion der Mutation im BDLF-2 Gen

Die Mutation im BDLF-2 Gen sollte durch einen Vektor, der das offene Leseraster inklusive der Promotorregion aufweist, kompensiert bzw. durch Rekombination der mutierten Sequenz mit der Wildtypsequenz revertiert werden.

4.8.1. Kompensation der BDLF-2- Mutation

Um die Mutation im BDLF-2 Gen zu kompensieren, mußte ein Vektor konstruiert werden, der das komplette Gen und die Promotorregion enthält. BJAB-Zellen wurden stabil mit diesem Vektor transfiziert. Nach Infektion der transfizierten Zellen mit Wildtyp-EBV sollte überprüft werden, ob das BDLF-2 Gen exprimiert wird. Im Vergleich zu Wildtyp-EBV-infizierten BJAB-Zellen wurde eine Überexpression in den infizierten, transfizierten BJAB-Zellen erwartet. Nach der Infektion der transfizierten Zellen mit EBV-BDLF-2⁻ sollte es dann zur Unterdrückung des Mutantenphänotyps kommen, so daß ein virales Genexpressionsmuster entsprechend dem in Wildtyp-EBV-infizierten Zellen nachweisbar ist.

4.8.1.1. Konstruktion eines BDLF-2-Überexpressionsvektors

Wie unter 4.6.1.1. für BGLF-5 beschrieben, wurde das 2249 bp Fragment (BDLF-2 Gen inklusive Promotorsequenz) in den Vektor *pGlow-TOPO* ligiert (3.4.) und das Ligationsprodukt in *One Shot[®] Top 10 E. coli* transformiert (3.5.). Die durch Minipräparation (3.10.) isolierten Vektoren wurden mit Hind III gespalten und auf das gewünschte Insert überprüft. Klone mit dem entsprechenden Bandenmuster, als pGlowBDLF-2 bezeichnet, wurden zur stabilen Transfektion von BJAB-Zellen verwendet.

4.8.1.2. Etablierung einer stabil mit pGlowBDLF-2 transfizierten Zell-Linie

BJAB-Zellen wurden mit pGlowBDLF-2 transfiziert (3.6.2.) und daraus mittels G418 eine stabile Zell-Linie (BJAB-BDLF-2) generiert.

Die Vektoren pGlowBDLF-2 wurden in den transfizierten Zellen einerseits über das Neomycinresistenzgen mittels PCR (3.16.2. Neomycin-PCR) nachgewiesen (nicht dargestellt), an-

dererseits durch *in situ* Hybridisierung (3.23.) mit spezifischen DIG-markierten Sonden (3.16.2.) gegen das BDLF-2 Gen (Abb. 4.39).

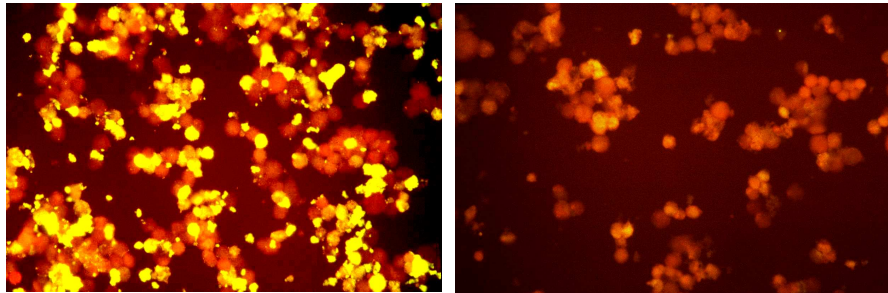


Abb. 4.39: *In situ* Hybridisierung zum Nachweis von pGlowBDLF-2 in BJAB-BDLF-2 Zellen (400-fache Vergrößerung). links: BJAB-BDLF-2 Zellen mit DIG markierter pGlowBDLF-2-Sonde; rechts: BJAB-Zellen mit DIG markierter pGlow-BDLF-2-Sonde

In den BJAB-BDLF-2 Zellen wurde der Vektor pGlowBDLF-2 mittels Neomycin-PCR und mittels *in situ* Hybridisierung nachgewiesen. Somit ist die Zell-Linie BJAB-BDLF-2 stabil und kann für weitere Infektionsexperimente genutzt werden.

4.8.1.3. BDLF-2-Expression in BJAB-BDLF-2 Zellen nach Wildtyp-EBV-Infektion

Es stellte sich heraus, daß auch in nicht-infizierten BJAB-BDLF-2 Zellen das BDLF-2 Gen exprimiert wurde. Die Expression erfolgte häufig, aber nicht permanent. Somit kann ohne Testung keine Vorhersage über die aktuelle Expression gemacht werden.

Die BJAB-BDLF-2 Zellen wurden unmittelbar vor der Infektion mit Wildtyp-EBV auf die Grundexpression von BDLF-2 untersucht und nur Kulturen infiziert, bei denen keine Expression nachgewiesen wurde. Nach der Infektion wurde die Expression des transfizierten BDLF-2 Gens mittels *Realtime* PCR überprüft (3.16.2.). Zur Kontrolle wurden BJAB-Zellen mit Wildtyp-EBV infiziert.

Es zeigte sich hier, ebenso wie bei Wildtyp-EBV-infizierten BJAB-DNase Zellen (Abb. 4.28), daß in Wildtyp-EBV-infizierten BJAB-BDLF-2 Zellen die Expression des BDLF-2 Gens kurz nach der Infektion wesentlich stärker war als in Wildtyp-EBV-infizierten BJAB-Zellen. Nach Erreichen des Maximums sank die Expression kontinuierlich ab.

Somit wurde bewiesen, daß BDLF-2 vom Vektor pGlowBDLF-2 exprimiert wird. Daraufhin wurden BJAB-BDLF-2 Zellen mit EBV-BDLF-2⁻ infiziert.

4.8.1.4. Infektion von BJAB-BDLF-2 Zellen mit EBV-BDLF-2⁻

BJAB-BDLF-2 Zellen und BJAB-Zellen wurden mit EBV-BDLF-2⁻ und zur Kontrolle mit Wildtyp-EBV infiziert. Nach zwei und fünf Tagen wurde die Expression viraler Gene untersucht. In EBV-BDLF-2⁻ infizierten BJAB-DNase Zellen wurde keine virale Expression festgestellt, während in EBV-BDLF-2⁻ infizierten BJAB-Zellen wie erwartet die lytischen Gene BMRF-1, BHRF-1, BRLF-1 und BZLF-1 exprimiert wurden. Alle untersuchten viralen Gene wurden jedoch in Wildtyp-EBV-infizierten BJAB-, wie auch in BJAB-DNase Zellen nachgewiesen. Der Vektor pGlowDNase eignet sich somit nicht zur Kompensation der Mutation im BDLF-2 Gen.

4.8.2. Rekombination von EBV-BDLF-2⁻ zu Wildtyp-Virionen

Da die Aufhebung der BDLF-2-Mutation mit dem Vektor pGlowBDLF-2 nicht möglich war, wurde versucht durch homologe Rekombination von EBV-BDLF-2⁻ mit Wildtyp-EBV-Sequenzen die Mutation aufzuheben.

Analog zu 4.6.2. wurden hierzu Raji-Zellen bzw. mit Klon 219 transfizierte Raji-Zellen mit EBV-BDLF-2⁻ infiziert, so daß es zu einer homologen Rekombination zwischen Sequenzen des Raji-Genoms bzw. des Klons 219, die die Mutation umgeben, kommen kann. Sollte homologe Rekombination zwischen Wildtyp-EBV Sequenzen und Bereichen um die Mutation stattfinden, würde Wildtyp-EBV entstehen.

Die mit EBV-BDLF-2⁻ infizierten bzw. die infizierten und mit Klon 219 transfizierten Raji-Zellen wurden für zwei bis sieben Tage kultiviert und die Kulturüberstände (Rek-BDLF-2⁻ genannt) steriltfiltriert. Damit wurden primäre B-Zellen EBV-negativer Spender infiziert.

Rek-BDLF-2⁻ infizierte B-Lymphozyten wurden eine Woche kultiviert und dann auf virale Genexpression untersucht. Es zeigte sich jedoch, daß keine viralen Gene exprimiert wurden. Folglich hat keine Rekombination zwischen den Mutanten-Virionen und dem Raji-Genom bzw. dem Klon 219 stattgefunden und die Mutation im Leseraster BDLF-2 konnte somit nicht aufgehoben werden.

4.9. Analyse von Wildtyp-EBV-infizierten B-Lymphozyten, Akata- und BJAB-Zellen

Bei Untersuchungen zur viralen Genexpression in EBV-BGLF-5⁻ und EBV-BDLF-2⁻ infizierten BJAB-Zellen (4.5.1., 4.5.2., 4.7.1., 4.7.2.) stellte sich heraus, daß hier die Genexpres-

sion im Vergleich zu der in infizierten primären B-Lymphozyten stark eingeschränkt war. Weiterhin wurden in Wildtyp-EBV-infizierten BJAB-Zellen alle untersuchten viralen Transkripte nachgewiesen, jedoch keine viralen Proteine. Um dieses Phänomen näher zu charakterisieren, wurden verschiedene, unterschiedlich lang kultivierte Wildtyp-EBV-infizierte Zell-Linien hinsichtlich viraler Genexpression untersucht.

Das Ziel dieser Untersuchungen war, eine geeignete Zell-Linie für Infektionsexperimente mit Mutanten- aber auch mit Wildtyp-EBV zu finden, um eine Alternative zu den in limitiertem Umfang vorhandenen B-Lymphozyten EBV-negativer Spender zu haben.

Zunächst wurden Wildtyp-EBV-infizierte BJAB-Zellen, die auf Transkriptebezug das gleiche Expressionsmuster wie infizierte B-Lymphozyten aufwiesen (Ergebnisse nicht dargestellt), 4 h, 24 h und 48 h nach der Infektion hinsichtlich der Proteinexpression mittels IFT untersucht. Verglichen wurde die Expression mit länger kultivierten, Wildtyp-EBV-infizierten primären B-Lymphozyten. Weiterhin wurden Wildtyp-EBV-infizierte B-Lymphozyten, Akata- und BJAB-Zellen, die seit mehreren Monaten kultiviert wurden, auf das Vorhandensein von EBV und auf das virale Genexpressionsmuster untersucht.

4.9.1. Nachweis viraler Genexpression auf Proteinebene in Wildtyp-EBV-infizierten BJAB-Zellen

Da in Wildtyp-EBV-infizierten primären B-Zellen nach drei Tagen EA-D exprimiert wurde, jedoch nicht in Wildtyp-EBV-infizierten BJAB, sollte überprüft werden, ob EA-D und auch die EBV-DNase zu einem früheren Zeitpunkt exprimiert werden.

Hierzu wurden BJAB-Zellen mit Wildtyp-EBV infiziert und 4 h, 24 h und 48 h nach der Infektion hinsichtlich der Expression der viralen Proteine EA-D, EBV-DNase und LMP-1 untersucht. Da sieben Tage nach der Infektion von B-Lymphozyten mit Wildtyp-EBV virale Genexpression auf Proteinebene nachgewiesen wurde (4.5.1., 4.7.1), wurden hier auch Wildtyp-EBV-infizierte B-Zellen die seit einem Monat bzw. sechs Monaten kultiviert wurden untersucht und mit infizierten BJAB-Zellen verglichen. In Abb. 4.40 und 4.41 sind die Ergebnisse der IFT für EA-D und EBV-DNase dargestellt.

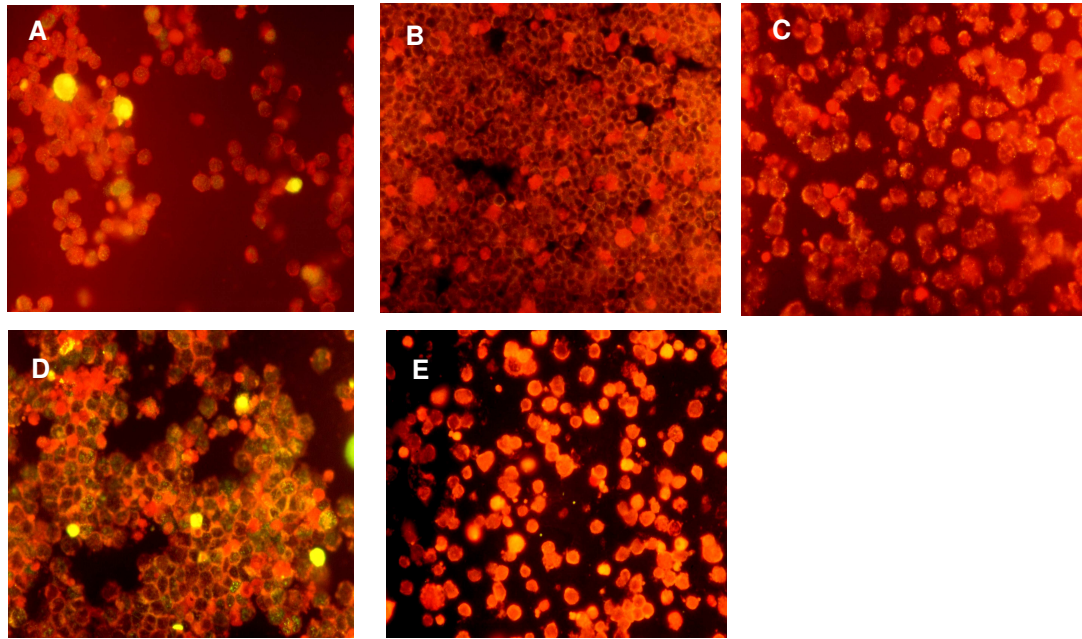


Abb. 4.40: IFT zum Nachweis von EA-D in Wildtyp-EBV-infizierten BJAB-Zellen und B-Lymphozyten in 400-facher Vergrößerung. A = Positivkontrolle (B95-8 Zellen), B = BJAB mit Wildtyp-EBV infiziert (nach 24 h), C = B-Lymphozyten mit Wildtyp-EBV infiziert (nach 6 Monaten), D = B-Lymphozyten mit Wildtyp-EBV infiziert (nach 1 Monat), E = Negativkontrolle (BJAB-Zellen)

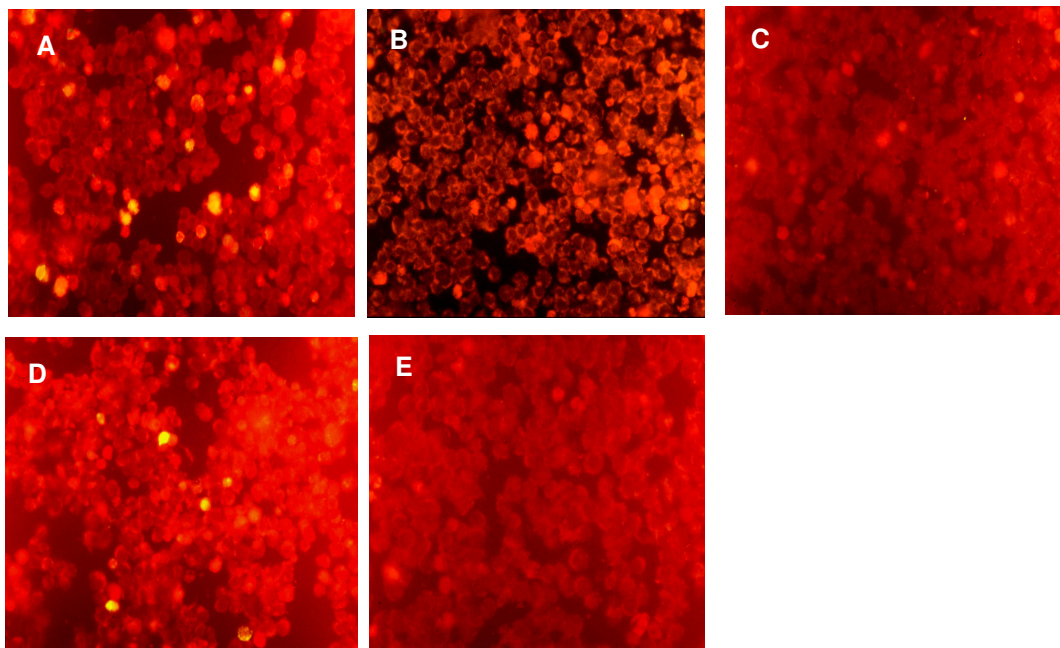


Abb. 4.41: IFT zum Nachweis der EBV-DNase in Wildtyp-EBV-infizierten BJAB-Zellen und B-Lymphozyten in 400-facher Vergrößerung. A = Positivkontrolle (B95-8 Zellen), B = BJAB mit Wildtyp-EBV infiziert (nach 24 h), C = B-Lymphozyten mit Wildtyp-EBV infiziert (nach 6 Monaten), D = B-Lymphozyten mit Wildtyp-EBV infiziert (nach 1 Monat), E = Negativkontrolle (BJAB-Zellen)

In Wildtyp-EBV-infizierten BJAB-Zellen wurden EA-D und die EBV-DNase wie auch LMP-1 (nicht dargestellt) 24 h nach der Infektion nicht exprimiert. Auch nach 4 h bzw. 48 h wurde

eine Expression nicht nachgewiesen. Scheinbar werden in dieser Zell-Linie keine viralen Proteine nach der Infektion mit Wildtyp-EBV exprimiert, obwohl virale Transkripte vorhanden sind. Die Expression von EA-D, der DNase und LMP-1 konnte in Wildtyp-EBV-infizierten B-Lymphozyten bis mindestens einem Monat nach der Infektion nachgewiesen werden. Bei 6 Monate kultivierten, Wildtyp-EBV-infizierten B-Zellen konnten diese Proteine nicht mehr nachgewiesen werden, so daß die Expression dieser Gene nach einiger Zeit scheinbar unterbunden wurde. Um dieses näher zu charakterisieren, wurden lange kultivierte Wildtyp-EBV-infizierte Zell-Linien auf virale Genexpression untersucht.

4.9.2. Nachweis von EBV in infizierten Zellkulturen

Um nachzuweisen, ob 6-18 Monate kultivierte, Wildtyp-EBV-infizierte B-Lymphozyten, Akata- und BJAB-Zell-Linien noch EBV positiv sind, wurde DNA aus den infizierten Zellen isoliert (3.12.) und in eine BRLF-1 spezifische PCR (2.4., 3.16.1.) eingesetzt. Die gelelektrophoretische Auftrennung der Reaktionsprodukte ist in Abb. 4.42 dargestellt.

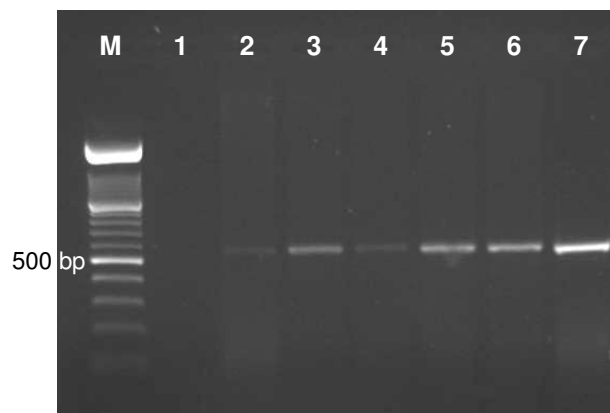


Abb. 4.42: Agarosegelelektrophorese von PCR-Produkten zum Nachweis des BRLF-1 Gens in Wildtyp-EBV-infizierten B-Lymphozyten, Akata- und BJAB-Zellen. M = Marker, 1 = Negativkontrolle, 2 = infizierte B-Lymphozyten nach 6 Monaten, 3 = infizierte B-Lymphozyten nach 18 Monaten, 4 = infizierte Akata-Zellen nach 6 Monaten, 5 = infizierte BJAB-Zellen nach 12 Monaten, 6 = infizierte BJAB-Zellen nach 6 Monaten, 7 = Positivkontrolle

In allen infizierten, für mehrere Monate kultivierten Zellen wurde das BRLF-1 Fragment nachgewiesen. Somit enthalten alle untersuchten Zellkulturen noch EBV-DNA. Diese Kulturen wurden auf lytische und latente Genexpression untersucht.

4.9.3. Nachweis der Expression lytischer Gene

Die EBV-Genom positiven infizierten B-Lymphozyten, Akata- und BJAB-Zellen wurden zunächst auf die Expression der lytischen Gene BZLF-1 und BMRF-1 (3.16.1.) auf Transkriptionsebene untersucht (Abb. 4.43). Alle PCRs wurden als Nested-PCRs durchgeführt.

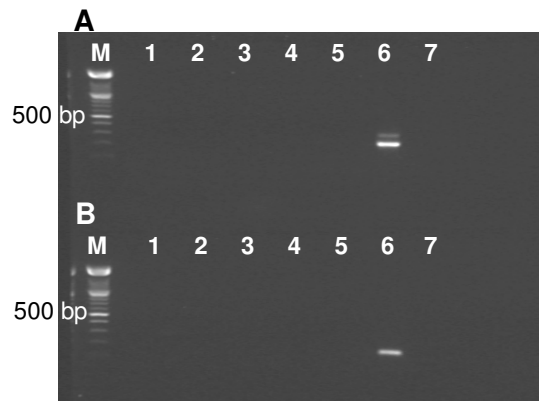


Abb. 4.43: Agarosegelelektrophorese von PCR-Produkten. A: Nachweis der Expression von BZLF-1 in Wildtyp-EBV-infizierten B-Lymphozyten, Akata- und BJAB-Zellen mittels Nested-PCR. B: Nachweis der Expression von BMRF-1 in Wildtyp-EBV-infizierten B-Lymphozyten, Akata- und BJAB-Zellen mittels Nested-PCR. M = 100 bp Marker, 1 = Negativkontrolle, 2 und 3 = infizierte B-Lymphozyten (nach 8 bzw. 18 Monaten), 4 = infizierte Akata-Zellen (nach 6 Monaten), 5 und 6 = infizierte BJAB-Zellen (nach 12 bzw. 6 Monaten), 7 = Positivkontrolle

In keiner der länger als 6 Monaten kultivierten, infizierten Zellen wurden BZLF-1 und BMRF-1 nachgewiesen. Daher ist darauf zu schließen, daß in diesen Zellen der lytische Zyklus nicht durchlaufen wird und somit auch keine Virionen in den Zellkulturüberstand freigesetzt werden.

4.9.4. Nachweis der Expression von Latenzgenen

Da in allen länger kultivierten Zell-Linien keine lytische Replikation stattfand, wurde getestet ob hier ein Latenzstadium etabliert wurde. Hierzu wurde die Expression der latenten virale Gene EBNA-1 (Latenz I-III) und LMP-2 untersucht. Zunächst wurde die Expression des latenten Gens EBNA-1 untersucht, da dieses zur Erhaltung des Episoms in EBV-infizierten Zellen notwendig ist. Das Ergebnis der PCR ist in Abb. 4.44 dargestellt. Weiterhin wurde das Genprodukt von LMP-2A untersucht (Abb. 4.45), da dieses auch in ruhenden, EBV-infizierten B-Lymphozyten *in vivo* nachgewiesen wurde [THORLEY-LAWSON ET AL., 1999]. Der Nachweis viraler Genprodukte auf Transkriptionsebene sollte im IFT bestätigt werden (Abb. 4.46).

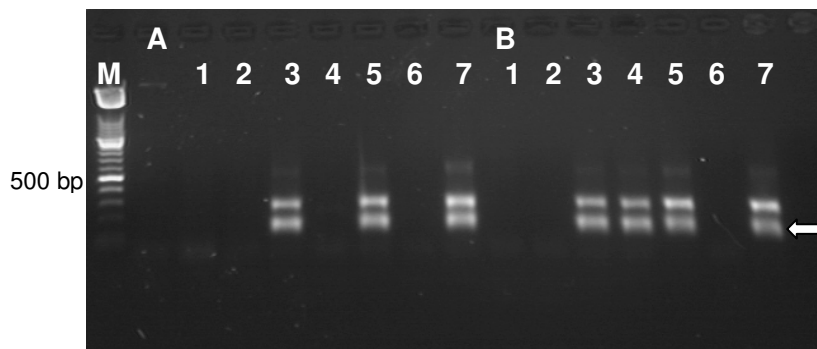


Abb. 4.44: Agarosegelelektrophorese von PCR Produkten zum Nachweis der Expression von EBNA-1 in Wildtyp-EBV-infizierten B-Lymphozyten, Akata- und BJAB-Zellen mittels Nested-RT-PCR. A: EBNA-1 Transkript der Latenz I und II; B: EBNA-1 Transkript der Latenz III; M = 100 bp Marker, 1 = Negativkontrolle, 2 und 3 = infizierte B-Lymphozyten (nach 6 bzw. 18 Monaten), 4 = infizierte Akata-Zellen (nach 6 Monaten), 5 und 6 = infizierte BJAB-Zellen (nach 12 bzw. 6 Monaten), 7 = Positivkontrolle

EBNA-1 wurde nicht in allen Wildtyp-EBV-infizierten Zellkulturen nachgewiesen. In seit 6 Monaten kultivierten B-Lymphozyten und BJAB-Zellen erfolgte kein EBNA-1 Nachweis. Die infizierten Akata-Zellen hingegen wiesen EBNA-1 der Latenz III auf, während die 18 Monate kultivierten B-Zellen und die 12 Monate kultivierten BJAB-Zellen EBNA-1 der Latenz I-III exprimierten.

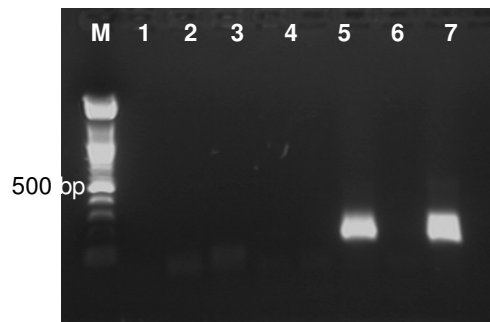


Abb. 4.45: Agarosegelelektrophorese von PCR-Produkten. Nachweis der Expression von LMP-2A in Wildtyp-EBV-infizierten B-Lymphozyten, Akata- und BJAB-Zellen mittels Nested-PCR. M = 100 bp Marker, 1 = Negativkontrolle, 2 und 3 = infizierte B-Lymphozyten (nach 6 bzw. 18 Monaten), 4 = infizierte Akata-Zellen (nach 6 Monaten), 5 und 6 = infizierte BJAB-Zellen (nach 12 bzw. 6 Monaten), 7 = Positivkontrolle

LMP-2 wurde nur in der Positivkontrolle (B95-8 Zellen) und in den seit 12 Monaten kultivierten, Wildtyp-EBV-infizierten BJAB-Zellen nachgewiesen. Diese LMP-2 positiven BJAB-Zellen exprimierten auch das EBNA-1 Gen (Abb. 4.44).

Da EBNA-1 in einigen Zellkulturen auf Transkriptebeine nachgewiesen wurde, sollte die Expression auf Proteinebene mittels IFT bestätigt werden (Abb. 4.46).

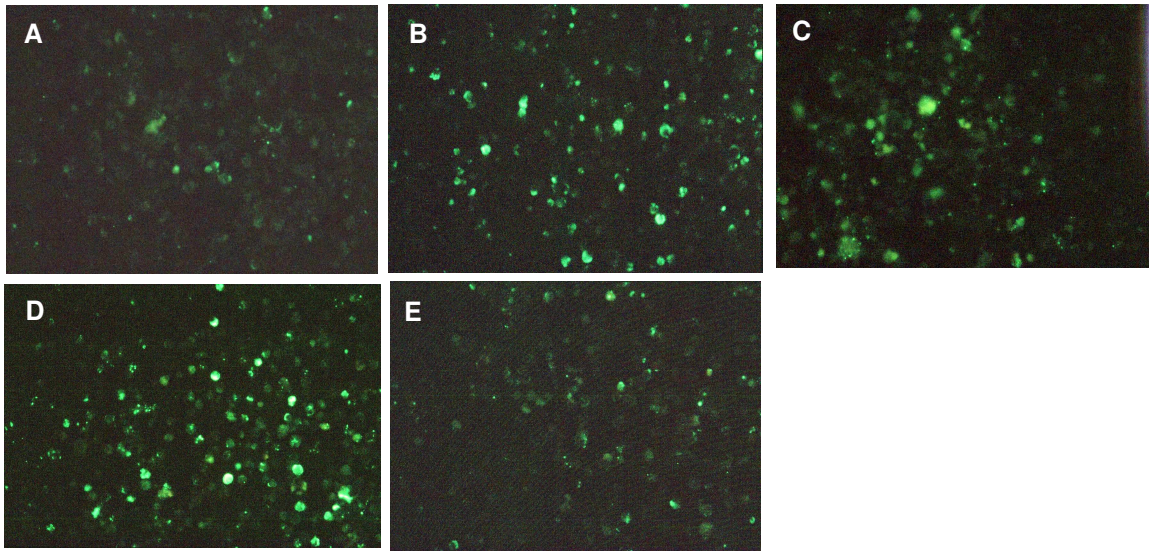


Abb. 4.46: IFT zum Nachweis der EBNA-1 in Wildtyp-EBV-infizierten BJAB-, Akata- und primären B-Zellen in 400-facher Vergrößerung. A = B-Zellen mit Wildtyp-EBV infiziert (nach 6 Monaten), B = B-Zellen mit Wildtyp-EBV infiziert (nach 18 Monaten), C = Akata mit Wildtyp-EBV infiziert (nach 6 Monaten), D = BJAB mit Wildtyp-EBV infiziert (nach 12 Monat), E = BJAB mit Wildtyp-EBV infiziert (nach 6 Monaten)

Im IFT zeigte sich, daß alle Zellkulturen (B, C, D), die in der EBNA-1 PCR (Abb. 4.44) positiv waren, auch das EBNA-1 Protein exprimierten. Offensichtlich ist in diesen Zellen ein Latenzzustand etabliert worden in dem lytische Genexpression nicht stattfindet (4.9.3.).

Die hier erzielten Ergebnisse zeigen, daß permanente Zell-Linien wie Akata und BJAB nach der Infektion mit Wildtyp-EBV zwar lytische und latente virale Transkripte exprimieren (4.5.1., 4.7.1.), jedoch nicht den lytischen Zyklus durchlaufen und nach längerer Zeit in Kultur ein Latenzstadium vom Typ I etablieren, da außer EBNA-1 kein weiteres virales Gen exprimiert wird. Auch mit Wildtyp-EBV-infizierte B-Lymphozyten etablieren nach mehreren Monaten in Kultur ein Latenzstadium. Bei einer Kultivierung bis zu ca. 4 Wochen, wird in diesen Zellen der komplette lytische Zyklus durchlaufen und es werden die Proteine der Latenz III exprimiert.

4.9.5. Infektion von B-Lymphozyten mit Zellkulturüberständen EBV-positiver Zellen

In Wildtyp-EBV-infizierten Akata- und BJAB-Zellen gibt es keinen Hinweis auf lytische Aktivität. Es wurde in einigen dieser Zellkulturen nur das EBNA-1 Protein nachgewiesen (4.9.4.), so daß sich die Zellen scheinbar in einem Latenzzustand befinden und somit keine Virionen freigesetzt werden. In Wildtyp-EBV-infizierten B-Lymphozyten die seit einer Woche bzw. seit einem Monat kultiviert wurden, wurden lytische virale Proteine nachgewiesen.

Diese Zellen scheinen den lytischen Zyklus zu durchlaufen. Es wurde überprüft, ob hierbei auch infektiöse Virionen freigesetzt wurden. Mit sterilfiltrierten Kulturüberständen dieser Zellen wurden B-Lymphozyten EBV-negativer Spender infiziert. Es konnte in wiederholten Versuchen weder virale DNA noch virale Genexpression nachgewiesen werden. Somit werden aus Wildtyp-EBV-infizierten B-Lymphozyten keine infektiösen Virionen freigesetzt, obwohl alle lytischen Gene exprimiert werden.

5. Diskussion

Das EBV ist Verursacher der infektiösen Mononukleose und wird mit der Entstehung von Malignomen in Verbindung gebracht [LIEBOWITZ ET AL., 1993]. Nach der Infektion persistiert das Virus lebenslang in B-Lymphozyten und wird regelmäßig reaktiviert [FARREL, 1995]. Die initialen Schritte der Tumorentstehung sowie Interaktionen zwischen Virus und Wirt sind noch weitgehend unverstanden und erfordern die Analyse EBV-kodierter Gene.

Es bestehen bereits mehrere methodische Ansätze zur Aufklärung der Funktion viraler Gene im Hinblick auf den lytischen Zyklus, die virale Latenz und die Immortalisierungskapazität des EBV. Bisher beziehen sich diese Untersuchungen nur auf EBV-kodierte Gene mit bekannter Funktion oder auf offene Leserahmen des EBV, für deren Genprodukt eine Funktion postuliert wird. Die gezielte Mutagenisierung hat den Nachteil, daß Sequenzen des EBV-Genoms, deren Funktionen nicht bekannt sind, unberücksichtigt bleiben. Sehr wahrscheinlich sind diese Gene für die Initiation des lytischen Zyklus, der Latenz, der Immortalisierung von B-Zellen sowie für die Pathogenese EBV assoziierter Erkrankungen essentiell.

Zur Aufklärung von Genfunktionen des EBV wurden in dieser Arbeit verschiedene EBV-Mutanten mittels Transposonmutagenese aus dem Bank-Klon 219 generiert und charakterisiert.

5.1. Absättigung von EBV-Subklonen mit Transposoninsertionen

In der Arbeitsgruppe PAVIAN (Pathogenese viral induzierter Autoimmunerkrankungen und Neoplasien) ist ein Konzept entwickelt worden, mittels Transposonmutagenese eine ungezielte Mutagenese des gesamten EBV-Genoms durchzuführen. Auf diese Weise muß nicht jede Mutation gezielt über spezifische Plasmidkonstruktionen eingebracht werden, sondern es können alle Bereiche des EBV-Genoms, auch nicht charakterisierte Genbereiche, gleichmäßig mutagenisiert werden.

Vorteile des hier verwendeten transponierbaren Elements, eines Derivats des Transposons Tn5, bestehen einerseits darin, daß die Integration in der Regel nur einmal in die Ziel-DNA erfolgt [DE BRUIJN ET AL., 1984]. Andererseits kann die Selektion der Mutanten leicht über die transposonkodierten Antibiotikaresistenzen erfolgen. Darüber hinaus sind die Mutationen in Abwesenheit einer aktiven Transposase aufgrund einer Insertion von einigen Kilobasen sehr stabil [HERRERO ET AL., 1990].

Eine EBV-Bank auf Cosmidbasis wurde konstruiert, in der jedes Cosmid ein ca. 25-35 kb großes EBV-Fragment enthält [Sözer, 1999]. Mittels des erwähnten Transposonmutagenesystems wurde begonnen die einzelnen Bank-Klone und somit das komplette EBV-Genom nach und nach mit Mutationen abzusättigen [De Graaf, 2000]. Die mutierten Klone wurden sequenziert, um den Insertionsort des Transposons zu bestimmen. Im Verlauf der fortschreitenden Mutagenisierung wurden einige Bereiche mehrfach mutagenisiert, andere hingegen gar nicht. Damit nicht jeder neu mutagenisierte Klon sequenziert werden mußte, sollte ein Verfahren entwickelt werden, daß eine effiziente Vorauswahl der zu sequenzierenden Klone erlaubt, um die nicht mutagenisierten Regionen möglichst einfach mit Mutationen abzusättigen. Hierzu wurden PCRs etabliert, in denen die Primer größere, nicht mutierte Sequenzbereiche umschließen. Entstanden durch die Amplifikation mutagenisierter Klone Produkte, die um die Länge des transponierbaren Elements größer waren, als der von den jeweiligen Primern umschlossene Sequenzbereich bzw. fand keine Amplifikation statt, konnte davon ausgegangen werden, daß das transponierbare Element in den entsprechenden Sequenzbereich integriert wurde. Wurde hingegen ein Fragment amplifiziert, das die Größe des ausgewählten Sequenzbereichs hatte, konnte man die Integration des transponierbaren Elements in diesen Bereich ausschließen. Diese Methode erlaubt somit eine schnelle Vorauswahl zur Auffindung der gesuchten Mutanten-Klone mit einfachen Mitteln, so daß nicht jeder mutierte Klon sequenziert werden muß.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden mit diesem Verfahren vier weitere Mutanten-Klone des Bank-Klons 219 gefunden, die eine Transposonintegration in bisher integrationsfreien Sequenzabschnitten aufwiesen.

5.2. Generierung rekombinanter Virionen

Die Insertionsmutationen der mutierten Bank-Klone mußten in komplette EBV-Virionen übertragen werden, um Aussagen über das Verhalten der Mutanten im Vergleich zu Wildtyp-Virionen zu erhalten. Da beiderseits des transponierbaren Elements Wildtyp-EBV-Sequenzen vorhanden waren, bot sich hier zur Generierung von Virionen mit nur einer Mutation das Prinzip der homologen Rekombination an. Hierzu ist ein *doppeltes Crossover* erforderlich [TOMKINSON ET AL., 1992]. Um eine große Rekombinationseffizienz zu erreichen, müssen die Transposon-flankierenden Sequenzen mindestens 5 kb lang sein [LEE ET AL., 1992]. Die nicht-homologe Sequenz des transponierbaren Elements, welche von ausreichend langen EBV-Sequenzen auf dem Cosmid flankiert wird, kann so durch zwei *Crossover*-Ereignisse homolog in das EBV-Genom integriert werden. Das Transposon wird somit

exakt an der Stelle in die Wildtyp-DNA integriert, an der es im mutierten Bank-Klon inseriert war.

Zur homologen Rekombination mit Wildtyp-Virionen wurden nur Mutanten-Klone ausgewählt, deren Transposoninsertion mindestens 5 kb vom Ende der im Klon vorliegenden EBV-Sequenz entfernt lagen. Die mutierten Bank-Klone wurden in B95-8 Zellen transfiziert. Als schonende Methode bot sich die Endozytose mittels *SuperFect*[®] an, einem Transfektionsreagenz auf Dendrimerbasis. Um eine hohe Transfektions- bzw. maximale Rekombinationseffizienz zu erzielen, mußte das Verhältnis von DNA zu *SuperFect*[®] optimiert werden. In wiederholten Versuchen konnte jedoch kein reproduzierbares Optimum gefunden werden. Die Rekombination ist ein sehr seltenes, zufälliges Ereignis. In der Literatur variieren die Angaben über Rekombinationshäufigkeiten von 2×10^{-3} bis zu $1,7 \times 10^{-7}$ [HANIN ET AL., 2001; ST-ONGE ET AL., 1993]. Da auch eine optimale Transfektion keinen Einfluß auf die Rekombinationsrate hatte, wurden in jedem Transfektionsansatz unterschiedliche Verhältnisse von DNA zu *SuperFect*[®] eingesetzt.

Es ist davon auszugehen, daß in die Überstände der transfizierten B95-8 Zellen ein Gemisch aus Wildtyp- und Mutanten-Virionen mit starkem Überschuß an Wildtyp-EBV freigesetzt wird, die voneinander getrennt werden müssen. Es wurden Raji-Zellen mit den Überständen der transfizierten B95-8 Zellkulturen superinfiziert und mit EBV-Mutanten infizierte Zellen mittels Puromycin selektiert. Raji-Zellen sind geeignet, da sie:

1. EBV-Genome enthalten, die aufgrund von Deletionen nicht den lytischen Zyklus komplett durchlaufen können und daher keine Virionen freisetzen. Da einige virale Proteine in den Raji-Zellen exprimiert werden, können Defekt-Mutanten kompensiert werden. Es ist somit möglich, daß auch Letal-Mutanten überlebensfähig ausgestattet werden und Nachkommen freisetzen. Dieses wäre in EBV-negativen Zellen nicht möglich.
2. nach Superinfektion mit EBV-Virionen aus der Zell-Linie HRI mehr Virionen produzieren als es durch Aktivierung des Virus in HRI-Zellkultur möglich wäre [TANAKA ET AL., 1976]. Durch die seltenen Rekombinationsereignisse werden nur geringe Mengen an Mutanten-Virionen in den Transfektionsüberständen erwartet. Werden Raji-Zellen superinfiziert, können vermehrt Mutanten-Virionen freigesetzt werden.

Überstände superinfizierter und selektionierter Raji-Zellen wurden mittels PCR auf rekombinante Virionen und Mutanten-Klon-Kontaminationen untersucht. Eine Kontamination mit Wildtyp-EBV konnte zu diesem Zeitpunkt noch nicht ausgeschlossen werden. Eine Amplifikationsreaktion (Ausschluß-PCR) mit mutantenspezifischen Primern, die links und rechts neben dem Insertionsort des Transposons positioniert sind, führt bei DNA aus EBV-Mutan-

ten oder Mutanten-Klonen als Matrize zu keinem Produkt. DNA aus Wildtyp-EBV als Template wird amplifiziert, ebenso wie DNA aus lysierten Raji-Zellen. Letzteres führt zu falsch positiven Ergebnissen. Ein eindeutiger Ausschluß einer Wildtypkontamination kann somit erst nach der Infektion von EBV-negativen Zellen erfolgen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Insertionsmutanten in denen die Leseraster BGLF-5 (alkalische EBV-DNase), BDLF-2 und BGLF-2 betroffen sind mittels homologer Rekombination generiert und im Weiteren charakterisiert.

5.3. Charakterisierung der BGLF-2-Mutante

Anhand der BGLF-2-Mutante wurde die Etablierung des Transposonmutagenesesystems gezeigt. Durch eine neu entwickelte Methode zum Auffinden von noch nicht mit transponierbaren Elementen inserierten Bereichen, wurde diese Mutante selektiert.

Die Funktion von BGLF-2 ist nicht bekannt. Wird die späte virale Transkription durch Phosphonoessigsäure (PAA) inhibiert, wird BGLF-2 nicht mehr transkribiert. Dieses weist darauf hin, daß es sich bei dem Genprodukt von BGLF-2 um ein spätes Protein, möglicherweise ein Strukturprotein handelt. Weiterhin reagieren Seren von EBV-infizierten Personen mit einem *in vitro* translatierten BGLF-2 Protein. Somit existiert nicht nur ein BGLF-2 Transkript, sondern auch das dazugehörige Protein [CHEN ET AL., 1991]. Eine Homologie des BGLF-2 Proteins zu bekannten Proteinen wurde nicht gefunden, jedoch besteht eine 20 %ige Übereinstimmung auf DNA-Ebene zum UL 16 Leserahmen des HSV-1 [CHEN ET AL., 1991]. Es wird vermutet, daß das UL 16 Protein eine Rolle bei der Capsidreifung, DNA-Verpackung und -Spaltung spielt [OSHIMA ET AL., 1998].

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß eine Infektion von B-Lymphozyten durch BGLF-2-Mutanten nicht mehr möglich ist. Zwar wurden Mutanten-Virionen mittels PCR mit DNA infizierter B-Zellen als Template nachgewiesen, jedoch konnte hierdurch nicht bestimmt werden, ob sich die Virionen in den B-Zellen befanden oder nur an der Zelloberfläche angelagert waren. Da eine virale Genexpression nicht nachgewiesen wurde, ist eine erfolgreiche Infektion auszuschließen. Die BGLF-2-Mutante wurde aufgrund fehlender viraler Genexpression und einer unzureichenden Infektiosität nicht weiter analysiert.

5.4. Charakterisierung der BGLF-5-Mutante

Das Genprodukt von BGLF-5, die alkalische EBV-DNase, hat Endo- und Exonukleaseaktivität und akzeptiert einzel-, wie doppelsträngige DNA als Substrat [LIU ET AL., 1998A]. Das Enzym entfaltet seine optimale Aktivität bei einem alkalischen pH-Wert in Anwesenheit divalenter Kationen [STOLZENBERG ET AL., 1990]. Bei Patienten mit Nasopharynxkarzinomen wurden im Vergleich zu gesunden, EBV-positiven Individuen und Patienten mit Burkitt-Lymphomen vermehrt Antikörper gegen die EBV-DNase gefunden [BAYLIS ET AL., 1989]. Mit Fortschreiten des Tumors steigen die Antikörperwerte gegen die DNase an [LIU ET AL., 1998A]. Es wurden Transkripte und auch das Protein der EBV-DNase in Biopsaten von Nasopharynxkarzinomen gefunden [SBIH-LAMMALI ET AL., 1996]. Da aber neben den hier normalerweise exprimierten, latenten Genen wie EBNA-1, LMP-1 und -2 auch die Proteine BZLF-1, EA-D und EA-R nachgewiesen wurden, ist darauf zu schließen, daß in Nasopharynxkarzinomen auch der lytische Zyklus ablaufen kann [SBIH-LAMMALI ET AL., 1996]. Weiterhin verläuft die Expressionskinetik des frühen Genprodukts von BMRF-1 (EA-D) parallel zu der der DNase und der DNA-Polymerase [DAIBATA ET AL., 1993]. Dieses sind Hinweise auf die Funktion der DNase während des lytischen Zyklus. Welche Aufgaben zu welchem Zeitpunkt die DNase hat, ist nicht genau bekannt. In Abb. 5.1 sind schematisch einige mögliche Ziele und Funktionen dieses Enzyms dargestellt.

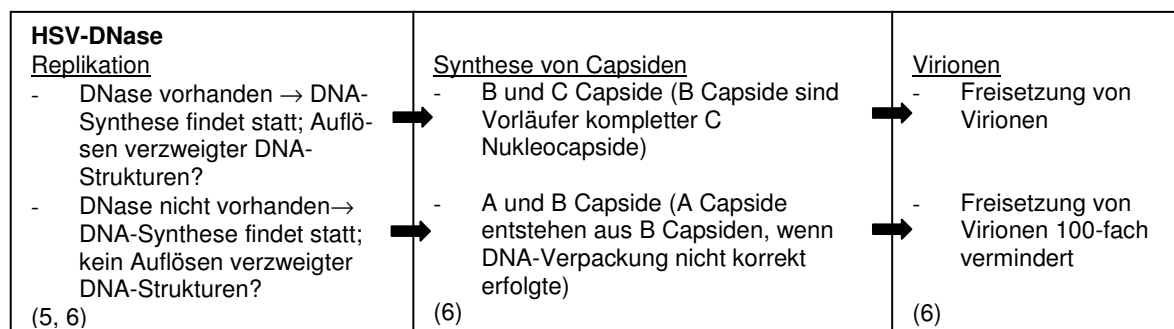
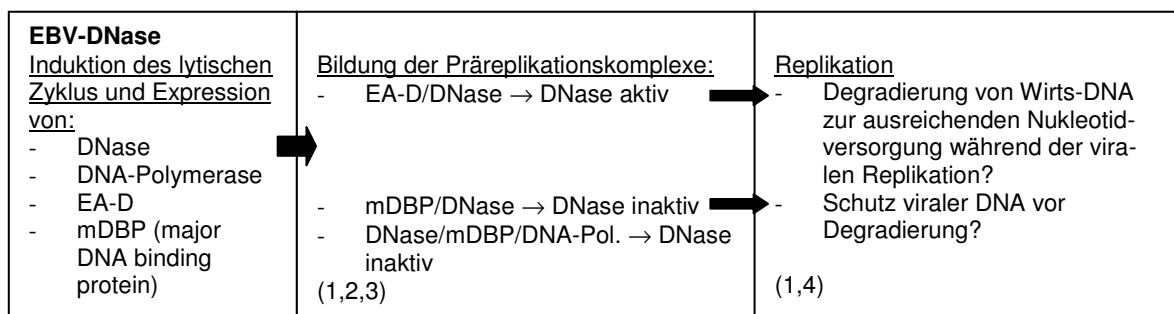


Abb. 5.1: Mögliche Ziele und Funktionen der EBV- und HSV-DNase.

1 ZENG ET AL., 1997; 2 LIN ET AL., 1995; 3 LIU ET AL., 1998A; 4 LIU ET AL., 1998B; 5 MARTINEZ ET AL., 1996; 6 SHAO ET AL., 1993

In dieser Arbeit wurden die Auswirkungen der Mutation des EBV BGLF-5 Gens auf die Infektiosität der Virionen, die virale Genexpression und die Induktion von Zelloberflächenantigenen untersucht.

Virale Genexpression

Zur Charakterisierung des Mutantenphänotyps wurden B-Lymphozyten EBV-negativer Spender und BJAB-Zellen mit EBV-BGLF-5⁻ infiziert und das virale Expressionsmuster im Vergleich zu Wildtyp-EBV infizierten B-Zellen bzw. BJAB-Zellen untersucht.

Analysiert wurden folgende virale Gene:

BZLF-1

Das Genprodukt des *immediate early* Gens BZLF-1 ist alleine in den meisten Zell-Linien oft ausreichend, um den lytischen Zyklus zu induzieren [DARR ET AL., 2001]. Für eine komplette lytische Replikation ist jedoch auch der Transaktivator BRLF-1 notwendig [FEEDERLE ET AL., 2000]. In Raji-Zellen ist die Expression von BZLF-1 zur Induktion des lytischen Zyklus essentiell. Das BZLF-1 kodierte Protein Zta bindet hierbei direkt an AP-1 Motive, die in vielen frühen EBV-Promotoren vorhanden sind und aktiviert die dazugehörigen EBV-Gene, wie BRLF-1, BMRF-1 und BHRF-1 [DARR ET AL., 2001; RAGOCZY ET AL., 1999]. BZLF-1 kann auch durch BRLF-1 sowie durch sich selbst aktiviert werden [ADAMSON ET AL., 2000; RAGOCZY ET AL., 1999].

BRLF-1

BRLF-1 gehört ebenfalls zu den *immediate early* Genen und kann in Epithelzellen und HH514-16 Zellen, einem Subklon der Zell-Linie P3JHR-1, alleine den lytischen Zyklus induzieren [ZALANI ET AL., 1996; RAGOCZY ET AL., 1998]. So werden BZLF-1 und in geringen Maßen auch BMRF-1 und BRLF-1 aktiviert [RAGOCZY ET AL., 1999]. In Raji-Zellen kann BRLF-1 jedoch nicht den Latenzzustand unterbrechen, da es hier BZLF-1 nicht induzieren kann [DARR ET AL., 2001]. Notwendig ist BRLF-1 für die Induktion des späten Gens BLRF-2 und des Oberflächenproteins gp350 [RAGOCZY ET AL., 1999; FEEDERLE ET AL., 2000]. Weiterhin wurde gezeigt, daß BRLF-1 in lymphoblastoiden Zellen (EBV-infizierte primäre B-Zellen) eine stärkere Aktivierung früher lytischer Gene zuzuschreiben ist als BZLF-1, während BRLF-1 in Burkitt-Lymphom-Zellen (Akata- und Raji-Zellen) keinen Effekt auf die Initiation lytischer Gene hat [BOGEDAIN ET AL., 1994].

BMRF-1 (EA-D)

BMRF-1 gehört zu den frühen Genen, wird durch BZLF-1 aktiviert und reguliert negativ seine eigene Transkription [ZHANG ET AL., 1996]. Für die virale Replikation ist BMRF-1 notwendig, da es zum Replikationskomplex gehört und die DNA-Polymerase aktiviert [ZENG ET

AL., 1997]. Neben Komplexbildungen mit der Polymerase existiert es auch in Verbindungen mit der DNase [DAIBATA ET AL., 1993].

BHRF-1

BHRF-1 gehört zu den früh exprimierten lytischen Genen, wurde aber auch in latent infizierten Zellen nachgewiesen [LIEBOWITZ ET AL., 1993]. Es ist funktionell homolog zu dem Onkogen Bcl-2 und kann Zellen vor Apoptose schützen, ist aber weder für die *in-vitro*-Transformation von B-Zellen noch für die lytische Replikation essentiell [DAWSON ET AL., 1995].

EBNA-1

EBNA-1 ist zur Aufrechterhaltung des episomalen EBV-Genoms in latent infizierten B-Zellen essentiell und wird durch EBNA-2 initiiert [THORLEY-LAWSON ET AL., 1999]. Nach der Infektion von B-Zellen mit Wildtyp-EBV wird EBNA-1, wie auch alle anderen EBNAs, vom Wp und später vom Cp Promotor transkribiert [LIEBOWITZ ET AL., 1993]. In den Latenzstadien I und II erfolgt die Transkription EBNA-2 unabhängig vom Qp Promotor [SALAMON ET AL., 2001; KÜPPERS, 2003]. Bei Patienten mit akuter infektiöser Mononukleose wurden beide EBNA-1 Transkripte, vom Qp und vom Wp/Cp Promotor nachgewiesen [TIERNEY ET AL., 1994]. Vermutlich wird der Qp Promotor aktiviert, wenn infizierte B-Zellen von Latenz III in den lytischen Zyklus übergehen [LEAR ET AL., 1992].

EBNA-2

EBNA-2 wird zuerst nach der Infektion von B-Lymphozyten mit Wildtyp-EBV exprimiert und initiiert danach die Expression aller anderen EBNAs und zuletzt die von LMP-1 und -2 [RING, 1994]. Eine EBNA-2 unabhängige Expression von EBNA-1, LMP-1 und -2 wird in der Latenzphase II bei Nasopharynxkarzinomen und Hodgkin-Lymphomen beobachtet [DOLCETTI ET AL., 2003].

EBNA-3A-C

Die Expression der EBNA-3 Familie wird nach der Infektion von B-Zellen durch EBNA-2 initiiert [RING, 1994]. Eine EBNA-2 unabhängige Expression wurde in einigen Burkitt-Lymphom-Zell-Linien nach der Infektion mit den EBNA-2 deletierten Virionen aus P3HR-1-Zellen nachgewiesen [MURRAY ET AL., 1988]. Welche genauen Funktionen die EBNA-3-Proteine haben, ist noch nicht eindeutig geklärt. Wahrscheinlich sind es Transkriptionsregulatoren. EBNA-3A und -3C sind essentiell für die *in-vitro*-Immortalisierung von B-Lymphozyten. EBNA-3C wird eine induzierende Wirkung auf die LMP-1 und CD21 Expression nachgesagt, während EBNA-3B die Expression von CD40 fördert [YOUNG ET AL., 2003].

LMP-1

LMP-1 verhält sich wie ein klassisches Onkogen und ist für die *in-vitro*-Transformation von B-Lymphozyten notwendig. Es induziert die Zelloberflächenadhäsionsmoleküle und das an-

tiapoptotische Protein Bcl-2 [YOUNG ET AL., 2003]. Wahrscheinlich verhält sich LMP-1 wie der aktivierte Rezeptor CD40 der TNFR (Tumor Nekrose Faktor) Familie, welcher als ein Signal für T-Helferzellen dient, um das Überleben und die Differenzierung der B-Zellen zu sichern [GIRES ET AL., 1997; BABCOCK ET AL., 1998]. Die Expression von LMP-1 ist in der Regel EBNA-2 abhängig, kann aber in der Latenz II auch EBNA-2 unabhängig exprimiert werden [DOLCETTI ET AL., 2003] .

LMP-2

Zur Expression von LMP-2 im Latenzstadium III ist der Transaktivator EBNA-2 notwendig, während LMP-2 in der Latenz II EBNA-2 unabhängig exprimiert wird [KÜPPERS, 2003]. LMP-2 imitiert den B-Zell-Rezeptor und kann so die Proliferation und das Überleben von B-Zellen induzieren [BABCOCK ET AL., 2000]. Für die *in-vitro*-Immortalisierung von B-Lymphozyten ist LMP-2 nicht notwendig [HUMME ET AL., 2003].

Nach der Infektion von B-Lymphozyten mit BGLF-5-Mutanten wurden nicht alle viralen Gene exprimiert. Aus der Gruppe der lytischen Gene wurden BMRF-1 und BHRF-1 zwei Tage nach der Infektion nachgewiesen, BRLF-1 nach zwei und sieben Tagen, während die BZLF-1 Expression extrem eingeschränkt war. Die Expression dieses Gens wurde hier nach 24 Stunden nachgewiesen und war nach 48 Stunden nicht mehr meßbar.

Wie der lytische Zyklus im Fall der BGLF-5-Mutante fast ohne BZLF-1, nur über BRLF-1 initiiert wurde, ist nicht klar. Möglicherweise reichte die kurzzeitige Expression von BZLF-1 24 Stunden nach der Infektion aus, um nach zwei Tagen zusammen mit BRLF-1 BMRF-1 und BHRF-1 zu aktivieren. Denn zur effizienten Expression dieser beiden Gene werden sowohl BZLF-1 als auch BRLF-1 benötigt [RAGOCZY ET AL., 1999]. Der Einfluß von BZLF-1 scheint sieben Tage nach der Infektion nicht mehr vorhanden zu sein. Zu diesem Zeitpunkt wurde nur noch BRLF-1 und kein anderes virales Gen nachgewiesen. Scheinbar wurde nur noch die BRLF-1 Transkription durch sich selbst aktiviert [RAGOCZY ET AL., 1999]. Die Expression von BZLF-1 und anderen lytischen Genen wurde aber nicht durch BRLF-1 alleine beeinflusst. Das Fehlen des BGLF-5 Gens scheint einen Einfluß auf die Expression des lytischen Aktivators BZLF-1, jedoch nicht auf die von BRLF-1 zu haben.

Bei Untersuchungen zu Expressionskinetiken von BZLF-1, BRLF-1 und der DNase nach der Infektion von BJAB-Zellen mit Wildtyp-EBV zeigte sich, daß BZLF-1 und BRLF-1 parallel exprimiert wurden. Beide Transkripte wurden ca. 30 Minuten nach der Infektion nachgewiesen und erreichten ihr Expressionsmaximum zwei Stunden nach der Infektion. In primären B-Lymphozyten konnte BZLF-1 jedoch erst zwei Stunden nach der Infektion mit Wildtyp-EBV nachgewiesen werden. Aufgrund der limitierten Menge zur Verfügung stehender B-Lymphozyten sind auch nur kleine Mengen an mRNA zu erwarten. Geringe Mengen ex-

primierter BZLF-1 mRNA könnten hier bei der RNA-Isolierung verlorengegangen sein, so daß ein Nachweis erst nach zwei Stunden möglich war. Dieses Problem ergibt sich auch bei den mit Mutanten infizierten B-Zellen, nur ist hier auch bei der Infektion der B-Zellen die Menge an Mutantenvirionen wesentlich geringer als bei den Infektionen mit Wildtyp-Virionen. In EBV-BGLF-5⁻ infizierten B-Lymphozyten wurde BZLF-1 erst 24 Stunden nach der Infektion nachgewiesen. Wie auch immer diese unterschiedlichen Expressionszeitpunkte erklärbar sind, steht dennoch fest, daß die EBV-DNase eine Stunde nach Infektion von BJAB-Zellen mit Wildtyp-EBV exprimiert wird, also nur wenig später als BZLF-1. Frühe Einflüsse der DNase auf die folgende Expression von BZLF-1 und auch anderer früher EBV-Gene sind demnach denkbar, da durch das Fehlen der DNase die BZLF-1 Expression frühzeitig unterbunden wird. Durch das spätere Fehlen von BZLF-1 wird der lytische Zyklus nicht mehr initiiert und es werden auch keine Virionen freigesetzt (Abb. 5.3). Wurden EBV-negative B-Lymphozyten mit Überständen BGLF-5-Mutanten infizierter B-Zellen infiziert, konnte hier keine Infektion mehr nachgewiesen werden. Aber auch nach der Infektion von primären B-Zellen mit Wildtyp-EBV wurden keine Virionen freigesetzt, obwohl hier alle lytischen Gene exprimiert wurden. Da jedoch kein geeigneteres Zellmodell zur Verfügung stand, wurden weiterhin Untersuchungen an primären B-Zellen durchgeführt. Mögliche Zellmodelle werden im Weiteren diskutiert (5.8.).

Neben dem Einfluß auf die Expression lytischer Gene, beeinflusst BGLF-5 auch den Eintritt in den Latenzzustand. Die BGLF-5-Mutante exprimierte nicht alle Latenzgene EBNA-2, EBNA-3A, EBNA-3C und LMP-1, die zur Immortalisierung von B-Lymphozyten *in vitro* essentiell sind [HUMME ET AL., 2003]. Zwei Tage nach der Infektion von B-Lymphozyten mit BGLF-5-Mutanten wurden EBNA-1, LMP-1 und LMP-2 exprimiert. Danach wurde die Expression der Latenzgene abgebrochen. Dieses Expressionsmuster ist untypisch für eine EBV-Infektion von primären B-Lymphozyten, die normalerweise nach der Infektion *in vitro* zu lymphoblastoiden Zell-Linien heranwachsen und die viralen Gene der Latenz III exprimieren [Ooka, 1985; Tab. 1.1]. Das nachgewiesene EBNA-1 Transkript entspricht dem der Latenz I und II, welches vom Qp Promotor initiiert wird. Da aber auch LMP-1 und -2 exprimiert wurden, wurde nach der Infektion von B-Lymphozyten mit BGLF-5-Mutanten scheinbar kurzfristig die Latenz vom Typ II induziert. In diesem Stadium können LMP-1 und LMP-2 EBNA-2 unabhängig transkribiert werden. Bekanntlich befindet sich das EBV in Nasopharynxkarzinomen im Latenzstadium II. Ein Latenz II artiger Zustand wird wahrscheinlich auch *in vivo* in Zentrozyten durchlaufen, wenn diese aus EBV-positiven Zentroblasten differenzieren (Abb. 5.2).

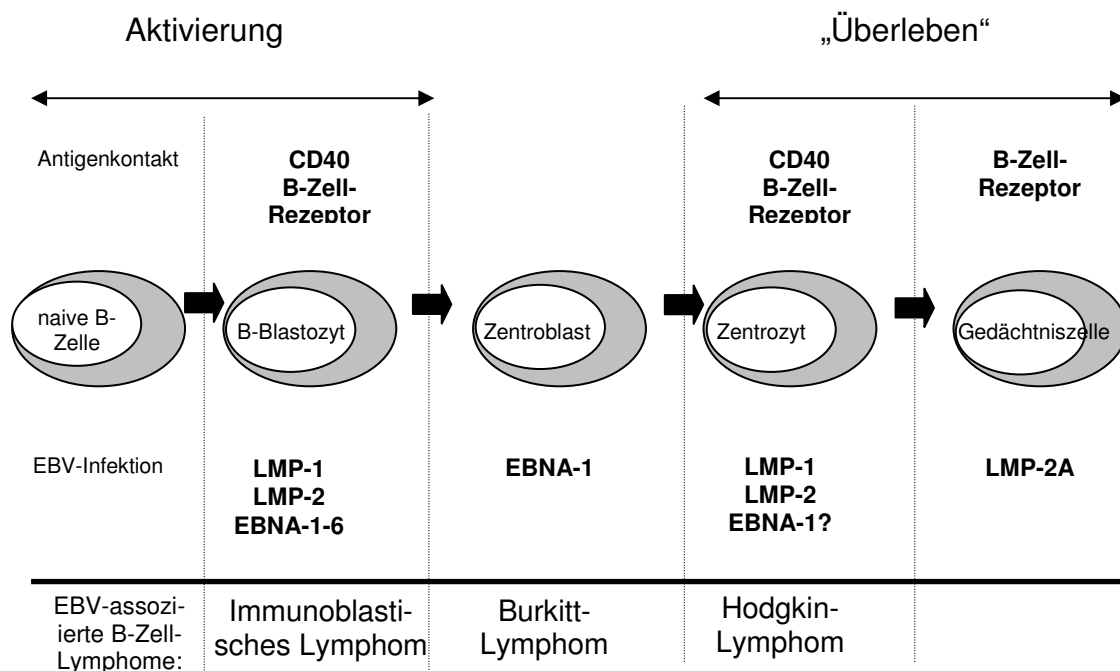


Abb. 5.2: Reaktion von B-Zellen nach EBV- und nach Antigen-abhängiger Aktivierung und Differenzierung. Aktivierungsmarker bzw. virale Proteine, die diesen Prozeß fördern sind für normale B-Zellen oben und für EBV-infizierte Zellen unten abgebildet. (Abb. nach Thorley-Lawson et al., 1999)

In EBV-positiven Zentrozyten werden LMP-1 und LMP-2 exprimiert, um die Apoptose in den Zellen zu unterbinden. Hierbei initiiert LMP-1 das CD40 Molekül, welches als Signal für T-Helferzellen dient, um die Proliferation und das Überleben der B-Zellen zu sichern. LMP-2A fungiert wie der B-Zell-Rezeptor, der sein spezifisches Antigen gebunden hat. Durch den B-Zell-Rezeptor wird einerseits die humorale Immunantwort ausgelöst, wodurch B-Zellen zu Antikörper-sezernierenden Plasmazellen differenzieren, andererseits wird dieses Signal für das Überleben von Gedächtniszellen benötigt. B-Lymphozyten in denen LMP-1 und LMP-2 exprimiert werden, können somit zur Gedächtniszelle differenzieren und überleben [THORLEY-LAWSON ET AL., 1999; BABCOCK ET AL., 2000]. Da BGLF-5-Mutanten EBNA-2 nicht exprimieren und dadurch nicht in die Latenz III übergehen können, versuchen sie möglicherweise durch die Expression der viralen Latenzgene vom Typ II ihr Überleben in B-Zellen zu sichern.

Die Infektion von primären B-Zellen mit Wildtyp-Virionen führte zur Induktion des lytischen Zyklus und zur Etablierung der Latenz III mit Immortalisierung der Zellen. Alle hier untersuchten Latenzgene (EBNA-1, -2, -3A-C, LMP-1, -2) wurden exprimiert. Neben EBNA-1 Transkripten der Latenz III waren auch die der Latenz I und II nachweisbar. Es scheint, daß in Wildtyp-EBV infizierten B-Zellen alle viralen Expressionsmuster gleichzeitig aktiviert wurden: der lytische Zyklus und die Latenzstadien I-III. Auch bei Patienten mit akuter infektiö-

ser Mononukleose wurden EBNA-1 Transkripte der Latenz I-III nachgewiesen [TIERNEY ET AL., 1994]. Gehen infizierte B-Zellen vom Latenzstadium III in den lytischen Zyklus über, wird wahrscheinlich der Qp Promotor aktiviert und es entstehen EBNA-1 Transkripte der Latenz I und II [LEAR ET AL., 1992]. Dieses würde eine gleichzeitige Expression der EBNA-1 Isoformen aller drei Latenzstadien in Wildtyp-EBV infizierten B-Zellen erklären.

Neben primären B-Zellen wurden auch BJAB-Zellen mit BGLF-5-Mutanten infiziert. Diese exprimierten nur noch BRLF-1. Das Expressionsmuster auf Transkriptebene Wildtyp-Virionen infizierter BJAB-Zellen entsprach dem Wildtyp-EBV-infizierter primärer B-Zellen: alle untersuchten viralen Gene wurden nachgewiesen. Merkwürdigerweise wurden aber die viralen Proteine EA-D und LMP-1 im IFT nicht detektiert. Untersuchungen zur viralen Genexpression in Wildtyp-EBV infizierten BJAB-Zellen werden in 5.8. diskutiert.

Morphologie und Oberflächenantigenexpression

EBV-infizierte Lymphozyten beginnen nach zwei Tagen in Kultur zu proliferieren und Zellaggregate zu bilden [TAKADA ET AL., 1979]. Weiterhin exprimieren infizierte B-Lymphozyten und lymphoblastoide Zell-Linien vermehrt die Adhäsionsmoleküle CD11a (LFA-1), CD54 (ICAM-1) und CD58 (LFA-3) sowie die B-Lymphozyten Aktivierungsmarker CD23, CD30, CD40 und CD44 [KILGER ET AL., 1998; KRYWORUCKHO ET AL., 1995; YOUNG ET AL., 2003].

Nach der Infektion von primären B-Zellen mit BGLF-5-Mutanten wurde keine vermehrte Oberflächenproteinexpression nachgewiesen (Abb. 5.3). Die Zellen bildeten auch keine Zellaggregate und proliferierten nicht.

LMP-1 steigert die Expression von CD11a, CD54 und CD58, die Voraussetzung für die Bildung von Zellaggregaten sind [ROCHFORD ET AL., 1993; ZEIDLER ET AL., 1996]. EBNA-2 ist für die Expression von CD44 notwendig [KRYWORUCKHO ET AL., 1995] und induziert zusammen mit LMP-1 CD23 [CALENDER ET AL., 1990]. Da EBNA-2 nach der Infektion von B-Lymphozyten mit BGLF-5-Mutanten nicht exprimiert wird, kann es auch nicht zur Expression der Aktivierungsmarker CD23 und CD44 kommen. Fraglich ist jedoch, warum trotz LMP-1 Expression CD11a, CD54 und CD58 nicht gebildet wurden. Durch die Infektion mit BGLF-5-Mutanten werden B-Lymphozyten nicht zu einer lymphoblastoiden Zell-Linie transformiert. Wird in lymphoblastoiden Zellen die EBNA-2 Expression unterbunden, nehmen die Zellen den *in-vivo*-Phänotyp von Burkitt-Lymphom-Zellen an und bilden vermehrt Differenzierungsmarker CD10, CD38 und CD77. Aktivierungs- und Adhäsionsmoleküle wie CD23, CD44, CD54 und CD58 werden nicht mehr exprimiert [POLACK ET AL., 1996]. Aber auch in EBV-infizierten Zentroblasten und Zentrozyten, die phänotypisch mit Burkitt-Lymphom- bzw. Hodgkin-Lymphom-Zellen vergleichbar sind, werden Aktivierungs- und Adhäsionsmoleküle herunter reguliert [THORLEY-LAWSON ET AL., 1999]. Das Fehlen einer vermehrten Expression

dieser Moleküle in BGLF-5-Mutanten infizierte B-Zellen ist möglicherweise darauf zurückzuführen, daß diese Zellen ein Zentrozyten-ähnliches Stadium durchlaufen.

Fazit

Anhand einer BGLF-5-Mutante konnte gezeigt werden, daß die EBV-DNase zur Aufrechterhaltung des lytischen Zyklus ebenso essentiell ist wie für die Etablierung der Latenz. Mit BGLF-5-Mutanten infizierte B-Zellen proliferieren nicht, werden nicht immortalisiert und exprimieren nicht vermehrt Oberflächenproteine, die für eine EBV-Infektion typisch sind. Da kein geeignetes Zellmodell zur Verfügung stand, konnte nicht festgestellt werden, ob Viren nach der Infektion mit BGLF-5-Mutanten freigesetzt wurden. In Abb. 5.3 sind Veränderungen und mögliche Auswirkungen im Infektionszyklus des EBV durch die BGLF-5-Mutante hinsichtlich viraler Genexpression und Oberflächenantigenexpression zusammenfassend dargestellt.

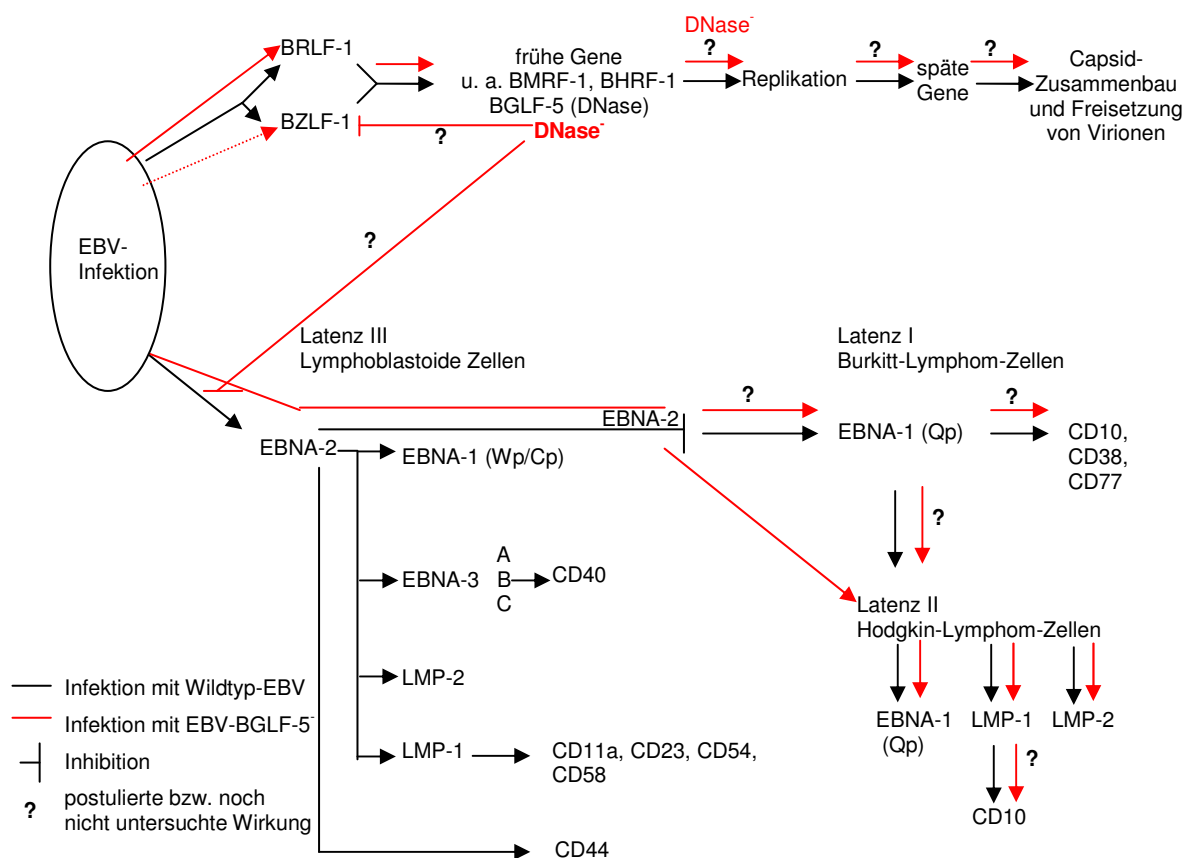


Abb. 5.3: Einfluß der BGLF-5-Mutation auf den Infektionszyklus des EBV im Vergleich zur Wildtyp-EBV-Infektion.

5.5. Reversion der BGLF-5-Mutation

Die Mutation im BGLF-5 Leseraster sollte revertiert werden, um zu zeigen, daß der Phänotyp von EBV-BGLF-5⁻ nur durch diese Mutation auftritt.

Zunächst sollte die Mutation durch Kompensation mit dem BGLF-5 Gen aufgehoben werden. Hierzu wurden BJAB-Zellen stabil mit dem konstruierten Vektor pGlowDNase, der das BGLF-5 Gen inklusive der postulierten Promotorregion enthält, transfiziert (BJAB-DNase Zellen). Der Vektor verfügte über keinen eukaryotischen Promotor, so daß das inserierte Gen erst nach der Infektion mit EBV exprimiert werden sollte. Es stellte sich jedoch heraus, daß das BGLF-5 Gen auch ohne Infektion mit EBV-Virionen transkribiert wurde. Dieses ist eventuell auf fehlende virale Faktoren zurückzuführen, die in Wildtyp-EBV infizierten Zellen die Expression der DNase unterbinden würden. Das Protein der DNase wurde jedoch nicht nachgewiesen. Weiterhin konnten durch die Grundexpression von BGLF-5 keine eindeutigen Rückschlüsse auf eine Überexpression dieses Gens nach der Infektion von BJAB-DNase Zellen mit B95-8 gemacht werden. Tendenziell stieg die Transkriptionsrate von BGLF-5 an, aber auch hier konnte das Protein nicht nachgewiesen werden.

Da gezeigt wurde, daß das BGLF-5 Gen in BJAB-DNase Zellen transkribiert wird, wurden diese Zellen mit BGLF-5-Mutanten infiziert. Hier kam es jedoch nicht zur erwarteten Komplementation der Mutation. DNA der Mutanten-Virionen wurde in den Zellen nachgewiesen, aber es wurden keine viralen Gene exprimiert. Sogar BRLF-1, welches sonst immer nach der Infektion von BJAB-Zellen mit BGLF-5-Mutanten exprimiert wurde, konnte nicht nachgewiesen werden. In Wildtyp-EBV infizierten BJAB-DNase-Zellen wurden jedoch alle untersuchten viralen Transkripte nachgewiesen.

Beobachtungen, daß die Kompensation einer Mutation durch Vektoren nicht immer effizient ist, wurden auch von SHAO ET AL. (1993) gemacht. Hier konnte die Mutation der HSV-1 DNase nicht komplett durch DNase-exprimierende Vektoren kompensiert werden. Diese Arbeitsgruppe vermutet, daß entweder die Menge des DNase-Proteins, die in den transfizierten Zellen exprimiert wird, nicht ausreichend ist, oder die DNase nicht zum richtigen Zeitpunkt bzw. in der richtigen Umgebung exprimiert wurde. Da in den BJAB-DNase Zellen jedoch nur das DNase Transkript und nicht das Protein nachgewiesen wurde, kann die DNase-Aktivität hier nicht die Ursache für eine fehlende virale Genexpression durch die Mutante sein. Vermutlich werden in den BJAB-Zellen die DNase-Transkripte des Vektors wieder abgebaut. Warum durch die BGLF-5-Mutante in den transfizierten BJAB-Zellen nicht einmal BRLF-1 exprimiert wird, ist unklar. Offensichtlich wird die virale Genexpression nach der Infektion mit BGLF-5-Mutanten durch die Anwesenheit von viralen DNase Transkripten des Vektors negativ beeinflusst, denn in Wildtyp-EBV infizierten, transfizierten BJAB-Zellen

wurden alle untersuchten viralen Gene transkribiert. BJAB-Zellen erscheinen somit ungeeignet zur Untersuchung von EBV-Mutanten. Geeigneter wären primäre B-Lymphozyten, jedoch überleben diese uninfiziert nur kurze Zeit in Kultur und somit würden sich auch Transfektionen schwierig gestalten. Eine stabile Zell-Linie ist aus primären B-Lymphozyten nicht herstellbar. Weitere Untersuchungen zu Infektionen von BJAB-Zellen mit Wildtyp-EBV werden unter 5.8. diskutiert.

Da die Kompensation der Mutation durch Vektoren mit dem BGLF-5 Gen nicht erfolgte, sollte die Mutation durch Rückrekombination mittels homologer Rekombination mit Wildtyp-EBV Sequenzen aufgehoben werden. Dieses System wird auch von WAGNER ET AL., 1999 beschrieben. Hier wurde das in ein *bacterial artificial chromosome* (BAC) klonierte Maus-Cytomegalovirusgenom durch homologe Rekombination wieder vom BAC-Anteil getrennt. In dieser Arbeit wurden Raji-Zellen bzw. mit dem EBV-Bank-Klon 219 transfizierte Raji-Zellen mit BGLF-5-Mutanten infiziert. Somit konnte eine homologe Rekombination zwischen der Mutante und dem Raji-Genom bzw. dem Bank-Klon stattfinden, so daß wieder Wildtyp-Virionen entstehen können. Da aber die Rekombination ein seltenes Ereignis ist (ca. 10^{-3} - 10^{-7} nach HANIN ET AL., 2001; ST-ONGE ET AL., 1993) und nur durchschnittlich $2 \cdot 10^5$ Genom-äquivalente/ml der Mutanten in den Überständen der superinfizierten Raji-Zellen vorhanden sind, von denen dann nur ca. 1 % infektiös sind, ist es erklärbar, daß hier keine Rückrekombination nachgewiesen werden konnte.

5.6. Charakterisierung der BDLF-2-Mutante

In der Literatur gibt es über BDLF-2 kaum Informationen. Im Zungengewebe von Patienten mit oraler Haarzell-Leukoplakie wurden Transkripte von BDLF-2 nachgewiesen, jedoch nicht in Hodgkin-Lymphomen, T-Zell-Lymphomen und Nasopharynxkarzinomen. Offensichtlich gehört BDLF-2 zu den lytischen Genen, denn eine lytische Infektion wurde nur in oraler Haarzell-Leukoplakie beschrieben, nicht aber in den anderen Lymphomen. Somit scheint BDLF-2 keine Bedeutung für die virale Latenz zu haben [HAYES ET AL., 1999].

Mit Hilfe einer BDLF-2-Mutante wurde die Funktion von Gen und Genprodukt untersucht; dabei standen die Untersuchungen auf Infektiosität, virale Genexpression und mögliche Veränderungen der Wirtszelle im Vordergrund.

Virale Genexpression

Zum Nachweis phänotypischer Veränderungen wurden B-Zellen EBV-negativer Spender und BJAB-Zellen mit BDLF-2-Mutanten infiziert und das virale Expressionsmuster im Vergleich zu Wildtyp-EBV infizierten B-Zellen bzw. BJAB-Zellen untersucht. Analysiert wurden die lytischen viralen Gene BZLF-1, BRLF-1, BMRF-1, BHRF-1 sowie die Latenzgene EBNA-1, -2, 3A-C, LMP-1 und -2 (5.4.).

Nach der Infektion von B-Lymphozyten mit BDLF-2-Mutanten wurden alle hier untersuchten lytischen Gene und die Latenzgene EBNA-3A, -3B, 3C und LMP-2 nach zwei Tagen exprimiert (Tab. 4.8, 4.9), so daß zu diesem Zeitpunkt scheinbar der komplette lytische Zyklus durchlaufen wurde. Sieben Tage nach der Infektion war jedoch nur noch BZLF-1 nachweisbar. Der Transaktivator BZLF-1 versuchte in BDLF-2-Mutanten infizierten B-Zellen offenbar immer wieder den lytischen Zyklus zu aktivieren, initiierte jedoch nur seine eigene Expression. Durch eine noch unbekannte Rückkopplung wird hier, ähnlich wie durch die BGLF-5-Mutation, die Aktivierung weiterer lytischer Gene unterbunden. Wurden frische B-Lymphozyten mit Überständen von BDLF-2-Mutanten infizierten und für zwei Tage kultivierten B-Zellen inkubiert, fand eine Infektion nicht mehr statt. Da aber, wie unter 5.4. beschrieben, auch keine Virionen nach der Infektion von B-Zellen mit Wildtyp-EBV freigesetzt wurden, kann die nicht erfolgte Virusfreisetzung nicht auf die BDLF-2-Mutation zurückgeführt werden. Möglicherweise wird auch die Expression einiger anderer, hier nicht untersuchter, viraler Gene durch das Fehlen von BDLF-2, dessen Transkript eine Stunde nach der Infektion nachweisbar ist, unterbunden. Zu diesen Genen, die essentiell für die lytische virale Replikation sind, gehören BALF-5 (virale DNA-Polymerase), BALF-2 (DNA-Einzelstrang-bindendes Protein), BSLF-1 (Primase), BBLF-4 (Helicase) und BBLF-2/-3 (Helicase-Primase-assoziiertes Protein) [ZHANG ET AL., 1996]. Ob deren Expression durch das Fehlen von BDLF-2 beeinflusst wird muß in Zukunft überprüft werden.

Ein Latenzstadium wird nach der Infektion von B-Lymphozyten mit der BDLF-2-Mutante nicht etabliert. EBNA-1, EBNA-2 und LMP-1 wurden nicht exprimiert, dagegen wurde aber die Expression von LMP-2A, EBNA-3A, -3B und -3C nachgewiesen. Die Expression der EBNA-3 Familie wurde bisher nur in Latenz III beschrieben, wo diese Gene durch EBNA-2 aktiviert werden [RING ET AL., 1994]. Wie die EBNA-3 Gene hier ohne EBNA-2 induziert wurden, gilt es in weiteren Arbeiten aufzuklären. Auch die Expression von LMP-2 wurde hier EBNA-2 unabhängig induziert. Es ist bekannt, daß LMP-2 in Latenz II und III exprimiert wird. In Latenz II erfolgt die Expression EBNA-2 unabhängig [MASUCCI ET AL., 1994]. Eine alleinige Expression von LMP-2 wurde bisher nur in EBV-positiven ruhenden B-Zellen *in vivo* nachgewiesen [ZETTERBERG ET AL., 2002]. Aber auch in einigen Burkitt-Lymphom-Biop-

saten wurde LMP-2A nachgewiesen. Hier wurde allerdings zusätzlich EBNA-1 exprimiert [DROTAR ET AL., 2003]. Es ist denkbar, daß durch das Fehlen des BDLF-2 die Genprodukte LMP-2 und die EBNA-3 EBNA-2 unabhängig transkribiert werden und die Latenz III abortiv verläuft, die Zellen aber auch keine Differenzierung durchlaufen um in einen ruhenden Zustand zu gelangen. Da EBNA-3C eine induzierende Wirkung auf LMP-1 hat [Young et al., 2003], letzteres aber nicht nach der Infektion von B-Zellen mit der BDLF-2-Mutante nachgewiesen wurde, ist davon auszugehen, daß BDLF-2 eine Funktion hinsichtlich dieses Mechanismus hat. Möglicherweise wurden die EBNA-3 Gene nur transkribiert, so daß ein Abbau der mRNA stattgefunden hat, die Translation nicht erfolgte und somit auch LMP-1 nicht initiiert wurde. Fest steht jedenfalls, daß durch die BDLF-2-Mutante keine Immortalisierung von B-Zellen erfolgt. Der Versuch eine Latenz zu etablieren verläuft abortiv, aber die Mutanten scheinen bis mindestens zwei Tage nach der Infektion von B-Zellen den lytischen Zyklus zu durchlaufen.

Wurden BJAB-Zellen mit BDLF-2-Mutanten infiziert, wurde das virale Genexpressionsmuster eingeschränkt. Zwei Tage nach der Infektion wurden alle untersuchten lytischen Gene bis auf BMRF-1 exprimiert, aber keine Latenzgene. Im Vergleich zur B-Lymphozyteninfektion wurden BHRF-1, BMRF-1 und BRLF-1 hier auch noch sieben Tage nach der Infektion nachgewiesen, während die BZLF-1 Expression zu diesem Zeitpunkt nicht mehr erfolgte. Möglicherweise reichte hier die frühe BZLF-1-Expression aus, um später noch andere lytische Gene zu induzieren. Da ein verändertes virales Genexpressionsmuster auch bei BGLF-5-Mutanten infizierten BJAB-Zellen, im Vergleich zu infizierten primären B-Zellen, erfolgte, scheint dieses Ereignis zelltypspezifisch zu sein, denn bei einer Infektion spielen nicht nur virale Genprodukte eine Rolle, sondern auch zelluläre Faktoren. So wird beispielsweise in latent mit EBV-infizierten Zellen vermehrt NF- κ B exprimiert, wodurch die lytische Replikation inhibiert wird [BROWN ET AL., 2003]. Weiterhin sind virale Infektionsabläufe vom Zelltyp abhängig und nicht jeder Virusstamm verhält sich in allen Zell-Linien gleich [TRIVEDI ET AL., 2001]. In Zukunft gilt es diese Verknüpfungen aufzuklären.

Morphologie und Oberflächenantigenexpression

Nach der Infektion von B-Lymphozyten mit BDLF-2-Mutanten wurden die Zellen auf eine veränderte Morphologie und eine gesteigerte Expression von Aktivierungsmarkern und Adhäsionsmoleküle untersucht (5.4.). Die Zellen zeigten eine andere Morphologie als mit Wildtyp-EBV infizierten B-Zellen. Mit Mutanten infizierte Zellen bildeten keine Zellaggregate und proliferierten nicht. Auch eine für EBV-Infektionen typische veränderte Oberflächenproteinexpression konnte in mit BDLF-2-Mutanten infizierten Zellen nicht festgestellt werden. Da BDLF-2-Mutanten weder EBNA-2 noch LMP-1, die für die Expression von bestimmten

Oberflächenproteine notwendig sind, exprimierten, ist erklärbar, warum weder Adhäsionsproteine noch Aktivierungsmarker in den infizierten Zellen exprimiert wurden (siehe auch 5.4.).

Fazit

Anhand der BDLF-2-Mutante wurde gezeigt, daß das Genprodukt von BDLF-2 an der Aufrechthaltung des lytischen Zyklus beteiligt ist und die Entstehung der Latenz beeinflusst. Weiterhin wurde festgestellt, daß BDLF-2 früh nach der Infektion von BJAB-Zellen mit Wildtyp-Virionen exprimiert wird. Nach der Infektion von primären B-Zellen mit BDLF-2-Mutanten bildeten die Zellen keine Zellaggregate, proliferierten nicht und wurden nicht immortalisiert. Auch eine für EBV-Infektionen typische vermehrte Expression von Adhäsions- und Aktivierungsmolekülen fand nicht statt. In Abb. 5.4 sind Veränderungen und mögliche Auswirkungen im Infektionszyklus des EBV durch die BDLF-2-Mutante hinsichtlich viraler Genexpression und Oberflächenantigenexpression zusammenfassend dargestellt.

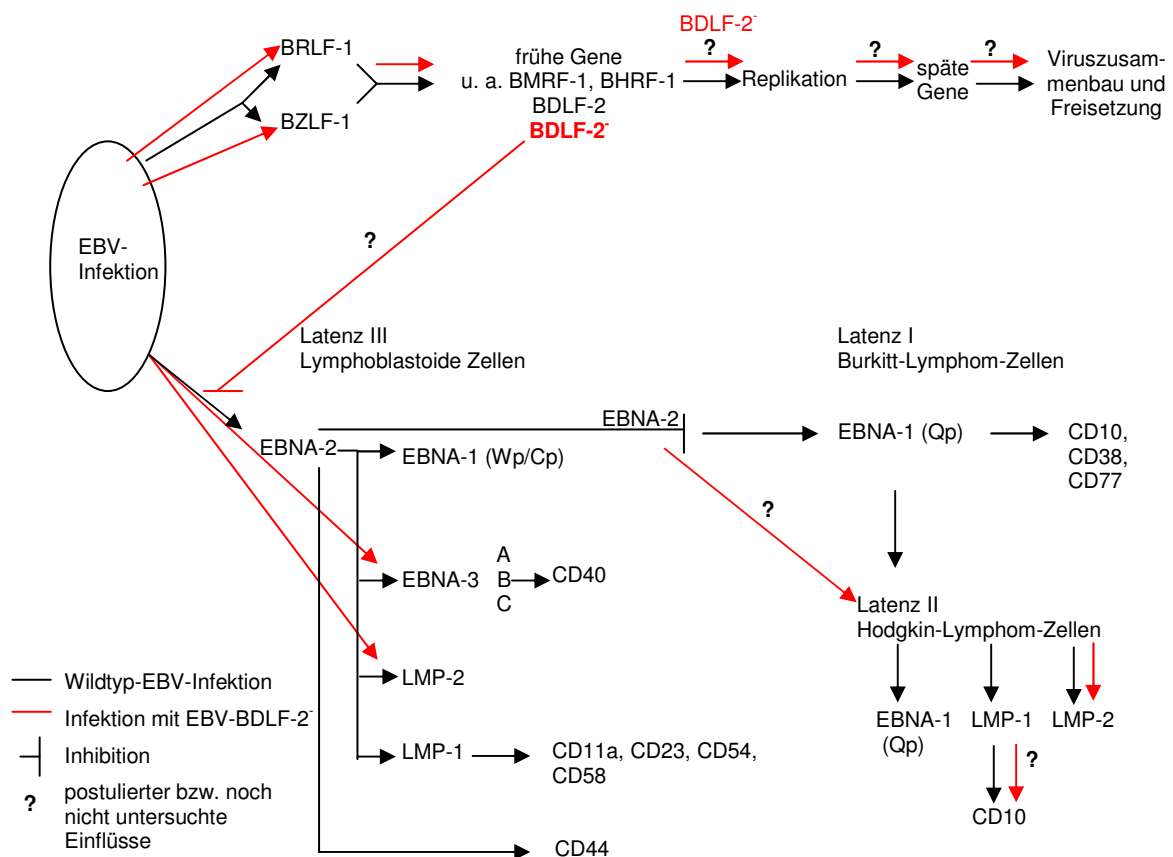


Abb. 5.4: Einfluß der BDLF-2-Mutation auf den Infektionszyklus des EBV im Vergleich zur Wildtyp-EBV-Infektion.

5.7. Reversion der BDLF-2-Mutation

Die Mutation im BDLF-2 Leseraster sollte revertiert werden um zu zeigen, daß der Phänotyp von EBV-BDLF-2⁻ nur durch diese Mutation auftritt.

Obwohl eine Reversion der BGLF-5-Mutation nicht erfolgreich war, wurde dieses hier dennoch mit der BDLF-2-Mutante versucht.

Durch Kompensation mit dem Vektor pGlowBDLF-2, der das BDLF-2 Gen und dessen Promotorsequenz enthält, sollte die Mutation aufgehoben werden. BJAB-Zellen wurden stabil mit pGlowBDLF-2 transfiziert (BJAB-BDLF-2). Es stellte sich jedoch genau wie bei BJAB-DNase Zellen heraus, daß von den Vektoren, das BDLF-2 ohne Infektion mit EBV-Virionen transkribiert wurde. Scheinbar fehlen hier virale Inhibitoren und zelluläre Faktoren, die nach einer Wildtyp-EBV-Infektion vorhanden sind. Dennoch wurden BJAB-BDLF-2 Zellen mit EBV-BDLF-2⁻ infiziert. Hierbei wurden keine viralen Gene exprimiert. Aber auch eine Rekombination von BDLF-2-Mutanten mit EBV-Sequenzen zu Wildtyp-Virionen, wie unter 5.5. beschrieben, war hier nicht erfolgreich. Es konnte somit nicht gezeigt werden, daß der Phänotyp der BDLF-2-Mutante nur auf die Mutation im BDLF-2 Leseraster zurückzuführen ist.

5.8. Infektion primärer B-Zellen und EBV-negativer Zell-Linien mit Wildtyp-EBV

Wie bereits unter 5.4. und 5.6. erwähnt, wurde nach der Infektion von BJAB-Zellen bzw. BJAB-DNase- und BJAB-BDLF-2-Zellen mit Wildtyp-EBV virale Genexpression auf Transkriptebeine nachgewiesen, jedoch keine virale Proteinexpression im IFT festgestellt. Gleiches wurde bei infizierten Akata-Zellen beobachtet, während in Wildtyp-EBV infizierten primären B-Zellen sowohl virale Transkripte als auch virale Proteine nachgewiesen wurden. Weiterhin zeigten infizierte B-Lymphozyten, Akata- und BJAB-Zellen die seit einigen Monaten kultiviert wurden ein eingeschränktes virales Genexpressionsmuster. Diese Phänomene sollen hier diskutiert werden.

In der Literatur werden unterschiedliche Beobachtungen nach der Infektion von BJAB-Zellen mit Wildtyp-EBV aus B95-8 Zellen beschrieben. Nach der Infektion kann EBNA-1 im IFT nachgewiesen werden, nicht aber EA-D, so daß der lytische Zyklus scheinbar nicht aktiviert wird [KLEIN ET AL., 1975]. Eine andere Arbeitsgruppe konnte das latente Protein LMP-1 bereits eine Stunde nach der Infektion von BJAB-Zellen mit Wildtyp-Virionen nachweisen [MARTIN ET AL., 1993]. Diese Beobachtungen stimmen zum Teil mit den Ergebnis-

sen dieser Arbeit überein. EBNA-1 wurde auf Transkript- und Proteinebene nachgewiesen, alle anderen untersuchten Gene nur auf Transkriptebe. Ebenso verhält es sich mit Akata-Zellen. Akata-Zellen waren genau wie BJAB-Zellen mit Virionen aus B95-8 Zellen infizierbar. Wenige Tage nach der Infektion konnten alle untersuchten viralen Transkripte in diesen Zellen nachgewiesen werden, jedoch nicht die untersuchten Proteine EA-D, EBV-DNase und LMP-1 (EBNA-1 wurde hier zu diesem Zeitpunkt nicht untersucht). Es wurde somit weder in Akata- noch in BJAB-Zellen der lytische Zyklus durchlaufen. In der Literatur wird beschrieben, daß in reinfizierten EBV-negativen Akata-Zellen ein effizienter lytischer Zyklus abläuft, wobei Virionen in großen Mengen freigesetzt werden, während in infizierten Zell-Linien wie BJAB, Ramos und Louckes keine Virusreplikation stattfindet [SHIMIZU ET AL., 1996]. In Akata-Zellen wird der lytische Zyklus jedoch nur durchlaufen, wenn diese mit Virionen aus EBV-positiven Akata-Zell-Linien infiziert wurden. Eine erfolgreiche Infektion von Akata-Zellen mit Virionen aus der Zell-Linie B95-8 konnte in der Arbeitsgruppe von TRIVEDI nicht durchgeführt werden [TRIVEDI ET AL., 2001]. In wie fern diverse Virusstämme unterschiedliche Zell-Linien beeinflussen, bzw. vice versa wie die Zellen auf eine Infektion durch verschiedene Virusstämme und deren Genexpression reagieren, ist noch weitgehend ungeklärt [TRIVEDI ET AL., 2001]. Warum aber die Mehrzahl viraler Gene in einigen Zell-Linien nur transkribiert und nicht translatiert werden, ist nicht genau verstanden. Das virale Gene transkribiert, aber nicht translatiert werden, wurde auch in EBV-infizierten Epithelzellen beobachtet. Hier wurden geringe Mengen an LMP-1 und LMP-2 mRNA nachgewiesen, jedoch nicht die entsprechenden Proteine. Lag hingegen eine hohe Transkriptabundanz vor, konnten auch die entsprechenden Proteine detektiert werden [KNOX ET AL., 1996]. Fraglich bleibt dennoch, warum nach der Infektion von Akata- und BJAB-Zellen die Kaskade der *immediate early* Gene (BRLF-1 und BZLF-1) und der *early* Gene (BMRF-1 und BHRF-1) auf Transkriptebe nachgewiesen wurde. Da die Proteinexpression von BRLF-1 und BZLF-1 hier nicht untersucht wurde, ist davon auszugehen, daß diese Proteine gebildet wurden, denn ohne die beiden Transaktivatoren ist die Expression der *early* Gene nicht möglich. BMRF-1 und BHRF-1 wurden auf Transkriptebe nachgewiesen. Ein Nachweis von BMRF-1 auf Proteinebe (EA-D) erfolgte nicht. Demnach muß die BMRF-1 mRNA degradiert oder die Translation inhibiert worden sein. Möglicherweise erfolgte dieses über RNA *silencing*. Der Prozeß wird durch die Bildung von Doppelstrang-RNA ausgelöst, die in kleine RNA-Fragmente gespalten wird. Diese RNAs, auch miRNA (microRNA) genannt, führen zur Degradierung oder zur Translationsinhibition von den zu ihnen komplementären mRNAs. In verschiedenen EBV-positiven Zell-Linien wurden diverse miRNAs nachgewiesen, unter anderem BART2, welches die Degradierung von BALF-5 mRNA (kodiert für die DNA-Polymerase) fördert [Pfeffer et al., 2004]. Es ist also denkbar, daß es auch

in EBV-infizierten BJAB- und Akata-Zellen miRNAs gibt, die unter anderem gegen BMRF-1 gerichtet sind und somit die Translation unterbunden wird. Dieses Phänomen ist auch auf BJAB-DNase und BJAB-BDLF-2 Zellen zu übertragen. In BJAB-DNase-Zellen wurden BGLF-5-Transkripte vor und nach EBV-Infektion nachgewiesen, aber keine Proteine. Wurden diese Zellen wie auch BJAB-Zellen mit Mutanten-Virionen infiziert, kam es sogar zusätzlich zu einer verminderten Transkription einiger Gene. Dieses kann mit einer geringen Transkriptmenge zusammenhängen. Sind viele Transkripte vorhanden, können einige der Degradierung durch miRNA entgehen. Liegen nur wenige Transkripte vor, werden sie vollständig eliminiert [PFEFFER ET AL., 2004]. Insgesamt kann gesagt werden, daß zwei bis sieben Tage nach der Infektion von Akata- und BJAB-Zellen mit Virionen aus der Zell-Linie B95-8 kein lytischer Zyklus durchlaufen wird, jedoch viele lytische Gene transkribiert werden.

Im weiteren soll das Verhalten EBV-infizierter Zellen nach mehreren Monaten in Kultur diskutiert werden.

In Wildtyp-EBV infizierten B-Lymphozyten, die für zwei Tage bis zu einen Monat kultiviert wurden, wurden alle hier untersuchten lytischen Gene und Latenzgene transkribiert. Nachgewiesen wurden auch die viralen Proteine EA-D, EBV-DNase und LMP-1. Infektiöse Virionen wurden trotz der Expression der lytischen Gene aus diesen Zellen nicht freigesetzt. So wurde auch beschrieben, daß Nabelschnurblut-Lymphozyten, die mit dem EBV-Stamm aus der Zell-Linie B95-8 infiziert worden waren, keine Virionen freisetzen [STOERKER ET AL., 1982]. Da nicht alle Gene, die für den lytischen Zyklus notwendig sind untersucht wurden, ist es möglich das einige Gene nicht exprimiert werden und somit eine Virusfreisetzung unterbunden wird.

Wurden Wildtyp-EBV infizierte B-Lymphozyten, BJAB- und Akata-Zellen sechs Monate und länger kultiviert, konnte aus allen untersuchten Proben noch virale DNA amplifiziert werden. Die virale Transkription war jedoch extrem eingeschränkt. Lytische Transkripte wie BMRF-1 und BZLF-1 wurden in keiner dieser Zell-Linien nachgewiesen. In einigen Kulturen wurden EBNA-1 Transkripte nachgewiesen, wobei die infizierten Akata-Zellen EBNA-1 der Latenz III exprimierten und je eine Kultur der B-Lymphozyten und BJAB-Zellen EBNA-1 aller drei Latenzstadien. Das EBNA-1 Protein wurde mittels IFT in allen Kulturen nachgewiesen, in denen auch EBNA-1 Transkripte gefunden wurden. In den EBNA-1-positiven BJAB-Zellen wurde auch LMP-2A auf Transkriptionsebene nachgewiesen, während in je einer der beiden infizierten B-Lymphozyten- und BJAB-Zell-Kulturen weder ein latentes virales Transkript noch das EBNA-1 Protein gefunden wurde. Da in allen Kulturen maximal das EBNA-1 Protein nachgewiesen wurde, wurde die Latenz I etabliert, die typisch für Burkitt-Lymphom-Zellen ist, zu denen BJAB-Zellen gehören. Warum in Wildtyp-EBV infizierten B-Zellen, also

einer lymphoblastoiden Zell-Linie für die das Latenzstadium III typisch ist, nach einigen Monaten in Kultur Latenz I etabliert wurde, konnte nicht geklärt werden. Auffällig ist auch, daß in je einem EBV-positiven Klon der BJAB-Zellen und B-Lymphozyten weder das EBNA-1 Transkript noch das Protein nachgewiesen wurde. EBNA-1 wird zur Aufrechterhaltung des episomalen EBV-Genoms benötigt [THORLEY-LAWSON ET AL., 1999]. Ohne die Expression von EBNA-1 kann das virale Genom nur persistieren, wenn es in die Wirts-DNA integriert wird [TAKAKUWA ET AL., 2004]. Nur in den Zellen, in denen EBV-DNA als Episom vorliegt, kann virale Transkription und Replikation erfolgen [WANG ET AL., 1991]. In der Burkitt-Lymphom-Zell-Linie Namalwa, in der jede Zelle nur eine Kopie der EBV-DNA aufweist, persistieren die Viren nur nach Integration in das zelluläre Genom. Virale Replikation findet in diesen Zellen nicht statt [MATSUO ET AL., 1984]. Auch in der EBV-infizierten AW-Ramos-Zell-Linie ist die EBV-DNA in zelluläre DNA integriert [MILLER, 1990]. Eine weitere Vermehrung des EBV-Genoms findet somit über die Teilung der Wirtszellen statt. Es ist also denkbar, daß in zwei der hier untersuchten Zellkulturen das EBV-Genom in das zelluläre Genom integriert wurde. Dieses wäre eine Erklärung für eine fehlende EBNA-1 Expression. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, daß sich verschiedene Klone einer Zell-Linie nach Virusinfektion unterschiedlich verhalten, so daß einerseits eine virale Insertion ins Wirtsgenom stattfindet, andererseits das virale Genom aber episomal vorliegt. Denkbar ist auch, daß in einer Kultur beide Formationen nebeneinander vorliegen: die episomale Form und die Insertion [HURLEY ET AL., 1991].

Insgesamt variieren die Aussagen in der Literatur über unterschiedliche Zell-Linien und deren Infizierbarkeit sehr stark. Wahrscheinlich differieren die im Umlauf befindlichen EBV-Stämme und Zell-Linien so stark, daß es zu diesen unterschiedlichen Aussagen kommen kann [FRESEN ET AL., 1976]. Fest steht jedoch, daß es noch kein universales Zellmodell zur Untersuchung von EBV-Infektionen gibt.

5.9. Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurden mittels Transposoninsertionsmutanten Funktionen der EBV-Gene BGLF-5 und BDLF-2 untersucht.

Die hier erzielten Ergebnisse weisen darauf hin, daß die EBV-Mutanten EBV-BDLF-2⁻ und EBV-BGLF-5⁻ wichtige Funktionen im Verlauf der EBV-Infektion beeinflussen. Sie können B-Zellen nicht immortalisieren, persistieren nicht und durchlaufen auch nicht den kompletten lytischen Zyklus. In nachfolgenden Untersuchungen müssen weitere Einflüsse der BGLF-5- und der BDLF-2-Mutanten auf die Expression viraler Gene (Abb. 5.3, 5.4) sowie

deren Interaktionen mit zellulären Faktoren analysiert werden. Weiterhin muß ein geeignetes Tiermodell gefunden werden, um die Auswirkungen der Mutanten *in vivo* zu untersuchen.

Aufgrund des nicht vorhandenen Immortalisierungspotentials, bei gleichzeitiger Fähigkeit zur Expression einiger viraler Proteine, scheinen beide Mutanten geeignete Kandidaten für einen Impfstoff zur Prophylaxe von EBV-Infektionen zu sein. Wird durch die Mutanten eine humorale und eine zelluläre Immunantwort ausgelöst, wäre ein ausreichender Schutz vor Infektionen möglich.

Zur Therapie einer EBV-Infektion, vor allem während der akuten infektiösen Mononukleose, wären die Genprodukte von BGLF-5 und BDLF-2 mögliche Angriffspunkte. Da beide Gene offensichtlich an der viralen Replikation beteiligt sind, ist durch die Blockade der Proteine mit spezifischen Substanzen eine Unterdrückung der Virusfreisetzung denkbar. Möglicherweise würde auch die Etablierung eines Latenzstadiums unterbunden, da weder die BGLF-5-Mutante noch die BDLF-2-Mutante *in vitro* alle Latenzgene exprimiert.

Denkbar wäre auch die Unterdrückung der Translation der BGLF-5 und BDLF-2 mRNA. Dieses könnte einerseits über *Antisense*-Oligonukleotide erfolgen, die spezifisch an die mRNA binden und so die Translation verhindern. Andererseits kann über RNAi (*RNA interference*) die Degradierung von mRNA erfolgen. Hierzu müßten spezifische kleine RNAs (siRNA = *small interfering RNA*) für die Sequenzen von BGLF-5 bzw. BDLF-2 generiert werden. Die doppelsträngigen siRNA werden in der Zelle aufgespalten und binden an die mRNA. Hierdurch entstehen doppelsträngige RNA-Abschnitte die degradiert werden und somit wird auch die Translation unterbunden. Fehlen die BGLF-5- bzw. BDLF-2-Proteine, würde die virale Replikation verhindert und Virionen würden nicht freigesetzt.

Insgesamt bieten die Genprodukte von BGLF-5 und BDLF-2, sowie die Mutanten EBV-BDLF-2⁻ und -BGLF-5⁻ vielversprechende Ansatzpunkte für eine Therapie und eine Prophylaxe von EBV-Infektionen.

6. Zusammenfassung

Das Epstein-Barr Virus (EBV) verursacht die infektiöse Mononukleose und ist an der Entstehung des Burkitt-Lymphoms, des Nasopharynxkarzinoms und von Hodgkin-Lymphomen beteiligt. Die initialen Schritte und das Mitwirken des Virus an der Tumorentstehung sind noch ungeklärt. Da der überwiegenden Zahl der EBV-Gene und Genprodukte eine Funktion noch nicht zugeordnet werden konnte, dürfte hier der Schlüssel für die Aufklärung der onkopathogenen Wirkung zu suchen sein. Dieses kann durch vollständige Mutagenisierung des EBV-Genoms und Charakterisierung der Mutanten erreicht werden.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher,

- 1) eine Methode zur effizienten Transposonmutagenese von EBV-Bank-Klonen zu entwickeln, die noch nicht mit Transposoninsertionen abgesättigt sind,
- 2) EBV-Mutanten zu generieren,
- 3) die EBV-Mutanten morphologisch und funktionell zu charakterisieren.

Folgende Ergebnisse wurden erzielt:

Es wurde eine Methode etabliert, die es erlaubt eine absättigende Mutagenese des EBV-Genoms mit Insertionsmutationen durchzuführen.

Es ist gelungen, ein System zur Generierung von EBV-Mutanten mittels homologer Rekombination aus Bank-Klonen mit Wildtyp-Virionen zu entwickeln.

Die Selektion von Mutanten-Virionen wurde am Beispiel einer EBV-BGLF-2⁻ Mutante gezeigt.

Es wurde eine Insertionsmutante des EBV im Leseraster von BGLF-5 (EBV-DNase) generiert.

Bei der Charakterisierung des Mutantenphänotyps von EBV-BGLF-5⁻ sowie bei der Untersuchung der Expressionskinetik von BGLF-5 zeigte sich, daß BGLF-5 zu den früh exprimierten viralen Genen gehört und an der Aufrechterhaltung des lytischen Zyklus, der Etablierung der Latenz und der Immortalisierung von primären B-Lymphozyten beteiligt ist.

Es wurde eine Insertionsmutante des EBV im Leseraster von BDLF-2 generiert.

Bei der Charakterisierung des Mutantenphänotyps von EBV-BDLF-2⁻ sowie bei der Untersuchung der Expressionskinetik von BDLF-2 zeigte sich, daß BDLF-2 zu den früh exprimierten viralen Genen gehört und an der Aufrechterhaltung des lytischen Zyklus, der Etablierung der Latenz und der Immortalisierung von primären B-Lymphozyten beteiligt ist.

Die Charakterisierung der BGLF-5- und der BDLF-2-Mutanten zeigte, daß hier zwei Kandidaten zur Generierung eines Impfstoffs zur Verfügung stehen: Beide Mutanten exprimieren virale Gene, die eine Immunantwort auslösen können, verfügen aber nicht über ein Immortalisierungspotential und etablieren keine Latenz.

Darüber hinaus stellen BGLF-5 und BDLF-2 mögliche Angriffspunkte für eine Therapie dar, da durch eine Mutation in diesen Genen der lytische Zyklus und somit die virale Replikation eingeschränkt wird.

7. Literaturverzeichnis

- Adamson AL**, Darr D, Holley-Guthrie E, Johnson RA, Mauser A, Swenson J, Kenney S: *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 Virol 74 (3), 1224-1233 (2000)
- Anagnostopoulos I**, Hummel M: *Epstein-Barr virus in tumours.*
Histopathology 29, 297-315 (1996)
- Babcock GJ**, Decker LL, Volk M, Thorley-Lawson DA: *EBV persistence in memory B cells in vivo.*
Immunity 9, 395-404 (1998)
- Babcock GJ**, Hochber D, Thorley-Lawson DA: *The expression pattern of Epstein-Barr virus latent genes in vivo is dependent upon the differentiation stage of the infected B cell.*
Immunity 13, 497-506 (2000)
- Baer B**, Bankier A, Biggin M, Deininger P, Farrel P, Gibson T, Hatfull G, Hudson G, Satchwell S, Seguin C, Tuffnell P, Barrell B: *DNA sequence and expression of the B95-8 Epstein-Barr virus genome.*
Nature 310 (5974), 207-211 (1984)
- Baylis SA**, Purifoy DJM, Littler E: *The characterization of the EBV alkaline deoxyribonuclease cloned and expressed in E. coli.*
Nucleic Acids Res 17 (19), 7609-7622 (1989)
- Bogedain C**, Alliger P, Schwarzmann F, Marschall M, Wolf H, Jilg W: *Different activation of Epstein-Barr virus immediate-early and early gene in Burkitt Lymphoma cells and lymphoblastoid cell lines.*
J Virol 68 (2), 1200-1203 (1994)
- Bornkamm GW**, Hammerschmidt W: *Molecular virology of Epstein-Barr virus.*
Phil Trans R Soc Lond B Biol Sci 356, 437-459 (2001)
- Brown HJ**, Song MJ, Deng H, Wu TT, Cheng G, Sun R: *NF κ B inhibits gammaherpesvirus lytic replication.*
J Virol 77 (15), 8532-8540 (2003)
- Burkitt DP**: *A sarcoma involving the jaw in African children.*
Br J Surg 46, 218-223 (1958)
- Calender A**, Corider M, Billaud M, Lenoir GM: *Modulation of cellular gene expression in B lymphoma cells following in vitro infection by Epstein-Barr virus (EBV).*
Int J Cancer 46, 658-663 (1990)
- Chardonnet Y**, Lizard G, Chignol MC, Schmitt D: *Analytical methods for evaluation on whole cells of human papillomavirus infection.*
Bull Cancer 82, 107-113 (1995)

- Chen MR**, Hsu TY, Lin SW, Chen JY, Yang CS: *Cloning and characterization of cDNA clones corresponding to transcripts from the BamHI G region of the Epstein-Barr virus genome and expression of BGLF2*.
J Gen Virol 72, 3047-3055 (1991)
- Cruchley AT**, Williams DM, Niedobitek G, Young LS: *Epstein-Barr virus: biology and disease*.
Oral Diseases 3 (1), 156-163 (1997)
- Daibata M**, Sairenji T: *Epstein-Barr virus (EBV) replication and expression of EA-D (BMRF-1 gene product), virus-specific deoxyribonuclease, and DNA polymerase in EBV-activated Akata cells*.
Virology 196, 900-904 (1993)
- Daibata M**, Speck SH, Mulder C, Sairenji T: *Regulation of the BZLF1 promoter of Epstein-Barr virus by second messengers in anti-immunoglobulin-treated B-cells*.
Virology 198, 446-454 (1994)
- Darr CD**, Mauser A, Kenney S: *Epstein-Barr virus immediate-early protein BRLF-1 induces the lytic form of viral replication through a mechanism involved phosphatidylinositol-3 kinase activation*.
J Virol 75 (13), 6135-6142 (2001)
- Dawson CW**, Eliopoulos AG, Dawson J, Young LS: *BHRF-1, a viral homologue of the Bcl-2 oncogene, disturbs epithelial cell differentiation*.
Oncogene 9, 69-77 (1995)
- De Bruijn FJ**, Lupski JR: *The use of transposon Tn5 mutagenesis in the rapid generation of correlated physical and genetic maps of DNA segments cloned into multicopy plasmids*.
Gene 27, 131-149 (1984)
- De Graaf K**: *Molekulare Analyse von Genfunktionen des Epstein-Barr Virus*.
Diplomarbeit, RWTH Aachen (2000)
- Delecluse HJ**, Hilsendegen T, Pich D, Zeidler R, Hammerschmidt W: *Propagation and recovery of intact, infectious Epstein-Barr virus from prokaryotic to human cells*.
Proc Natl Acad Sci USA 95, 8245-8250 (1998)
- Delecluse HJ**, Hammerschmidt W: *The genetic approach to the Epstein-Barr virus: from basic virology to gene therapy*.
J Clin Pathol: Mol Pathol 53, 270-279 (2000)
- Dolcetti R**, Masucci MG: *Epstein-Barr virus: Induction and control of cell transformation*.
Journal of Cellular Physiology 196m 207-218 (2003)
- Drotar ME**, Silva S, Barone E, Campbell D, Tsimbouri P, Jurvansu J, Bhatia P, Klein G, Wilson JB: *Epstein-Barr virus nuclear antigen-1 and myc cooperate in lymphomagenesis*.
Int J Cancer 106, 388-395 (2003)
- Epstein MA**, Achon BG, Barr YM: *Virus particles in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma*.
Lancet 1; 702-703 (1964)

Farrel JP: *Epstein-Barr virus immortalizing genes.*
Trends in Microbiology 3 (3), 105-109 (1995)

Farrel PJ, Cludts I, Stühler A: *Epstein-Barr virus genes and cancer cells.*
Biomed & Pharmacother 51, 258-267 (1997)

Faulkner GC, Krajewski AS, Crawford DH: *The ins and outs of EBV infection.*
Trends in Microbiology 8 (4), 185-189 (2000)

Feederle R, Kost M, Baumann M, Janz A, Drouet E, Hammerschmidt W, Delecluse HJ: *The Epstein-Barr virus lytic program is controlled by the co-operative functions of two trans-activators.*
EMBO Journal 19 (12), 3080-3089 (2000)

Fresen KO, zur Hausen H: *Establishment of EBNA-expressing cell lines by infection of Epstein-Barr virus (EBV)-genome-negative human lymphoma cells with different EBV strains.*
Int J cancer 17, 161-166 (1976)

Gires O, Zimmer-Strobl U, Gonnella R, Ueffing M, Marschall G, Zeidler R, Pich D, Hammerschmidt W: *Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus mimics a constitutively active receptor molecule.*
EMBO Journal 16 (20), 6131-6140 (1997)

Gong M, Kieff E: *Intracellular trafficking of two major Epstein-Barr virus glycoproteins, gp350/220 and gp110.*
J Virol 64 (4), 1507-1516 (1990)

Hanin M, Volrath S, Bogucki A, Briker M, Ward E, Paszkowski J: *Gene targeting in Arabidopsis.*
The Plant Journal 28 (6), 671-677 (2001)

Hayes DP, Brink AATP, Vervoort MBHJ, Middeldorp JM, Meijer CJLM, van Brule AJC: *Expression of Epstein-Barr virus (EBV) transcripts encoding homologues to important human proteins in diverse EBV associated diseases.*
Mol Pathol 52, 97-103 (1999)

Henle G, Henle W, Diehl V: *Relation of Burkitt's tumor associated herpes-type virus to infectious mononucleosis.*
Proc. Natl. Sci. USA 59, 94-101 (1968)

Herrero M, De Lorenzo V, Timmis KN: *Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in Gram-negative bacteria.*
J Bacteriol 172 (11), 6557-6567 (1990)

Humme S, Reisbach G, Feederle R, Delecluse HJ, Bousset K, Hammerschmidt W, Schepers A: *The EBV nuclear antigen 1 (EBNA1) enhances B cell immortalization several thousandfold.*
Proc. Natl. Sci. USA 100 (19), 10989-10994 (2003)

Hurley EA, Agger S, McNeil JA, Lawrence JB, Calendar A, Lenoir G, Thorley-Lawson DA: *When Epstein-Barr virus persistently infects B-cell lines, it frequently integrates.*
J Virol 65 (3), 1245-1254 (1991)

Inman GJ, Binné UK, Parker GA, Farrel PJ, Allday MJ: *Activators of the Epstein-Barr virus lytic program concomitantly induce apoptosis, but lytic gene expression protects from cell death.*

J Virol 75 (5), 2400-2410 (2001)

Kawa K: *Epstein-Barr virus-associated diseases in humans.*

Int J Hematology 71, 108-117 (2000)

Kempkes B, Spitkovsky D, Jansen-Dürr P, Ellwart JW, Kremmer E, Delecluse HJ, Rottenberger C, Bornkamm GW, Hammerschmidt W: *B-cell proliferation and induction of early G₁-regulating proteins by Epstein-Barr virus mutants conditional for EBNA2.*

EMBO Journal 14 (1), 88-96 (1995A)

Kempkes B, Pich D, Zeidler R, Sugden B, Hammerschmidt W: *Immortalization of human B lymphocytes by a plasmid containing 71 kilobase pairs of Epstein-Barr virus DNA.*

J Virol 69 (1), 231-238 (1995B)

Kienzle N, Young DB, Liaskou D, Buck M, Greco S, Sculley TB: *Intron retention may regulate expression of Epstein-Barr virus nuclear antigen 3 family genes.*

J Virol 73 (2), 1195-1204 (1999)

Kilger E, Kieser A, Baumann M, Hammerschmidt W: *Epstein-Barr virus-mediated B-cell proliferation is dependent upon latent membrane protein 1, which simulates an activated CD40 receptor.*

EMBO Journal 17 (6), 1700-1709 (1998)

Klein G, Lindahl T, Jondal M, Leibold W, Menézes J, Nilsson K, Sundström C: *Continuous Lymphoid Cell Lines with characteristics of B Cells (Bone-Marrow-Derived), Lacking the Epstein-Barr Virus Genome and Derived from Three Human Lymphomas.*

Proc Nat Acad Sci USA 71 (8), 3283-3286 (1974)

Klein G, Giovanella B, Westman A, Stehlin J, Mumford D: *An EBV-genome-negative cell line established from an american Burkitt lymphoma; receptor characteristics. EBV infectibility and permanent conversion into EBV-positiv sublines by in vitro infection.*

Intervirology 5, 319-334 (1975)

Klein G: *EBV-B cell interactions: immortalization, rescue from apoptosis, tumorigenicity.*

Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica 43 (2-3), 97-105 (1996)

Knox PG, Li QX, Rickinson AB, Young LS: *In vitro production of stable Epstein-Barr virus-positive epithelial cell clones which resemble the virus:cell interaction observed in nasopharyngeal carcinoma.*

Virology 215, 40-50 (1996)

Kryworuckho M, Diaz-Mitoma F, Kumar A: *CD44 isoforms containing exons V6 and V7 are differentially expressed on mitogenically stimulated normal and Epstein-Barr virus-transformed human B cells.*

Immunology 86, 41-48 (1995)

Küppers R: *B cells under influence: transformation of B cells by Epstein-Barr virus.*

Immunology 3, 801-812 (2003)

Lear AL, Rowe M, Kurilla MG, Lee S, Henderson S, Kieff E, Rickinson AB: *The Epstein-Barr virus (EBV) nuclear antigen 1 BamHI F promoter is activated on entry of EBV-transformed B cells into the lytic cycle.*

J Virol 66 (12), 7461-7468 (1992)

Lee MA, Kim OJ, Yates JL: *Targeted gene disruption in Epstein-Barr virus.*

Virology 189 (1), 253-265 (1992)

Liebowitz D, Kieff E: *Epstein-Barr Virus.*

In Roizmann B, Whitley RJ, Lopez C: *The Human Herpesviruses*. Raven Press (New York), 107-172 (1993)

Lin SF, Hsu TY, Liu MY, Lin LS, Yang HL, Chen JY, Yang CS: *Characterization of Epstein-Barr virus DNase and its interaction with the major DNA binding protein.*

Virology 208, 712-722 (1995)

Liu MT, Hsu TY, Lin SF, Seow SV, Liu MY, Chen JY, Yang CS: *Distinct regions of EBV DNase are required for nuclease and DNA binding activities.*

Virology 242, 6-13 (1998A)

Liu MT, Hsu TY, Chen JY, Yang CS: *Epstein-Barr virus DNase contains two nuclear localization signals, which are different in sensitivity to the hydrophobic regions.*

Virology 247, 62-73 (1998B)

Longnecker R, Miller CL: *Regulation of Epstein-Barr virus latency by latent membrane protein 2.*

Trends in Microbiology 4 (1), 38-42 (1996)

Marchini A, Longnecker R, Kieff E: *Epstein-Barr virus (EBV)-negative B-lymphoma cell lines for clonal isolation and replication of EBV-recombinants.*

J Virol 66 (8), 4972-4981 (1992)

Martin JM, Veis D, Korsmeyer SJ, Sugden B: *Latent membrane protein of Epstein-Barr virus induces cellular phenotypes independently of expression of Bcl-2.*

J Virol 67 (9), 5269-5278 (1993)

Martinez R, Sarisky RT, Weber PC, Weller SK: *Herpes simplex virus type 1 alkaline nuclease is required for efficient processing of viral DNA replication intermediates.*

J Virol 70 (4), 2075-2085 (1996)

Maruo S, Yang L, Takada K: *Roles of Epstein-Barr virus gp350 and gp25 in the infection of human epithelial cells.*

J Gen Virol 82, 2373-2383 (2001)

Masucci MG, Ernberg I: *Epstein-Barr virus: adaption to a life within the immune system.*

Trends in Microbiology 2 (4), 125-130 (1994)

Matsuo T, Heller M, Petti L, O'Shiro E, Kieff E: *Persistence of the entire Epstein-Barr virus genome integrated into human lymphocyte DNA.*

Science 226, 1322-1325 (1984)

Miller G, Lipman M: *Release of infectious Epstein-Barr virus by transformed marmoset leukocytes.*

Proc Nat Acad Sci USA 70 (1), 190-194 (1973)

Miller G: *Epstein-Barr Virus: Biology, pathogenesis, and medical aspects.*

In Fields BN, Knipe DM: *Virology 2nd Edition*, Raven Press (New York), 1921-1958 (1990)

Modrow S, Falke D, Truyen U: *Molekulare Virologie*

Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg, Berlin (2003)

Murray RJ, Young LS, Calender A, Gregory CD, Rowe M, Lenoir GM, Rickinson AB: *Different patterns of Epstein-Barr virus gene expression and cytotoxic T-cell recognition in B-cell lines infected with transforming (B95-8) or nontransforming (P3HR1) virus strains.*

J Virol 62 (3), 894-901 (1988)

Niedobitek G, Meru N, Delecluse HJ: *Epstein-Barr virus infection and human malignancies.*

Int J Exp Path 82, 149-170 (2001)

Ooka T: *The molecular biology of Epstein-Barr Virus.*

Biomedicine & Pharmacotherapy 39, 59-66 (1985)

Oshima S, Daikoku T, Shibata S, Yamada H, Goshima F, Nishiyama Y: *Characterization of the UL 16 gene product of herpes simplex virus type 2.*

Arch Virol 143 (5), 863-880 (1998)

Oudejans JJ, van den Brule AJC, Jiwa NM, de Bruin PC, Ossenkuppele GJ, van der Valk P, Walboomers JMM, Meijer CJLM: *BHRF1, the Epstein-Barr virus (EBV) homologue of the bcl-2 protooncogene, is transcribed in EBV-associated B-cell lymphomas and in reactive lymphocytes.*

Blood 86 (5), 1893-1902 (1995)

Pfeffer S, Zavolan M, Grässer FA, Chien M, Russo JJ, Ju J, John B, Enright AJ, Marks D, Sander C, Tuschl T: *Identification of virus-encoded microRNAs.*

Science 304, 734-736 (2004)

Polack A, Hörtnagel K, Pajic A, Christoph B, Baier B, Falk M, Mautner J, Geltinger C, Bornkamm GW, Kempkes B: *c-myc activation renders proliferation of Epstein-Barr virus (EBV)-transformed cells independent of EBV nuclear antigen 2 and latent membrane protein 1.*

Proc Natl Acad Sci 93, 10411-10416 (1996)

Prang N, Wolf H, Schwarzmann F: *Epstein-Barr virus lytic replication is controlled by post-transcriptional negative regulation of BZLF1.*

J Virol 69 (4), 2644-2648 (1995)

Pulvertaft JV: *Cytology of Burkitt's tumours (African lymphoma).*

Lancet 1, 238-240 (1964)

Ragoczy T, Heston L, Miller G: *The Epstein-Barr virus Rta protein activates lytic cycle genes and can disrupt latency in B lymphocytes.*

J Virol 72 (10), 7978-7984 (1998)

Ragoczy T, Miller G: *Role of the Epstein-Barr virus Rta protein in activation of distinct classes of viral lytic cycle genes.*
J Virol 73 (12), 9858-9866 (1999)

Reznikoff WS, Goryshin IY, Jendrisa J, Hoffman LM, Meis R: *Insertional transposon mutagenesis by electroporation of released Tn5 transposition complexes.*
Nature biotechnology 18 (1), 97-100 (2000)

Ring CJA: *The B cell-immortalizing functions of Epstein-Barr virus.*
J Gen Virol 75, 1-13 (1994)

Ritter K, Kühl RJ, Semrau F, Eiffert H, Kratzin HD, Thomssen R: *Manganese superoxide dismutase as a target of autoantibodies in acute Epstein-Barr virus infection.*
J Exp Med 180, 1995-1998 (1994)

Robertson E, Kieff E: *Reducing the complexity of the transforming Epstein-Barr virus genome to 64 kilobase pairs.*
J Virol 69 (2), 983-993 (1995)

Rochford R, Hobbs MV, Garnier JL, Cooper NR, Cannon MJ: *Plasmacytoid differentiation of Epstein-Barr virus-transformed B cells in vivo is associated with reduced expression of viral latent genes.*
Proc Natl Acad Sci USA 90, 352-356 (1993)

Salamon D, Takacs M, Ujvari D, Uhlig J, Wolf H, Minarovits J, Niller HH: *Protein-DNA binding and CpG methylation at nucleotide resolution of latency-associated promoters Qp, Cp, and LMP1p of Epstein-Barr virus.*
J Virol 75 (6), 2584-2596 (2001)

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR: *DNA sequencing with chain-termination inhibitors.*
Proc Natl Acad Sci USA 74 (12), 5463-5467

Sato H, Takimoto T, Tanaka S, Tanaka J, Raab-Traub B: *Concatametric replication of Epstein-Barr virus: structure of the termini in virus-producer and newly transformed cell lines.*
J Virol 64, 5295-5300 (1990)

Sbih-Lammali F, Berger F, Busson P, Ooka T: *Expression of the DNase encoded by the BGLF-5 gene of Epstein-Barr virus in nasopharyngeal carcinoma epithelial cells.*
Virology 222, 64-74 (1996)

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

Serio TR, Kolman JL, Miller G: *Late gene expression from the Epstein-Barr virus BcLF1 and BFRF3 promoters does not require DNA Replication in cis.*
J Virol 71 (11), 8726-8734 (1997)

Shao L, Rapp LM, Weller SK: *Herpes Simplex virus 1 alkaline nuclease is required for efficient egress of capsids from the nucleus.*
Virology 196, 146-162 (1993)

- Shimizu N**, Yoshiyama H, Takada K: *Clonal propagation of Epstein-Barr Virus (EBV) Recombinants in EBV-Negative Akata Cells.*
J Virol 70 (10), 7260-7263 (1996)
- Sözer N**: *Untersuchung der Immortalisierung und Lalignisierung von B-Lymphozyten nach einer Infektion mit dem Epstein-Barr Virus (EBV) mit molekularbiologischen Methoden.*
Diplomarbeit, RWTH Aachen (1999)
- Speck SH**, Chatila T, Flemington E: *Reactivation of Epstein-Barr virus: regulation and function of the BZLF1 gene.*
Trends in Microbiology 5 (10), 399-405 (1997)
- Steven NM**, Annels NE, Kumar A, Leese AM, Kurilla MG, Rickinson AB: *Immediate early and early lytic cycle proteins are frequent targets of the Epstein-Barr virus-induced cytotoxic T cell respnse.*
J Exp Med 185 (9), 1605-1617 (1997)
- Stoerker J**, Yajima Y, Glaser R: *The interaction of non-transforming Epstein-Barr virus (EBV) with cell-associated EBV DNA in superinfected lymphoblastoid cell lines.*
Int J Cancer 30, 385-392 (1982)
- Stolzenberg MC**, Ooka T: *Purification and properties of Epstein-Barr virus DNase expressed in Eschericia coli.*
J Virol 64 (1), 96-104 (1990)
- ST-Onge L**, Bouchard L, Bastin M: *High-frequency recombination mediated by polyoma-virus large T antigen defective in replication.*
J Virol 67 (4), 1788-1795 (1993)
- Straus SE**, Cohen Ji, Tosato G, Meier G: *Epstein-Barr virus infections: Biology, pathogenesis and management.*
Annals of Internal Medicine 118 (1), 45-56 (1993)
- Takada K**, Osato T: *Analysis of the transformation of human lymphocytes by Epstein-Barr virus.*
Intervirology 11, 30-39 (1979)
- Takakuwa T**, Luo WJ, Ham MF, Sakane-Ishikawa F, Wada N, Aozasa K: *Integration of Epstein-Barr virus into chromosome 6q15 of Burkitt lymphoma cell line (Raji) induces loss of BACH2 expression.*
Am J Pathol 164 (3), 967-974 (2004)
- Tanaka A**, Miyagi M, Yjima Y, Nonoyama M: *Improved production of Epstein-Barr virus DNA for nucleic acid hybridization studies.*
Virology 74, 81-85 (1976)
- Thorley-Lawson DA**, Miyashita EM, Khan G: *Epstein-Barr virus and the B cell: that's all it takes.*
Trends in Microbiology 4 (5), 204-208 (1996)
- Thorley-Lawson DA**, Babcock GJ: *A model for persistent infection with Epstein-Barr virus: The stealth virus of human B cells.*
Life Sciences 65 (14), 1433-1453 (1999)

Tierney RJ, Steven N, Young LS, Rickinson AB: *Epstein-Barr virus latency in blood mononuclear cells: Analysis of viral gene transcription during primary infection and in the carrier state.*

J Virol 68 (11), 7374-7385 (1994)

Tomkinson B, Kieff E: *Second-site homologous recombination in Epstein-Barr virus: Insertion of type 1 EBNA 3 genes in place of type 2 has no effect on in vitro infection.*

J Virol 66 (2), 780-789 (1992)

Trivedi P, Spinsanti P, Cuomo L, Volpe M, Takada K, Frati L, Faggioni A: *Differential regulation of Epstein-Barr virus (EBV) latent gene expression in Burkitt lymphoma cells infected with a recombinant EBV strain.*

J Virol 75 (10), 4929-4935 (2001)

Wang F, Marchini A, Kieff E: *Epstein-Barr virus (BV) recombinants: Use of positive selection markers to rescue mutants in EBV-negative B-lymphoma cells.*

J Virol 65 (4), 1701-1709 (1991)

Yamamoto N, Takizawa T, Iwanaga Y, Shimizu N, Yamamoto N: *Malignant transformation of B-lymphoma cell line BJAB by Epstein-Barr virus-encoded small RNAs.*

FEBS Letters 484, 153-158 (2000)

Young LS, Murray PG: *Epstein-Barr virus and oncogenesis: from latent genes to tumours.*

Oncogene 22, 5108-5121 (2003)

Zalani S, Holley-Guthrie E, Kenney S: *Epstein-Barr viral latency is disrupted by the immediate-early BRLF1 protein through a cell-specific mechanism.*

Proc Natl Acad Sci USA 93, 9194-9199 (1996)

Zeidler R, Meissner P, Eissner G, Lazis S, Hammerschmidt W: *Rapid proliferation of B cells from adenoids in response to Epstein-Barr virus infection.*

Cancer Research 56, 5610-5614 (1996)

Zeng Y, Middeldorp J, Madjar JJ, Ooka T: *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 (1997)

Zetterberg H, Jansson A, Rymo L, Chen F, Karlsson A, Klein G, Brodin B: *The Epstein-Barr virus ZEBRA protein activates transcription from the early lytic F promoter by binding to a promoter-proximal AP-1-like site.*

J Gen Virol 83, 2007-2014 (2002)

Zhang Q, Hong Y, Dorsky D, Holley-Guthrie E, Zalani S, Aly Elshiekh N, Kiehl A, Le T, Kenney S: *Functional and physical interactions between the Epstein-Barr virus (EBV) proteins BZLF1 and BMRF1: Effects on EBV transcription and lytic replication.*

J Virol 70 (8), 5131-5142 (1996)

Zimmermann J, Hammerschmidt W: *Structure and role of the terminal repeats of Epstein-Barr virus in processing and packaging of virion DNA.*

J Virol 69 (5), 3147-3155 (1995)

Danksagung

Herrn Prof. Dr. K. Ritter danke ich für die Vergabe des Themas und der kritischen Beurteilung aller Ergebnisse.

Bei Herrn Prof. Dr. F. Kreuzaler möchte ich mich für die freundliche Übernahme des Korreferats bedanken.

Mein Dank gilt außerdem Herrn Dr. Michael Kleines für die praktische und theoretische Betreuung und die gewissenhafte Durchsicht dieser Arbeit.

Ganz besonders möchte ich mich bei Kirsten Schellenberg für die tolle Zusammenarbeit im Labor und die allgegenwärtige Diskussionsbereitschaft bedanken.

Bedanken möchte ich mich auch ganz herzlich bei Christina Kupper, Georg Werth, Silke Grannemann und Sabrina Kuropka für die Unterstützung bei den gemeinsam durchgeführten Versuchen und der Anfertigung dieser Arbeit.

Allen Doktoranden, Diplomanden und Mitarbeitern danke ich für das nette Arbeitsklima und die gute Zusammenarbeit.

Zu guter Letzt bedanke ich mich bei meiner Familie, die mich jederzeit in allem unterstützt hat und somit in großem Maße zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Name: Michele Peters
Geburtsdatum: 14.09.1971
Geburtsort: Greven

1978-1982	Grundschule in Lienen
1982-1991	Gymnasium in Lengerich Abschluß: Abitur

08/1991-02/1994	Ausbildung zur Pharmazeutisch-Technischen Assistentin (PTA) an der Völkerschule Osnabrück Berufspraktikum in der Falken-Apotheke in Lengerich
04/1994-03/1995	PTA in der Apotheke zur Robbe in Lienen
04/1995-09/1995	PTA in der Josefs Apotheke in Münster

10/1995-09/2000	Biopharmakologiestudium an der Ernst-Moritz-Arndt-Universität in Greifswald
02-03/1999	Berufspraktikum in der Forschungstoxikologie bei der Bayer AG in Wuppertal
08.09.2000	Abschluß als Diplom-Biopharmakologin (Thema der Diplomarbeit: Histologische und biochemische Charakterisierung des Granulationsgewebes von Patienten mit Parodontitis marginalis).

seit 10/2000 am Institut für Medizinische Mikrobiologie des Universitätsklinikums der RWTH Aachen, Lehr- und Forschungsgebiet Virologie
Arbeitsgebiet: Generierung von Transposonmutanten des Epstein-Barr Virus zur Charakterisierung von Genfunktionen für die lytische Virusvermehrung und die virale Latenz.