

# **Erste Schritte zu einem Mausmodell für Epstein-Barr Virus**

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades  
der Fakultät Biologie  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von

**Heidrun Herrmann**

München, Januar 2007

### Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich mich nicht anderweitig einer Doktorprüfung ohne Erfolg unterzogen habe.

### Ehrenwörtliche Erklärung

Ich versichere hiermit ehrenwörtlich, dass die Dissertation von mir selbstständig, ohne unerlaubte Beihilfe angefertigt worden ist.

München 01.01.2007

Erstgutachter: Prof. Dr. Dirk Eick

Zweitgutachter: PD Dr. Steffen Dietzel

Tag der mündlichen Prüfung: 28.06.2007

---

## Inhaltsverzeichnis

1. Einführung .....	5
<b>1.1. Das Epstein-Barr Virus.....</b>	<b>5</b>
<b>1.2. EBV-assoziierte Erkrankungen.....</b>	<b>8</b>
<b>1.3. <i>In vivo</i> Modelle für EBV.....</b>	<b>12</b>
1.3.1 Tiermodelle mit humanem EBV.....	12
1.3.2 Tiermodelle mit EBV-verwandten Herpesviren.....	17
<b>1.4 ES-Zellen.....</b>	<b>21</b>
<b>1.5. <i>In vitro</i> B-Zell-Differenzierung.....</b>	<b>23</b>
2. Zielsetzung.....	25
3. Material und Methoden.....	26
<b>3.1. Material.....</b>	<b>26</b>
3.1.1. Antikörper.....	26
3.1.2. Plasmide.....	26
3.1.3. Oligonukleotide.....	28
3.1.4. Southernblot-Sonden.....	28
3.1.5. Bakterien.....	29
3.1.6. Zell-Linien.....	29
3.1.7. Mäuse.....	30
3.1.8. Chemikalien, Enzyme, Geräte und Sonstiges.....	30
<b>3.2. Methoden.....</b>	<b>33</b>
3.2.1. Zellkultur und Analyse von Zellen.....	33
3.2.2. Bakterienkultur.....	40
3.2.3. DNA-Arbeitstechniken.....	41
3.2.4. RNA-Arbeitstechniken.....	48
3.2.5. Proteintransfer und immunologischer Nachweis von Proteinen.....	49
4. Ergebnisse.....	52
<b>4.1. Klonierung des Mini-EBV-Plasmids 3314 .....</b>	<b>52</b>
<b>4.2. Herstellung der EBNA1 exprimierenden ES-Zell-Linie C1.....</b>	<b>56</b>
4.2.1 Integration des Konstrukts p3032 in ES-Zellen.....	57
4.2.2 Überprüfung der Integration von p3032.....	58
4.2.3 Cre-Deletion der Stopp-Kassette.....	61
4.2.4 Überprüfung der Expression von EBNA1.....	62
<b>4.3. Generierung EBV-positiver ES-Zell-Linien.....</b>	<b>63</b>
4.3.1 Episomale Aufrechterhaltung der EBV-Plasmide.....	68
4.3.2 Expression von EBV-Genen.....	71

---

4.3.3	Untersuchung der ES-Zellen mit Realtime-PCR.....	73
4.3.4	Aktivität der EBV-Promotoren Cp und Wp.....	75
<b>4.4.</b>	<b><i>In vitro</i> Differenzierung der EBV-tragenden ES-Zellen.....</b>	<b>78</b>
4.4.1	FACS-Analysen der <i>in vitro</i> differenzierten Zellen.....	82
4.4.2	Expression von EBV-Genen in murinen B-Zellen.....	86
4.4.3	Realtime-PCR-Analyse der <i>in vitro</i> differenzierten Zellen.....	88
5.	Diskussion.....	91
<b>5.1.</b>	<b>Etablierung und Charakterisierung EBV-positiver ES-Zellen der Maus.....</b>	<b>91</b>
<b>5.2.</b>	<b><i>In vitro</i> B-Zell-Differenzierung EBV-positiver ES-Zellen.....</b>	<b>97</b>
6.	Zusammenfassung und Ausblick.....	102
7.	Anhang.....	105
<b>7.1.</b>	<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>105</b>
<b>7.2</b>	<b>Abkürzungen.....</b>	<b>106</b>
8.	Literatur .....	108
9.	Danksagung.....	122
10.	Lebenslauf.....	123

# 1. Einführung

## 1.1 Das Epstein-Barr Virus

1964 isolierten Anthony Epstein, Yvonne Barr und Budd Achong aus B-Zell-Linien, die aus Burkitt-Lymphomen hervorgegangen sind, herpesvirusähnliche Partikel (Epstein et al., 1964). 1966 beschrieben dann Klaus Hummeler, Gertrude Henle und Werner Henle die Feinstruktur des Erregers und erkannten in ihm ein neues Herpesvirus (Hummeler et al., 1966). Er wurde nach den Entdeckern Epstein-Barr-Virus (EBV) genannt. Der systematische Name des Virus ist humanes Herpesvirus 4.

Das Virus gehört zu den humanen  $\gamma$ -Herpesviren und hat ein sehr enges Wirtsspektrum (Übersicht Kieff und Rickinson 2001). Es besitzt ein doppelsträngiges DNA-Genom von ungefähr 172 kb Größe und ist das erste Herpesvirus, dessen Genom kloniert und vollständig sequenziert wurde (Baer et al., 1984). EBV ist weltweit verbreitet und 95 % der Erwachsenen sind seropositiv. Infizierte Personen besitzen lebenslang nach der Primärinfektion EBV-positive B-Zellen im Blut und scheiden in unterschiedlichen Mengen Virus über den Speichel aus (Yao et al., 1985). Auf diesem Weg wird der Virus von Mensch zu Mensch übertragen.

In Europa und den USA erfolgt die Infektion meist im Jugendlichen- und frühen Erwachsenenalter und ist oft verbunden mit den Symptomen einer infektiösen Mononukleose (vgl. Abschnitt 1.2). Der Übertragungsweg über den Speichel gab der mit der Infektion verbundenen Mononukleose im englischsprachigen Raum die Bezeichnung „kissing disease“. In China und den Entwicklungsländern sind aufgrund der geringen Hygiene bzw. der mancherorts noch üblichen Mund-zu-Mund-Fütterung von Kleinkindern alle Kinder im Alter von etwa zwei Jahren seropositiv. Bei der Primärinfektion mit dem Virus beträgt die Inkubationszeit ca. vier bis sechs Wochen. Sie verläuft im Kindesalter meist asymptomatisch. Von der frühen Phase der Infektion, die der oralen Übertragung des Virus folgt, ist wenig bekannt. Es ist unklar, ob B-Zellen direkt infiziert werden oder ob Epithelzellen bei der Infektion involviert sind.

Der Lebenszyklus des EBV weist wie andere Herpesviren eine lytische und eine latente Phase auf. Das Virus-Genom liegt linear in den Viruskapsiden vor und wird bei Eintritt in die Zelle zirkularisiert. In der lytischen Phase kommt es zur Expression fast aller viralen Gene und zur DNA-Replikation. Viruspartikel werden produziert und durch die Lyse der Wirtszellen freigesetzt. Die latente Phase zeichnet sich durch die Expression von nur 11 viralen Genen aus, von denen neun für Proteine kodieren (zur Übersicht Cohen, 2000). In diesem Zustand werden

keine Viren produziert. Die so genannten latenten Proteine sind entweder im Kern (EBNA-1, -2, -3A, -3B, -3C und -LP) oder in der Plasmamembran (LMP1, LMP2A und LMP2B) der infizierten B-Zelle lokalisiert. Zusätzlich werden zwei nicht polyadenylierte RNAs, EBER1 und EBER2, transkribiert, die in allen Formen der Latenz vorhanden sind.

Die infizierten Zellen verändern sich zu lymphoblastoiden Zellen. Da bis auf EBNA1 alle latenten Proteine Epitope tragen, die auf MHC-KlasseI-Molekülen der B-Zelle präsentiert werden, löst die Proliferation dieser Zellen eine massive humorale und zelluläre Immunantwort aus, die eine unkontrollierte Expansion der infizierten Zellen verhindert (Rowe, 1999). Diese Form der Latenz wird als Latenz III bezeichnet und findet sich in der infektiösen Mononukleose und lymphoproliferativen Erkrankungen bei immunsupprimierten Patienten.

Neben der ersten Expansionsphase, der Latenzphase III, zeigt das Virus noch zwei weitere Expressionsmuster, die Latenzphase I und II genannt werden. In diesen Phasen entgeht das Virus der Überwachung durch das Immunsystem und kann lebenslang in den Wirtszellen persistieren.

In der Latenzphase I, die in ruhenden Gedächtnis-B-Zellen nachgewiesen wurde, werden nur EBNA1 und die EBER RNAs exprimiert. Das Genom liegt in mehrere Kopien als Episom vor und wird bei der Zellteilung an die Tochterzellen weitergegeben. Auf welche Weise EBV in Gedächtnis-B-Zellen gelangt, wird momentan noch kontrovers diskutiert (Babcock et al., 2000, Kurth et al., 2000). Die Latenz I ist auch für Burkitt-Lymphome charakteristisch.

Einige EBV-positive B-Zellen exprimieren EBNA1, LMP1, LMP2A und die EBER RNAs. Dieses Expressionsmuster wird als Latenz II bezeichnet. Es wird vermutet, dass es sich dabei um ein Übergangstadium zwischen der proliferativen Phase der Latenz III und viralen Persistenz in Latenz I handelt. Man findet die Latenz II aber auch in Tumorzellen von Hodgkin-Lymphomen und undifferenzierten Nasopharynxkarzinomen.

Als *in vitro* Modell für die latente EBV-Infektion werden lymphoblastoide Zell-Linien (LCLs) angesehen, die durch die Infektion primärer, humaner B-Zellen mit EBV entstehen (Thorley-Lawson und Mann 1985). Die Zell-Linien zeigen das Expressionsmuster der Latenz III, doch nicht alle Gene sind für die Proliferation EBV-immortalisierter Zellen essentiell (Übersicht Kieff und Rickinson, 2001). EBNA3B und die EBER-RNAs scheinen keine Rolle zu spielen. EBNA-LP, LMP2A und LMP2B steigern zwar die Effizienz des Immortalisierungsprozesses, sind aber nicht zwingend notwendig. Die restlichen Gene werden im Folgenden kurz charakterisiert:

### ***EBNA1***

EBNA1 ist ein DNA-bindendes Kernprotein, das für die Replikation und Aufrechterhaltung des episomalen EBV-Genoms wichtig ist. Es bindet den viralen Replikationsursprung oriP (Kieff und Reikinson, 2001) und vermittelt die Rekrutierung des zellulären ORC-Komplexes (Schepers et al., 2001). Die korrekte Segregation der Episome während der Zellteilung wird ebenfalls von dem Protein vermittelt (Aiyar et al., 1998, Yates et al., 1985). EBNA1 kann außerdem mit zwei Stellen in der Nähe des Qp Promotors interagieren und so seine eigene Expression negativ regulieren (Nonkwelo et al., 1996). Das Protein beinhaltet eine Glycin-Alanin-Repeat-Sequenz, deren Größe in verschiedenen EBV-Isolaten variiert (Young und Murray, 2003) und die die proteolytische Degradation von EBNA1 durch den Proteasomen-Komplex unterbindet (Levitskaya et al., 1995). Durch diesen Mechanismus wird die Präsentation von Antigenen auf der Zelloberfläche durch MHC-KlasseI-Moleküle verhindert (Levitskaya et al., 1997). Zusätzlich ist EBNA1 auch ein transkriptioneller Regulator viraler EBV-Gene und damit des transformierenden Phänotyps, den diese erzeugen (Altmann et al., 2006). Es konnte gezeigt werden, dass die Mutation eines bestimmten Sequenzabschnitts von EBNA1 (UR1) die Transkription des viralen Promotor Cp unterbindet, wodurch eine Wachstumstransformation von B-Zellen nicht mehr möglich ist.

### ***EBNA2***

EBNA2 aktiviert die Transkription von zellulären und viralen Genen und ist für die B-Zell-Transformation essentiell. Zu den aktivierten Genen gehören z. B. die B-Zell-Aktivierungsmarker CD23 und CD21 (Calender et al., 1987, Wang et al., 1990) sowie die viralen Gene LMP1 und LMP2 (Abbot et al., 1990, Zimmer-Strobl et al., 1991). EBNA2 transaktiviert auch den viralen Cp Promoter, von dem aus die Transkription der EBNA-Gene reguliert wird. (Jin und Speck, 1992, Sung et al., 1991). EBNA2 bindet nicht direkt an DNA, sondern wird über die Interaktion mit dem DNA-bindenden Protein RBP-Jκ (Grossmann et al., 1994) in die Promotorregion EBNA2-regulierter Gene rekrutiert. Da auch aktivierte Notch-Rezeptoren über die Interaktion mit RBP-Jκ Genexpression modulieren, wird angenommen, dass EBNA2 als biologisches Äquivalent zu einem aktivierten Notch-Rezeptor fungiert (Zimmer-Strobl et al., 2001).

### ***EBNA3A-C***

Versuche mit rekombinantem EBV zeigten, dass EBNA3A und EBNA3C für die *in vitro* Transformierung von B-Zellen essentiell sind, während EBNA3B dabei keine Rolle zu spielen

scheint (Robertson et al., 1996). Die beiden Proteine sind an der transkriptionellen Regulation viraler und zellulärer Gene, wie z. B. CD21 und LMP1, beteiligt (Allday et al., 1993, Silins und Sculley, 1994, Wang et al., 1990). Alle EBNA3 Proteine können mit RBP-J $\kappa$  interagieren, verhindern damit die Bindung des EBNA2/RBP-J $\kappa$ -Komplexes an die DNA und regulieren dadurch die EBNA2-vermittelte Transaktivierung (Robertson et al., 1995).

### ***LMP1***

LMP1 ist essentiell für die B-Zell-Transformation *in vitro* und zeigt onkogenes Potential in Nager-Fibroblasten (Wang et al., 1985, Kaye et al., 1993). Auch *in vivo* konnte das Protein als virales Onkogen identifiziert werden (Kulwicht et al., 1998, Wilson et al., 1990). LMP1 agiert als konstitutiv aktiver Rezeptor (Gires et al., 1997), der eine Reihe von Charakteristika mit Mitgliedern der TNF-Rezeptor-Familie, besonders CD40, gemeinsam hat. Es aktiviert den kanonischen und den nicht-kanonischen NF $\kappa$ B-Signalweg (Eliopoulos et al., 2003, Huen et al., 1995). Außerdem werden der JAK-STAT Signalweg (Gires et al., 1999), sowie die p38 MAPK- und die JNK/AP1-Signalkaskade aktiviert (Kieser et al., 1999, Kieser et al., 1997). Dadurch induziert LMP1 die Expression von anti-apoptotischen Genen wie Bcl-2 (Henderson et al., 1991), von Cytokinen wie IL6 (Eliopoulos et al., 1997 u. 1999), von Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1 (Rowe, 1995) und von B-Zell-Aktivierungsmarkern wie CD21 (Wang et al., 1990, Dirmeier et al., 2005).

## **1.2. EBV-assozierte Erkrankungen**

Das Epstein-Barr-Virus (EBV) kann unbehelligt vom Immunsystem lebenslang im Menschen persistieren (Babcock et al., 1998). Neben den Symptomen einer Primärinfektion (siehe Infektiöse Mononukleose) hat die Koexistenz mit dem Virus für die meisten infizierten Menschen keine ernstesten Konsequenzen. Bei einigen Individuen jedoch ist das Virus an der Entstehung von bösartigen Tumoren beteiligt. Er ist daher ätiologisch eng mit verschiedenen malignen Erkrankungen des Menschen assoziiert.

Zu diesen Erkrankungen gehören Burkitt-Lymphome (BL), Hodgkin-Lymphome (HL), einige T-Zell-Lymphome sowie lymphoproliferative Erkrankungen bei immundefizienten Patienten. Während in gesunden Menschen die durch EBV hervorgerufene Proliferation von B-Zellen durch das Immunsystem kontrolliert wird, kann es in immunsupprimierten Patienten zu einer unkontrollierten Proliferation der infizierten B-Lymphozyten kommen. Transplantations- und AIDS-Patienten entwickeln daher vermehrt EBV-assozierte, immunoblastische Lymphome

(Freter, 1990, Gratama et al., 1991, Craig et al., 1993, Thomas et al., 1993). Auch einige epitheliale Tumoren wie Magenkarzinome und Nasopharynxkarzinome (NPK) sind mit EBV assoziiert (Niedobitek et al., 2001). Auf einige dieser Erkrankungen wird im Folgenden genauer eingegangen.

### *Infektiöse Mononukleose*

Bei der Primärinfektion mit dem Epstein-Barr-Virus treten bei Jugendlichen und Erwachsenen gehäuft die Anzeichen einer infektiösen Mononukleose (IM) auf. Diese selbstlimitierende, lymphoproliferative Erkrankung wird auch „Pfeiffersches Drüsenfieber“ bzw. im englischsprachigen Raum „kissing disease“ genannt. Anzeichen für eine Erkrankung sind Halsschmerzen, Fieber und geschwollene Lymphknoten. Teilweise kommt es auch zu Hautausschlägen und Milzschwellungen. Die Symptome klingen üblicherweise nach ein paar Wochen ab, wobei das Virus aber lebenslang im Körper verbleibt.

In der akuten Phase der Infektion sind bis zu 10 % der im Blut zirkulierenden B-Lymphozyten EBV-positiv. Die Infektion führt zu einer starken Stimulation der T-Zellen, die in der akuten Phase bis zu 50 % der atypischen Lymphozyten im Blut ausmachen und für einen Großteil der Symptome verantwortlich sind. Nach Ablauf der akuten Phase findet man die latent mit EBV infizierten Gedächtnis-B-Zellen im Blut und in den lymphatischen Organen. Von einer Million Gedächtnis-B-Zellen sind nur 1 bis 50 infiziert (Thorley-Lawson, 2001).

In sehr seltenen Fällen klingen die Symptome der IM nicht vollständig ab. Die Patienten entwickeln eine chronisch-persistierende Infektion. Dabei sind neben Viren in der Latenzphase auch vermehrt Viren in der lytische Phase zu finden. Die Symptome dieser chronischen Infektion sind geringer ausgeprägt als bei der akuten Infektion, können aber über Monate und sogar Jahre hinweg andauern.

Tödliche Verläufe der Krankheit treten nur familiär gehäuft bei Männern mit einem Gendefekt auf dem X-Chromosom auf. In diesen Patienten mit XLP-Syndrom (auch Duncan-Syndrom) ist das SAP-Gen mutiert oder fehlt ganz, was zu Defekten in der lytischen Aktivität von T- und NK-Zellen führt (Dupre et al., 2005). Dadurch kann das Immunsystem nicht mehr effektiv auf die Infektion mit EBV reagieren (Purtilo et al., 1975). Es kommt zu multiplem Organversagen bzw. zur Entwicklung polyklonaler B-Zell-Lymphome.

### ***Das Burkitt-Lymphom (BL)***

1961 beschrieb der englische Arzt Denis Burkitt ein Lymphom, das bei Kindern und Jugendlichen in Ost- und Zentralafrika vorkommt (Burkitt und O'Conor, 1961). Das BL tritt in Äquatorialafrika und in Neuginea bei Kindern im Alter von etwa sieben bis neun Jahren endemisch auf und ist mit einer Inzidenz von fünf bis zehn Fällen pro 100 000 Personen und Jahr die häufigste kindliche Tumorerkrankung in Afrika. Etwa 95 % dieser Burkitt-Lymphome enthalten EBV in den transformierten Zellen. Die endemische Form manifestiert sich überwiegend als schnell wachsender Tumor des Kiefer- und Gesichtsbereichs oder des Abdomens. Bei der sporadischen Form dieses Lymphoms, die weltweit mit geringerer Inzidenz vor allem bei Erwachsenen zu finden ist, sind nur 20 % mit EBV assoziiert (Kieff und Rickinson, 2001). Burkitt-Lymphome kommen auch im Zusammenhang mit einer HIV-Infektion vor. Nur 30 - 40 % der Fälle von AIDS-Burkitt-Lymphomen ist mit EBV-assoziert.

Alle BL-Tumore, unabhängig von ihrem geographischen Vorkommen oder einer AIDS-Assoziation, weisen spezifische Chromosomentranslokationen des langen Armes des Chromosoms 8 auf. In dieser Genomregion liegt das c-myc-Gen. Die Region wird entweder auf das Chromosom 14 oder seltener auf die Chromosomen 2 oder 22 übertragen. In allen Fällen gelangt das Protoonkogen c-myc unter die Kontrolle von Elementen, die in B-Zellen Genaktivität verstärken, wodurch hohe Konzentrationen des c-myc-Proteins in den Zellen vorliegen. In etwa 30 % der Fälle finden sich zusätzlich Mutationen des Tumorsuppressorgens p53 (Farrell et al., 1989, Gaidano et al., 1991). In den Tumorzellen scheint EBNA1 als einziges virales Protein durchweg detektierbar zu sein (Hatzubai et al., 1987, Gregory et al., 1990), wobei unklar ist, welchen Beitrag EBNA1 bei der Entstehung dieser Tumoren leistet. EBER-Transkripte sind ebenfalls in den Tumoren vorhanden (Young und Rickinson, 2004). Dieses Expressionsmuster wird als Latenz I bezeichnet.

### ***Das Hodgkin-Lymphom (HL)***

Schon 1966 postulierte Brian MacMahon, dass das Hodgkin-Lymphom durch einen Infektionserreger verursacht wird (MacMahon, 1966), aber erst 1987 konnten Lawrence M. Weiss und seine Kollegen als Erste das Vorhandensein von EBV-DNA in HL-Gewebeproben nachweisen (Weiss et al., 1987). Der Tumor macht ca. 20 % aller Lymphome der westlichen Welt aus und hat eine steigende Inzidenz. In den westlichen Ländern enthalten 20 - 50 % der Hodgkin-Lymphome virale DNA, und die EBV-positiven Tumorzellen produzieren die EBER-RNAs und die latenten Proteine EBNA1, LMP1 und LMP2A (Latenz II, Deacon et al., 1993). In den Entwicklungsländern sind nahezu alle Hodgkin-Lymphome EBV-positiv.

Die Lymphome entwickeln sich in den sekundären lymphatischen Organen wie der Milz oder den Lymphknoten. Histologisch sind sie durch mononukleäre Hodgkin- und polynukleäre Reed-Sternberg-Zellen gekennzeichnet, die nur ca. 1 % der Tumormasse ausmachen und mit einer großen Zahl von Lymphozyten und anderen immunologisch aktiven Zellen vermischt sind. Der Ursprung der Hodgkin- und Reed-Sternberg-Zellen wurde lange diskutiert, aber durch eine Untersuchung ihrer Ig-Gene konnte geklärt werden, dass sie von B-Lymphozyten des Keimzentrums abstammen und klonal sind (Crawford, 2001, Anagnostopoulos et al., 1989). Ungefähr 25 % der Hodgkin/Reed-Sternberg-Zellen können aufgrund von Mutationen keinen funktionsfähigen B-Zell-Rezeptor exprimieren (Marafioti et al., 2005). Die meisten dieser B-Zell-Rezeptor-negativen HL sind EBV-positiv, was eine Beteiligung des Virus bei der Entstehung der Krankheit vermuten lässt. Mancao und Kollegen konnten zudem zeigen, dass LMP2A die Funktion des B-Zellrezeptors imitiert und so B-Zell-Rezeptor-negative B-Zellen durch ein Überlebenssignal vor der Apoptose bewahrt (Mancao et al., 2005). Die Rolle, die EBV bei der Entwicklung von Hodgkin-Lymphomen spielt, ist allerdings noch nicht ganz verstanden.

### ***Das undifferenzierte Nasopharynx-Karzinom (NPK)***

Bei dem undifferenzierten Nasopharynxkarzinom handelt es sich um einen Tumor im Nasen-Rachen-Raum, der mit einer Inzidenz von 20 – 30 Erkrankungen pro 100 000 Personen pro Jahr der häufigste Tumor in China und Südostasien ist. In anderen Teilen der Welt kommt das Karzinom nur selten vor. Es entwickelt sich als Primärtumor in der Rosenmüllerschen Grube des Nasopharynx aus Epithelzellen. Typische Symptome sind Einschränkung des Gehörs, Nasenbluten und eine Blockierung der Ohrtuben. Der Tumor metastasiert rasch, so dass die meisten Patienten durch die Verbreitung der Tumorzellen im lymphatischen System Sekundärtumoren ausbilden (Crawford, 2001).

Eine Verbindung zwischen EBV und dem NPK wurde schon 1966 vermutet (Old et al., 1966), aber erst später konnte EBV-DNA in Biopsien nachgewiesen werden (zur Hausen et al., 1970, Wolf et al., 1973). Beim undifferenzierten NPK wird in fast allen Fällen EBV-DNA gefunden, wohin gegen eine Assoziation mit dem Virus in differenzierteren Subtypen des Karzinoms kontrovers diskutiert wird (Thompson und Kurzrock 2004). Die Monoklonalität der EBV-Genome in den undifferenzierten Tumoren wurde durch eine Untersuchung der terminalen Repeats gezeigt (Raab-Traub und Flynn 1986).

Durch die auffällige geographische Verbreitung wird eine genetische Prädisposition vermutet. Auch Umweltfaktoren, wie die Ernährung, scheinen eine Rolle bei der Entstehung der Karzinome zu spielen. So gibt es Hinweise auf eine Verbindung mit Nitrosaminen, die dort in größeren Mengen in der Nahrung (gesalzener Fisch) vorkommen (Yu et al., 1986, Armstrong et al., 1998). In Nasopharynxkarzinomen lassen sich virale Transkripte von EBNA1, LMP1, LMP2A und die EBER-RNAs nachweisen. Dies entspricht einer Latenz II. Welche Rolle diese viralen Proteine bei der Tumorentstehung spielen, ist in den meisten Fällen noch unklar (Kieff und Rickinson, 2001).

### **1.3. In vivo Modelle für EBV**

Die Forschung am Menschen ist aus offensichtlichen ethischen und praktischen Gründen schwierig. Da EBV nur humane Zellen infiziert, war die bisherige Forschung meist auf *in vitro* Versuche beschränkt, denen die Komponenten und die Komplexität eines lebenden Organismus fehlen. Um trotzdem z. B. die Entstehung von EBV-positiven Tumoren *in vivo* studieren zu können, müssen geeignete Tiermodelle entwickelt werden. Dazu gibt es für EBV verschiedene Ansätze. Einige der Tiermodelle benutzen humanes EBV, während andere EBV-verwandte Herpesviren aus Tieren verwenden.

#### **1.3.1 Tiermodelle mit humanem EBV**

##### ***Infektion humanisierter Mäuse mit EBV***

In Menschen und Mäusen sind viele biologische Mechanismen ähnlich, aber es gibt signifikante Unterschiede z. B. in der Struktur und Funktion des Immunsystems. Humanisierte Mäuse wurden mit dem Ziel geschaffen, ein Tiermodell für die Untersuchung des humanen Immunsystems in Mäusen zu haben. Humanisiert bedeutet in diesem Zusammenhang, dass in Mäuse humane Immunzellen oder humane, hämatopoetische Stammzellen transferiert wurden, um ein humanes Immunsystem zu etablieren. Damit dies möglich ist, müssen die Tiere immundefizient sein (Überblick Thomsen et al., 2005).

Es gibt eine ganze Reihe verschiedener, immundefizienter Mäusestämme. Ich möchte hier nur auf eine Auswahl davon eingehen und Versuche in den Mittelpunkt rücken, bei denen humanisierte Mäuse mit EBV infiziert wurden.

Die ersten immundefizienten Mäuse, bei denen es gelang ein humanes Immunsystem zu rekonstituieren, waren SCID-Mäuse (Mosier et al., 1988). Diese Tiere haben eine Mutation in

einem Gen, das für die DNA-Reparatur nötig ist. Dadurch ist die Rekombination der VDJ-Segmente bei der Bildung der T- und B-Zell-Rezeptoren inhibiert, was zu Defekten in der T- und B-Zell-Entwicklung führt. Die Deletion wirkt sich aber auch negativ auf die allgemeine Fähigkeit zur DNA-Reparatur aus, was die Mäuse sensitiv gegenüber Bestrahlungen macht. Davon abgesehen besitzen diese Mäuse ein intaktes, angeborenes Immunsystem (NK-Zellen, Makrophagen, usw.). Der Defekt ist allerdings nicht vollständig, da ungefähr 2 – 23 % der Mäuse eine begrenzte Zahl von funktionsfähigen B- und T-Zellen entwickeln (Überblick Johannessen und Crawford, 1999). Außerdem entstehen spontan in ca. 15 % der Mäuse T-Zell-Lymphome. Eine Entwicklung von B-Zell-Lymphomen in den Mäusen wurde nicht beobachtet. Gewöhnlich werden SCID-Mäusen EBV-positive periphere, mononukleare Blutzellen (PBMCs) intraperitoneal injiziert. Im Blut und den lymphatischen Organen der Mäuse werden humane Lymphozyten gefunden und es entwickeln sich innerhalb von 6 - 16 Wochen EBV-positive humane B-Zell-Lymphome, wobei die Inzidenz, der Zeitpunkt des Auftretens und die Aggressivität der Tumore variabel und abhängig von Spender der Zellen sind (Murphy 1996). Das gleiche Ergebnis konnte bei Mäusen beobachtet werden, die EBV-negative PBMCs erhalten hatten und anschließend mit EBV infiziert wurden. Auch die Injektion von LCLs führte zu Tumorbildung. EBV konnte durchweg in allen Tumoren nachgewiesen werden und Tumorzellen exprimierten latente EBV-Gene (Latenz III).

Allerdings ist die Etablierung eines humanen Immunsystems sehr variabel, was unter anderem an der fehlenden Standardisierung der Protokolle liegt. Humane Zellen werden zudem durch das intakte, angeborene Immunsystem (NK-Zellen) bekämpft. Es kommt bei diesem Mausstamm zum Auftreten von Transplantat-gegen-Wirt-Erkrankungen (engl. graft-versus-host). Das äußert sich in Milzvergrößerungen und Lebererkrankungen und führt unter Umständen zum Tod.

Um den in SCID-Mäusen relativ niedrigen Grad an Rekonstitution von humanen Zellen zu erhöhen, wurde ein weiterer Mausstamm geschaffen, die NOD/SCID-Mäuse. Diesen Mäusen fehlen nicht nur funktionsfähige B- und T-Zellen, sondern sie besitzen auch eine verminderte Funktion ihrer NK-Zellen, Monozyten und Makrophagen, sowie Defekte im Komplementsystem. Dies erleichtert den Transfer von humanen Zellen in die Mäuse. Aber auch diese Tiere entwickeln nach 3 – 4 Monaten T-Zell-Lymphome und eignen sich nicht für Langzeitversuche (Islas-Ohlmayer et al., 2004). Nach der Transplantation von humanen CD34<sup>+</sup>-Zellen konnten humane Lymphozyten, vor allem B-Zellen, in den Mäusen nachgewiesen und mit EBV infiziert werden. 100 % der Tiere entwickelten Tumore, die ihren Ursprung in den humanen Zellen

hatten. Diese großzelligen Lymphome ähneln den Lymphomen, die bei immunsupprimierten Patienten gefunden werden. Eine Transplantat-gegen-Wirt-Erkrankung der Mäuse trat nicht auf.

Rag2<sup>-/-</sup>γc<sup>-/-</sup>-Mäuse sind ein weiterer alymphoider Mausstamm, der für die Xenotransplantation von humanen Zellen benutzt wird (Goldman et al., 1998, Mazurier et al., 1999). Die Deletion der γ-Kette der Cytokinrezeptoren für IL2, IL4, IL7, IL9 und IL15 führt zu einer reduzierten Zahl von T- und B-Zellen und zur Abwesenheit von NK-Zellen und NK-T-Zellen. Die Deletion des Rag2-Gens verhindert die VDJ-Rekombination der Gene für die B- und T-Zell-Rezeptoren, weswegen Tiere mit dieser Mutation wenige oder keine funktionalen T- und B-Zellen besitzen. Tiere, die eine Kombination der beiden Mutationen tragen, besitzen weder T- noch B- oder NK-Zellen und eignen sich deswegen sehr gut für die Transplantation von humanen Zellen.

Traggiai und Kollegen transplantierten in die Leber von neugeborenen Rag2<sup>-/-</sup>γc<sup>-/-</sup>-Mäuse CD34<sup>+</sup>-Zellen aus humanem Nabelschnurblut (Traggiai et al., 2004). Sie konnten humane B- und T-Zellen in den Mäusen nachweisen und diese mit EBV infizieren. In den Tieren konnte das Virus in B-Zellen des Knochenmarks, der Milz und der Lymphknoten nachgewiesen werden. Einige der Tiere zeigten eine Proliferation von LMP1<sup>+</sup>-B-Zellen, während in anderen keine Proliferation von B-Zellen zu detektieren war. In den letztgenannten stieg die Zahl der T-Zellen in der Milz deutlich an. Im Gegensatz zu den SCID- und NOD/SCID-Mäusen konnte eine Bildung von Tumoren nicht beobachtet werden.

Allen Mausmodellen gemeinsam ist das Problem der Reproduzierbarkeit. Da biologische Systeme sehr komplex und sensitiv gegenüber den Ausgangsbedingungen sind, hängen die Ergebnisse der Versuche von vielen Faktoren ab, die nicht komplett verstanden bzw. nicht beherrschbar sind (Kvell et al., 2000). Zudem ist es schwierig dieses System für eine Untersuchung der Auswirkungen von EBV auf das humane Immunsystem zu nutzen. Eine komplette Rekonstitution eines funktionalen, humanen Immunsystems konnte in diesen Tieren nicht gezeigt werden, insbesondere Probleme bei der T-Zell-Differenzierung sind zu erwarten. Die Ergebnisse, die nach einer EBV-Infektion der humanisierten Mäuse gewonnen wurden, müssen immer im Zusammenhang mit dem Grad der Humanisierung gesehen werden. Eine Übertragung in das humane System ist auf Grund der fehlenden Gesamtheit der Immunantwort schwierig.

### ***EBV-Infektion von genetisch veränderten Mäusen und Ratten***

EBV hat ein enges Wirtsspektrum in vivo und infiziert neben Menschen nur einige Neuwelt-Affen, nicht aber andere Tierarten wie z. B. Mäuse. Da viele wichtige biologische Prinzipien und Prozesse in Menschen und Mäusen konserviert sind, wurde versucht Zellen von Mäusen oder Ratten so zu verändern, dass eine Infektion mit dem Virus möglich ist.

Das zelluläre Oberflächenprotein CD21 stellt den dominanten viralen Rezeptor dar, der mit dem viralen Glykoprotein gp350 einen Komplex bildet (Janz et al., 2000). Das murine CD21-Protein unterscheidet sich von dem humanen und ermöglicht keine Bindung des Virus, weswegen eine Infektion von B-Zellen der Maus mit EBV nicht möglich ist (Fingerroth et al., 1989). Es konnte gezeigt werden, dass murine Fibroblasten (L-Zellen), die mit hCD21 transfiziert wurden, EBV binden (Ahearn et al., 1988). Allerdings konnten nur 0.5 % der Zellen mit einem EBNA-Antikörper gefärbt werden und blieben vier Wochen lang positiv, was für eine sehr geringe Infektionsrate spricht. Milzzellen transgener Mäuse, die ebenfalls humanes CD21 exprimierten (Kearns-Jonker et al., 1997), konnten EBV binden und zeigten eine transiente Expression von EBNA1. Jedoch war nur 1 % der Zellen EBV-positiv und eine EBNA1-Expression konnte schon nach zwei Tagen nicht mehr detektiert werden.

Neben der Interaktion mit CD21 benötigt EBV bei humanen B-Zellen die zusätzliche Bindung an einem weiteren, zellulären Rezeptor, das humanen Leukozytenantigen (HLA) Klasse II. Die viralen Proteine gp85, gp25 und gp42 bilden einen heterotrimeren Komplex, der durch die Bindung von gp42 an das HLA-Molekül eine Rolle bei der B-Zell-Infektion spielt.

Deshalb wurde murine die B-Zell-Linie M12 mit hCD21 und HLA Klasse II (Isotyp DR) transfiziert und mit EBV infiziert (Haan et al., 2001). Die Koexpression beider Oberflächenproteine führte zu einer effizienteren Infektion der Zellen durch das Virus. Es konnten 11 % EBV-positive Zellen detektiert werden. Die murinen Zellen konnten wie humane Zellen das virale Genom als Episom aufrechterhalten. Es konnte eine Expression der Gene EBNA1 und LMP1 gezeigt werden. Da der in diesem Experiment benutzte Virus eine Deletion der LMP2-Gene besitzt, konnte eine Expression dieser Gene nicht untersucht werden. EBNA2 und die EBNA3s wurden nicht in den Zellen gefunden. Dieses Expressionsmuster deutet auf eine Latenz II hin, die auch in einigen humanen Zellen gefunden wird.

Neben Versuchen mit murinen Zellen wurden auch andere transgene Tiere als mögliches EBV-Modell untersucht. Yang und Kollegen zeigten, dass die hCD21-positiven Zell-Linien MDCK (Hund), 9L (Ratte) und c-SST-2 (Ratte) mit EBV infiziert werden konnten (Yang et al., 2000).

Das EBV-Genom lag als Episom in den Zellen vor und alle neun latenten Gene des Virus sowie die EBER-RNAs wurden exprimiert. Alle drei EBNA-Promotoren Qp, Cp und Wp waren aktiv. Bei einer ebenfalls untersuchten murinen Zell-Linie (NIH3T3) konnte keine EBNA-Expression gezeigt werden.

Primäre Milzzellen einer hCD21-positiven, transgenen Ratte wurden nach einer Infektion mit EBV ebenfalls auf die Expression von viralen Genen untersucht (Yang et al., 2003). Es konnten 0.3 % EBNA-positive Zellen gefunden werden. Diese Zellen exprimierten bis Tag 30 EBNA1 und die EBER-RNAs. Eine Expression von EBNA2, LMP1, LMP2 sowie den frühen Antigenen und Kapsidantigenen konnte nicht gezeigt werden. Eine Untersuchung der EBNA-Promotoren ergab, dass Qp aktiv, Cp und Wp aber inaktiv waren. Die Morphologie der EBNA-positiven Lymphozyten veränderte sich nicht und sie zeigten keine Proliferation.

Zusammenfassend lassen die Berichte erkennen, dass eine Veränderung der Zelloberfläche von B-Zellen der Maus bzw. Ratte durch hCD21 eine Infektion mit EBV prinzipiell ermöglicht. Eine zusätzliche Expression HLA-DR konnte die Effizienz der Infektion deutlich steigern. Zwar wurde bei transgenen, infizierten, primären Ratten-B-Zellen eine mit LCLs vergleichbare Genexpression gefunden, aber bei EBV-infizierten, transgenen Ratten beschränkt sich die leider auch transiente Genexpression auf die Latenz I, die auch in Burkitt-Lymphomen gefunden wird. Eine lymphoproliferative Erkrankung oder eine Tumorbildung konnte nicht detektiert werden. Das gleiche Bild zeigt sich bei EBV-positiven, transgenen Mäusen. Allerdings ist die Zahl der mit dem Virus infizierten Zellen in beiden Fällen sehr niedrig, weswegen eine Detektion viraler Gene vermutlich auch ein Problem der Nachweisgrenze ist. Leider gibt es im Moment keine transgene Maus, bei der die Effizienz der Infektion ein ausreichendes Niveau erreicht.

### ***Primaten als EBV-Modell***

Lymphocryptoviren ( $\gamma$ 1 Herpesviren), zu denen auch EBV gehört, wurden neben dem Menschen auch in Primaten gefunden. Sie weisen eine ähnliche Genomstruktur und Genorganisation auf (vgl. Abschnitt 1.3.2 Tiermodelle mit EBV-verwandten Herpesviren). Es lag deshalb nahe, Primaten als Tiermodell für EBV einzusetzen. Sowohl Alt- als auch Neuweltaffen wurden direkt mit humanem EBV infiziert, allerdings waren diese Versuche nur bei einigen Neuweltaffen erfolgreich. Dazu gehören der Lisztaffe (*Saguinus oedipus*), der Nachtaffe (*Aotus trivirgatus*) und der Weißbüschelaffe (*Callithrix jacchus*). Keiner der Affen konnte mit EBV

über den beim Menschen natürlichen Weg über den Oropharynx infiziert werden (Hayashi et al., 2002).

Bei Weißbüschelaffen, denen EBV direkt intramuskulär oder intraperitoneal gespritzt wurde, entstand eine akute und persistierende Infektion, EBV-assoziierten Tumore konnten allerdings nicht gefunden werden (Wedderburn et al., 1984). Einige Lisztaffen dagegen entwickelten multifokale, großzellige Lymphome, die mehrere Kopien des EBV-Genoms enthielten (Cleary et al., 1985). Die Tumore zeigen eine unbegrenzte, virale Latenz (Young et al., 1989) und ähneln den Lymphomen bei immunsupprimierten Menschen.

Das macht die Tiere zu einem guten Modell um das onkogene Potential von EBV zu untersuchen, aber die Immunreaktion der Affen auf einen humanen Virus muss nicht unbedingt die Immunantwort eines humanen Systems abbilden. Trotz dieser Einschränkung wurden die Lisztaffen als Modell für Versuche mit Impfstoffen genutzt (Epstein, 1976). Zwar konnte durch den Impfstoff in den Affen eine Tumorentwicklung verhindert werden (Epstein et al., 1985), aber das Virus persistierte auch in immunisierten Tieren (Niedobitek et al., 1994), was durch EBER-positive Zellen in den lymphatischen Geweben nachgewiesen werden konnte. Altweltaffen konnten nur in seltenen Fällen erfolgreich mit EBV infiziert werden (Levine et al., 1980), wobei nicht genau bekannt ist, worin die Ursachen dafür liegen (Wang et al., 2001). Eine Vermutung ist, dass es eine Kreuzimmunität durch die natürlich erworbene LCV-Infektion der Affen gibt. Generell ist zu Primaten als Tiermodelle anzumerken, dass die Haltung sehr aufwendig und kostenintensiv ist. Darüber hinaus gehören viele der Neuweltaffen zu den gefährdeten Arten und es können nur geringe Tierzahlen für die Forschung genutzt werden. Auch sind die Generationszeiten wesentlich länger als bei kleineren Tieren wie z. B. Nagetieren.

### **1.3.2. Tiermodelle mit EBV-verwandten Herpesviren**

#### ***Primaten als EBV-Modell***

Die Unterfamilie der  $\gamma$ -Herpesviren kann in die Gattungen (Genera) Lymphocryptoviren (LCV oder  $\gamma$ 1-Herpesviren) und Rhadinoviren (oder  $\gamma$ 2-Herpesviren) unterteilt werden. Das Epstein-Barr-Virus gehört zu den humanen Lymphocryptoviren. Um 1970 entdeckten Forscher EBV-verwandte LCV in Altweltaffen (bezieht sich hier nur auf Nicht-Menschenartige) durch einen neu entwickelten indirekten Immunfluoreszenz-Assay. Damit konnten Antikörper, die kreuzreaktiv mit dem EBV-Kapsid-Antigen (VCA) waren, im Serum vieler Altweltaffen nachgewiesen werden (Dunkel et al., 1972, Frank et al., 1976, Goldman et al., 1968). Schon bald wurden verschiedene LCV sowohl bei den Altweltaffen als auch später bei den Neuweltaffen

identifiziert und Forscher begannen nach den Gemeinsamkeiten und Unterschieden der Affen-LCV und EBV zu suchen.

Historisch bedingt wurden Viren dieser Virusgattung eine Vielzahl verschiedener Namen gegeben, die oft weder korrekt noch sehr spezifisch sind. Ich werde mich deswegen bei der Benennung der Viren an die Veröffentlichung von Wang und Kollegen halten (Wang et al., 2001), die statt der offiziellen Nomenklatur eine „umgangssprachliche“ Kombination aus Wirtsorganismus und LCV benutzen, z. B. Rhesus-LCV statt cercopithiciner Herpesvirus 15 (früher Rhesus-EBV).

*In vivo* ähnelt eine LCV-Infektion in Altweltaffen der Infektion mit EBV beim Menschen. Neugeborene Tiere sind vier bis sechs Monate nach der Geburt seronegativ und werden innerhalb eines Jahres seropositiv (Jenson et al., 2000). LCV-negative Rhesusaffen (*Macaca mulatta*) entwickelten bei oraler Inokulation mit Rhesus-LCV eine akute und persistierende, virale Infektion (Moghaddam et al., 1997) und es konnten LCV-positive B-Zell-Linien aus dem peripheren Blut von gesunden, symptomlosen Tieren gewonnen werden. Ebenso waren Viruspartikel in oralen Sekreten der Tiere nachweisbar.

Das Genom des Rhesus-LCVs ist komplett sequenziert (GenBank AY037858) und weist eine 65 %ige Sequenz-Homologie auf Nukleotidebene zu EBV auf (Übersicht Rivaller et al., 2002). Die meisten lytischen Gene von EBV haben Homologe in anderen Herpesviren, da der Mechanismus der Replikation in Herpesviren sehr konserviert ist. Diese Gene von EBV haben eine Homologie von über 82 % in Vergleich zu den Rhesus-LCV-Genen. Auch lytische Gene, die einzigartig für EBV unter den Herpesviren sind, konnten als Homologe in Rhesus-LCV nachgewiesen werden. Die durchschnittliche Sequenzhomologie beträgt nur ca. 60 %. Das Oberflächenprotein gp350 ist mit ca. 50 % dabei eins der am wenigsten konservierten Proteine. Allerdings ist die Rezeptorbindungsstelle gut konserviert, was einen ähnlichen Infektionsmechanismus wie bei EBV vermuten lässt. Es konnte auch gezeigt werden, dass Rhesus-LCV humane B-Zellen infizieren, darin persistieren und replizieren, nicht aber die Zellen transformieren können (Moghaddam et al., 1997).

Alle latenten EBV-Gene (EBNA1-3, EBNA-LP, LMP1-2 und die EBERs) besitzen Homologe in Rhesus-LCV (Blake et al., 1999, Cho et al., 1999, Franken et al., 1996, Jiang et al., 2000, Peng et al., 2000, Rao et al., 2000, Rivaller et al., 1999). Bei den latenten LCV-Genen zeigen sich größere Sequenzunterschiede zu EBV als bei den lytischen, aber trotz der Sequenzhetero-

genität weisen die Gene oft die gleiche Funktionalität auf. So kann z. B. Rhesus-LMP1 sowohl NF- $\kappa$ B- als auch AP1-Aktivität induzieren.

Die große Ähnlichkeit zwischen EBV und Rhesus-LCV macht den Rhesusaffen zu einem guten Modell für die Untersuchung genereller Prinzipien der Virusbiologie von Lymphocryptoviren wie etwa die Beziehung zwischen Wirt und Virus. Eine Nutzung des Rhesusaffen als Tumormodell ist aber schwierig, da das Vorhandensein des Rhesus-LCVs in Affen nicht zwangsläufig mit einer Tumorbildung assoziiert ist. Allerdings konnten bei Langschwanzmakaken (*Macaca fascicularis*), die mit einem simianen Immundefizienzvirus und Makaken-LCV infiziert wurden, in einigen Fällen aggressive, monoklonale LCV-positive Lymphome entdeckt werden (Rivailler et al., 2004). Dies ähnelt der Situation in HIV-Patienten mit EBV-assoziierten Lymphomen.

Auch in Neuweltaffen wurden EBV-verwandte Viren gefunden. Als erster Virus konnte 2001 aus Weißbüschelaffen (*Callithrix jacchus*), die an B-Zell-Lymphomen litten, Büschelaffen-LCV (callithrichines Herpesvirus 3) isoliert werden (Cho et al., 2001). 2003 konnten drei weitere LCV in Rothandtamarinen (*Saguinus midas*), Totenkopffaffen (*Saimiri sciureus*) und Weißkopfsakis (*Pithecia pithecia*) gefunden werden (de Thoisy et al., 2003). Die Infektion von Neuweltaffen mit diesem Virus führt zu einer akuten und persistierenden Infektion mit dem Virus (Cho et al., 2001). Es können auch hier LCV-positive B-Zell-Linien aus dem peripheren Blut von gesunden Tieren gewonnen und Viruspartikel in oralen Sekreten der Tiere gefunden werden. Das Genom des Büschelaffen-LCVs ist noch nicht komplett sequenziert, aber schon jetzt zeigen sich Unterschiede zu EBV und den LCVs aus Altweltaffen. So besitzt das Virus drei einzigartige Gene (C1-3), die keinerlei Homologie zu viralen oder zellulären Genen aufweisen. Ihm fehlen aber auch einige Gene wie BARF1 und LMP2, die sowohl in EBV als auch in LCVs von Altweltaffen vorkommen. Dies schränkt die Nutzung des Virus als EBV-Modell ein.

### ***Das murine Gammaherpesvirus-68 (MHV-68)***

MHV-68 wurde ursprünglich aus Gelbhalsmäusen (*Apodemus flavicollis*) und Rötelmäusen (*Clethrionomys glareolus*) isoliert (Blaskovic et al., 1980), kann aber auch Hausmäuse (*Mus musculus*) infizieren und verhält sich in ihnen wie ein natürlicher Erreger. Das komplette Genom des Virus wurde sequenziert (Virgin et al., 1997) und zeigt Homologien zu EBV und dem Karposi-Sarkom-assoziierten Herpesvirus (KSHV oder humanes Herpesvirus 8). Etwa 90 % der MHV-68-Gene sind homolog zu KSHV und rund 80 % zu EBV (Efsthathiou et al., 1990,

Virgin et al., 1997), wobei auffällt, dass EBV-Gene wie die EBNA<sub>s</sub>, LMP1 und LMP2A/B sowie BZLF1 in dem murinen Virus fehlen. Aufgrund einer ähnlichen Genomstruktur und –organisation sowie der Genzusammensetzung wird EBV den  $\gamma$ 1-Herpesviren zugeordnet, wohingegen KSHV und MHV-68 zu den  $\gamma$ 2-Herpesviren gehören.

MHV-68 besitzt wie alle Gammaherpesviren Gene, die zu zellulären Genen homolog sind und die vermutlich in der Evolution von der Wirtszell-DNA übernommen wurden. Beispiele sind ein IL8-Rezeptor-Homolog, ein D-Typ Cyclin und ein bcl-2 Homolog, die in der Zellproliferation, der Tumorbildung und der Apoptose-Inhibierung eine Rolle spielen könnten (Simas und Efstathiou, 1998).

Die natürliche Route, auf der der Virus in seinen murinen Wirt gelangt ist nicht bekannt. Im Labor wird das Virus entweder intranasal oder intraperitoneal auf Mäuse übertragen, was zu einer Variation in der Infektion führt (Stevenson et al., 2005). Bei der intranasalen Inokulation ist die primäre Stelle der Virusproduktion in den Epithelzellen und mononuklearen Zellen der Lunge und die Mäuse erkranken an Lungenentzündung (Pneumonie). Die akute Infektion der Lunge dauert 10 – 12 Tage und wird von einer persistierenden, latenten Infektion der B-Zellen abgelöst. In der Milz erreicht die Menge an latenten Viren an Tag 14 ihren Höhepunkt, es kommt zur Vergrößerung der Milz und den Lymphknoten. Dann nimmt die Virusmenge schnell ab und bleibt anschließend lebenslang stabil (Cardin et al., 1996, Sunil-Chandra et al., 1992). Bei der intraperitonealen Inokulation dagegen gelangt Virus direkt in die Milz und der B-Zell-Pool kann dort über lytische Verbreitung infiziert werden.

Das allgemein anerkannte Modell ist, dass MHV-68 in Gedächtnis-B-Zellen latent persistiert (Willer und Speck, 2003), aber eine Unterscheidung zwischen lytischer und latenter Infektion in der langfristigen Infektion ist nicht so deutlich. Die Situation wird dadurch unübersichtlich, dass MHV68 außer in Gedächtnis-B-Zellen auch in Makrophagen (Weck et al., 1996) und Epithelzellen (Stewart et al., 1998) von B-Zell-defizienten Mäusen latent zu finden ist. Eine chronische, lytische Replikation scheint dabei eine wichtige Komponente des Fortbestandes des Virus zu sein (Gangappa et al., 2002). Eine ähnliche Interaktion zwischen latenter und lytischer Infektion wird für KSHV vermutet (Grundhoff und Ganem, 2004).

Versuche, B-Zellen *in vitro* mit MHV-68 ähnlich wie bei EBV zu transformieren, waren bis jetzt nicht erfolgreich, aber die langfristige Infektion von Mäusen scheint mit der Entstehung von Lymphoproliferativen Erkrankungen (LPDs) und aggressive Lymphomen assoziiert zu sein (Sunil-Chandra et al., 1994). In einen Zeitraum von drei Jahren entwickelten 9 % der infizierten Mäuse LPDs, wovon 50 % aggressive Lymphome mit gemischtem T- und B-Zell-

Phänotyp waren. Die Assoziation dieser Tumore mit MHV-68 bzw. das onkogene Potential des Virus muss allerdings noch in weiteren Studien untersucht werden, um seine Relevanz als Tumormodell für Gammaherpesviren zu zeigen.

Eine Infektion mit MHV-68 induziert in Mäusen Krankheitssymptome, die sehr ähnlich der durch EBV im Menschen ausgelösten, infektiösen Mononukleose sind (Überblick Dogherty et al., 1997). Neben der Vergrößerung von Lymphknoten, ist auch die Anwesenheit einer großen Zahl von aktiven CD8<sup>+</sup> T-Zellen in den peripheren, lymphatischen Organen charakteristisch (Stevenson et al., 1999). Es kommt zu einer massiven Proliferation von Lymphozyten, hauptsächlich von CD8<sup>+</sup> T-Zellen, aber auch CD4<sup>+</sup> und B220<sup>+</sup> Zellen tragen zu der Vergrößerung der Milz und der Lymphknoten bei (Tripp et al., 1997, Usherwood et al., 1996). CD8<sup>+</sup> T-Zellen sind dabei entscheidend für die Eingrenzung der akuten Infektion und die langfristige Kontrolle der persistierenden Infektion (Cardin et al., 1996, Weck et al., 1996). Eine Depletion dieser Zellpopulation in Mäusen vor der Infektion geht mit unkontrollierter Virusreplikation einher und führt zum Tod der Tiere (Ehtisham et al., 1993).

Das MHV-68-System bietet ein gutes Tiermodell, um die grundlegende Biologie von Gammaherpesviren zu untersuchen. Die Fähigkeit Virusmutationen zu generieren in Kombination mit der Vielfalt an verfügbaren Knockout-Mäusen bietet ein breites Spektrum an Möglichkeiten. Allerdings eignet sich MHV-68 nur bedingt als Modell für EBV, da wichtige Gene wie EBNA2 oder LMP1, die bei der B-Zell-Immortalisierung und Tumorentstehung eine Rolle spielen, nicht vorhanden sind. Deswegen kann ein wesentlicher Bereich der EBV-Biologie nicht in diesem System abgebildet werden.

## 1.4 ES-Zellen

Embryonale Stammzellen (ES-Zellen) der Maus bieten eine weitere Möglichkeit humane oder virale Gene im murinen Kontext zu untersuchen und daraus Mausmodelle zu etablieren. ES-Zellen werden aus der inneren Zellmasse (ICM) von Blastozysten gewonnen (Überblick Stem cells 2001). Die Effizienz, mit der ES-Zell-Linien gewonnen werden können, hängt neben dem Mausstamm auch von den individuellen Einflüssen auf die Schwangerschaft der Mäuse ab (Brook und Gardner, 1997).

Die Erzeugung proliferierender, undifferenzierter ES-Zell-Linien ist ein mehrstufiger Prozess. Dabei wird die ICM vom Trophoblasten getrennt und die Zellen auf einer Feeder-Zellschicht kultiviert. Die Feeder-Zellen sind dabei meist embryonale Fibroblasten, die chemisch behandelt

wurden und deswegen nicht mehr proliferieren. Nach ein paar Tagen entstehen proliferierende, undifferenzierte ES-Zell-Kolonien, die auf eine neue Feeder-Zellschicht überführt werden können. Manche der entstehenden Kolonien beginnen zu differenzieren, während andere in einem undifferenzierten Zustand bleiben. Diese Kolonien werden erneut auf eine Feeder-Zellschicht übertragen. Kann der undifferenzierte Status der Zellen bei diesen Passagen aufrechterhalten werden, ist es gelungen eine ES-Zell-Linie zu isolieren.

Undifferenzierte ES-Zellen sind durch die Expression verschiedener Marker charakterisiert. Dazu zählen neben dem Oberflächenprotein SSEA-1 auch die Transkriptionsfaktoren Oct4 und Nanog. Oct4 (auch Oct3, Pou5fl) ist ein Transkriptionsfaktor der POU-Familie und seine Expression ist strikt auf totipotente und pluripotente Zellen beschränkt (Pesce et al., 1998). Eine Reduktion des Expressionsniveaus um weniger als 50 % führt zu einer Dedifferenzierung der ES-Zellen zu Trophektoderm, wohingegen eine Überexpression eine Differenzierung in Meso- bzw. Endoderm verursacht (Niwa et al., 2000). Oct4 gilt deswegen als Hauptregulator der Initiation, Aufrechterhaltung und Differenzierung von pluripotenten Zellen (Niwa, 2001). Nanog ist ein Transkriptionsfaktor, der eine Homöobox-Domäne beinhaltet. Er ist essentiell für die Aufrechterhaltung pluripotenter Zellen der ICM. Er wird nur in der ICM der Morula und der Blastozyste gefunden und verschwindet beim Einnisten des Embryos in die Gebärmutter (Mitsui et al., 2003, Wang et al., 2003, Chambers et al., 2003). Erneut kann er erst wieder im Epiblast an Tag 6 der Embryogenese detektiert werden und bleibt für den Rest der Entwicklung stabil (Hart et al., 2004). Eine Deletion des Faktors führt zum Verlust der Pluripotenz (Mitsui et al., 2003).

Um die ES-Zellen auch *in vitro* in einem undifferenzierten Zustand zu halten, wird dem Medium LIF zugesetzt. LIF ist ein Cytokin, das zur IL6-Familie gehört und die Differenzierung von ES-Zellen inhibiert. Es ist durch die Zugabe von LIF auch möglich, ES-Zellen ohne Feeder-Zellschicht in Kultur zu halten, ohne dass sie beginnen zu differenzieren (Nichols et al., 1990). Die Funktion von LIF ist dabei auf eine Unterdrückung der Differenzierung beschränkt und scheint keine Wachstumssignale zu übermitteln (Raz et al., 1999). Der LIF-Rezeptor besteht aus einer Rezeptor-spezifischen Untereinheit LIFR $\beta$  und der allgemeinen Untereinheit gp130, die bei allen Rezeptoren der IL6-Familie zu finden ist (Taga und Kishimoto, 1997). Die beiden Hauptsignalwege, die durch den Rezeptor angesteuert werden können, sind der JAK-STAT-Signalweg und der SHP-ERK-Signalweg. Dabei ist der JAK-STAT-Signalweg essentiell für die Selbsterneuerung der ES-Zellen (Matsuda et al., 1999).

ES-Zellen können im undifferenzierten Zustand nicht nur über einen langen Zeitraum hinweg kultiviert werden, sondern sie sind auch pluripotent. Das bedeutet, sie haben die Fähigkeit zu Zellen aller drei embryonalen Gewebearten (Ektoderm, Endoderm und Mesoderm) differenzieren zu können. Dies wird genutzt, um die Zellen *in vitro* zu verschiedenen Zellen und Geweben zu differenzieren.

### 1.5 *In vitro* B-Zell-Differenzierung

Schon 1985 konnte gezeigt werden, dass ES-Zellen *in vitro* zu hämatopoetischen Zellen differenziert werden können (Doetschman et al., 1985), aber dieses System benötigte die Bildung komplexer, Embryo-ähnlicher Strukturen bzw. die Zugabe von exogenen Wachstumsfaktoren (Wiles et al., 1991, Gutierrez-Ramos et al., 1992). Nakano und Kollegen verbesserten das System, indem sie ES-Zellen ohne Zugabe von Wachstumsfaktoren auf der Stromazell-Linie OP9 kultivierten (Nakano et al., 1994). Durch eine Mutation besitzen diese Zellen kein funktionsfähiges M-CSF, ein Faktor, der für die Differenzierung von Makrophagen nötig ist (Yoshida et al., 1990). Ein kleiner Teil der ES-Zellen entwickelte sich unter diesen Bedingungen nach 40 Tagen zu B220<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup> Zellen. Eine Zugabe von rekombinantem M-CSF während der Differenzierung verhinderte die Bildung hämatopoetischer Zellen. Cho und Kollegen analysierten die Stromazell-Linie OP9 weiter und fanden heraus, dass sie ein hohes Expressionsniveau von SCF und ein moderates von IL-7 zeigte (Cho et al., 1999). Eine Expression von Flt3-L war fast nicht zu detektieren. Flt3-L und IL7 wirken synergetisch und steigern die B-Zell-Differenzierung von undifferenzierten Vorläuferzellen (Veiby et al., 1996). Die Forscher konnten zeigen, dass die Zugabe von Flt3-L die *in vitro* B-Zell-Entwicklung auf OP9-Zellen stark verbesserte (Cho et al., 1999). So waren bei Kokultur von ES-Zellen und OP9-Zellen an Tag 19 60 % der Zellen B220<sup>+</sup>, wohingegen ohne Flt3-L nur 6 % der Zellen B220 exprimierten. Die B220<sup>+</sup> Zellen waren zudem CD19<sup>+</sup>, CD24<sup>+</sup> und IgM<sup>+</sup>, eine Markerkombination für unreife B-Zellen. Die Gesamtzahl der Zellen stieg nur leicht (ca. 30%). Da aber die Zahl myeloider und erythroider Zellen in der Kultur sank, konnte der Anteil B220<sup>+</sup> Zellen erhöht werden.

Um zu überprüfen, ob diese B-Zell-Entwicklung *in vitro* ähnlich der *in vivo* abläuft, wurden neben der Analyse von Oberflächenmarkern auch Infektionsversuche mit dem Retrovirus Abelson Murine Leukemia Virus (A-MuLV) gemacht. A-MuLV ist ein RNA-Tumorstoff, das in Mäusen Leukämien auslöst und etablierte Zell-Linien transformiert (Goff et al., 1982). Während der *in vitro* B-Zell-Differenzierung sollten die Zellen ein Stadium durchlaufen, das dem

von Pre-B-Zellen aus fetaler Leber entspricht und damit ein gutes Ziel für das Virus sein. ES-Zellen, die an Tag 15 der Differenzierung mit A-MuLV infiziert wurden, wuchsen zu transformierten B-Zell-Linien aus. Der Phänotyp der Zellen war dabei identisch zu anderen *in vitro* von dem Virus transformierter Zellen.

Um die Funktionalität der *in vitro* differenzierten, reifen B-Zellen zu überprüfen, wurden die Zellen an Tag 28 mit LPS behandelt. Die IgM<sup>+</sup> Zellen wurden größer und begannen stark zu proliferieren. Nach der Stimulation konnten im Überstand IgM-Antikörper nachgewiesen werden.

Mit dieser Methode können ES-Zellen *in vitro* zu unreifen B-Zellen differenziert werden und scheinen die gleiche Funktionalität wie *in vivo* zu zeigen. Damit bietet sie eine gute Möglichkeit transgene ES-Zellen *in vitro* zu differenzieren und den Einfluss der humanen oder viralen Gene auf die B-Zell-Entwicklung zu untersuchen. Auch eine gezielte Aktivierung von eingebrachten Genen in unreifen B-Zellen wäre in diesem System denkbar. Die *in vitro* Differenzierung von murinen ES-Zellen stellt damit ein geeignetes System dar, um den Einfluss von EBV-Genen auf die B-Zell-Differenzierung zu untersuchen und wichtige Informationen für die Etablierung eines Mausmodells für EBV-assoziierte Tumoren zu liefern.

## 2. Zielsetzung

Das Epstein-Barr Virus (EBV) wurde 1964 als erstes humanes Tumovirus aus Burkitt-Lymphomen isoliert. Es gehört zu den  $\gamma$ -Herpesviren und infiziert hauptsächlich humane B-Lymphozyten, in denen es auch Persistenz entwickeln kann. EBV steht neben den Burkitt-Lymphomen auch in engem Zusammenhang mit einer Reihe anderer lymphoproliferativer Erkrankungen, wie Hodgkin-Lymphomen und Nasopharynxkarzinomen. In Tumorbiopsien sind regelmäßig einige der viralen Gene exprimiert, die auch in *in vitro* transformierten B-Lymphozyten gefunden werden. Dies legt eine ähnliche Funktion viraler Gene *in vivo* und *in vitro* nahe. Die Transformierung der primären B-Lymphozyten gilt deshalb als wertvolles *in vitro* Modellsystem, um Situationen nachzustellen, die bei der Entstehung von Tumoren eine Rolle spielen.

Ein *in vivo* System für Aspekte der viralen Latenz und der Tumorentwicklung ist nicht existent, da EBV ausschließlich humane Zellen, bzw. Zellen von Primaten infiziert. Ein alternativer Weg zu einem Mausmodell für EBV-assoziierte Tumoren und Veränderungen der B-Zell-Differenzierung durch EBV könnte über die genetische Manipulation von embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) der Maus führen.

Ziel meiner Arbeit ist es, die genetische Information des Epstein-Barr Virus als Episom in ES-Zellen der Maus direkt einzubringen und stabile Zell-Linien zu etablieren. Die EBV-positiven ES-Zellen sollten dann *in vitro* zu B-Zellen differenziert werden, um den transformierenden Phänotyp dieses Virus in murinen B-Zellen zu analysieren. Sowohl in den ES-Zellen als auch in den *in vitro* differenzierten B-Zellen sollte die Expression der viralen Gene und die Aktivität der viralen Promotoren analysiert werden.

Langfristiges Ziel ist es, das Virus in verschiedenen genetisch veränderten murinen B-Zellen auf seinen Beitrag zur B-Zell-Transformation untersuchen zu können. Zudem bietet das System die Möglichkeit verschiedenen Virusmutanten zu nutzen und damit den Beitrag einzelner Gene zur B-Zell-Entwicklung analysieren zu können. Die Ergebnisse dieser Versuche liefern wichtige Informationen für die Etablierung eines Mausmodells für EBV.

## 3. Material und Methoden

### 3.1. Material

#### 3.1.1. Antikörper

Angegeben sind die Spezifität, der Name, die eingesetzte Verdünnung, die Tierart, das Konjugat und die Herkunft des jeweiligen Antikörpers.

##### Westernblot

EBNA2	R3+1E6, 1:100 (1+1), Ratte, E.Kremmer, GSF
EBNA1	1H4, 1:100, Ratte, E. Kremmer, GSF
LMP1	CS.1-4, 1:400, Maus, DAKO
Ratte	IgG, 1:10 000, Ziege, HRP, Dianova
Maus	IgG, 1:5000, Ziege, HRP, Promega

##### FACS

B220	RA3-6B2, 1:500, Maus, FITC, Pharmingen
B220	RA3-6B2, 1:400, Maus, PE, Pharmingen
B220	RA3-6B2, 1:200, Maus, PerCp, Pharmingen
B220	RA3-6B2, 1:250, Maus, APC, Pharmingen
CD19	1D3, 1:400, Maus, PE, Pharmingen
IgM	II/41, 1:200, Maus; APC, Pharmingen
IgD	11-26c.2a, 1:800, Maus, FITC, Pharmingen

#### 3.1.2. Plasmide

Ein Teil der nachfolgenden Plasmide war bereits in der Arbeitsgruppe vorhanden oder wurden netterweise von anderen Arbeitsgruppen zur Verfügung gestellt. Die mit einem Stern (\*) gekennzeichneten Plasmide wurden von mir hergestellt. Die folgende Auflistung gibt alle verwendeten Plasmide als Auszug aus der Datenbank der Abteilung Genvektoren wieder.

p2190	Maxi-EBV-Plasmid mit F-Faktor-Rückgrad, GFP-Expressionskassette und Hygromycin-Resistenzgen in B95.8 DNA; Promotor und erstes Exon von LMP2A loxP flankiert;
p2801	Mini-EBV-Plasmid mit F-Faktor-Rückgrad, Resolvase-Bindungsstelle und Chloramphenicol-Resistenzgen; enthält keine G418-Resistenz (vgl. Abb. 4.2);

---

p2975	RecA-Expressionsplasmid mit Zeocin-Resistenzgen; enthält einen temperatursensitiven Replikationsursprung;
p2995	Resolvase-Plasmid mit Kanamycin- und Zeocin-Resistenzgen; enthält einen temperatursensitiven Replikationsursprung;
p3032	Shuttle-Plasmid mit loxP-flankierter Stopp-Kassette und EBNA1-Exon, enthält zum ROSA26-Lokus homologe Flanken, ein G418- und Amicillin-Resistenzgen (vgl. Abb 4.4);
p3053	Wildtyp Maxi-EBV-Plasmid mit F-Faktor-Rückgrad, GFP-Expressions-kassette, Chloramphenicol- und G418-Resistenz (vgl. Abb. 4.9);
p3103	pEasyFloX; T-Easy-Vektor mit G418- und Ampicillin-Resistenzgen; U. Zimmer-Strobl, GSF;
p3298	Maxi-EBV-Plasmid mit F-Faktor-Rückgrad, GFP-Expressionskassette, Chloramphenicol- und G418-Resistenz (vgl. Abb. 4.10); trägt eine 51 kB große Invertierung, die alle latenten Gene inaktiviert und von zwei mutierten loxP-Stellen flankiert ist (lox66 und lox71); der lytische Replikationsursprung oriLyt ist durch eine Deletion inaktiviert;
p3300*	Shuttle-Plasmid mit Ampicillin- und G418-Resistenzgen (PGK-Promoter), p2801-homologer Flanke und Resolvase-Bindungsstelle (vgl. Abb. 4.2); enthält einen temperatursensitiven Replikationsursprung;
p3307*	Kointegrat aus p2801 und p3300; vereint die Merkmale beider Plasmide (vgl. Abb. 4.2); trägt ein Ampicillin-, Chloramphenicol- und G418-Resistenzgen;
p3314*	Mini-EBV-Plasmid mit F-Faktor-Rückgrad, Chloramphenicol- und G418-Resistenzgen (PGK-Promotor) und Resolvase-Bindungsstelle (vgl. Abb. 4.2);
pGK-Cre-bpA	Plasmid mit Cre-Rekombinase-Gen (PGK-Promotor) und Polyadenylierungssignalsequenz (bpA); U. Strobl, GSF;
pRosa26-5-pBS KS	Plasmid mit einem 550 bp langen Fragment aus dem ersten Intron des Rosa26-Lokus, das in einen pBlueskript II KS kloniert wurde; U. Zimmer-Strobl, GSF;

#### 3.1.3. Oligonukleotide

Die Synthesen der verwendeten Oligonukleotide wurden bei der Firma Metabion, München, in Auftrag gegeben. Die Sequenzen der Oligonukleotide sind in 5'-3'-Orientierung angegeben.

2190 B2	CCCGTCATTCCCGTCGTG
2190 F3	ATCTGCTTCTGGCTCTTCTGGG
89 mGAPDH seq	TCGTCCCGTAGACAAAATG
90 mGAPDH rev	GAGATGATGACCCGTTTGG
Actin1	CACCTGTGCTGCTCACCGAGGCC
Actin2	CCGCTCGTTGCCAATAGTGATGA
C1	TGTAGATCTGATGGCATAGAGAC
EBNA2 for	TCTTAGAGAGTGGCTGCTACG
EBNA2 rev	GTGGGAGTGGTGGGGGCA
EBNA2-RTas	TGTCTGACAGTTTTTCCTGGTAGG
EBNA2-RTse	AGAGTGGCTGCTACGCATTAGAG
LMP1 for	CGTGGTGGTGTTCATCACTGTG
LMP1 back	TTGCTCTCCTTCTCCTCCTCTTG
LMP1-RTas	TGTTCACTACTGTGTCGTTGTCC
LMP1-RTse	AGAAGAGACCTTCTCTGTCCACT
LMP2A for	ATGACTCATCTCAACACATA
LMP2A back	CATGTTAGGCAAATTGCAAA
LMP2A-RTas	CATGTTAGGCAAATTGCAAA
LMP2A-RTse	ATGACTCATCTCAACACATA
mNanogf	GTTGAAGACTAGCAATGGTCTGATT
mNanogr	GTTGCGTAAGTCTCATATTTACCT
mOCT4f2	TGTTTCTGAAGTGCCCGAAGCC
mOCT4r	GAACAAAATGATGAGTGACAGACAG
W0W1'B	GGAGTCCACACAAATGGG
W2	ACTGAAGCTTGACCGGTGCCTTCTTAGGAG

#### 3.1.4. Southernblot-Sonden

##### *Rosa-Sonde*

Die 550 bp lange Sonde wurde aus dem Plasmid pRosa26-5-pBS KS mit den Restriktionsenzymen EcoRI und PacI isoliert und über ein Agarose-Gel gereinigt. Waschbedingungen: 30 Minuten bei 65 °C;

***Neo-Sonde***

Die 466 bp lange Sonde wurde aus dem Plasmid p3103 (pEasy-Flox) mit den Restriktionsenzymen RsrII und PstI isoliert und über ein Agarose-Gel gereinigt. Waschbedingungen: 5 Minuten bei 65 °C;

***EBNA1-Sonde***

Die 407 bp lange Sonde wurde aus dem Plasmid p3032 mit den Restriktionsenzymen Bsp120I und BvbCI isoliert und über ein Agarose-Gel gereinigt. Waschbedingungen: 10 Minuten bei 65°C;

**3.1.5. Bakterien**

<i>E.coli</i> DH5	F-, <i>lacI</i> -, <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> , $\Delta(lacZYA-argF)$ , U169, F80 <i>dlacZ</i> $\Delta$ M15, <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> (Hanahan, 1985)
<i>E.coli</i> DH10B	F-, <i>mcrA</i> , $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$ , $\Phi$ 80 <i>dlacZ</i> $\Delta$ M15, $\Delta lacX74$ , <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>araD139</i> , $\Delta(ara, leu)7697$ , <i>galU</i> , <i>galK</i> , $\lambda$ -, <i>rpsL</i> , <i>nupG</i> (Life Technologies)

**3.1.6. Zell-Linien**

Die verwendeten Zell-Linien stammen, wenn nicht anders vermerkt, aus der Sammlung der Abteilung Genvektoren oder wurden von mir im Rahmen dieser Arbeit etabliert (mit \* gekennzeichnet).

293 EBNA1	293-Zellen, die ein EBNA1-Gen chromosomal integriert haben; F. Nimmerjahn;
721	lymphoblastoide Zell-Linie, immortalisiert mit EBV aus B95.8; B. Sugden, Madison, USA
B95.8	lymphoblastoide Affen-Zell-Linie (Miller et al., 1972)
Bruce4	ES-Zell-Linie aus Mausblastozysten des Stammes C57 /BL6; C. Steward, Australien
Bruce4 stop EBNA1*	Bruce4 ES-Zellen mit integrierter EBNA1-Expressionskassette (Rosa26-Lokus), vor der sich eine Stopp-Kassette befindet; verschiedene Klone
Bruce4 EBNA1*	Bruce4 ES-Zellen mit integrierter EBNA1-Expressionskassette (Rosa26-Lokus); die Stopp-Kassette ist deletiert; verschiedene Klone

Bruce4 EBNA1 3314*	Bruce4 ES-Zellen mit integrierter EBNA1-Expressionskassette und episomalem Mini-EBV-Plasmid p3314; verschiedene Klone
Bruce4 EBNA1 3053*	Bruce4 ES-Zellen mit integrierter EBNA1-Expressionskassette und episomalem Mini-EBV-Plasmid p3053; verschiedene Klone
Bruce4 EBNA1 3298*	Bruce4 ES-Zellen mit integrierter EBNA1-Expressionskassette und episomalem Mini-EBV-Plasmid p3298; verschiedene Klone
EB5	ES-Zell-Linie, aus E14-ES-Zellen (129/Ola-Mäuse) subkloniert; T.Schröder, München
mEF-Zellen	embryonale Fibroblasten; wurden aus Mäusen des Maustammes NeoR präpariert; W. Wurst, München
OP9	Stromazell-Linie aus neugeborenen op/op-Mäusen; tragen eine Mutation im M-CFS-Gen und exprimieren diesen Faktor nicht; (Nakano et al., 1994)
Raji	humane EBV-positive Burkitt-Lymphom-Zell-Linie (Pulvertaft, 1964)

### 3.1.7. Mäuse

Balb/C J	Mäuse dieses Stammes wurden zur Isolation von Milzzellen als Kontrollen verwendet; Tierhaltung Großhadern, München
NeoR	Mäuse dieses Stammes wurden zur Isolation von embryonalen Fibroblasten für die ES-Zell-Kultur verwendet; W. Wurst, Neuherberg

### 3.1.8. Chemikalien, Enzyme, Geräte und Sonstiges

Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg

Hybond<sup>TM</sup>-ECL-Zellulosemembran, Hybond<sup>TM</sup>-N+-Nylonmembran, <sup>32</sup>P-dCTP (3000 Ci/mmol), ECL<sup>TM</sup>-Western blotting analysis System, G50 und G25-Sepharose-Säulen („Nick columns“)

Beckmann, Heidelberg

Avanti J25 Zentrifuge, L7-55 Ultrazentrifuge

BectonDickinson GmbH, Heidelberg

Plastik-Reagenzgefäße 15 und 50 ml, Zellkulturflaschen, 96 und 6-Loch-Platten, Zellschaber, FACS Calibur

Bio-Rad Lab., Richmond, Calif., USA

Gene Pulser<sup>TM</sup>, Gene Pulser Küvette (0,4 cm Elektrode)

Calbiochem GmbH, Frankfurt/Main

Dithiothreitol (DTT), Hygromycin B

Coulter Electronics GmbH, Krefeld

"Particle Counter", Z Serie

Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA

Bacto-Agar, Hefeextrakt, Trypton

Eastman Kodak Company, Rochester, N.Y., USA

Biomax MS Filme

Eppendorf Gerätebau, Hamburg

Tischzentrifuge 5415, Reaktionsgefäße verschiedener Größe, BioPhotometer

Fermentas, St. Leon-Rot

Taq DNA Polymerase

Genomed, Bad Oeynhausen

Maxi-Präparations-Kit für Plasmidpräparationen (Jetstar)

Gibco BRL, Life Technologies, Eggenstein

Fötales Kälberserum (Feeder-Zellkultur, Mauspräparationen), L-Glutamin für Zellkultur; Natrium-Pyruvat für Zellkultur; Penicillin/Streptomycin, Trypsin-EDTA (1x); Trypanblau; Zellkultur Medien; RPMI 1640, DMEM, Yeast Extract, Bacto-Agar, Bacto-Trypton; Trypanblau, Nicht-essentielle Aminosäuren (100x), BHK-21 Medium Glasgow MEM, KnockoutTMSR Serum Ersatz (KSR),  $\alpha$ -MEM

Hereus Christ Instruments, Düsseldorf

Zytoperm Begasungs-Brutschrank; Umluft-Sterilbank; Zentrifuge

Hoefler Scientific Instruments, San Francisco, USA

Mighty Small II Gel Elektrophorese Einheit, SemiPhor, Semidry Blottingsystem

Eastman Kodak Company, Rochester, N.Y., USA

Biomax MS PE Applied Biosystems 35x43 cm

Life Technologies, Eggenstein

Amphotericin B (Fungizone), fötales Kälberserum, HEPES, 1 Kb DNA-Leiter, L-Glutamin, Lipofectamin Transfektionsreagenz, Natrium-Pyruvat, Optimem I, Penicillin, Streptomycin, Trypsin-EDTA (1x), Trypton, Zellkulturmedium RPMI 1640, Superscript<sup>TM</sup>II-Reverse Transkriptase Kit, BenchMark<sup>TM</sup> Prestained Protein Ladder

Macherey-Nagel, Düren

Nucleobond AX500 Säulen

MBI Fermentas, St. Leon-Rot

Restriktionsenzyme

MEDCO, München

Markierte Objektträger

Merck-Eurolab GmbH

Glycerin, Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), Ammoniumperoxodisulfat (APS), Essigsäure, Ethidiumbromid, Ethanol, Glucose, Glyzin, Glyzylglyzin, Isopropanol, Kaliumacetat, Kaliumchlorid, Kaliumdihydrogenphosphat, Lithiumchlorid, Magnesiumchlorid, Magnesiumsulfat, Natriumacetat, Natriumchlorid, Natriumdihydrogenphosphat, Natriumdodecylsulfat (SDS), Natrium-Orthovanadat, Salzsäure, Saccharose, Tetramethylethylen-diamin (TEMED), Triton-X-100

Miltenyi-Biotec

CD43, CD19 Beads; LS-Columns; LD-Columns

Nunc GmbH, Wiesbaden

Cryotubes 3 ml, Impfösen, Plastikpetrischalen, Zellkulturflaschen, Zellkulturschalen, 48 und 96 Loch Platten

New England Biolabs, Schwalbach

Restriktionsenzyme, DNA modifizierende Enzyme

Pall Gelman Sciences, Dreieich

Acrodisc Syringe Filter, 0,8 µm

PAN

Fötale Kälberserum (ES-Zellkultur)

PE Biosystems, Weiterstadt

PCR-Reaktionsgefäße

Peqlab, Erlangen

Reaktionsgefäße, Elektroporationsküvetten (2 mm Plattenabstand), Elektrophorese-Kammern, dNTPs

Promega GmbH, Mannheim

GoTaq DNA Polymerase

Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

dNTPs, Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS), alkalische Phosphatase, DNase I, RNase I, Klenow-Fragment, Restriktionsenzyme, Random primed DNA labeling kit, cDNA-Synthese-System, High Pure RNA Isolation Kit, Light Cycler, Light Cycler – Fast Start DNA Master SYBR green I

Roth, Karlsruhe

Natriumdodecylsulfat, Phenol, Roti-Block, Acrylamid

Sigma Chemie, München

Ampicillin, Bromphenolblau, Glycerophosphat, DMSO, Dithiothreitol (DTT), Glyzin, HEPES, Harnstoff, Kälberthymus-DNA, Lysozym, Natriumfluorid, Natriummolybdat, Natriumorthovanadat, Natriumpyrophosphat, Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), Triton X-100, Monolaurat (Tween-20), Prestained SDS Molecular Weight Marker, Rinderserumalbumin (BSA)

Stratagene, Heidelberg

Robocycler

Schleicher & Schuell, Dassel

Filterereinheit 1,2 µm

Zeiss, Oberkochen

Axiovert 10 Fluoreszenzmikroskop

Alle hier nicht aufgeführten Materialien werden im Methodenteil erwähnt oder wurden von Sigma Chemie (München) oder Merck-Eurolab GmbH (Darmstadt) bezogen.

**3.2. Methoden****3.2.1. Zellkultur und Analyse von Zellen***Allgemeine Zellkulturtechniken*

Die beschriebenen Zellkulturtechniken halten sich an das leicht abgewandelte Protokoll von Torres und Kühn (1997). Alle Arbeiten wurden unter Benutzung steriler Pipetten sowie Lösungen durchgeführt und unter einer Umluft-Sterilbank. Die Zellen wurden, falls nicht anders beschrieben, bei 1200 Upm (ca. 300 x g) für 10 Minuten zentrifugiert. Für die Waschschrte wurde steriles PBS verwendet. Die Zellen wurden im Brutschrank bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Die verschiedenen Zelltypen wurden in Medien kultiviert, die für diese angepasst waren. Die Zellkulturplatten wurden mit 2 % Gelatine in PBS für 15 Minuten beschichtet, um bei adhärenen Zellen eine gute Festsetzung zu gewährleisten. Die OP9-Zellen wurden alle 2 - 3 Tage im Verhältnis 1 - 3 bis 1 : 4 auf neue Zellkulturschalen überführt.

ES-Zell-Medium                    500 ml DMEM, 75 ml FCS, 6 ml Natrium-Pyruvat (100x), 6 ml Glutamin (100x), 6 ml Nicht essentielle Aminosäuren (100x), 1,2 ml 2-β-Mercaptoethanol (50 mM) 0,8 ml LIF

EF-Zell-Medium                    500 ml DMEM, 60 ml FCS, 6 ml Natrium-Pyruvat (100x), 56 ml Glutamin (100x), 5 ml Penicillin/Streptomycin (100x)

B-Zell Medium (primäre B-Zellen)                    500 ml RPMI 1640, 60 ml FCS, 6 ml Penicillin/Streptomycin (100x), 6 ml Glutamin (100x), 6 ml Natrium-Pyruvat (100x)

Medium (293-, 721-, B95.8-, Raji-Zellen)                    500 ml RPMI 1640, 10 % FCS, 5 ml Penicillin/Streptomycin (100x), 5 ml Natrium-Pyruvat (100x), 5 ml HEPES

---

<u>OP-Medium</u>	500 ml $\alpha$ -MEM, 20 % FCS, $10^{-4}$ M $\beta$ -Mercaptoethanol
<u>Differenzierungsmedium</u>	500 ml $\alpha$ -MEM, 10 % FCS, $10^{-4}$ M $\beta$ -Mercaptoethanol
<u>EB5-Medium</u>	500 ml BHK-21 Medium Glasgow MEM, 10 % KSR, 1 % FCS, 6 ml Natrium-Pyruvat (100x), 6 ml Nicht-essentielle Aminosäuren (100x), $10^{-4}$ M $\beta$ -Mercaptoethanol, 0,8 ml LIF

### ***Bestimmung der Zellzahl***

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen 1:2 mit Trypanblau gemischt, einem Farbstoff, der nur von toten Zellen aufgenommen wird. 10  $\mu$ l der gefärbten Zellen wurde auf eine Neubauer Zählkammer aufgetragen, die Anzahl lebender Zellen lichtmikroskopisch bestimmt und die Zellzahl/ml berechnet.

### ***Trypsinieren von Zellen***

Durch eine kurze Behandlung mit dem proteolytischen Enzym Trypsin wurden adhärente Zellen von der Zellkulturschale gelöst und in Suspension gebracht. Die Zellen wurden dazu zweimal mit PBS gewaschen und anschließend für 5 Minuten mit 1x Trypsin bei 37° C inkubiert. Die Enzymreaktion wurde anschließend mit der doppelten Menge des jeweiligen Medium gestoppt. Die Zellen wurden mehrmals pipettiert, um eine Einzelzelllösung zu erhalten, zentrifugiert und je nach Verwendungszweck in Medium aufgenommen.

### ***Aufbewahrung von Zellen***

In Gegenwart von DMSO können Zellen in flüssigem Stickstoff eingefroren und über einen längeren Zeitraum gelagert werden. Die Zellen wurden zuerst in Einzelzellsuspension gebracht, zentrifugiert und in Einfriermedium resuspendiert. In einem Crypröhrchen wurden die Zellen schonend auf -80 °C abgekühlt und für eine längere Aufbewahrung in flüssigen Stickstoff überführt. Sollten Zellen in 96-Loch-Platten eingefroren werden, wurden diese ebenfalls abtrypsinieren, in Einzelzellsuspension gebracht und die Enzymreaktion durch 2fach konzentriertes Einfriermedium abgestoppt. Die Zellsuspension wurde mit Mineralöl überschichtet, die Platten mit Parafilm versiegelt und mit Zellstoff umwickelt. Die Platten wurden bei -80 °C gelagert. Zum Auftauen der Zellen wurden sie in einem 37 °C warmen Wasserbad schnell erwärmt, vorsichtig in 30 ml Kulturmedium gewaschen und in ein Zellkulturschale mit frischem Medium überführt.

<u>Einfriermedium</u>	40 % Medium, 50 % FCS und 10 % DMSO
-----------------------	-------------------------------------

### ***Mitotische Inaktivierung von EF-Zellen***

EF-Zellen müssen mitotisch inaktiviert werden, bevor man sie zur Kokultivierung mit murinen ES-Zellen verwenden kann. Diese Inaktivierung erfolgt mit Hilfe des Zellgiftes Mitomycin C (10 µg / ml), das aus dem Pilz *Streptomyces caespitosus* gewonnen wird. Es vernetzt die beiden DNA-Stränge durch alkylierende Reaktionen kovalent und verhindert dadurch weitere Zellteilungen. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen, mit Mitomycin C-haltigem EF-Medium 2 - 4 Stunden im Brutschrank inkubiert und anschließend dreimal mit PBS gewaschen. Nach dem Trypsinieren, wurden die Zellen in geeigneter Dichte ausplattiert.

### ***Transfektion und Selektion von ES-Zellen***

Für eine Transfektion wurden  $1 \times 10^7$  ES-Zellen eingesetzt, die mit PBS gewaschen, abtrypsinisiert und anschließend in 700 µl RPMI 1640 ohne Phenolrot aufgenommen wurden. Die Zellen wurden mit 25 µg DNA versetzt und in eine Elektroporationsküvette (0,4 cm Elektrodenabstand) überführt. Die Elektroporation erfolgte in einem Elektroporator bei 230 mV und 500 µF. Nach der Elektroporation wurden die Zellen nochmals für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und dann auf eine 10-cm-Zellkulturplatte ausgebracht, die mit einer EF-Zellschicht bewachsen war. 48 Stunden nach der Elektroporation wurde mit der Selektion mit G418 Sulfat begonnen.

### ***Vereinzeln und Expandieren von ES-Zell-Kolonien***

Neun bis elf Tage nach der Transfektion wurden die G418-resistenten Kolonien gepickt. Dazu wurden die Platten mit 10 ml PBS überschichtet. In einer Gegenstrom-Sterilbank wurden mit Hilfe einer Pipette unter einem Stereomikroskop einzelne Kolonien in 20 µl PBS aufgenommen. Die Kolonien wurden jeweils in ein Loch einer 96-Loch-Platte transferiert und mit 40 µl Trypsin versetzt. Nach einer kurzen Inkubation bei 37 °C wurden sie in Einzelzellsuspension gebracht und die Reaktion mit 100 µl Medium gestoppt. Anschließend wurden die Zellen auf eine mit EF-Zellen beschichtete 96-Loch-Platten ausgebracht.

### ***Präparation primärer Maus Lymphozyten***

Primäre, murine B-Zellen wurden aus der Milz von Balb/C J-Mäusen isoliert. Die Mäuse wurden durch 2-minütige CO<sub>2</sub> Begasung in einem geschlossenen Behälter getötet und die Milz als ganzes Organ entnommen. Um die lymphatischen Zellen aus dem Gewebeverbund zu lösen, wurde das Gewebe durch ein feines Sieb gedrückt.

### ***Isolierung von B-Zellen***

Um aus einer Zellsuspension von Milzzellen oder einem Differenzierungsansatz B-Zellen zu isolieren, wurden die Zellen durch „Magnetic Cell Sorting“ (MACS)-Separation (Miltenyi Biotec) fraktioniert. Dabei werden die Zellen an magnetische Kügelchen gebunden, die an spezifische Antikörper gekoppelt sind, und auf eine Säule geladen, die sich in einem starken magnetischen Feld befindet. Gebundene Zellen werden durch das Magnetfeld angezogen und bleiben in der Säule, während die ungebundenen Zellen die Säule passieren können. Nach Entfernen des Magnetfeldes können die auf der Säule gebundenen Zellen eluiert werden. Für die Isolation der B-Zellen wurden  $\alpha$ -CD19-Antikörper- bzw.  $\alpha$ -IgM-Antikörper-gekoppelte „MicroBeads“ von Miltenyi Biotec verwendet und die Zellen nach Firmenprotokoll isoliert.

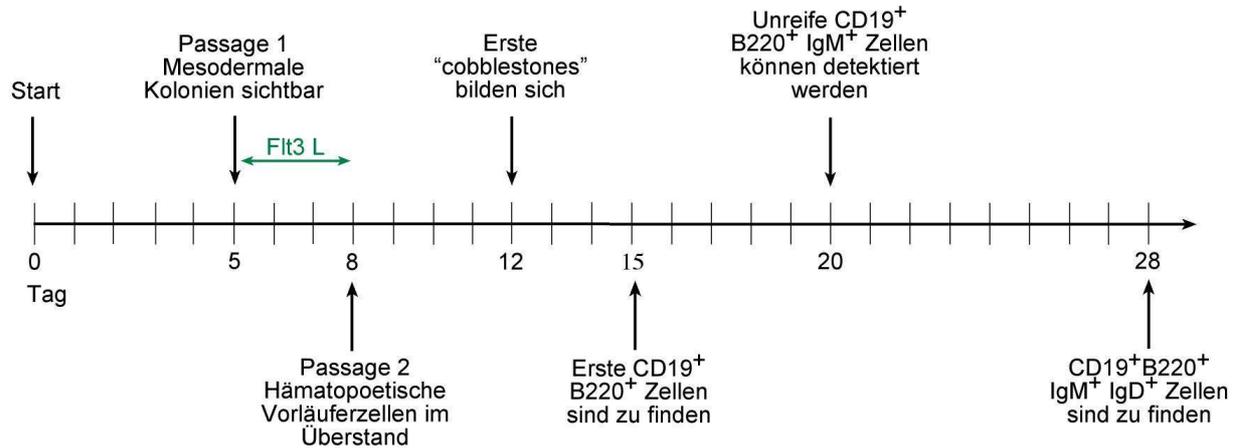
### ***Durchflusszytometrie***

Einzelzellen einer Zellsuspension können durch Durchflußzytometrie in einem FACS<sup>TM</sup>-Gerät analysiert werden. Die Zellen werden mit Antikörpern, die mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt sind, gefärbt. Man kann bei der FACS-Analyse auf der Basis einzelner Zellen bestimmen, wie viele Zellen einer Zellsuspension ein bestimmtes Protein exprimieren und welches relative Expressionsniveau erreicht wird. Die verwendeten Antikörper sind unter Abschnitt 3.1.1 aufgeführt. Die Zellen wurden zuerst mit PBS/2 % FCS gewaschen und anschließend mit einer Kombination von FITC-, PE-, PerCP- oder APC-konjugierten monoklonalen Antikörpern gefärbt, die ebenfalls in PBS/2 % FCS verdünnt waren. Um tote Zellen von den lebenden abzugrenzen, wurden den Färbungen Propidiumiodid (PI) zugegeben. Dieser Farbstoff dringt nur in tote Zellen ein, deren Membran permeabilisiert ist. Die Zellen wurden für mindestens 15 Minuten gefärbt, in PBS/2 % FCS gewaschen und anschließend für die Analyse in 150 - 500  $\mu$ l PBS/2 % FCS aufgenommen. Es wurden je Färbung wenn möglich  $5 \times 10^4$  lebendige Zellen aufgenommen, die sich innerhalb des „Lymphozyten-Fensters“ befanden. Dieses wird durch eine bestimmte Größe der Zellen und die lichtbrechenden Eigenschaften der Zelle definiert. Durch die PI-Färbung konnten toten Zellen aus dieser Population ausgeschlossen. Da die Färbungen teilweise in ihrer Intensität variieren, wurden primäre B-Zellen als Kontrollen mit den jeweils verwendeten Antikörpern gefärbt.

### ***In vitro Differenzierung von ES-Zellen***

ES-Zellen sind pluripotent, d. h. sie haben die Fähigkeit in Zellen aller drei Keimschichten (Endoderm, Ektoderm und Mesoderm) zu differenzieren. Diese Eigenschaft wird genutzt, um ES-Zellen *in vitro* zu B-Zellen zu differenzieren. Dazu wurde das von Cho et al. beschriebene

Protokoll verwendet und geringfügig modifiziert (Cho et al., 1999). Während des gesamten Differenzierungsprozesses werden die ES-Zellen auf einer Zellschicht aus OP9-Stromazellen kultiviert, die bestimmte für die Differenzierung der ES-Zellen zu B-Zellen notwendige Cytokine (SCF, IL7) exprimieren.



**Abb. 3.1: Die Zeitlinie der *in vitro* B-Zell-Differenzierung**

Dargestellt ist der zeitliche Verlauf einer *in vitro* B-Zelldifferenzierung von murinen ES-Zellen. An Tag 0 werden die ES-Zellen auf eine OP9-Zellschicht in Differenzierungsmedium ausgebracht. Bis Tag 5 beginnen die ES-Zell-Kolonien zu differenzieren und zerfallen zu Einzelzellen. Erste mesodermale Kolonien entstehen. An Tag 5 werden die Zellen zum ersten Mal passagiert und auf eine neue OP9-Zellschicht übertragen. Dem Medium wird Flt3L zugesetzt. An Tag 8 befinden sich die hämatopoetischen Vorläufer-Zellen im Überstand des Differenzierungsansatzes und werden auf eine neue OP9-Zellschicht überführt. Dort nisten sie sich unter der OP9-Zellschicht ein und bilden sogenannte „cobblestones“, die ab Tag 12 zu sehen sind. Ab Tag 15 befinden sich erste B220<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup> Zellen im Überstand des Differenzierungsansatzes und entwickeln sich zu unreifen B-Zellen weiter (B220<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup>). Reife B-Zellen die zusätzlich IgD exprimieren können erst ab Tag 28 detektiert werden.

An Tag 0 der Differenzierung werden  $1 \times 10^4$  ES-Zellen in Differenzierungsmedium auf eine mit OP9-Zellen beschichtete 6-Loch-Zellkulturplatte ausgebracht. Das Differenzierungsmedium enthält kein LIF, so dass die ES-Zellen im Laufe der nächsten fünf Tage beginnen zu differenzieren und die ES-Zell-Kolonien in Einzelzellen aufbrechen. An Tag 3 wird das Medium gewechselt. An Tag 5 sind neben undifferenzierten ES-Zell-Kolonien auch viele mesodermale Kolonien zu beobachten. Um nichtadherente Zellen, die sich zu hämatopoetischen Vorläuferzellen entwickeln, von den adherenten Geweben zu trennen, werden die Zellen trypanblau gefärbt, auf eine mit Gelatine beschichtete 10 cm-Zellkulturplatte überführt und für 25 Minuten in einem Brutschrank inkubiert. Anschließend werden die im Überstand befindlichen Zellen auf eine neue 10 cm-Zellkulturplatte überführt. Dem Differenzierungsmedium wird zu diesem Zeitpunkt das Cytokin Flt3-Ligand (20 ng/μl) zugesetzt. Dieses Cytokin unterstützt die Bildung

von hämatopoetischen Vorläuferzellen (Namikawa et al., 1996). An Tag 8 befinden sich kleine Trauben runder, glatter Zellen mit hämatopoetischem Potential im Überstand, werden in Differenzierungsmedium ohne Flt3-Ligand überführt und können auf zwei Löcher einer 6-Loch-Platten mit einer frischem OP9-Zellschicht ausgebracht werden.

Die zeitlich begrenzte Zugabe von Flt3-Ligand weicht von dem Protokoll von Cho et al. ab, in dem das Cytokin ab Tag 5 während der gesamten Differenzierungsperiode zugegeben wird (Cho et al., 1999). Diese Änderung wurde von C. Hömig eingeführt, die zeigen konnte, dass der Einfluss des Cytokins nur in dieser begrenzten Zeit notwendig ist (persönliche Kommunikation). Die Zellen befinden sich nur in einem relativ engen Zeitfenster im Überstand der Kultur und wandern danach wieder unter die OP9-Zellschicht. Sie bilden so genannte „cobblestones“ aus (engl. für Kopfsteinpflaster). Die Bezeichnung beschreibt das Aussehen der Zellen unter der Zellschicht, wo man sie als dunkle, eng beieinander liegende, runde bis leicht eckige Zellen erkennen kann. Ansätze in denen sich keine „cobblestones“ bildeten wurden verworfen, da sich ohne diese Strukturen keine B-Zellen entwickeln können.

An Tag 10 wird erneut das Medium gewechselt. Aus den „cobblestones“ entwickeln sich im Laufe der nächsten Tage unreife B-Zellen (B220<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup>), die aus der OP9-Zellschicht in den Überstand der Kultur wandern und sich dort zu reifen B-Zellen (B220<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>) weiterentwickeln. Abweichend von dem Protokoll von Cho et al. wurden die Zellen nach Tag 8 nicht mehr trypsiniert und auf eine neue OP9-Zellschicht überführt (Cho et al., 1999), da bei dem Umsetzen der Zellen die „cobblestone“-Strukturen aufbrechen und sich nur in einem geringeren Maße wieder unter der neuen Zellschicht bilden. An Tag 21 wurden die im Überstand befindlichen Zellen teilweise abgenommen und analysiert. Ansätze bei denen zu diesem Zeitpunkt unreife B-Zellen im Überstand gefunden wurden, wurden an Tag 28 auf das Vorhandensein von reifen B-Zellen überprüft.

Im Laufe der Differenzierung kommt es zur Ausbildung anderer, z. B. mesodermaler Gewebe, die die Bildung von „cobblestones“ beeinflussen. So kann mesodermales Gewebe durch starke Proliferation die Zellschicht aus OP9-Zellen sowie „cobblestones“ zurückdrängen und damit die lose adhärennten frühen B-Zellen. Zwar sollten mit dem Überführen der im Überstand befindlichen Zellen an Tag 8 der Differenzierung mesodermales Gewebe und undifferenzierte ES-Zell-Kolonien abgetrennt werden, aber es ist nicht immer zu verhindern, dass Teile dieser Gewebe mit in die neue Zellkulturschale transferiert werden und dort durch ihre starke Proliferation große Bereiche einnehmen. Dies wirkt sich insbesondere während der frühen Phase der

„cobblestone“-Bildung, bei der sich die Vorläuferzellen unter der OP9-Zellschicht einnisten und dessen Unterstützung benötigen, negativ auf die B-Zell-Entwicklung aus.

OP-Medium 500 ml  $\alpha$ -MEM, 20 % FCS,  $10^{-4}$  M  $\beta$ -Mercaptoethanol

Differenzierungsmedium 500 ml  $\alpha$ -MEM, 10 % FCS,  $10^{-4}$  M  $\beta$ -Mercaptoethanol, (Flt3-Ligand)

### **„plasmid rescue“-Analyse**

Ein Verfahren zum Nachweis episomaler Plasmide in eukaryotischen Zellen ist das sogenannte „plasmid rescue“-Verfahren, bei dem Plasmid-DNA aus den Zellen isoliert, in *E.coli*-Bakterien überführt und dort durch Restriktionsverdau analysiert wird. Die Plasmide werden dadurch sozusagen aus den Zellen „gerettet“, daher der Name des Nachweises. Neben der episomalen Aufrechterhaltung kann mit diesem Verfahren auch noch untersucht werden, ob es zu groben Veränderungen in der DNA-Sequenz der Plasmide gekommen ist (z. B. durch Deletion großer Fragmente) und ob die Plasmide auch ohne Selektionsdruck über viele Zellgenerationen stabil aufrechterhalten werden können.

$1 \times 10^7$  Zellen werden einmal mit PBS gewaschen und in 10 ml Lysepuffer aufgeschlossen. Die genomische DNA wird durch kurzes Vortexen zerstört. Nach 5 Minuten bei RT wird tropfenweise 500  $\mu$ l 1 M Tris pH 7,1 sowie 1,2 ml 5 M NaCl und 35  $\mu$ l Proteinase K (20 mg/ml) zugegeben und der Ansatz bei 37 °C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wird das gleiche Volumen Phenol zugeben, 5 Minuten bei RT inkubiert und 15 Minuten bei 3500 Upm zentrifugiert. Die wässrige, obere Phase wird in ein neues 50 ml Falcon überführt und mit zweifachen Volumen Butanol vermischt. Nach einem Zentrifugationschritt (2 Minuten, 3500 Upm, 20 °C) wird die untere, wässrige Phase erneut in ein neues Falcon übertragen und die DNA durch Zugabe des 2,5fachen Volumen 100 % Ethanol bei -20 °C gefällt. Die pelletierte DNA wird in 80 % Ethanol gewaschen und in 200  $\mu$ l TE-Puffer aufgenommen. Die DNA kann dann mittels Elektroporation in *E.coli* Bakterien eingebracht und erneut Plasmid-DNA gewonnen werden. Durch eine anschließende Restriktionsanalyse der DNA kann das dadurch erhaltene Bandenmuster mit dem vorhergesagten Restriktionsschema verglichen werden.

Lysepuffer 1 % SDS, 2 mM EDTA, 50 mM NaCl, 40 mM NaOH

### **Analyse von ES-Zellen mit Gardella-Gelen**

Mit Hilfe von Gardella-Gelen kann untersucht werden, ob in Zellen episomale Plasmide vorliegen. Von den zu untersuchenden Zellen werden  $5 \times 10^6$  Zellen in PBS gewaschen und in 50  $\mu$ l 15 % Ficoll resuspendiert. Die Proben werden in die Taschen eines 0,8 %igen TBE-Gels überführt. Das Gel besitzt zwei Abschnitte: einen ca. 3 cm breiten Gelabschnitt, der mit 2 % SDS und 1 mg/ml Proteinase K versetzt ist und aus dem nach Anlegen einer Spannung das SDS und

die Proteinase K sich durch ihre Ladung in Richtung der Geltaschen bewegen. Durch diesen Vorgang werden die Zellen aufgebrochen und die darin enthaltene DNA wandert in den zweiten Gelabschnitt ohne Zusätze. Das ermöglicht es, intakte Mini- bzw. Maxi-EBV-Konstrukte mit einer Größe von 82 kB bzw. 182 kB zu isolieren.

Das Gel läuft bei 4 °C in TBE-Puffer in einer Gelkammer 3 Stunden bei 20 V. Danach wird die Spannung auf 120 V erhöht und zusätzlich eine Pumpe aktiviert, die den Puffer in der Gelkammer umwälzt. Das Gel läuft über Nacht ebenfalls bei 4 °C. Am nächsten Tag wird der obere Gelabschnitt entfernt, der restliche Teil 20 Minuten mit Ethidiumbromid-Lösung gefärbt. Die DNA wird dann wie unter „Southern-Blot-Hybridisierung“ beschrieben von dem Gel auf eine Membran übertragen und anschließend mit einer radioaktivmarkierten Sonde detektiert. Bei einer eventuellen, chromosomalen Integration der episomalen Konstrukte, können keine Signale detektiert werden, da die genomische DNA aufgrund ihrer Größe in den Taschen des Gels verbleibt. Als Positivkontrolle wurden Raji-Zellen benutzt, die 50 EBV-Genome pro Zelle extrachromosomal enthalten. Eine leichte Verschiebung in der Höhe der Banden im Gel kommt durch die Zahl der erfolgreich lysierten Zellen zustande, wie an den Raji-Kontrollen zu sehen ist, bei denen absteigende Zellzahlen pro Spur aufgetragen wurden (Abb. 4.14).

PBS	4 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 16 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 115 mM NaCl, pH 7,4
TBE-Puffer	89 mM Tris, 89 mM Borat, 2 mM EDTA

### 3.2.2. Bakterienkultur

#### *Vermehrung und Aufbewahrung*

Bakterien wurden als Suspensionskultur in LB-Medium oder zur Vereinzelung von Kolonien auf LB-Agar-Platten kultiviert. Bei Selektion auf Resistenz gegen ein oder mehrere Antibiotika wurden dem LB-Medium Ampicillin (100 µg/ml), Chloramphenicol (30 µg/ml), Zeocin (25 µg / ml) und Kanamycin (30 µg/ml) zugegeben. Zur Lagerung von Bakterien über längere Zeiträume wurde eine dicht gewachsene Bakterienkultur mit 50 % Glycerin versetzt und bei -80 °C aufbewahrt.

<u>LB-Medium</u>	1 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 0,5 % NaCl
<u>LB-Agar-Platten</u>	15 g Bacto-Agar ad 1 l LB-Medium

#### *Transformation*

Transformationskompetente *E.coli* Stämme wurden nach einem Protokoll von Hanahan et al. hergestellt (Hanahan, 1985). Die kompetenten Bakterien wurden bei – 80 °C gelagert. Für eine Transformation wurden 200 µl dieser Bakterien zusammen mit ca. 50 ng eines Ligationsansatzes und 7 µl DMSO gemischt. Der Ansatz wurde für 90 Sekunden bei 42 °C im Wasserbad

inkubiert. Nach Zugabe von 1 ml SOC-Medium wurden die Zellen eine Stunde bei 37 °C inkubiert und die Zellsuspension auf Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

SOC-Medium                    2 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 0,2 % Glukose

TFB-Puffer                    10 mM K-Mes (pH 6,2), 50 mM CaCl<sub>2</sub>, 45 mM MnCl<sub>2</sub>, 100 mM RbCl

Alternativ dazu wurde nach dem Protokoll von Chung et al. gearbeitet (Chung et al., 1989). Hierbei wurden die Bakterien in LB-Medium bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,3 - 0,4 angezogen. Ein 1ml der Kultur wurde bei 3000 Upm in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert und das Bakterienpellet zusammen mit 100 ng Plasmid-DNA in 100µl TSS-Puffer resuspendiert. Der Transformations-ansatz wurde 30 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend 90 Sekunden bei 42 °C. Nach Zu-gabe von 1ml SOC-Medium und einer Inkubation von 1 Stunde bei 30 bzw. 37 °C wurde die Zellsuspension auf Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert. Die Platten wur-den über Nacht bei 30 bzw. 37 °C im Brutschrank inkubiert.

TSS-Puffer                    LB-Medium, 10 % PEG (Molekulargewicht 3350 oder 8000), 5 % DMSO, 20 - 50mM Mg<sup>2+</sup>, pH 6,5

### 3.2.4. DNA-Arbeitstechniken

Die Anwendung allgemein üblicher Techniken, die im Umgang mit Nukleinsäuren benutzt wurden, wie z.B. Phenolextraktion, Ethanolpräzipitation, Konzentrationsbestimmung im Spektralphotometer, Auftrennung bzw. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen, enzymatische Restriktionshydrolyse, Dephosphorylierung von DNA mit alkalischer Phosphatase, Behandlung von DNA-Fragmenten mit Klenow-Polymerase oder T4-DNA-Polymerase, Ligation freier DNA-Enden, Präparation von Plasmid-DNA über alkalische Lyse, oder durch Ultrazentrifugation in einem Cäsiumchlorid-Ethidiumbromid-Gradienten, etc. erfolgte in Anlehnung an Standardprotokolle (Sambrook et al., 1989).

#### ***DNA-Präparation von ES-Zellen in 96-Loch-Platten:***

Für die Präparation der ES-Zell-Klone aus 96-Loch-Platten wurden diese bis zur Konfluenz kultiviert. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und pro Loch 50 µl Lyse-Puffer zugegeben. Die Platten wurden anschließend in wasserdampfgesättigter Atmosphäre bei 56 °C über Nacht inkubiert und am nächsten Tag auf Raumtemperatur abgekühlt. Pro Loch wurden 100 µl 100 %-Ethanol zugesetzt, um die DNA zu präzipitieren. Nach einer Stunde Inkubation bei RT wurde der Überstand sehr vorsichtig abgegossen. Die DNA wurde dann noch zweimal mit 100 µl

75 %-Ethanol gewaschen, anschließend getrocknet bis keine Ethanol mehr wahrzunehmen war und direkt in der vorbereiteten Lösung für den darauf folgenden Restriktionsverdau resuspendiert (35 µl/Loch).

Lyse-Puffer 10 mM Tris pH 7,5, 10 mM EDTA, 10 mM NaCl, 0,5% Sarcosyl, 1 mg/ml Proteinase K

### ***DNA-Präparation von ES-Zellen aus 10 cm-Platten***

Zur Präparation der genomischen DNA von ES-Zellklonen in größeren Mengen wurden die Klone auf 10 cm-Platten bis zur Konfluenz kultiviert. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und Lysepuffer zugegeben. Nach 5 Minuten Inkubation bei 37 °C wurden die Zellen dann mit einer Pipette in ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführt und bei 56 °C über Nacht inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die DNA über eine Ethanol-Präzipitation isoliert. Statt der Zentrifugationsschritte wurde die DNA jedoch mittels eines Glashakens aus den Lösungen gefischt und bei jedem Schritt in ein neues Gefäß überführt.

### ***Enzymatische Spaltung genomischer DNA aus ES-Zellen:***

Bei der Spaltung von genomischer DNA aus Zellen, die direkt in 96-Loch-Platten präpariert wurden, wurde die DNA direkt nach der Fällung in 35 µl Restriktionslösung aufgenommen und die Platten, nach der Versiegelung mit Parafilm, in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre über Nacht bei 37 °C inkubiert. Für die Spaltung genomischer DNA, die bereits gelöst war, wurden 5 - 10 µg DNA mit 50 - 60 µl Restriktionslösung bei 37 °C über Nacht inkubiert.

Restriktionslösung 1 mM Spermidin, 1 mM DTT, 100 µg/ml BSA, 50 µg/ml RNase, 1/10 Volumen Puffer (10X), 50 U/Loch Enzym

### ***Extraktion zellulärer DNA aus eukaryotischen Zellen***

Ca.  $1 \times 10^7$  Zellen wurden abzentrifugiert, mit PBS gewaschen, in 2,1 ml TE aufgenommen und durch Zugabe von 1 % SDS lysiert. Das Lysat wurde 2 Stunden lang bei 50 °C, alternativ über Nacht bei 37 °C, mit Proteinase K (50 µg/ml Endkonzentration) verdaut. Nach Zusetzen von 1 ml 5 M NaCl wurde die Suspension kräftig geschüttelt und für 30 Minuten bei 15000 Upm in einer Sigma Zentrifuge abzentrifugiert. Der Überstand wurde mit zweifachem Volumen Ethanol präzipitiert, das Pellet mit 70 %-igem Ethanol gewaschen und in einem geeigneten Volumen TE (ca. 500 µl) über Nacht resuspendiert.

### ***Schnellaufreinigung von Plasmiden mit einer Größe von bis zu 30kb***

Die Plasmidpräparation erfolgte nach der modifizierten „Boiling Method“ (Holmes und Quigley, 1981). 1/4 eines konfluenten Bakterienrasens auf einer Agarplatte wurde abgeschabt und in 200 µl Lysis-puffer resuspendiert. Durch Zugabe von 3 µl Lysozym-Lösung (10 mg/ml)

wurde die Zellwand aufgelöst. Zur Denaturierung der Proteine wurde der Ansatz für 2 Minuten bei 100 °C erhitzt und 5 Minuten auf Eis abgekühlt. Durch Zentrifugation (10 Minuten, 15000 Upm, RT) wurden Zellreste mit chromosomaler DNA, die mit der Zellwand assoziiert sind, und ribosomale RNA sedimentiert. Der Überstand konnte direkt für enzymatische Spaltungen eingesetzt werden, oder er wurde nach Entfernung des Pellets mit 500 µl 100 % Ethanol gefällt, mit 70 % Ethanol gewaschen und die luftgetrocknete DNA in 40 µl H<sub>2</sub>O gelöst.

Lysispuffer: 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 62,5 mM EDTA, 0,4 % (v/v) Triton X-100, 2,5 M LiCl

### ***Präparative Plasmidreinigung***

Die präparative Plasmidreinigung aus einer stationären 400 ml Kultur erfolgte mit Hilfe von DNA-Adsorptionssäulen nach Angabe des Herstellers (Genomed). Die eluierte DNA wurde mit 0,7 Volumenprozent Isopropanol gefällt und in einem geeigneten Volumen TE-Puffer aufgenommen.

### ***Präparation von EBV-Plasmid-DNA aus E.coli***

2,4 l Bakterienkultur wurde für 15 Minuten bei 5000 Upm und Raumtemperatur in einer Heraeus Seratech Zentrifuge abzentrifugiert. Die Bakterienlyse und DNA-Präparation erfolgte nach dem Prinzip der alkalischen Lyse (Sambrook et al., 1989). Anschließend wurde die gewonnene DNA in insgesamt 5 ml 5x TE Puffer, 100 µl RNase A (1 mg/ml) und 100 µl Proteinase K-Lösung (10 mg/ml) aufgenommen und 30 Minuten bei RT geschwenkt. 6,5 g CsCl wurden hinzugegeben und aufgelöst. Diese Mischung wurde in ein Ultrazentrifugenröhrchen (Sorvall, 11,5 ml) überführt, in das 800 µl Ethidiumbromid (1% w/v, Merck) vorgelegt wurde. Das UZ-Röhrchen wurde mit 1,55 g/ml CsCl-Lösung aufgefüllt. Die Zentrifugation erfolgte in einem 70 TI-Festwinkelrotor für 72 Stunden bei 38000 Upm und 20 °C in einer Beckmann L-60 Ultrazentrifuge. Nach dieser Zeit wurden die DNA-Banden unter UV-Licht (365 nm) sichtbar gemacht und die untere Bande, die der „supercoiled“-Plasmid-DNA entspricht, mit einer Einmalkanüle (2,1x38 mm, BOVI•VET) abgezogen und das restliche Ethidiumbromid durch Ausschütteln mit CsCl-gesättigtem Isopropanol extrahiert. Nach Zugabe von TE-Puffer auf das fünffache Volumen und DNA-Präzipitation mit Isopropanol wurde die EBV Plasmid-DNA in TE-Puffer aufgenommen. Alternativ dazu wurde EBV Plasmid-DNA auch mit Nucleobond AX500 Säulen der Firma Macherey-Nagel, Düren, nach Angaben des Herstellers gewonnen. Hierzu wurde von 400 ml einer stationär gewachsenen Kultur ausgegangen.

5x TE 50 mM TRIS pH 8,0, 20 mM EDTA

### ***Homologe DNA-Rekombination in E. coli zur Konstruktion des Plasmids p3314***

Das Plasmid p3300 wurde zur homologen Rekombination mit dem Mini-EBV Plasmid p2801 in *E.coli* DH10B mit dem Transformationsprotokoll von Chung et al. transformiert (Chung et al., 1989). Dieser *E.coli* -Stamm trug das Rezipienten-Mini-EBV Plasmid p2801, sowie das Plasmid p2975. Dieses Rekombinationssystem in *E.coli* DH10B wurde in Anlehnung an den bereits beschriebenen *recA*-positiven, *recBC*-negativen *E.coli* Stamm BJ5183 (Janz et al., 2000) entwickelt (B. Neuhierl, Abteilung Genvektoren, GSF). Der verwendete *recA*-negative Stamm *E.coli* DH10B enthält zusätzlich zu dem Mini-EBV-Plasmid das Plasmid p2975, das unter Kontrolle eines temperatursensitiven Replikationsursprungs für die Rekombinase RecA und den Exonukleaseinhibitor Redy kodiert. Nach Transformation von p3300 wurden dreifach resistente Klone bei 30 °C inkubiert (p2801 Chloramphenicolresistenz, p3300 Ampicillin-Resistenz, p2975 Zeocin-Resistenz). Ein anschließender Temperaturwechsel auf 42 °C führte zum Verlust des temperatursensitiven Plasmids p2975, was leicht an der Sensitivität der gewachsenen Kolonien gegen Ampicillin nachzuprüfen war. In Ampicillin-sensitive Klone wurde das Plasmid p2995 (Kanamycin-Resistenz) transformiert, das für Resolvase codiert. Die Bakterien wurden bei 30°C unter Kanamycin- und Chloramphenicol-Selektion kultiviert. Dies führt zu einer Deletion des zwischen den beiden Resolvase-Bindungsstellen gelegenen Plasmidabschnitts. Ein erneuter Temperaturwechsel auf 42 °C führt zum Verlust des ebenfalls temperatursensitiven Plasmids p2995. Die nun mehr Kanamycin-sensitiven Klone enthalten das Mini-EBV-Plasmid p3314, was durch einen Restriktionsverdau bestätigt werden kann.

### ***Southern-Blot-Hybridisierung***

15 µg zelluläre DNA wurden mit entsprechenden Restriktionsenzymen gespalten und in einem 0,8 %-igen Agarosegel in TAE-Puffer elektrophoretisch aufgetrennt. Die DNA wurde nach der Gelelektrophorese durch Färbung mit Ethidiumbromid (40 ng/ml in 1 x TAE-Puffer) sichtbar gemacht. Anschließend wurde das Gel 20 Minuten lang mit 0,25 M HCl behandelt, um Strangbrüche in den DNA-Fragmenten durch Hydrolyse hervorzurufen. Danach wurde die DNA 60 Minuten in Transferpuffer denaturiert und durch kapillaren Transfer auf eine Nylon-Membran (Hybond N+) übertragen. Der Transfer wurde nach 3 h beendet (nach: Southern, 1975). Die Membran wurde kurz in 2x SSC geschwenkt und anschließend für die Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten Probe verwendet. Die Prähybridisierung erfolgte in 15 ml Church-Puffer 60 Minuten lang bei 65 °C (Church und Gilbert, 1984). Nach dieser Zeit wurde der Puffer erneuert, die radioaktiv markierte Probe ( $3 \times 10^7$  dpm) zugegeben und die Hybridisierung an homologe DNA-Bereiche über Nacht bei 65 °C durchgeführt. Die Membran wurde

anschließend mit vorgewärmtem Waschpuffer bei 60 - 65 °C gewaschen. Die Waschbedingungen wurden je nach Sonde variiert und sind daher bei der Beschreibung der Sonden einzeln vermerkt. Die markierten Banden auf der Membran ließen sich im Anschluss mit einem fotosensitiven Film (Biomax MS) nachweisen. Die Dauer der Exposition richtete sich nach der Intensität der Signale.

<u>1x TAE-Puffer</u>	40 mM Tris-HCl (pH 8,0), 5 mM NaAc, 1 mM EDTA
<u>Transferpuffer</u>	0,6 M NaCl, 0,4 N NaOH
<u>2x SSC</u>	300 mM NaCl, 30 mM Natriumcitrat
<u>Church-Puffer</u>	400 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 100 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 7 % SDS, 1 mM EDTA (pH 7,2)
<u>Waschpuffer</u>	2x SSC, 0,1 % SDS

### ***Radioaktive Markierung von DNA***

Für die radioaktive Markierung einzelsträngiger DNA-Fragmente wurde eine von Feinberg und Vogelstein entwickelte Methode verwendet, bei der Hexanukleotide von zufälliger Sequenz an hitzedenaturierte, einzelsträngige DNA binden und als Primer für die Elongation mit Hilfe der Polymerase-Aktivität des Klenow-Fragmentes dienen (Feinberg und Vogelstein, 1983). Die Markierung von 50 ng DNA wurde mit dem "random primed DNA labeling kit" der Firma Roche Diagnostics nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Abtrennung der nicht eingebauten Nukleotide erfolgte über eine Sephadex-G50 Säule (Nick Column, Amersham Pharmacia). Nach Hitzedenaturierung (5 Minuten bei 95 °C, 5 Minuten auf Eis) konnte die markierte Sonde direkt zur Hybridisierungslösung gegeben werden.

### ***PCR-Analysen***

Die PCR (Polymerase Chain Reaction) dient der selektiven Amplifikation von DNA- oder cDNA-Sequenzen, die von zwei Abschnitten bekannter Basenfolge flankiert sind. Zu diesen bekannten Abschnitten komplementäre Oligonukleotide (Primer) lagern sich in einem Hybridisierungsschritt an die einzelsträngige Matrize an und bilden hierdurch den Startpunkt für die DNA-Synthese. Abfolgen aus Denaturierung, Anlagerung und Elongation werden zyklisch wiederholt, was zu einer exponentiellen Vervielfältigung der zwischen den Oligonukleotiden lokalisierten Sequenzen führt.

In meiner Arbeit wurde die PCR dazu verwendet, cDNA von Maxi- bzw. Mini-EBV-Plasmiden zu amplifizieren. In der Gesamtheit gesehen handelte es sich also um eine Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR). Die GoTaq DNA-Polymerase und der dazugehörige Puffer wurden von der Firma Promega bezogen und die PCR-Analysen nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die optimalen Schmelztemperaturen der Oligonukleotide wurden über einen Temperatur-

gradienten in einer speziellen PCR Maschine (Robocycler, Stratagene) ermittelt. Für die Extension wurden 90 Sekunden pro 1000 zu amplifizierenden Basen angenommen. In der Regel wurden 30 Zyklen für die PCR Amplifikation durchlaufen. Folgendes Standardprotokoll wurde dabei in der Regel angewandt:

Reaktionsansatz:

2 µl cDNA

4 µl GoTaq-Puffer (5x)

2 µl dNTP-Mix (10 mM)

1 µl Primer 1 (10 mM)

1 µl Primer 2 (10 mM)

0,15 µl GoTaq-DNA-Polymerase (5 U/µl), Promega

H<sub>2</sub>O ad 20 µl

PCR-Programm: 94°C/ 4 min.; 30 Zyklen (94°C/ 1 min., 59°-65°C/ 1 min., 72°C/ 1 min.); 72°C/ 10 min., 4°C

Die Anlagerungstemperatur der Primer wurden je nach Primerpaar gewählt:

Nachweis	Primer	Anlagerungstemperatur	Größe des Amplifikates cDNA/DNA
Aktin	Actin1 / Actin2	59 - 61 °C	463 bp/904 bp
Nanog	mNanogf / mNanogr	60 °C	453 bp/879 bp
Oct4	mOCT4f2 / mOCT4r	60 °C	405 bp/ -
EBNA2	EBNA2 for / EBNA2 rev	61 – 63 °C	427 bp/ 814 bp
LMP1	LMP1 for / LMP1 back	61 – 63 °C	511 bp/667 bp
LMP2A	LMP2A for / LMP2A back	56 °C	276 bp/ -

Für die RT-PCR der Promotoren Cp und Wp wurden folgende Reaktionsansätze benutzt:

Reaktionsansatz:

2 µl cDNA

2 µl KCl-Puffer (10x)

2 µl dNTP-Mix (2 mM)

1 µl Primer 1 (10 mM)

1 µl Primer 2 (10 mM)

0,6 µl Taq-DNA-Polymerase (5 U/µl), Fermentas

0,2 µl DMSO

MgCl<sub>2</sub>

H<sub>2</sub>O ad 20 µl

PCR-Programm: 94°C/ 4 min, 35 Zyklen [94°C/ 1 min., 63 - 65°C/ 1 min., 72°C/ 2 min], 72°C/ 10 min., 4°C

Nachweis	Primer	Anlagerungstemperatur	Größe des Amplifikates cDNA	MgCl <sub>2</sub> (25 mM)
Cp	C1 / W2	63 °C	312 bp, 510 bp, 708 bp, usw.	0,8 µl

Wp            W0W1 B / W2    65 °C                            110 bp, 308 bp, 506 bp, usw.            1,2 µl

### ***Realtime-PCR***

Die konventionelle PCR ist eine Methode, die die logarithmische Amplifikation einer kurzen DNA-Sequenz innerhalb eines langen doppelsträngigen DNA-Moleküls erlaubt. Nach ca. 25 - 40 Zyklen wird das PCR-Produkt meist mit Ethidiumbromid gefärbt und zur Analyse auf ein Agarosegel aufgetragen. Diese Methode wird häufig eingesetzt, um das Vorkommen bzw. die Abwesenheit spezieller DNA-Abschnitte qualitativ zu bestimmen. Quantitative Aussagen sind aber kaum möglich, da die Amplifikation des Produkts sich in den ersten Zyklen nicht über den Hintergrund abhebt, dann nur für kurze Zeit logarithmisch ansteigt, um schließlich in ein Plateau überzugehen. Eine Quantifizierung kann nur während der wenigen exponentiellen Zyklen erfolgen. Die amplifizierte Menge an Produkt am Ende der PCR-Reaktion kann dann nicht mehr in Relation zur Ausgangsmenge an Matrize gesetzt werden. Mit Hilfe der 1992 von Higuchi (Higuchi et al., 1992) eingeführten Realtime-PCR ist es jedoch möglich, die Amplifikation der DNA über Fluoreszenzmessung während des gesamten PCR-Vorgangs „in Echtzeit“ zu verfolgen und daraus auf die zu Beginn eingesetzte Anzahl von DNA-Molekülen zu schließen. Bei dem von mir verwendeten „Light-cyclers“ von Roche Diagnostics geschieht dies durch einen als SYBR-green bezeichneten Farbstoff, der sequenzspezifisch an Doppelstrang-DNA, nicht aber an einzelsträngige DNA, bindet und dann sehr stark fluoresziert.

Bevor man die Amplifikation eines Produkts über die Realtime-PCR quantifizieren kann, muss über Standardkurven eine Kalibrierung erfolgen. Dazu setzt man DNA mit bekannter Konzentration, die das zu amplifizierende Gen ebenfalls enthält, in unterschiedlichen Verdünnungen als Matrize ein. Die Analysen wurden in meinem Fall nicht mit DNA sondern mit cDNA durchgeführt und es war nicht möglich für die verschiedenen untersuchten Gene cDNA-Standardkurven zu erstellen. Aus diesem Grund konnten die Proben nicht quantifiziert werden und das Amplifikat wurde wie bei einer herkömmlichen PCR mit Ethidiumbromid gefärbt und mittels eines Agarosegels analysiert.

Zur Amplifikation wurden 2,5 – 5 µg mRNA mit dem cDNA-Synthese-System der Firma Invitrogen nach Angaben des Herstellers revers transkribiert und 1:10 verdünnt. 1 µl der verdünnten cDNA wurde in die Realtime-PCR eingesetzt. Die Amplifikation erfolgte mit einem „Light-cycler“ von Roche wie bei Schepers et al. beschrieben (Schepers et al., 2001).

Reaktionsansatz:

1 µl cDNA

0,8 µl MgCl (25 mM)

0,5 µl Primer 1

0,5 µl Primer 2

1 µl Polymerase Mix

6,2 µl H<sub>2</sub>O

PCR-Programm: 95 °C/10 min, 35 – 55 Zyklen [95 °C/1 sek, 54 – 67 °C/10 sek, 72 °C/20 sek], 70 °C/10 sek, 40°C/15 min

Nachweis	Primer	Anlagerungstemperatur	Größe des Amplifikates cDNA/DNA
EBV	2190 F3 / 2190 B2	67 °C	189 bp / 189 bp
GAPDH	89 mGAPDH seq / 90 mGAPDH rev	54 °C	390 bp / -
EBNA2	EBNA2-RTas / EBNA2-RTse	63 °C	360 bp / 745 bp
LMP1	LMP1-RTas / LMP1-RTse	63 °C	343 bp / 522 bp
LMP2A	LMP2A-RTas / LMP2A-RTse	63 °C	277bp / -

**3.2.4. RNA-Arbeitstechniken*****RNA-Isolation***

Die Isolation der gesamtzellulären RNA erfolgte mit Hilfe des RNeasy Midi Kits von Qiagen nach Angaben des Herstellers. Das Prinzip basiert auf der Guanidinisothiocyanat-Methode. Dabei wurden die Zellen in β-Mercaptoethanol-haltigem Puffer durch mehrmaliges Aufziehen in eine Spritze aufgebrochen und die nach erfolgter Zentrifugation (10 Minuten, 4000xg) im Überstand befindliche RNA durch Zugabe von 70 %igem Ethanol präzipitiert. Anschließend wurde die RNA über die im Kit enthaltenen RNA-Adsorptionssäulen aufgereinigt, mehrmals gewaschen und in zwei aufeinander folgenden Elutionsschritten mit 350 µl RNase-freiem Wasser eluiert. Die Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgte photometrisch.

***Reverse Transkription***

Mittels Reverser Transkription ist es möglich, RNA unter Einsatz von DNA-Oligomeren und dem Enzym Reverse Transkriptase in copy-DNA (cDNA) umzuschreiben. 2 – 5 µg gesamtzelluläre RNA wurden mit Oligo-(dT)<sub>20</sub>-Primern (im verwendeten cDNA-Synthese-System von

Invitrogen enthalten) und dNTPs 5 Minuten lang bei 65 °C denaturiert und sofort auf Eis gestellt. Durch die Verwendung von Oligo-dT-Primern ist es möglich, nur die in den Proben enthaltene mRNA, die ca. 1 – 2 % der Gesamt-RNA ausmacht, in cDNA umzuschreiben. Nach Zugabe von 2 µl 10x RT-Puffer, 4 µl 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 µl 0,1 M DTT, 1 µl RNase Out (40 U/µl) und 1 µl Superscript<sup>TM</sup>III-Reverse Transkriptase (Invitrogen Life Technologies) erfolgte die Elongationsreaktion nach Angaben des Herstellers für 50 Minuten bei 50 °C, bevor sie durch eine 5-minütige Inkubation der Proben bei 85 °C abgebrochen wurde. Zum Abbau des RNA-Anteils in den RNA/cDNA-Hybridsträngen wurde abschließend 1 µl RNase H (2 U/µl) zugesetzt und die Proben für 20 Minuten bei 37 °C inkubiert. In die anschließende PCR-Reaktion zum Testen der Qualität der cDNA wurden 2 µl aus den erhaltenen 20 µl des RT-Reaktionsansatzes eingesetzt.

### **3.2.5. Proteintransfer und immunologischer Nachweis von Proteinen**

#### *Präparation von Proteinen aus Zellen*

Für die Isolierung der Zellproteine wurden  $3 \times 10^6$  Zellen bei Zellkultur-Zellen und  $5 \times 10^6$  Zellen bei primären B-Zellen verwendet. Die Zellen wurden 1x mit PBS gewaschen und anschließend direkt in 60 µl heißem 2x Laemmli Probenpuffer (2,5 % SDS; 20 % Glycerin; 0,12 M Tris pH 6,8) aufgenommen. Um die Degradation der Proteine durch Proteasen zu minimieren, wurden Proteaseinhibitoren zugegeben (Protease Inhibitor Complete Mini Tabletten, Roche). Die Proben wurden 5 Minuten bei 100 °C erhitzt und anschließend gut gemischt. Die Lysate wurden für weitere Experimente verwendet bzw. bei -20 °C eingefroren. Proteinextrakte wurden teilweise auch aus eingefrorenen Zellen gewonnen. Diese wurden vor dem Einfrieren einmal mit PBS gewaschen und in ca. 25 µl PBS bei -80 °C gelagert.

#### *Proteinquantifizierung*

Die Quantifizierung des Proteins erfolgte mit dem DC Protein Assay von Bio-Rad, und wurde nach Firmenprotokoll durchgeführt. Zur Ermittlung der Konzentration wurde parallel zu den Proben eine Eichgerade mit Rindergammaglobulin angefertigt.

#### *SDS-PAGE und Westernblot-Analyse*

Bei dieser Methode wurden die Proteine in einem Polyacrylamidgel aufgetrennt, das 0,1 % SDS enthält. Zur Vorbereitung der Zell-Lysate wurde zu jeder Probe jeweils 1/10 Volumen 1M DTT und 1/10 Volumen Bromphenolblau-Lösung gegeben und diese nochmals 5 Minuten bei 100 °C aufgekocht. Durch das Aufkochen wurden die enthaltenen Proteine denaturiert und die erneute Faltung durch das Detergenz SDS verhindert, welches die Eigenladung der Proteine

überlagert, so dass alle Proteine negativ geladen sind. Die Disulfidbrücken zwischen den Polypeptidketten wurden durch DTT reduziert.

Das Acrylamidgel bestand aus einem Sammelgel, das der Fokussierung der geladenen Proteine dient und einem Trenngel, das für die Auftrennung der Proteine nach ihrer molekularen Masse ermöglicht. Die verwendeten 10 % und 12 % Trenngele ermöglichten eine Auftrennung von Proteinen im Bereich zwischen 20 und 80 kDa.

Anschließend wurden die Proben durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) in „mighty small“-Gelapparaturen (Hofer) aufgetrennt. Als Molekulargewichtsstandard wurde die „BenchMark™ Prestained Protein Ladder“ (Life Technologies, Eggenstein) verwendet. Die SDS-PAGE erfolgte bei 35 mA und maximaler Voltzahl (Laemmli, 1970).

Bei der Western-Blot Analyse können die im SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennten Proteine durch elektrischen Transfer auf eine proteinbindende Nitrozellulosemembran transferiert werden. Da das elektrische Feld dabei senkrecht zur vorherigen Trennrichtung angelegt wird, bleibt das Muster der getrennten Proteine auf der Membran erhalten. Unmittelbar nach der SDS-PAGE wurden die aufgetrennten Proteine mit Hilfe des „SemiPhor“-Elektroblotsystems von Hofer auf eine Hybond-C Membran (Amersham) transferiert. Der Transfer erfolgte bei 80 mA innerhalb von 40 Minuten. Nach dem Transfer der Proteine auf die Membran wurde diese eine Stunde lang in Blocklösung geschwenkt, um unspezifische Proteinbindstellen abzusättigen. Anschließend wurde die Membran über Nacht mit dem primären Antikörper in Waschpuffer bei 4 °C inkubiert. Die benutzten Antikörper sind unter Abschnitt 3.1.1 aufgeführt. Vor Zugabe des Zweitantikörpers wurde die Membran fünfmal für 5 Minuten in Waschpuffer geschwenkt. Die Inkubation mit dem gegen den Primärantikörper gerichteten und Peroxidasegekoppelten Sekundärantikörper in Waschpuffer erfolgte bei Raumtemperatur für 2 Stunden. Der Immunoblot wurde wieder dreimal für 5 Minuten in Waschpuffer gewaschen, anschließend weitere zweimal für 5 Minuten in PBS. Danach wurde er mit Hilfe von verstärkter Chemilumineszenz (ECL, Amersham) nach Angaben des Herstellers entwickelt.

<u>Trenngel 10%</u>	4 ml H <sub>2</sub> O, 3,3ml 30 % Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung, 2,5 ml 1,5 M Tris pH 8,8, 100 µl 10 % SDS, 100µl 10 % APS (Ammoniumperoxodisulfat), 4 µl 10 % TEMED (N,N,N',N'- Tetramethyldiamin)
<u>Trenngel 12 %</u>	3,3 ml H <sub>2</sub> O, 4 ml 30 % Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung, 2,5 ml 1,5 M Tris pH 8,8, 100 µl 10 % SDS, 100 µl 10 % APS, 4 µl 10 % TEMED
<u>Sammelgel (10 ml):</u>	3,4 ml H <sub>2</sub> O, 40 µl 30 % Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung, 625 µl 1 M Tris pH 6,8, 50 µl 10 % SDS, 50 µl 10 % APS, 3 µl 10 % TEMED
<u>Transferpuffer:</u>	48 mM Tris, 39 mM Glycin, 0,0375 % SDS, 20 % Methanol
<u>Blocklösung:</u>	20 mM Tris-HCl pH 7,4, 150 mM NaCl, 4 % Magermilchpulver

Waschlösung: 20 mM Tris-HCl pH 7,4, 150 mM NaCl, 1 % Magermilchpulver, 0,04 % Tween-20

## 4. Ergebnisse

Der Ergebnisteil meiner Arbeit ist in vier Abschnitte gegliedert. Der erste Teil beschreibt die genetische Modifikation des Mini-EBV-Konstruktes p2801, in das eine Neomycinresistenz-Kassette integriert wurde. Dieser Klonierungsschritt war nötig, damit ES-Zellen, die mit dem Mini-EBV-Plasmid transfiziert wurden, durch G418 selektioniert werden konnten. Dieses neue Mini-EBV-Konstrukt diente zusammen mit bereits bestehenden, rekombinanten Maxi-EBV-Plasmiden als Grundlage für alle meine Versuche in ES-Zellen.

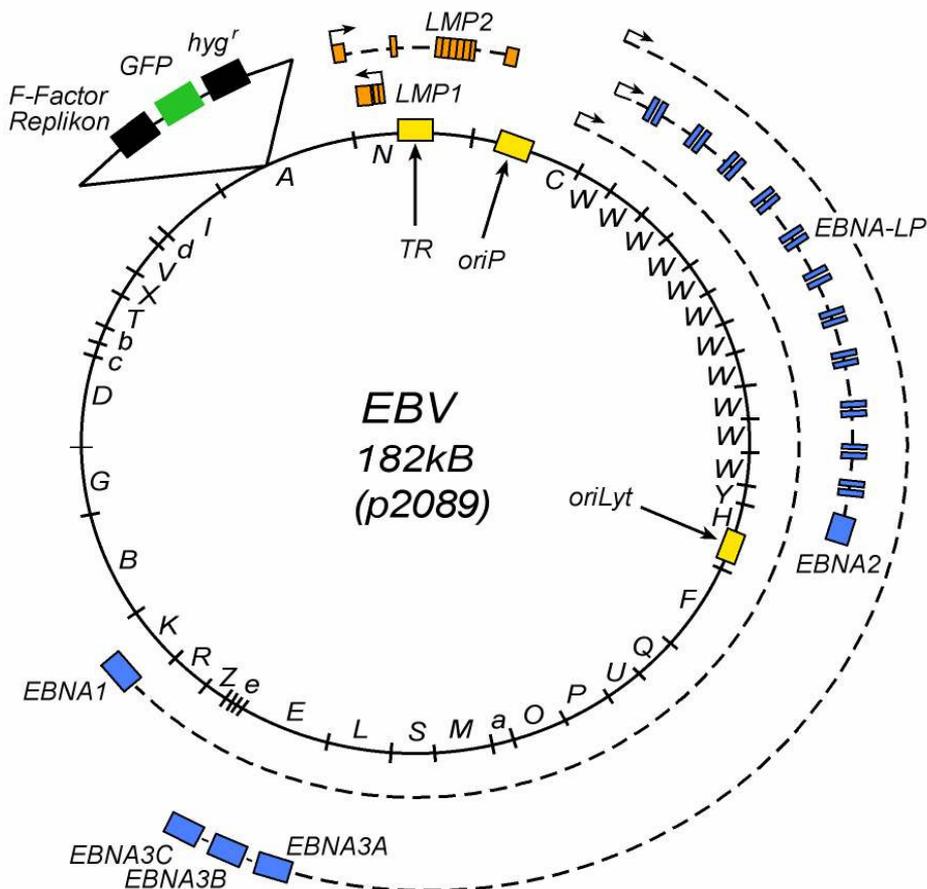
Im zweiten Teil wird eine Lokus-spezifische Integration einer EBNA1-Expressionskassette in die ES-Zell-Linie Bruce4 beschrieben. Diese genetische Manipulation wurde vorgenommen, da zu Beginn der Arbeit nicht sicher war, ob nach Transfektion der EBV-Plasmide in ES-Zellen genügend EBNA1-Protein synthetisiert wird, um die Aufrechterhaltung der Plasmide zu garantieren.

Der dritte Teil meiner Arbeit beschäftigt sich mit dem Einbringen des Mini-EBV-Plasmids p3314 und der beiden Maxi-EBV-Plasmide p3053 und p3298 in die EBNA1-positiven ES-Zell-Linien. Die entstandenen EBV-positiven ES-Zell-Linien wurden charakterisiert und *in vitro* zu B-Zellen differenziert. Die Differenzierung und die Genexpression der eingebrachten EBV-Plasmide in diesen Zellen werden im vierten und letzten Teil meiner Arbeit behandelt.

### 4.1. Klonierung des Mini-EBV-Plasmids p3314

Um das EBV-Genom genetisch manipulieren zu können, wurde ein prokaryotisches Mini-F-Plasmid und eine Chloramphenicolresistenz-Kassette in das EBV-Genom in der Zell-Linie B95.8 eingebaut (Delecluse et al., 1998). Dadurch konnte das nun Maxi-EBV-Plasmid (p2089) genannte Konstrukt in Bakterien (*E.coli*) stabil eingeführt werden, um das EBV-Genom für genetische Modifikationen zugänglich zu machen. Das Maxi-EBV-Plasmid trägt neben einer GFP-Expressionskassette, mit deren Hilfe Plasmid-tragende eukaryotische Zellen leicht identifiziert werden können, auch eine Hygromycinresistenz-Kassette, die eine Selektion von Maxi-EBV-Plasmid tragenden Zellen ermöglicht (Abb. 4.1).

Im Gegensatz zu diesem Prototyp eines Maxi-EBV-Konstrukts sind auf einem sogenannten Mini-EBV-Konstrukt nur latente EBV-Gene auf einem rekombinanten Plasmid vereinigt. Das Mini-EBV-Plasmid (p1478.A) ist das erste Konstrukt einer Serie von Plasmiden, die ebenfalls in *E.coli* genetischer Manipulation zugänglich sind, denen aber alle lytischen Funktionen fehlen, so dass eine Virussynthese ausgeschlossen werden kann.



**Abb. 4.1: Plasmidkarte des Maxi-EBV-Plasmids p2089**

Das gesamte Plasmid hat eine Größe von 182 kB. Die einzelnen Buchstaben im Inneren des Kreises bezeichnen die Fragmente, die durch einen Restriktionsverdau mit dem Enzym BamHI entstehen und der Namensgebung der EBV-Gene zugrunde liegen. Auf der Plasmidkarte sind zur besseren Übersicht nur die latenten Gene von EBV eingetragen: LMP1 und LMP2 sind orange, EBNA1, EBNA2, EBNA3 und EBNA-LP blau gefärbt. EBER1 und EBER2 sind wegen der geringen Größe nicht aufgeführt. Die gestrichelten Linien stellen die Gene als Primärtranskripte dar, und die Promotoren sind als Pfeile angegeben. Der Replikationsursprung der latenten Phase *oriP* und der der lytischen Phase *oriLyt* sind, ebenso wie die „terminal repeats“ (TR), gelb hervorgehoben. Hervorgehoben wurde außerdem das prokaryotische Plasmid-Rückgrat, das neben einem F-Faktor-Replikon auch eine GFP-Expressionskassette sowie eine Hygromycinresistenz trägt. Eine ebenfalls auf dem Rückgrat liegende Chloramphenicolresistenz ist nicht dargestellt. Diese Elemente ermöglichen es, das Genom des Virus in Bakterien, z.B. *E.coli*, genetisch verändern zu können. Durch die Resistenzen kann auf das Vorhandensein des Plasmids in Zellen selektiert und Plasmid-tragende Zellen können durch GFP-Expression detektiert werden. Von p2089 abstammende Viruspartikel besitzen alle Eigenschaften des Wildtyp-EBV-Virus, d. h. sie können humane B-Zellen infizieren und transformieren (Delecluse et al., 1998).

Das Plasmid p1478.A kann, wenn es als DNA in humane B-Zellen eingebracht wird, diese wie das Maxi-EBV-Konstrukt transformieren (Kempkes et al., 1995) und bildet damit die latente Phase des Lebenszyklus des Virus ab. Das Plasmid p2801 ist ebenfalls ein Mini-EBV-Plasmid und stammt von dem Ursprungsplasmid p1478.A ab. p2801 trägt im Vergleich zu

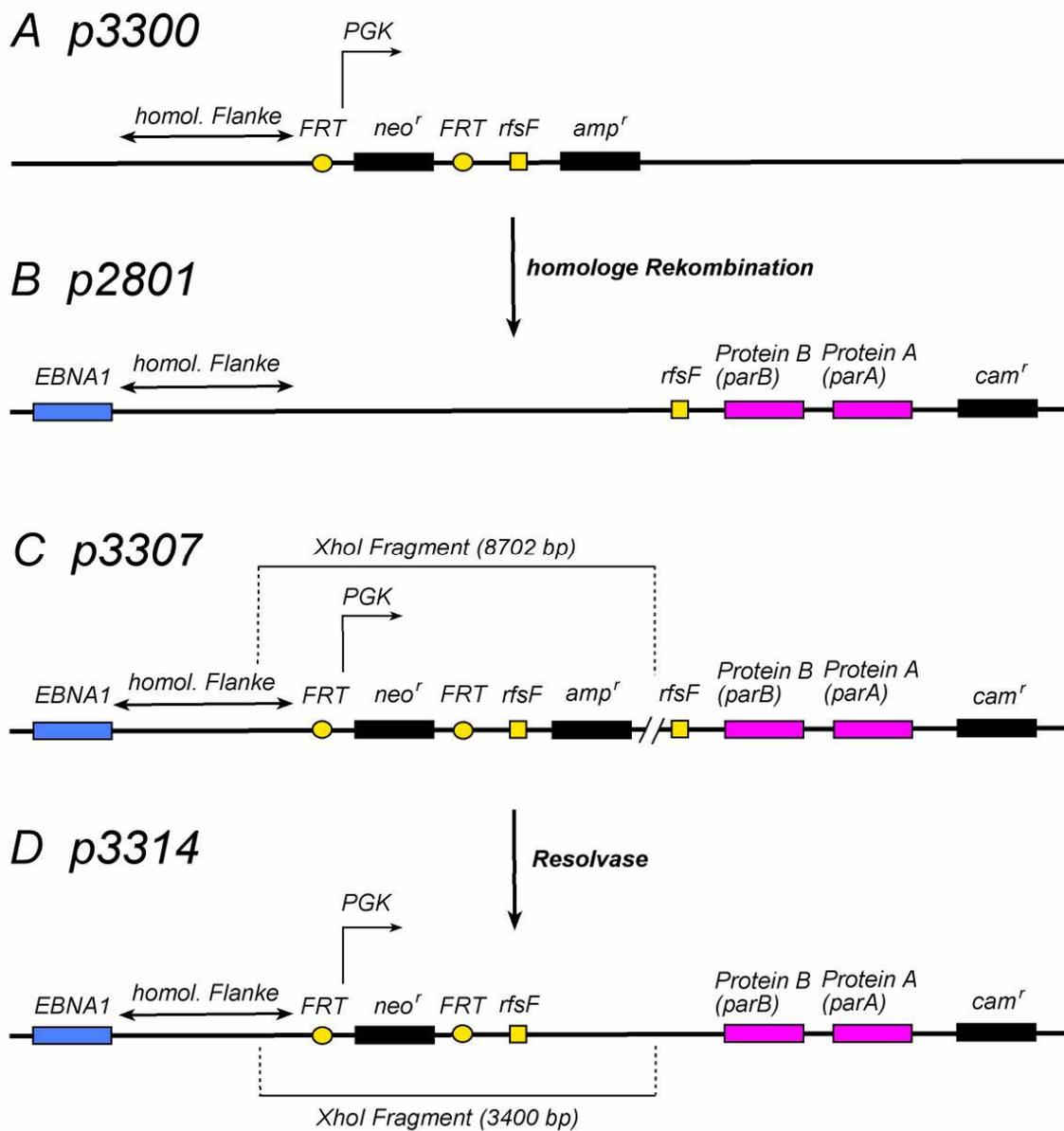
p1478.A kein Resistenzgen im prokaryotischen Rückgrat. Da eine Aufrechterhaltung der EBV-Plasmide in den murinen ES-Zellen über einen längeren Zeitraum hinweg ohne Selektion durch ein Antibiotikum nicht gewährleistet werden kann, wurde ein G418-Resistenzgen in das Plasmid p2801 eingebaut.

Die Resistenz gegenüber dem Antibiotikum G418 ist essentiell, da alle EBV-Plasmide in ES-Zellen eingeführt und diese selektioniert werden sollten. Wie in meiner Einleitung ausgeführt, werden ES-Zellen auf primären, murinen, embryonalen Feeder-Zellen kultiviert. Diese müssen im meinem Fall auch resistent gegen G418 sein, um unter diesen Kulturbedingungen zu überleben. Sie wurden deshalb aus transgenen Mausembryonen (NeoR-Mäuse) gewonnen, die ein Neomycinresistenz-Gen im Genom tragen.

Für die Konstruktion eines Mini-EBV-Plasmids mit einem Resistenzgen für G418 wurde zunächst das Shuttle-Plasmid p3300 kloniert, das als wichtige Elemente neben einer Neomycinresistenz-Kassette eine zum Mini-EBV-Genom homologe Flanke und eine Resolvase-Bindungsstelle (*rfsF*) besitzt (vgl. Abb. 4.2 A). Dieses Shuttle-Plasmid wurde dann durch homologe Rekombination mit dem Mini-EBV-Plasmid p2801 in *E. coli* (Abb. 4.2 B) vereint. Das entstandene, plasmidale Kointegrat p3307 enthält nun neben dem Resistenzgen für G418 auch das gesamte Rückgrat des Shuttle-Plasmids, das von zwei Resolvase-Bindungsstellen flankiert ist (Abb.4.2C). Da nur die Resistenz-Kassette auf das Mini-EBV-Plasmid übertragen werden sollte, musste das Rückgrat des Plasmids wieder entfernt werden.

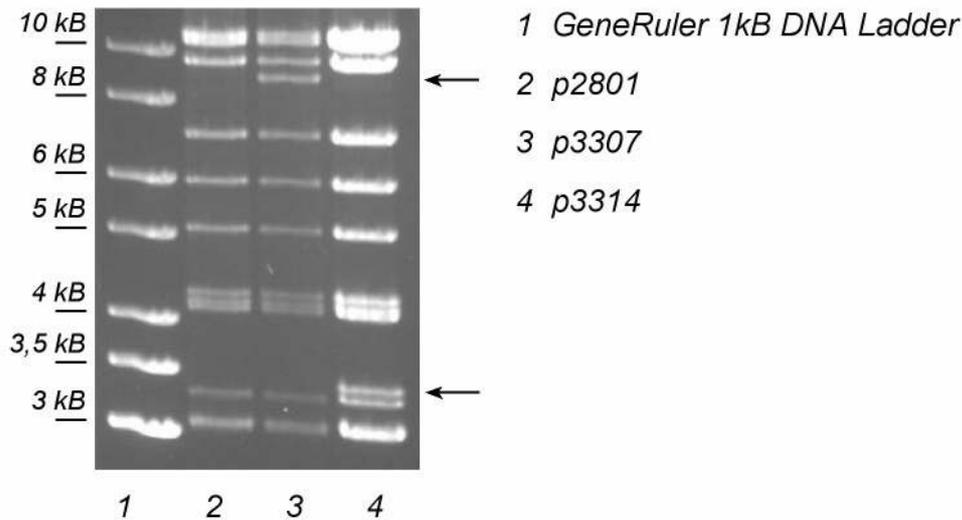
Durch das Enzym Resolvase, das in *E. coli*-Zellen durch das Expressionsplasmid p2995 transient eingebracht wurde, konnte das Rückgrat des Shuttle-Plasmids durch *rfsF*-vermittelte Rekombination deletiert werden, um das finale Mini-EBV-Konstrukt p3314 zu erhalten (Abb. 4.2 D). Dieses trägt nun das Gen für G418-Resistenz und erfüllt damit die Voraussetzungen, um eine Selektion in ES-Zellen zu ermöglichen.

Zur Kontrolle der Klonierungsschritte wurde eine Restriktionsanalyse mit dem Restriktionsenzym *XhoI* durchgeführt (vgl. Abb. 4.3). Das Ausgangskonstrukt unterscheidet sich durch das Bandenmuster eindeutig von dem Kointegrat p3307 als auch von dem Endprodukt p3314. Das Kointegrat weist eine zusätzliche 8,7 kB große Bande auf, die auf eine erfolgreiche Integration des gesamten Shuttle-Plasmids schließen lässt. Nach der Deletion des Shuttle-Plasmid-Rückgrates durch die Resolvase verkürzt sich die Bande auf 3,4 kB. Diese Bande zeigt nicht nur eine gelungene Entfernung des Rückgrates, sondern unterscheidet das Endprodukt p3314 auch vom Ausgangsplasmid p2801 und zeigt den gelungenen Einbau der Neomycinresistenz-Kassette.



**Abb. 4.2: Klonierungsstrategie zur Integration eines G418-Resistenzgens in das Rückgrat des Mini-EBV-Plasmids p2801**

A Das Shuttle-Plasmid p3300 enthält eine homologe EBV-Flanke und zwei Bindungsstellen für FLP-Resolvase (FRT), die ein Neomycinresistenz-Gen flankieren. Das Gen steht unter der Kontrolle des Promotors des „Housekeeping“-Gens Phosphoglyceratkinase (PGK). Zusätzlich ist eine Bindungsstelle für Resolvase (*rfsF*) und eine Ampizillinresistenz angegeben. B Die Neomycinresistenz-Kassette wurde durch homologe Rekombination auf das Mini-EBV-Plasmid p2801 übertragen. Dargestellt ist ein Ausschnitt des Plasmids, der einen Teil der EBV-Sequenz (EBNA1) und das prokaryotische Rückgrat (ProteinB, ProteinA und die Chloramphenicolresistenz (*camR*)) zeigt. Dieser Abschnitt enthält auch eine Resolvase-Bindungsstelle (*rfsF*). C Das Kointegrat p3307 besteht aus dem Mini-EBV-Plasmid p2801 und dem Shuttle-Plasmid p3300, die durch Rekombination über die homologen Flanken vereint wurden. Gekennzeichnet ist das XhoI-Fragment, das nach einer Kointegration der Plasmide auftritt (vgl. Abb. x). D Das Mini-EBV-Plasmid p3314 ist nach Auflösung des Kointegrates p3307 durch Resolvase entstanden. Dabei wird das gesamte, zwischen den zwei Bindungsstellen der Resolvase (*rfsF*) liegende Rückgrat des Shuttle-Plasmids p3300 entfernt. Das entstehende Konstrukt p3314 vermittelt nun eine Resistenz gegen G418. Das angegebene XhoI-Fragment unterscheidet das Plasmid vom Ausgangskonstrukt p2801.



**Abb. 4.3: Restriktionsanalyse der Plasmide p2801, p3307 und p3314 mit dem Restriktionsenzym XhoI**

In das Mini-EBV-Konstrukt p2801 wurde durch homologe Rekombination ein Shuttle-Plasmid integriert, das eine Neomycinresistenz-Kassette trägt. Das entstehende Kointegrat p3307 unterscheidet sich von p2801 in der Restriktionsanalyse durch eine Bande von 8,7 kB (Pfeil). Nach Auflösen des Kointegrates durch Resolvase entstand das Mini-EBV-Plasmid p3314, das im prokaryotischen Rückgrat eine Neomycinresistenz-Kassette trägt, die eine Selektion des Plasmids in ES-Zellen ermöglicht. Die eingefügte Sequenz wird bei einem Restriktionsverdau mit XhoI durch eine 3,4 kB Bande (Pfeil) sichtbar, die ebenfalls nicht im Ausgangskonstrukt p2801 vorhanden ist.

## 4.2. Herstellung der EBNA1 exprimierenden ES-Zell-Linie C1

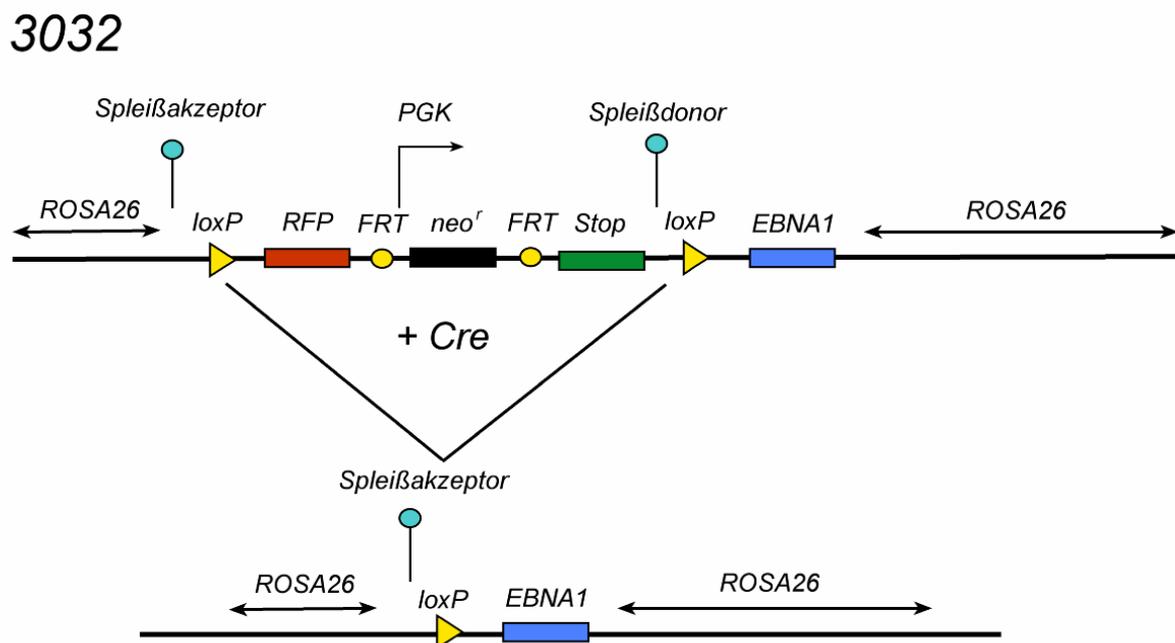
EBNA1 ist das einzige Gen, das in alle Latenzstadien des Virus exprimiert wird (Kang et al., 2005). Es ist für die Funktionalität des plasmidalen Replikationsursprungs *oriP* unabdingbar und ist verantwortlich für die korrekte Segregation der EBV-Episomen bei der Zellteilung (Schepers et al., 2001, Aiyar et al., 1998). So sorgt es für die Aufrechterhaltung des EBV-Plasmids in den humanen Zellen (Humme et al., 2003).

Da nicht vorausgesetzt werden konnte, dass EBNA1 in murinen ES- bzw. B-Zellen in ausreichender Menge von den viralen Promotoren transkribiert werden würde, sollte vor dem Einbringen des EBV-Genoms das EBNA1-Gen stabil in den Rosa26-Lokus der ES-Zellen integriert werden. So konnten eine konstitutive Expression des Gens unter Kontrolle des Rosa26-Promotors und eine Aufrechterhaltung des EBV-Plasmids in den murinen Zellen sichergestellt werden. Der Rosa26-Lokus wurde gewählt, da er ubiquitär in nahezu allen Geweben der Maus exprimiert wird, insbesondere auch in den hämatolymphoiden Zellen (Zambrowicz et al., 1997). Darüber hinaus führt die Inaktivierung der Rosa26-Transkripte zu keinem offensichtlich veränderten Phänotyp, und homozygot transgene Tiere zeigen keinerlei Auffälligkeiten

(Soriano, 1999). Die ES-Zell-Linie Bruce4 stammt von C57BL/6-Mäuse ab (Köntgen et al., 1993). Sowohl der Locus als auch die ES-Zell-Linie wurden bereits mehrfach erfolgreich für die Generierung transgener ES-Zell-Linien genutzt (U.Zimber-Strobl, persönliche Kommunikation).

#### 4.2.1. Integration des Konstruktes p3032 in Bruce4

Um eine Integration des EBNA1-Gens in den Rosa26-Lokus zu erreichen, wurde das Shuttle-Plasmid p3032 durch Elektroporation in die murine ES-Zell-Linie Bruce4 eingebracht. Das Shuttle-Plasmid besteht aus zwei zum Rosa26-Lokus homologen Flanken, zwischen denen sich eine EBNA1-Expressionskassette befindet (vgl. Abb. 4.4). Diese setzt sich zusammen aus einem LoxP-flankierten Abschnitt und dem dahinter liegenden für EBNA1 kodierenden Exon.



**Abb. 4.4: Aufbau der EBNA1-Expressionskassette des Plasmids p3032**

Zwischen zwei für den Rosa26-Lokus homologen Flanken befindet sich ein Spleißakzeptor und eine EBNA1-Expressionkassette, vor dem EBNA1 codierenden Exon befindet sich eine LoxP-flankierte Stopp-Kassette. Diese Kassette verhindert sicher sowohl eine Transkription als auch eine Translation des EBNA1-Gens. Zusätzlich liegen zwischen den LoxP-Stellen eine Neomycinresistenz unter Kontrolle des PGK-Promotors, die von FLP-Rekombinase-Bindungsstellen flankiert (FRT) ist, und eine RFP-Expressionskassette. Nach Deletion der Stopp-Kassette und des Neomycinresistenz-Gens durch Cre-Rekombinase verbleibt nur ein Spleißakzeptor, eine LoxP-Stelle und das EBNA1 Gen in dem Intron des Rosa26-Lokus. Die beiden homologen Flanken des Plasmids ermöglichen eine Rekombination der Expressionskassette in das erste Intron des Rosa26-Lokus (vgl. Abb. 4.5). Die Ausprägung des EBNA1-Gens erfolgt von einer durch den Rosa26-Promotor ubiquitär erzeugten mRNA (Soriano et al., 1999, Mao et al., 2001).

Die LoxP-Stellen flankieren neben dem G418-Resistenzgen eine Stopp-Kassette, die zu einem vorzeitigen Abbruch von Transkription und Translation führt. Durch diese Konstruktion ist es möglich, auf eine erfolgreiche Integration der Genkassette mit dem Antibiotikum G418 in Abwesenheit von EBNA1 zu selektionieren. Nach Etablierung der Zell-Linie kann durch Cre-vermittelte Rekombination die Stopp-Kassette zusammen mit dem Neomycinresistenz-Gen deletiert werden. Dies ermöglicht die EBNA1-Expression und die erneute G418-Selektion der eingebrachten EBV-Plasmide.

Das Shuttle-Plasmid p3023 wurde durch Elektroporation in die ES-Zellen eingebracht und die transfizierten Zellen mit G418 selektioniert. Eine ES-Zell-Kolonie entsteht dabei aus einer einzigen Zelle, so dass es möglich ist, verschiedene Klone zu isolieren. Es wurden 400 Klone gepickt und per Southernblot-Analyse weiter untersucht.

#### **4.2.2. Überprüfung der Integration von p3032**

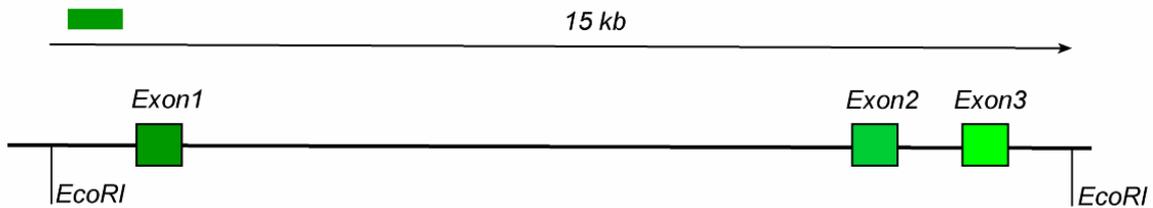
Um die erfolgreiche und korrekte Integration der Expressionskassette zu überprüfen, wurde zelluläre DNA aus den ES-Zell-Klonen isoliert, mit verschiedenen Restriktionsenzymen verdaut und anschließend durch eine Southernblot-Analyse untersucht. Ein Überblick über die komplette Southernblot-Strategie ist in Abb. 4.5 zu sehen, die im Folgenden beschrieben wird.

Beim Verdau der zellulären DNA der ES-Zell-Klone mit dem Restriktionsenzym EcoRI, entsteht in der Wildtyp-Situation eine Bande mit 15 kB, die die ersten drei Exons des Rosa26-Lokus umfasst. Nach der spezifischen Integration der Expressionskassette erhält man bei einem Verdau mit EcoRI zwei Fragmente (7,15 kB und 3,6 kB).

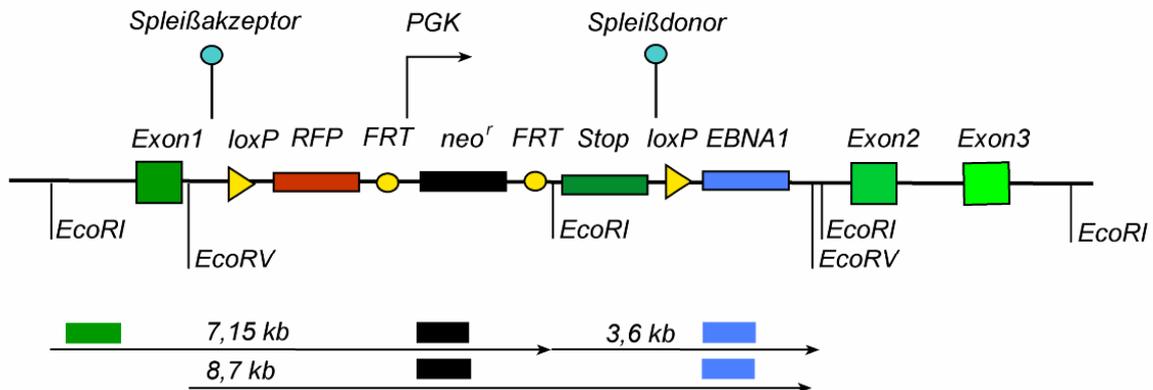
Diese unterschiedlichen EcoRI-Restriktionsenzym-Fragmente können mit Hilfe von drei radioaktiven Sonden, der Rosa-Sonde, der EBNA1-Sonde bzw. der Neo-Sonde detektiert und differenziert werden. Wird das korrekte Fragment mit der Rosa-Sonde erkannt, so ist dies ein Hinweis, dass sich die Expressionskassette im Rosa26-Lokus befindet und nicht in einen anderen Locus integriert hat. Mit der Neo-Sonde wird nicht nur das Vorhandensein der Neomycinresistenz gezeigt, sondern es kann auch, wenn keine zusätzlichen Banden auftreten, nahezu ausgeschlossen werden, dass das Resistenzgen sich noch an einer anderen Stelle des Maus-Genoms befindet. Mit der EBNA1-Sonde kann das kodierende Exon des EBNA1-Gens detektiert werden. Auch hier würde das Auftreten mehrerer Banden auf eine zusätzliche Integration des Fragments im Genom der Maus hindeuten.

Die DNA wurde noch mit einem weiteren Restriktionsenzym (EcoRV) verdaut, um zu zeigen, dass die EBNA1-Expressionskassette als Ganzes integriert wurde. Dabei entsteht ein Fragment

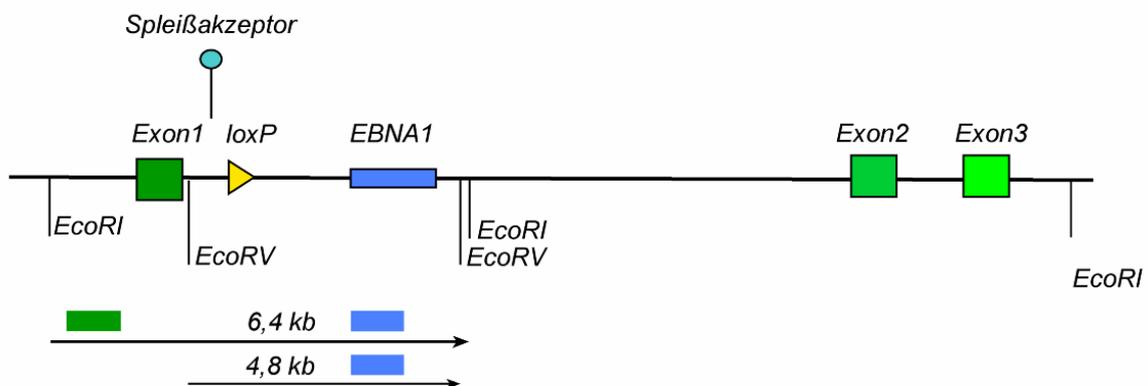
### A *wt Rosa26*



### B *Bruce4 stop EBNA1*



### C *Bruce4 EBNA1*

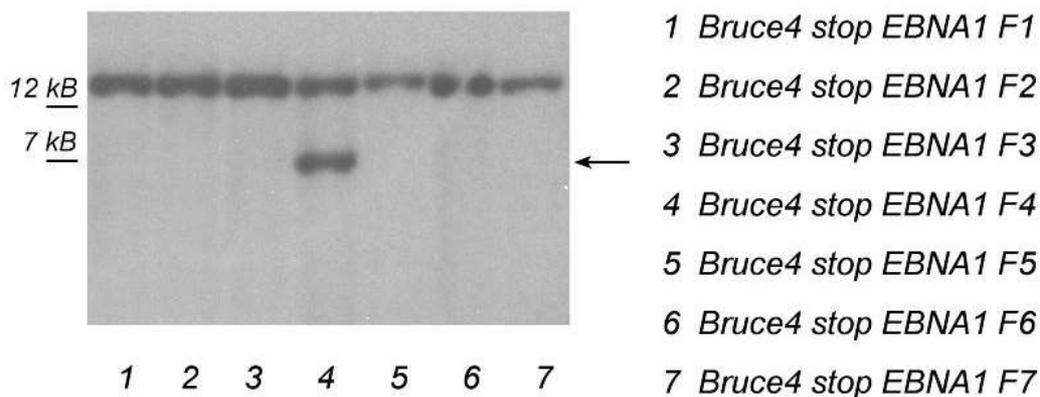


**Abb. 4.5: Integration einer EBNA1-Expressionskassette in den Rosa26-Lokus der Maus**

**A** Dargestellt ist ein Ausschnitt aus dem Rosa26-Lokus (Wt) der Maus mit den ersten drei Exons. **B** Die EBNA1-Expressionskassette befindet sich im ersten Intron des Rosa26-Lokus. Für eine genaue Beschreibung der Kassette siehe Abb. x. Vor dem EBNA1-Gen befindet sich eine von Cre-Rekombinase-Bindungsstellen (LoxP) flankierte Stopp-Kassette, die sowohl eine Transkription als auch eine Translation des EBNA1-Gens verhindert. Zusätzlich trägt das Konstrukt ein Neomycinresistenz-Gen **C** Nach Deletion der Stopp-Kassette und des Neomycinresistenz-Gens durch Cre-Rekombinase verbleiben nur der Spleißakzeptor, eine der Rekombinase-Bindungsstellen und das EBNA1-Gen im Intron. Die Transkription von EBNA1 wird vom Rosa26-Promotor aus initiiert. Angegeben sind für alle Konstrukte die Restriktionsschnittstellen für die Enzyme EcoRI und EcoRV und die Länge der Fragmente, die durch die Southernblot-Sonden detektiert werden. Southernblot-Sonden: Grüne Box - Rosa-Sonde, blaue Box - EBNA1-Sonde, schwarze Box - Neo-Sonde.

(8,7 kB), das die gesamte Expressionskassette umfasst. Dieses wurde sowohl mit der Neo- bzw. EBNA1-Sonde erkannt, was auf die Vollständigkeit des eingebauten Fragments schließen lässt.

Als Beispiel für die Southernblot-Analyse ist in Abb. 4.6 der Ausschnitt eines Blots zu sehen, bei dem die DNA mit dem Restriktionsenzym EcoRI verdaut und mit der Rosa-Sonde detektiert wurde. Man erkennt neben mehreren Klonen, die die Wildtyp-Bande von 15 kB zeigen, auch einen Klon (Bruce4 stop EBNA1 F4), bei dem die EBNA1-Expressionskassette erfolgreich in den Rosa26-Lokus integriert wurde, wodurch sich die Bande aufgrund der zusätzlichen EcoRI-Schnittstelle auf 7,15 kB verkürzt. Bei dem Klon F4 gibt es zusätzlich eine Bande bei 15 kB, da die Expressionskassette nur in eines der beiden Allele integriert hat und das andere noch in der Wildtyp-Konformation vorliegt.



#### Abb. 4.6: Southernblot-Analyse von Bruce4 stop EBNA1 Zellen

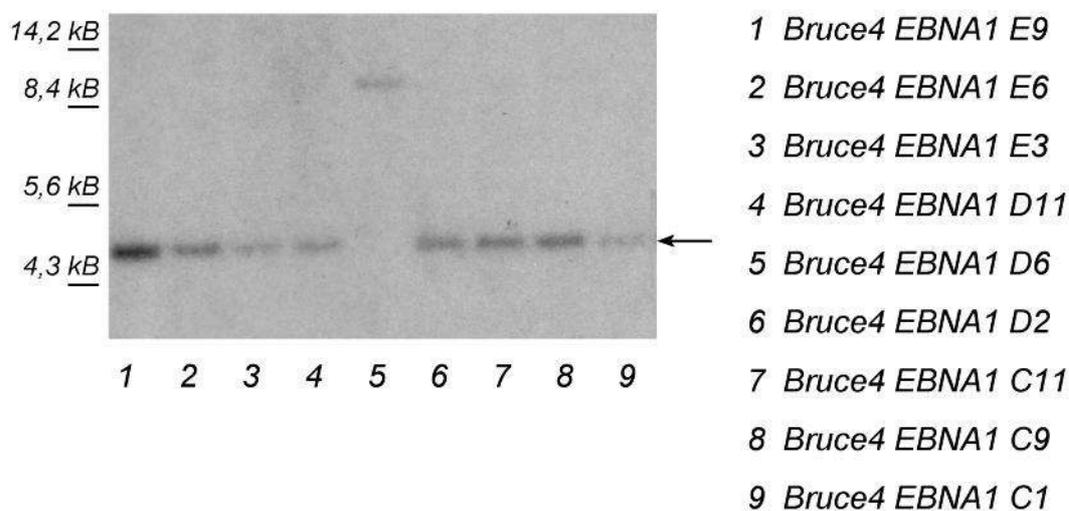
Eine EBNA1-Expressionskassette wurde in den Rosa26-Lokus der murinen ES-Zell-Linie Bruce4 integriert. Der unveränderte Rosa26-Lokus ergibt im Southernblot (EcoRI Verdau, Rosa-Sonde) eine 15 kB Bande. Nach Einbau des Fragments verkürzt sich die Bande auf 7,15 kB (Pfeil), da sich in der integrierten Kassette eine weitere EcoRI-Schnittstelle befindet (vgl. Abb. 4.5). Im Klon F4, der die Expressionskassette eingebaut hat, wurde dadurch nur eins der beiden Allele verändert, weswegen zwei Fragmente mit der Größe 7,15 kB bzw. 15 kB detektiert werden.

Von 200 getesteten Klonen erwiesen sich 23 nach einer Analyse mit der Rosa-Sonde als positiv. Davon wurden 13 mit der Neo-Sonde untersucht und acht Klone konnten bestätigt werden. Mit der EBNA1-Sonde konnten davon weitere vier als fehlerhaft ausgeschlossen werden, so dass am Ende vier mit allen Sonden positive Klone übrig blieben, bei denen die Expressionskassette korrekt in den Rosa26-Lokus eingebaut wurde. Nach der Southernblot-Analyse wurde der Klon Bruce4 EBNA1 stop F4 ausgewählt, um in den Zellen mit der Rekombinase Cre die Stopp-Kassette und die Neomycinresistenz zu deletieren.

### 4.2.3. Cre-vermittelte Deletion der Stopp-Kassette

In diesem Schritt wurde die im Rosa26-Lokus integrierte Stopp-Kassette durch die Cre-Rekombinase deletiert, um eine EBNA1-Expression in den genetisch veränderten ES-Zellen zu ermöglichen. Dazu wurden Bruce4 stop EBNA1 F4 Zellen mit einem Cre-Expressionsplasmid (pGK-Cre-bpA) transfiziert, Kolonien gepickt und diese anschließend auf Neomycinsensitivität untersucht. Von den sensitiven Klonen wurde die DNA isoliert und die Deletion im Southernblot überprüft.

Die theoretischen Überlegungen ergaben folgendes Bild. Durch die Deletion der Stopp-Kassette wird eine EcoRI-Schnittstelle entfernt. Das bei einem Restriktionsverdau entstehende Fragment, das sowohl mit der Rosa- als auch mit der EBNA1-Sonde detektiert werden kann, verkürzt sich dadurch auf 6,4 kB (vgl. Abb. 4.5). Die Analyse mit dem Restriktionsenzym EcoRV ergibt ein auf 4,8 kB Größe verkürztes Fragment, das nur noch mit der EBNA1-Sonde markiert werden kann. Zur Kontrolle kann mit der Neo-Sonde zusätzlich überprüft werden, ob die Resistenz und damit die Stopp-Kassette entfernt wurde. Bei einem solchen Southernblot sollten keine Banden zu sehen sein.



**Abb. 4.7: Southernblot von Bruce4 EBNA1 Zellen nach Deletion der Stopp-Kassette durch Cre-Rekombinase**

In der in den Rosa26-Lokus integrierten EBNA1-Expressionskassette befindet sich eine Stopp-Kassette, die eine Expression von EBNA1 verhindert. Durch Cre-Rekombinase kann die von loxP-Stellen flankierte Stopp-Kassette entfernt werden. Die undeletierte Stopp-Kassette kann in einem Southernblot (EcoRV-Verdau, EBNA1-Sonde) als 8,7 kB Bande sichtbar gemacht werden, während die deletierte Form nur eine 4,8 kB Bande aufweist (Pfeil). Neben einem Klon mit undeletiertem Stopp (D6) wurde in allen anderen abgebildeten Klonen die Stopp-Kassette erfolgreich deletiert.

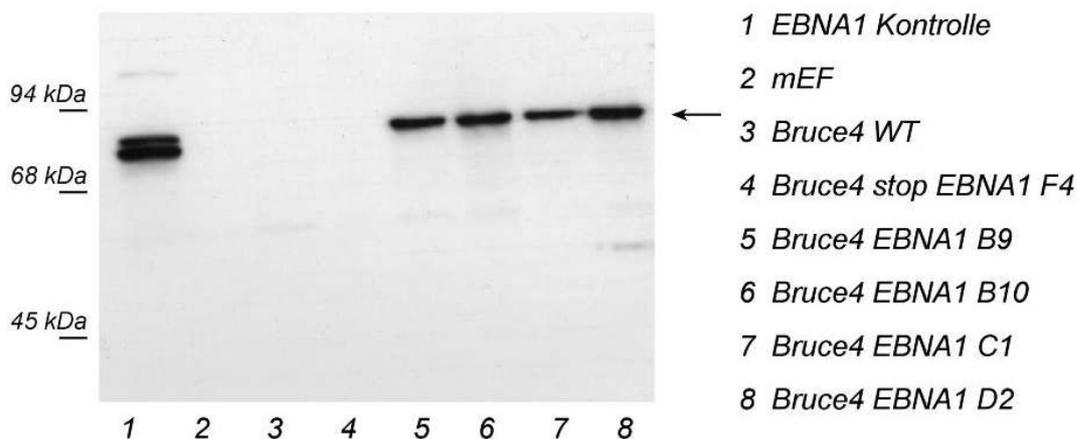
Im Experiment erwiesen sich von 100 gepickten Klonen 20 als Neomycin-sensitiv und wurden mit den drei Southernblot-Sonden genauer analysiert. Bei 17 Klonen war die Stopp-Kassette erfolgreich deletiert worden. In Abb. 4.7 ist ein Beispielblot der Analyse zu sehen, bei dem die DNA mit EcoRV verdaut und die Banden mit der EBNA1-Sonde markiert wurden. Man sieht neben acht deletierten Klonen auch einen Klon (Bruce4 EBNA1 D6), der immer noch die undeletierte Expressionskassette trägt.

#### 4.2.4. Überprüfung der Expression von EBNA1

Nach der Entfernung der Stopp-Kassette, die eine Transkription und Translation des EBNA1-Gens verhinderte, wurden die Zellen mit einer Westernblot-Analyse auf Expression des Gens überprüft.

Von den vier analysierten Klonen ohne Stopp-Kassette exprimierten alle EBNA1 (vgl. Abb. 4.8). Zur Kontrolle wurde der ursprüngliche ES-Zell-Klon Bruce4 stop EBNA1 F4 aufgetragen, um eine Fehlfunktion der Stopp-Kassette auszuschließen. Dieser Klon zeigte im Westernblot keine mit einem EBNA1-spezifischen Antikörper zu detektierende Bande. Das bedeutet, dass die Stopp-Kassette in den ES-Zellen eine Transkription und Translation des eingebrachten Gens unterbindet.

Für den nächsten Schritt, das Einbringen von EBV-Plasmiden in eine EBNA1-positive ES-Zell-Linie, wurde der Klon Bruce4 EBNA1 C1 gewählt.



**Abb. 4.8: EBNA1-Expression in Bruce4 EBNA1 ES-Zellen nach Deletion der Stopp-Kassette**

Bruce4 EBNA1-Zellen, in die eine EBNA1-Expressionskassette integriert wurde, zeigen im Westernblot eine Expression des Proteins (Pfeil). Weder Bruce4 WT, die Ursprungszell-Linie, noch Bruce4 stop EBNA1 F4, der Ausgangsklon für die Deletion der Stopp-Kassette, exprimieren das Protein. Auch mEF-Zellen, auf denen ES-Zellen kultiviert werden, sind im Westernblot negativ. Als Expressionskontrolle für EBNA1 wurde eine 293 EBNA1-Zell-Linie benutzt.

### 4.3. Generierung EBV-positiver ES-Zell-Linien

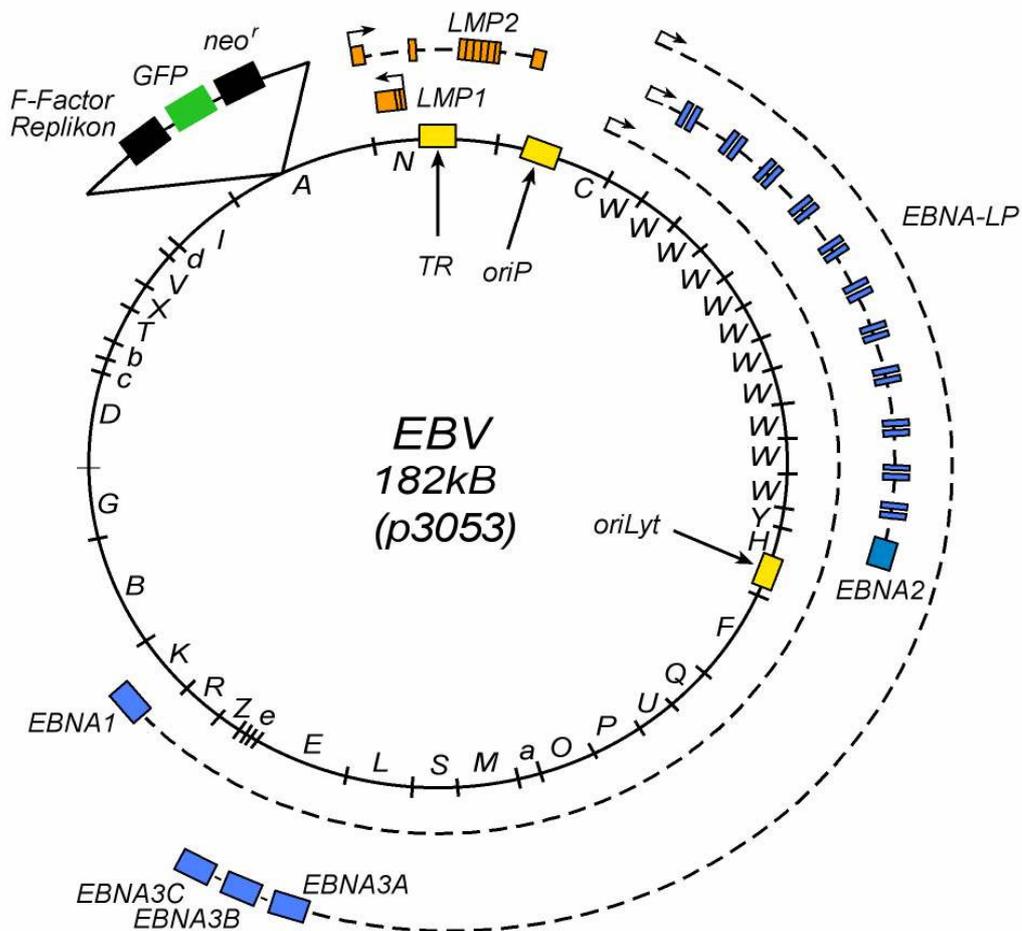
Das Ziel der Arbeit war es, EBV-tragende ES-Zell-Linien zu etablieren, die dann *in vitro* zu murinen B-Zellen differenziert werden sollten. Um dieses Ziel zu erreichen, wurde eine EBNA1-exprimierende ES-Zell-Linie mit verschiedenen EBV-Plasmiden transfiziert. Dabei handelte es sich um das Maxi-EBV-Plasmid p3053 und das Mini-EBV-Plasmid p3314. Das Maxi-EBV-Plasmid p3053 ist eine Wildtyp-Maxi-EBV-Version, die eine Neomycinresistenz-Kassette trägt (vgl. Abb. 4.9).

Als Kontrollplasmid zu p3053 habe ich auch das Maxi-EBV-Plasmid p3298 eingesetzt. Dieses Maxi-EBV-Plasmid wurde von Magdalena Zychlinska generiert und für meine Versuche dankenswerterweise zur Verfügung gestellt. Es trägt im Gegensatz zu p3053 eine 51 kB große Invertierung (vgl. Abb. 4.10), die alle latenten Gene (mit Ausnahme von EBER1 und EBER2) inaktiviert. Dabei wurden in die Genlozi von EBNA2 und LMP1 mutierte Cre-Rekombinase-Bindungsstellen (Lox66, Lox71) eingefügt und der von den LoxP-Motiven begrenzte Bereich invertiert.

Durch diese genetische Veränderung ist eine Expression von latenten EBV-Schlüsselgenen wie EBNA2 unterbunden, aber konditional revertierbar. Die Inversion unterbricht die transkriptionellen Einheiten von Promotor und kodierenden Sequenzen bzw. es findet eine Unterbrechung zweier Gene (EBNA2 und LMP1) innerhalb ihrer Introns statt. Durch eine Expression der Rekombinase Cre kann diese Situation wieder revertiert und damit aufgehoben werden.

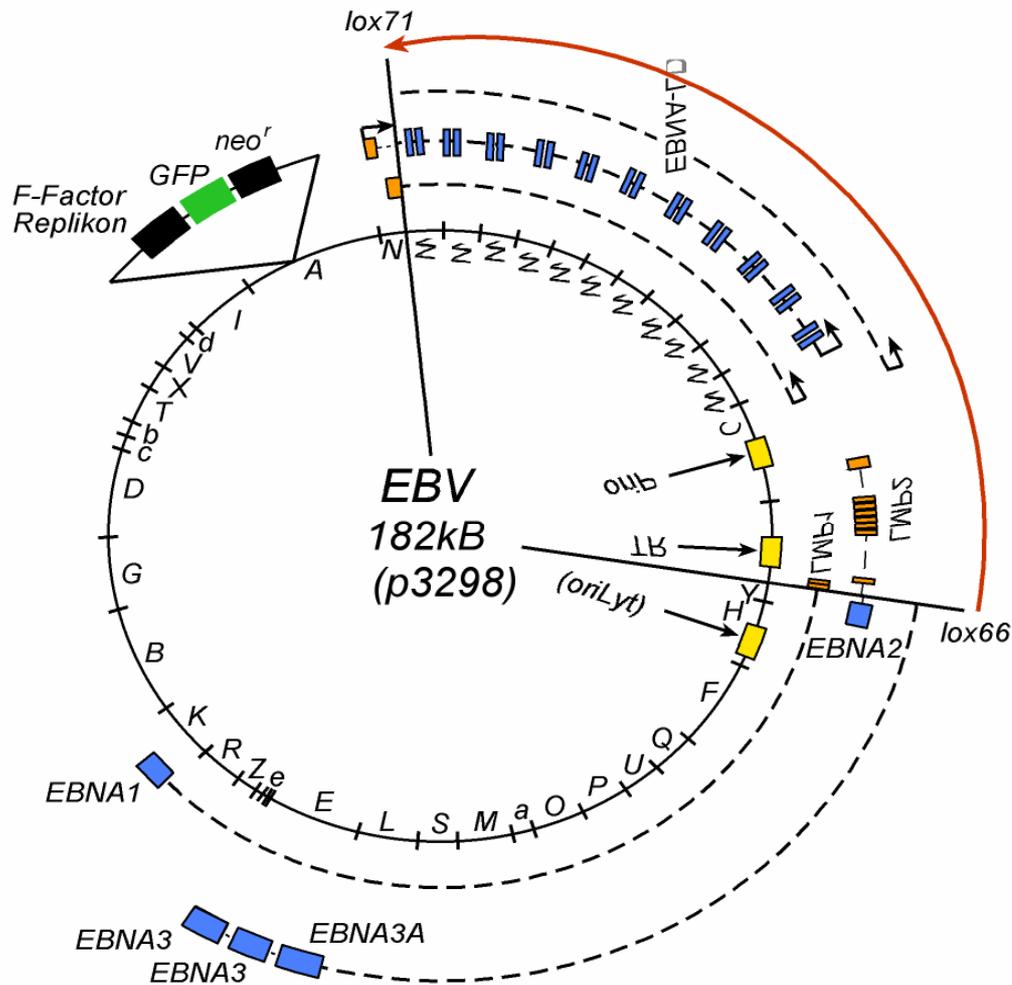
Dabei entstehen aus den beiden mutierten LoxP-Motiven eine Wildtyp-LoxP-Stelle und eine kombinierte Lox66/71-Stelle. Letztere ist aufgrund der eingefügten Mutationen kein Substrat mehr für das Enzym Cre. Dadurch arretiert die Sequenz des Maxi-EBV-Plasmids nach einer Revertierung wieder in der Wildtyp-Konformation. In der Sequenz bleiben nur zwei 43 bp lange LoxP-Motive in den Introns der beiden Genlozi zurück, die keinerlei Einfluss auf eine Genexpression des Virus haben. Beide Maxi-EBV-Plasmide tragen im prokaryotischen Rückgrat eine GFP-Expressions-kassette, durch die es möglich ist, Plasmid-tragende Zellen anhand ihrer GFP-Expression zu detektieren.

Zusätzlich zu den schon beschriebenen Veränderungen trägt das Plasmid eine weitere Mutation im lytischen Replikationsursprung oriLyt, die die Synthese von viraler DNA für die Virusproduktion unterbindet (Schepers et al., 1993). Dies war besonders in Hinblick auf eine geplante Integration des Plasmids in den HPRT-Lokus von murinen ES-Zellen und die Generierung einer transgenen Maus notwendig (Zychlinska, persönliche Kommunikation).



#### Abb. 4.9: Plasmidkarte des Maxi-EBV-Plasmids p3053

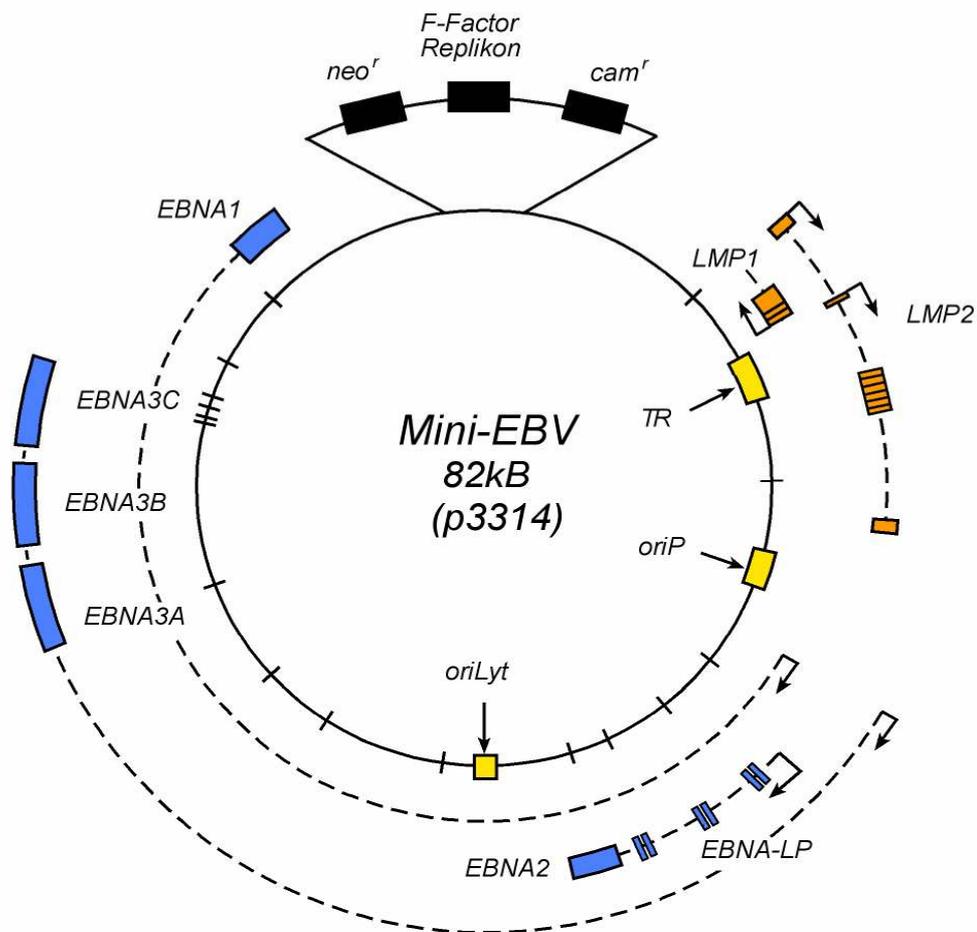
Das Maxi-EBV-Plasmid hat eine Größe von 182 kB. Im Inneren des Kreises bezeichnen einzelne Buchstaben die Fragmente, die durch einen Verdau mit dem Restriktionsenzym BamHI entstehen. Sie liegen der Namensgebung der EBV-Gene zugrunde. Zur besseren Übersicht sind auf der Plasmidkarte nur die latenten Gene von EBV eingetragen: LMP1 und LMP2 sind orange, EBNA1, EBNA2, EBNA3 und EBNA-LP blau gefärbt. Wegen der geringen Größe sind die Transkripte EBER1 und EBER2 nicht aufgeführt. Die gestrichelten Linien stellen die Primärtranskripte der Gene dar. Die Promotoren sind als Pfeile angegeben. Der Replikationsursprung der latenten Phase oriP und der der lytischen Phase oriLyt sind ebenso wie die „terminal repeats“ (TR) als gelbe Boxen dargestellt. Hervorgehoben wurde außerdem das prokaryotische Plasmid-Rückgrat. Es trägt neben einem F-Faktor-Replikon auch eine GFP-Expressionskassette sowie eine Neomycinresistenz. Eine ebenfalls auf dem Rückgrat liegende Chloramphenicolresistenz ist nicht dargestellt. Diese Elemente ermöglichen es, das Genom des Virus in Bakterien, z.B. *E.coli*, durch gängige Klonierungstechniken zu manipulieren. Durch die Neomycinresistenz kann auf das Vorhandensein des Plasmids in ES-Zellen selektioniert werden. Durch GFP-Expression können Plasmid-tragende Zellen detektiert werden.



#### Abb. 4.10: Plasmidkarte des Maxi-EBV-Plasmids p3298

Das Maxi-EBV-Plasmid p3298 hat im Gegensatz zu p2098 (Abb. 4.1) und p3053 (Abb. 4.9) eine 51kB große Inversion (roter Pfeil), die von zwei mutierten Cre-Rekombinase-Bindungsstellen flankiert ist (Lox66, Lox71). Durch diese Inversion kommt es zu einer Unterbrechung der latenten Genexpression, durch die Schlüsselgene wie EBNA-LP, EBNA2, LMP1, LMP2A oder die EBNA3 Familie betroffen sind. Durch eine weitere Mutation wurde der lytische Replikationsursprung *oriLyt* funktionslos gemacht, so dass eine Virusproduktion nicht mehr möglich ist. Die Annotierung der einzelnen genetischen Elemente und Gene entspricht der in Abb. 4.1 und Abb. 4.9.

Als drittes Konstrukt wurde in die ES-Zellen eine Mini-EBV-Version (p3314) eingebracht (vgl. Abb. 4.11). Auf dieser befinden sich, neben einer Zusammenstellung latenter EBV-Gene, auch ein prokaryotisches F-Plasmid, eine Chloramphenicolresistenz-Kassette ( $cam^r$ ) und das Neomycinresistenz-Gen ( $neo^r$ ). Ein Vorteil dieses Konstruktes ist es, dass die Rolle der latenten EBV-Gene gezielt untersucht werden kann, ohne dass es zu einer spontanen Aktivierung des lytischen Zykluses und einer Vielzahl von lytischen, viralen Genen kommen kann.



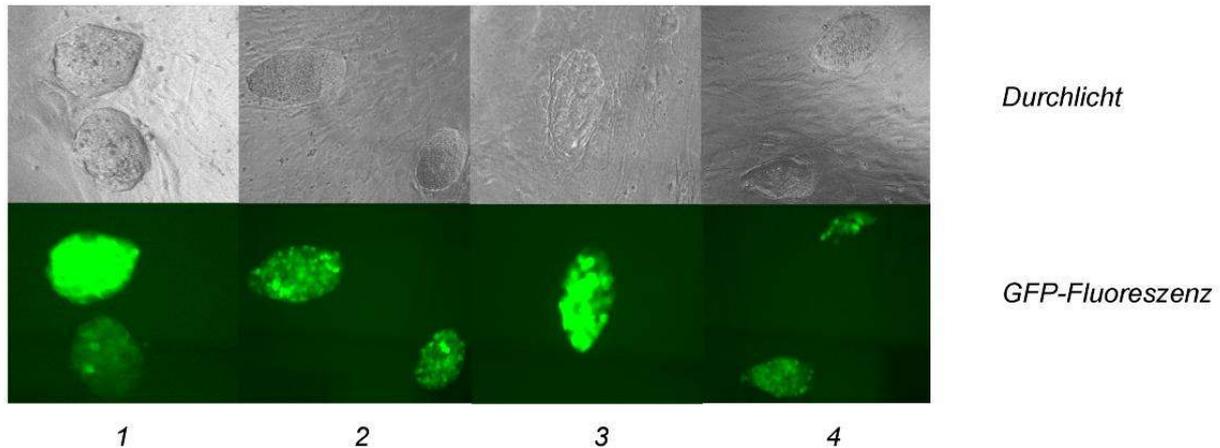
**Abb. 4.11: Plasmidkarte des Mini-EBV-Plasmids p3314**

Auf der Plasmidkarte sind nur die latenten Gene von EBV eingetragen: LMP1 und LMP2 sind orange, EBNA1, EBNA2, EBNA3 und EBNA-LP blau gefärbt. EBER1 und EBER2 sind wegen der geringen Größe nicht aufgeführt. Die gestrichelten Linien stellen die Gene als Primärtranskripte dar, und die Promotoren sind als Pfeile angegeben. Der Replikationsursprung der latenten Phase oriP und der der lytischen Phase oriLyt sind, ebenso wie die „terminal repeats“ (TR), gelb. Weitere Elemente wie das prokaryotische F-Faktor Rückgrat, die Chloramphenicolresistenz-Kassette ( $cam^r$ ) und die Neomycinresistenz-Kassette ( $neo^r$ ) sind ebenfalls angegeben. Durch diese Elemente ist nicht nur eine Manipulation des Plasmids in *E.coli* möglich, sondern es können auch ES-Zellen, die das Plasmid enthalten, mit G418 selektiert werden. Die Gesamtgröße des Plasmids beträgt 82 kB.

Im prokaryotischen Rückgrat des Plasmids ist keine GFP-Expressionskassette vorhanden, weshalb transfizierte Zellen nicht direkt identifiziert werden können.

Die EBNA1-exprimierende ES-Zell-Linie Bruce4-EBNA1-C1 wurde mit den drei Konstrukten transfiziert und 48 Stunden nach der Elektroporation mit G418 selektiert (vgl. Abschnitt 3.2.1). Die resistenten Kolonien, die das Mini-EBV-Plasmid p3314 trugen, wurden an Tag 7 der Selektion einzeln in 96-Loch Platten überführt. Bei den beiden Maxi-EBV-Konstrukten wurden jeweils zehn Kolonien in einem Loch vereint. Mit Hilfe des Fluoreszenz-Mikroskops

konnten bei Zellen, die ein GFP-tragendes Maxi-EBV-Plasmid enthalten, grüne Kolonien nachgewiesen werden (vgl. Abb. 4.12). Parallel wurde versucht, die drei Plasmide in Bruce4-Zellen ohne integriertes EBNA1 einzubringen. Trotz dreimaliger Wiederholung des Versuchs konnte ich keine G418-resistenten ES-Zell-Kolonien etablieren. Kolonien, die in Abwesenheit von G418 auswuchsen, waren alle ausnahmslos G418-sensitiv. Es gelang also bei keinem der Plasmide eine Zell-Linie in EBNA1-negativen ES-Zellen zu etablieren.

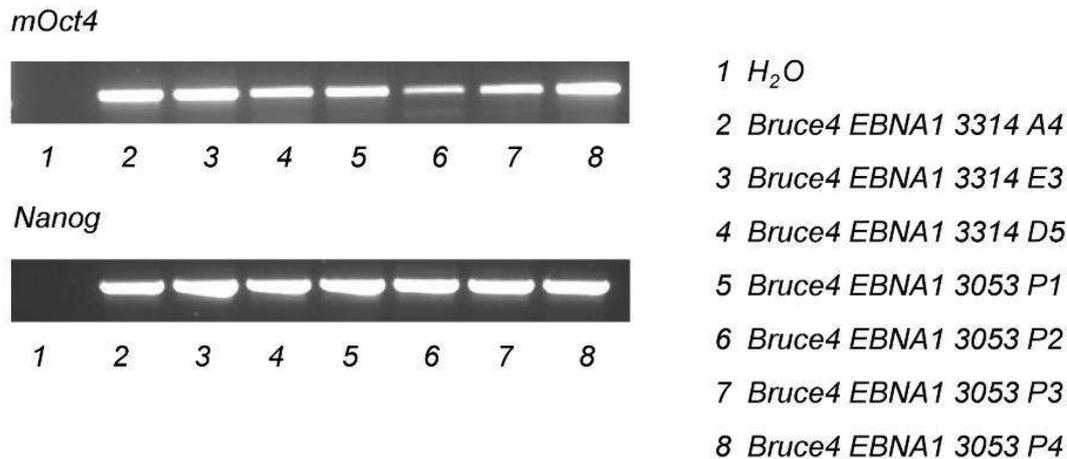


**Abb. 4.12: ES-Zellen, die das Maxi-EBV-Plasmid p3053 oder p3298 tragen, exprimieren GFP**

ES-Zell-Kolonien, die erfolgreich mit dem Maxi-EBV-Plasmid p3053 (1 und 2) oder mit p3298 (3 und 4) transfiziert wurden, exprimieren das GFP-Gen, das im prokaryotischen Rückgrat der Maxi-EBV-Plasmide lokalisiert ist (Abb.4.9 und 4.10)

ES-Zellen sind pluripotent, d. h. sie können in Zellen aller drei Keimblätter (Endoderm, Ekto-derm und Mesoderm) differenzieren (Boiani und Scholer, 2005). Zwei Marker für den undifferenzierten Zustand von murinen ES-Zellen sind die Gene *Nanog*, ein Homöobox-Gen, und *Oct4*, ein Transkriptionsfaktor (Boiani und Scholer, 2005). Beide Gene werden bei der Differenzierung von ES-Zellen nicht mehr exprimiert (Chambers et al., 2003, Boiani und Scholer, 2005).

Um zu überprüfen, ob die experimentellen Schritte in den ES-Zellen zu einem Verlust der Expression der beiden Gene geführt haben, wurde RNA aus den verschiedenen EBV-enthaltenden ES-Zell-Linien gewonnen, in cDNA umgeschrieben und durch RT-PCR untersucht. In allen getesteten Klonen bzw. Pools sind die beiden Gene exprimiert, was darauf hindeutet, dass die ES-Zellen ihren pluripotenten Status nicht eingebüßt haben (vgl. Abb. 4.13).



#### Abb. 4.13: Expression der Gene Nanog und mOct4 in EBV-tragenden ES-Zellen

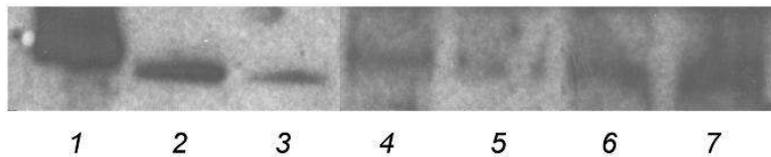
mOct4 und Nanog sind Marker für undifferenzierte, embryonale Stammzellen der Maus. Um zu zeigen, dass diese Gene auch nach wiederholter Elektroporation und Selektion der ES-Zellen noch exprimiert werden, wurde eine RT-PCR mit spezifischen Primern für diese Gene durchgeführt. Sowohl alle Mini-EBV-ES-Zell-Klone als auch die vier getesteten Maxi-EBV-ES-Zell-Klone waren für beide Gene positiv, d. h. die Zellen befinden sich noch in einem undifferenzierten Zustand, da die Gene bei der Differenzierung herunterreguliert werden. Die verwendeten Primer, PCR-Programme und die erwarteten Bandengrößen sind in Abschnitt 3.2.4 aufgeführt.

#### 4.3.1. Episomale Aufrechterhaltung der EBV-Plasmide

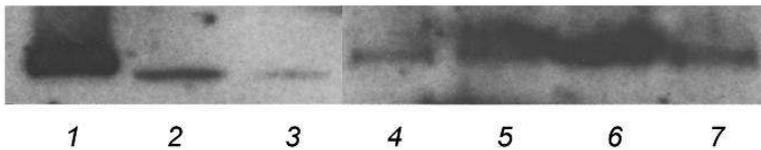
Ein wichtiger Punkt in der Untersuchung der etablierten ES-Zell-Linien ist der Nachweis der episomalen Aufrechterhaltung der Plasmide in den Zellen. Im Kontext der humanen Zellen wird das EBV-Plasmid als Episom aufrechterhalten und bei der Teilung an die Tochterzellen weitergegeben (Bornkamm und Hammerschmidt, 2001). Um zu überprüfen, ob in den murinen Zellen dieser Mechanismus ebenso funktioniert, wurden die Zellen mit Hilfe von Gardella-Gelen analysiert. Dabei werden die Zellen direkt im Gel lysiert. Das ermöglicht es, intakte Mini- bzw. Maxi-EBV-Konstrukte mit einer Größe von 82 kB bzw. 182 kB zu isolieren und mit Hilfe von radioaktiv markierten Sonden zu detektieren.

Bei einer eventuellen, chromosomalen Integration der EBV-Genome, konnten keine Signale detektiert werden, da die genomische DNA aufgrund ihrer Größe in den Taschen des Gels verbleibt. In diesen Versuchen wurden als Positivkontrolle Raji-Zellen benutzt, die 50 EBV-Genome pro Zelle extrachromosomal enthalten.

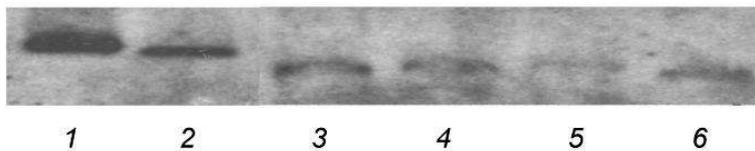
Bei allen drei Konstrukten konnten in den Gardella-Gelen Banden detektiert werden (vgl. Abb. 4.14), d.h. es liegen episomale EBV-Plasmide in den Zellen vor. Eine leichte Verschiebung in der Höhe der Banden im Gel wird durch die Zahl der erfolgreich lysierten Zellen bedingt, wie an den Raji-Kontrollen zu sehen ist, bei denen absteigende Zellzahlen pro Spur aufgetragen wurden.



- 1 Raji-Zellen  $5 \times 10^6$
- 2 Raji-Zellen  $1 \times 10^6$
- 3 Raji-Zellen  $3 \times 10^5$
- 4 Bruce4 EBNA1 3053 C5
- 5 Bruce4 EBNA1 3053 D4
- 6 Bruce4 EBNA1 3053 G5
- 7 Bruce4 EBNA1 3053 H5



- 1 Raji-Zellen  $5 \times 10^6$
- 2 Raji-Zellen  $1 \times 10^6$
- 3 Raji-Zellen  $3 \times 10^5$
- 4 Bruce4 EBNA1 3298 D9
- 5 Bruce4 EBNA1 3298 F7
- 6 Bruce4 EBNA1 3298 F8
- 7 Bruce4 EBNA1 3298 G7



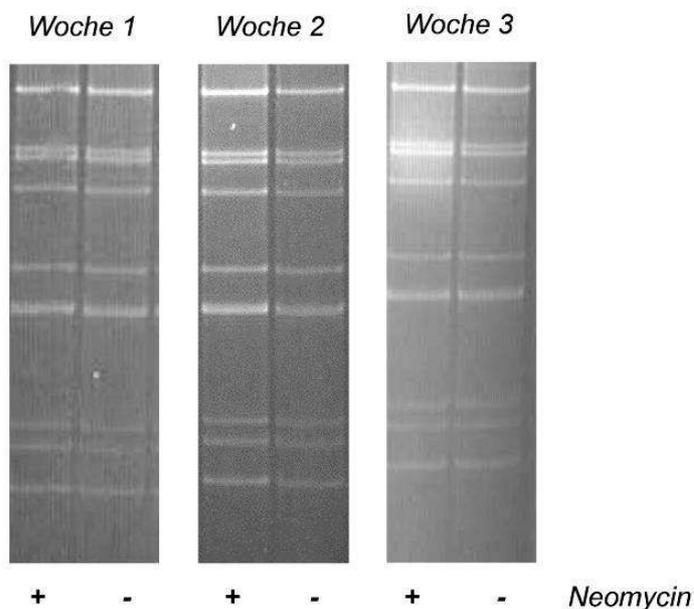
- 1 Raji-Zellen  $5 \times 10^6$
- 2 Raji-Zellen  $1 \times 10^6$
- 3 Bruce4 EBNA1 3314 D5
- 4 Bruce4 EBNA1 3314 D10
- 5 Bruce4 EBNA1 3314 E3
- 6 Bruce4 EBNA1 3314 F8

**Abb. 4.14: Gardella-Gele der ES Zellen, die das Maxi-EBV-Plasmid p3053 oder p3298 bzw. das Mini-EBV-Plasmid p3314 enthalten**

Das episomale Aufrechterhalten von Plasmiden in Zellen kann durch Gardella-Gele nachgewiesen werden, bei denen die Zellen direkt im Gel lysiert und die Plasmide mit spezifischen, radioaktiven Sonden detektiert werden können. Hier wurde das Mini-EBV-Plasmid p3314 als Sonde benutzt. Als Kontrolle wurden in allen Gelen Raji-Zellen eingesetzt. Getestet wurden jeweils vier Klone der ES-Zell-Linien Bruce4 EBNA1 3053 (Wildtyp-Maxi-EBV), Bruce4 EBNA1 3298 (invertiertes Maxi-EBV) und Bruce4 EBNA1 p3314 (Mini-EBV). Bei gleich großen Plasmiden kommt es durch die unterschiedliche Zahl erfolgreich lysierter Zellen zu leichten Verschiebungen in der Höhe der Banden im Gel. Dies ist gut bei den Raji-Kontrollen zu sehen, bei denen die gleichen Zellen in unterschiedlicher Zellzahl aufgetragen wurden.

Ein weiteres Verfahren, um die Aufrechterhaltung von Plasmiden in Zellen nachzuweisen, ist die so genannte „plasmid rescue“-Analyse, bei der Plasmid-DNA aus den Zellen isoliert, in *E.coli*-Bakterien überführt und dort durch Restriktionsverdau analysiert wird. Die Plasmide werden dadurch sozusagen aus den Zellen „gerettet“, daher der Name des Nachweises. Neben der episomalen Aufrechterhaltung kann mit diesem Verfahren auch noch untersucht werden, ob

es zu groben Veränderungen in der DNA-Sequenz der Plasmide gekommen ist (z. B. durch Deletion großer Fragmente) und ob die Plasmide auch ohne Selektionsdruck über viele Zellgenerationen stabil aufrechterhalten werden können. Wichtig wird dieser letzte Aspekt bei der geplanten Differenzierung zu murinen B-Zellen, da dabei die ES-Zellen ohne Selektion bis zu drei Wochen kultiviert werden. Würden die Plasmide in den sich schnell teilenden ES-Zellen während dieser Zeitspanne nicht ohne Selektion aufrechterhalten, könnte der Beitrag viraler Gene in differenzierten B-Zellen nicht untersucht werden.



**Abb. 4.15: „plasmid rescue“-Experiment mit der ES-Zell-Linie Bruce4 EBNA1 3314 D5, die mit oder ohne G418 drei Wochen lang kultiviert wurde**

Bei der „plasmid rescue“-Methode wird Plasmid-DNA aus eukaryotischen Zellen isoliert, in *E.coli*-Zellen überführt und diese auf das Vorhandensein des Plasmids selektioniert. Aus den daraus entstehenden Kolonien wird erneut Plasmid-DNA gewonnen und mit Hilfe von Restriktionsenzymen analysiert. Die Aufrechterhaltung des Plasmids kann so auch unter unterschiedlichen Selektionsbedingungen untersucht werden. Bruce4 EBNA1 3314 D5 Zellen wurden drei Wochen mit oder ohne G418 kultiviert und jede Woche Zellen analysiert. Dargestellt sind für jede Woche die Restriktionsanalysen zweier *E.coli*-Kolonien, deren Plasmid-DNA mit dem Enzym BamHI verdaut wurde. Jeweils eine der Kolonien stammt dabei von ES-Zellen ohne G418-Selektion, die andere von ES-Zellen, die mit G418 im Medium kultiviert wurden. Die Zahl der Bakterienkolonien war über den Zeitraum vergleichbar. Das Bandenmuster entspricht dem erwarteten Restriktionsfragmentmuster.

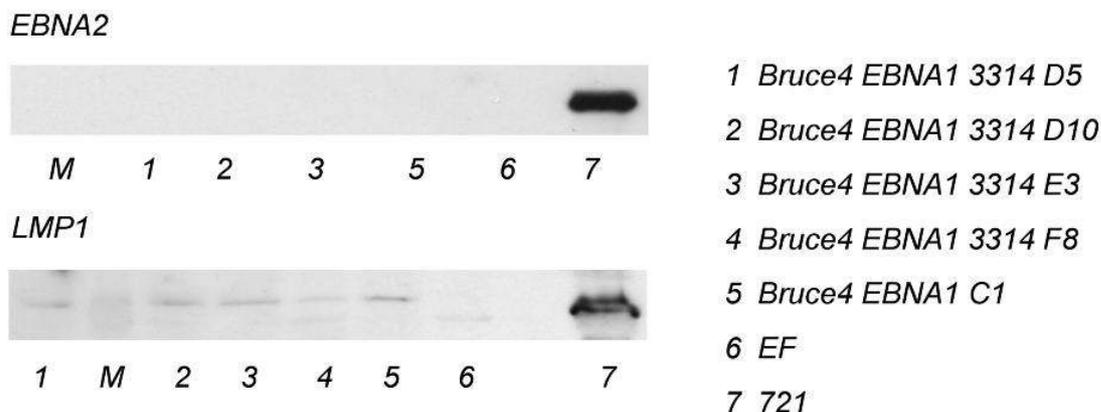
Die ES-Zellen wurden für diese Analyse drei Wochen mit oder ohne G418 im Medium kultiviert und jede Woche Zellen zu Analyse entnommen. Aus allen ES-Zell-Linien konnte DNA isoliert und durch Elektroporation in Bakterien (*E.coli*) überführt werden. Die Zahl der Bakterienkolonien war bei allen Klonen vergleichbar und jeweils 10 Kolonien wurden genauer untersucht. Die Restriktionsanalyse der aus *E.coli* isolierten Plasmid-DNA mit dem Enzym BamHI

ergab bei allen Klonen das erwartete Bandenmuster. In Abb. 4.15 ist für jeweils zwei analysierte Bakterienklone (mit/ohne G418) der Mini-EBV- enthaltenden Zellen die Restriktionsanalyse gezeigt. Diese Untersuchung zeigt, dass es nach einem Zeitraum von drei Wochen ohne Selektion immer noch möglich ist, EBV-Plasmide aus den ES-Zellen zu isolieren. Das Ergebnis bedeutet, dass die EBV-Plasmide in ES-Zellen auch während der Differenzierung ohne Selektion durch G418 zuverlässig episomal aufrechterhalten werden.

### 4.3.2. Expression von EBV-Genen

Nachdem stabile Zell-Linien etabliert waren und nachgewiesen wurde, dass EBV-Plasmide in An- und Abwesenheit von G418 in den murinen ES-Zellen aufrechterhalten werden konnten, stellte sich die Frage, ob EBV-Genen in murinen, undifferenzierten ES-Zellen von den viralen Promotoren exprimiert werden. Um diese Frage zu beantworten, wurde versucht, mit Westernblot die beiden Proteine EBNA2 und LMP1 nachzuweisen (vgl. Abb. 4.16).

Als Kontrollzellen wurden dabei 721-Zellen benutzt, eine Zell-Linie, die mit dem EBV-Prototyp B95.8-Virus transformiert wurde und beide Proteine exprimieren. Bei keinem der untersuchten Klone konnte die Expression von EBNA2 und LMP1 nachgewiesen werden (Abb. 4.16). Die Proteine scheinen in ES-Zellen nicht oder nur schwach exprimiert zu werden.

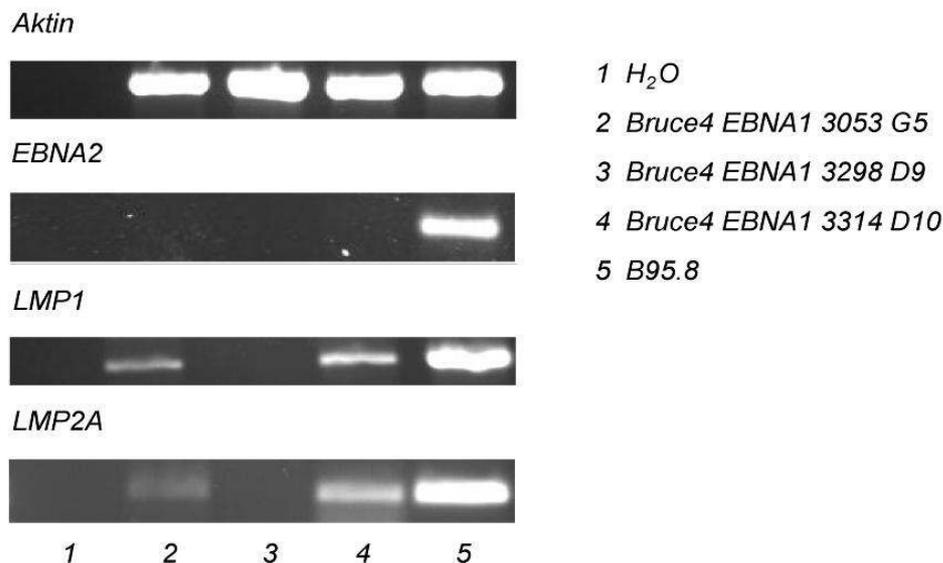


**Abb. 4.16: Westernblot-Analyse der EBV-enthaltenden ES-Zell-Linie Bruce4 EBNA1 3314**

Zum Nachweis der Expression der beiden EBV-Gene EBNA2 und LMP1 in Bruce4 EBNA1 3314 Klonen wurde eine Westernblot-Analyse durchgeführt. Zum Nachweis von EBNA2 wurde ein Gemisch der  $\alpha$ EBNA2-Antikörper R3 und 1E6 eingesetzt; LMP1 wurde durch den  $\alpha$ LMP1-Antikörper CS14 detektiert. Als Kontrolle diente die etablierte Zell-Linie 721, die beide Proteine exprimieren, sowie embryonale Feeder-Zellen (EF), auf denen die ES-Zellen kultiviert werden. Auch die Ausgangszell-Linie Bruce4 EBNA1 C1, die eine integrierte EBNA1-Expressionskassette trägt, wurde untersucht, die ebenfalls negativ war.

Da aber nicht auszuschließen war, dass die beiden Gene auf Grund einer unzureichenden Sensitivität der Westernblot-Analyse nicht nachgewiesen werden konnten, wurde mit der RT-PCR eine Methode getestet, die die mRNA beider Gene direkt und sensitiv detektieren kann. Dazu wird zelluläre RNA extrahiert und in cDNA umgeschrieben (vgl. Abschnitt 3.2.3).

Zur Kontrolle der reversen Transkription wurden mit allen cDNA-Proben RT-PCRs auf das Aktin-Gen durchgeführt (vgl. Abb. 4.17). Waren diese positiv, wurden die Proben auf die Expression der Gene EBNA2, LMP1 und LMP2A hin untersucht. Da die spezifischen Primer für diese Gene in Exons liegen und mindestens ein Intron überspannen, kann leicht zwischen kontaminierender, zellulärer DNA, die die RNA-Isolation verunreinigen kann, und cDNA unterschieden werden. Als Kontrolle für die Expression der EBV-Gene wurde die etablierte Zelllinie B95.8 gewählt.



**Abb. 4.17: Expression von EBV-Genen in den mit EBV stabil transfizierten ES-Zell-Linien**

Zum Nachweis der Expression der EBV-Gene EBNA2, LMP1 und LMP2A wurde eine RT-PCR-Analyse durchgeführt. Die verwendeten Primer, PCR-Programme und die erwarteten Bandengrößen sind in Abschnitt 3.2.4 aufgeführt. Die Auswahl der Oligonukleotide lässt eine Unterscheidung zwischen DNA und cDNA zu, so dass eine etwaige Verunreinigung der cDNA durch DNA nicht zu falsch positiven Ergebnissen führt. Als Kontrolle dienten B95.8-Zellen, die alle drei Gene exprimieren. Zum Test der cDNAs wurde eine RT-PCR mit Aktin-spezifischen Primern durchgeführt, die für alle aufgetragenen Zellen positiv war.

Eine Expression der Gene EBNA1, LMP1 und LMP2A entspricht dem Latenzprogramm II des Virus, wie es z.B. in Hodgkin-Lymphomen oder nasopharyngealen Karzinomen gefunden wird (Crawford et al., 2001). Da EBNA1 in den Rosa26-Lokus integriert wurde und unter Kontrolle des Rosa-Promotors steht, kann eine Transkription des Gens durch die viralen Promotoren

nicht untersucht werden. Allerdings gibt es Hinweise darauf, dass eine ausreichende Expression von EBNA1 ohne Integration einer Expressionskassette nicht stattfindet. So konnten ohne Einbau des für EBNA1 codierenden Exons in das Genom von ES-Zellen keine EBV-tragenden Klone gewonnen werden.

ES-Zellen, die das Maxi-EBV-Plasmid p3053 stabil trugen, zeigten keine Expression von EBNA2, dafür war eine Expression von LMP1 und LMP2A klar nachweisbar. Das gleiche Expressionsmuster zeigten ES-Zellen, die das Mini-EBV-Plasmid p3314 trugen. Wie erwartet gelang der Nachweis für alle drei analysierten Gene nicht mit RNA, die aus ES-Zellen mit dem invertierten Maxi-EBV-Plasmid p3298 stammte, da durch die Inversion eine Expression eben dieser Gene verhindert wird.

### **4.3.3. Untersuchung der ES-Zellen mit Realtime-PCR**

EBNA2 ist notwendig für die Transformation von humanen B-Zellen und wirkt als Koaktivator bei der Transkription von zellulären und viralen Genen (Bornkamm und Hammerschmidt, 2001). Da auch mit der RT-PCR keine Expression des EBNA2-Gens gefunden werden konnte, wurde mit einer sehr sensitiven PCR-Methode, der Realtime-PCR, versucht, die Nachweisgrenze noch weiter zu senken, um kleinste Mengen des EBNA2-Transkripts nachweisen zu können. Auch für diese Methode wurde RNA in cDNA umgeschrieben und geeignete Primer verwendet, so dass nur mRNA der Zellen detektiert wurde.

Zur Kontrolle dieses Prozesses wurden mit allen cDNA-Proben Realtime-PCRs für das Gen Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) durchgeführt (vgl. Tab. 4.1). GAPDH ist ein Enzym des Stoffwechselwegs Glykolyse und ein „Housekeeping“-Gen. Es wird ubiquitär exprimiert und häufig als endogene Kontrolle für Realtime-PCR eingesetzt (Bustin, 2000).

Waren diese Realtime-PCR-Läufe positiv, wurden die Proben auf eine Expression der Gene EBNA2, LMP1 und LMP2A hin untersucht. Auch hier ist es wie bei der konventionellen RT-PCR möglich, durch die geeignete Positionierung der Primer zelluläre DNA von cDNA zu unterscheiden, da bei zellulärer DNA sowohl Exons als auch Introns vorhanden sind. Das führt entweder zu einem längeren PCR-Produkt oder es entsteht kein Produkt, da die Länge des Amplifikates zu groß für eine effiziente PCR-Reaktion ist.

Darüber hinaus wurden zur Detektion von EBV-Plasmid-DNA geeignete Primer benutzt, um das Vorhandensein von DNA in der cDNA bestätigen. Als Kontrolle wurde die Zell-Linie B95.8 benutzt. Sie ist nicht nur positiv für EBV-DNA, sondern exprimiert auch alle latenten EBV-Transkripte.

	EBV	GAPDH	EBNA2	LMP1	LMP2A
Bruce4 EBNA1 3314 A4	+	+	-	+	+
Bruce4 EBNA1 3314 E3	+	+	-	+	+
Bruce4 EBNA1 3314 D5	+	+	-	+	+
Bruce4 EBNA1 3053 P1	+	+	-	+	+
Bruce4 EBNA1 3053 P2	+	+	-	+	+
Bruce4 EBNA1 3053 P3	+	+	-	+	+
Bruce4 EBNA1 3053 P4	+	+	-	+	+
B95.8	+	+	+	+	+

**Tab. 4.1: Zusammenfassung der Realtime-PCR-Auswertung**

Zum Nachweis der Expression der EBV-Gene EBNA2, LMP1 und LMP2A in Klonen der ES-Zell-Linien Bruce4 EBNA1 3314 und Bruce4 EBNA1 3053 wurde eine Realtime-PCR-Analyse durchgeführt. Die verwendeten Primer und „LightCycler“-PCR- Programme sind in Abschnitt 3.2.3 angegeben. Das Design der Primer ermöglicht es zudem, zwischen DNA, die die RNA-Präparation verunreinigen kann, und cDNA zu unterscheiden, so dass dies nicht zu falsch positiven Ergebnissen führt. Außerdem wurden spezielle Primer benutzt, die ein Vorhandensein von genomischer DNA (EBV) in den Proben nachweisen. Zum Test der cDNAs wurde ein RT-PCR-Lauf mit Primern spezifisch für das „House-keeping“-Gen Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) durchgeführt. Als Kontrolle der Expression diente die etablierte Zell-Linie B95.8. Ein positives Ergebnis ist durch ein + dargestellt, ein negatives durch ein -.

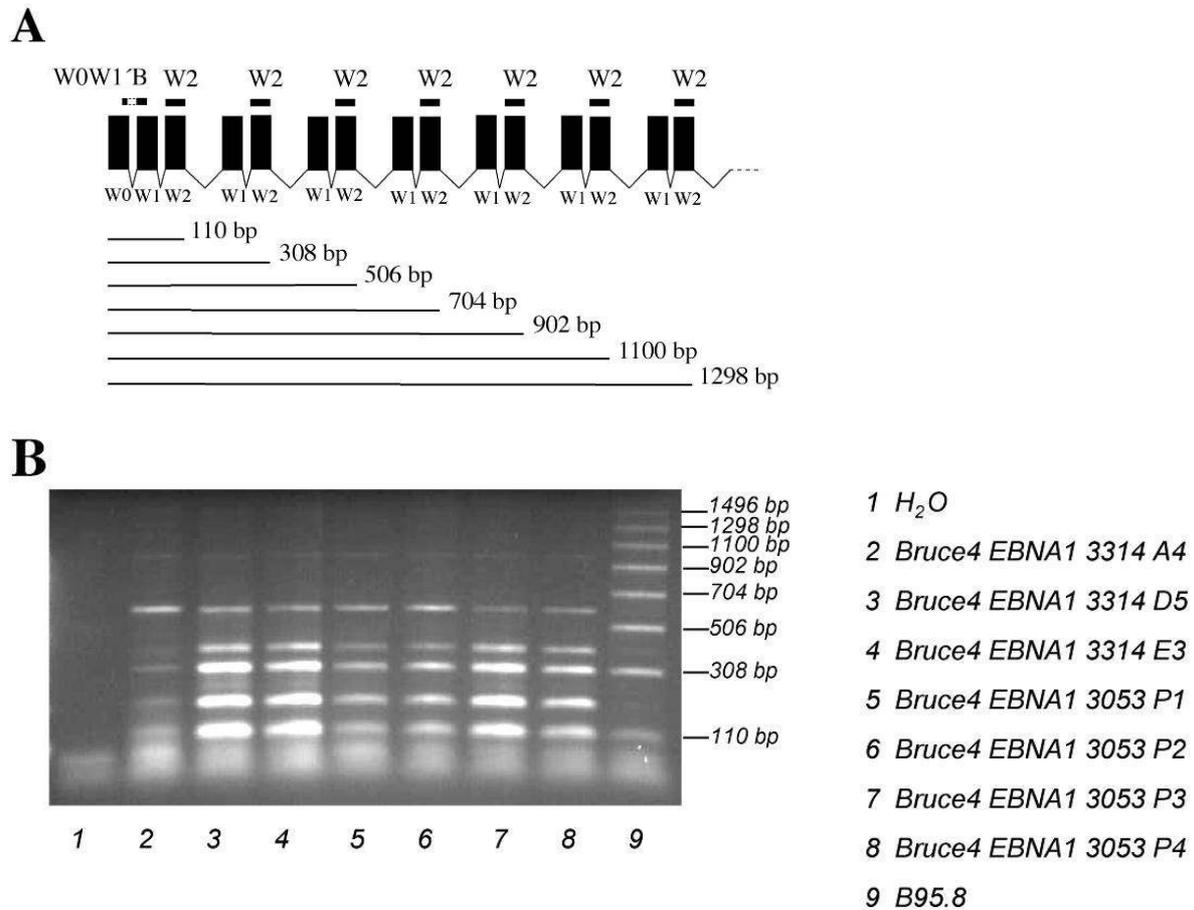
Die Zusammenfassung meiner Ergebnisse ergibt folgendes Bild: Mini-EBV-positive ES-Zell-Linien exprimierten die Gene LMP1 und LMP2A, aber eine Expression des EBNA2-Gens konnte auch hier nicht gezeigt werden. Das gleiche Bild zeigt sich in den ES-Zell-Linien, die das Maxi-EBV-Plasmid p3053 tragen. Alle untersuchten Zell-Linien exprimieren die beiden LMP-Gene, aber in keiner der Linien konnte EBNA2 nachgewiesen werden.

#### **4.3.4. Aktivität der EBV-Promotoren Cp und Wp**

Die Transkription der EBNA-Gene wird in Form langer Primärtranskripte von den Promotoren Cp bzw. Wp aus initiiert. Durch alternatives Spleißen und 3'-Prozessierung entstehen die mRNAs, die für die unterschiedlichen EBNA-Proteine kodieren (Kerr et al., 1992). Da keine EBNA2-Expression in den ES-Zellen detektierbar war, wollte ich die Aktivität der EBNA-spezifischen Promotoren in diesen Zellen untersuchen.

Zu diesem Zweck wurde eine RT-PCR-Analyse mit Primern durchgeführt, mit denen speziell promotorspezifische mRNAs nachgewiesen werden. Die Primer wurden aus einer Publikation von Schlager et al. (1996) übernommen. Die Upstream-Primer für die Amplifikation Wp- und Cp-initiiertes mRNAs binden dabei an Exons, die nur in den promotorspezifischen Transkripten enthalten sind. Im Falle der Wp-Transkripte liegt der Primer W0W1' B am Übergang des W0-Exon zum W1-Exon (Abb. 4.18 A). Bei den Cp-Transkripten befindet sich die Primerbindungsstelle des Primers C1 im C1-Exon (Abb. 4.19 A). Der Downstream-Primer W2 ist in beiden Fällen der gleiche und bindet im W2-Exon der „Major Internal Repeats“ (Abb. 4.18 A und 4.19 A). Das dabei entstehende Bandenmuster weist eine Leiter von Banden im Agarosegel auf, deren Größe in Abhängigkeit des benutzten W2-Exons variiert, an die der Downstream-Primer W2 gebunden hat.

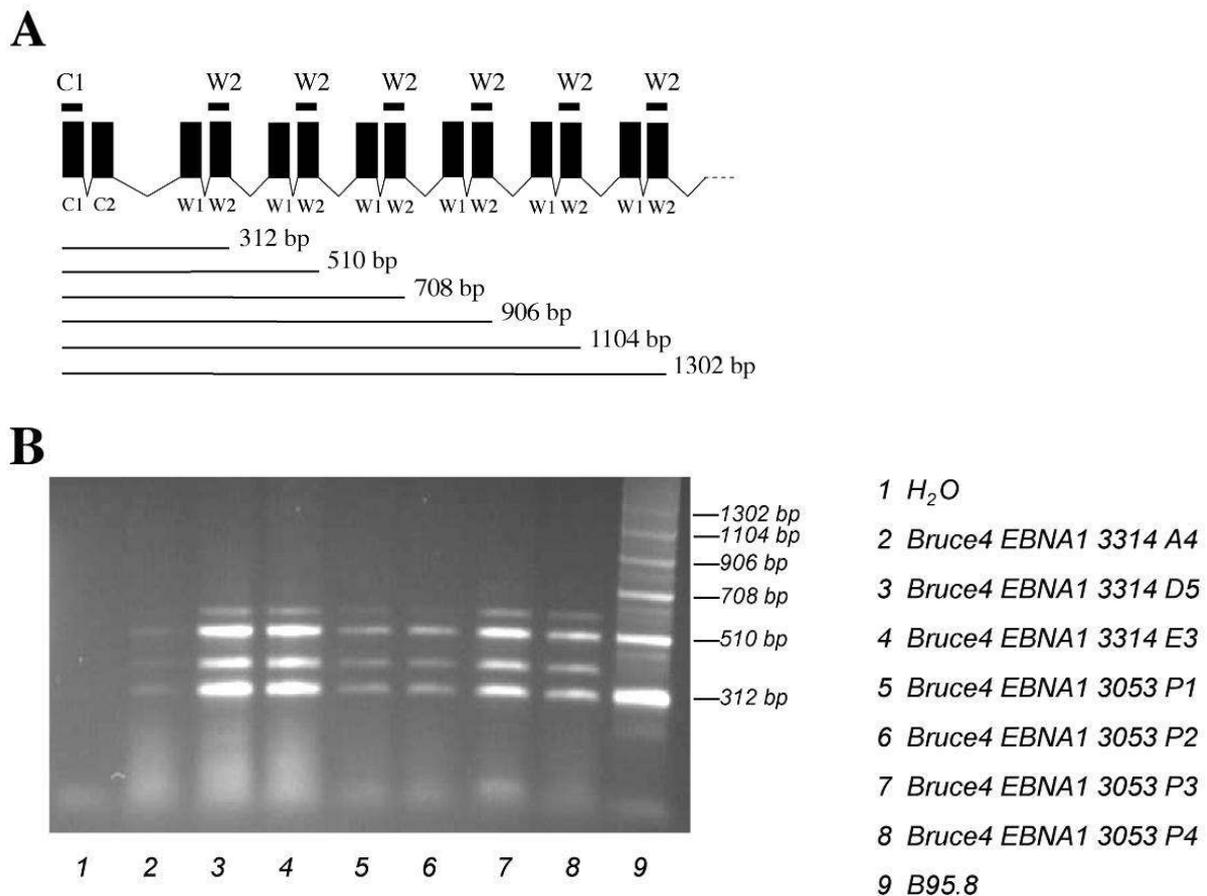
Die etablierte Zell-Linie B95.8 wurde als Kontrolle für die typische Promotorenaktivität in Zell-Linien mit dem Latenztyp III benutzt und zeigt bei beiden Promotor-spezifischen RT-PCRs das erwartete Bandenmuster (vgl. Abb. 4.18 B und Abb. 4.19 B). ES-Zell-Klone mit dem Maxi-EBV-Plasmid p3053 zeigten bei beiden RT-PCRs nur die kleinsten erwarteten Banden (312 bp, 510 bp bei Cp und 110 bp, 308 bp bei Wp), größere vorhergesagte Banden fehlen. Zusätzlich sind weitere Banden zu sehen, die nicht dem Bandenmuster von B95.8 zugeordnet werden können (vgl. Abb. 4.18 B und Abb. 4.19 B). Bei Klonen mit dem Mini-EBV-Plasmid p3314 waren nur die Banden der Größe 110 bp bzw. 308 bp bei der Wp-RT-PCR und 312 bp bzw. 510 bp bei Cp-RT-PCR zu erwarten, da dieses Konstrukt im Gegensatz zu Maxi-EBV-Plasmiden nur zwei W-Repeats enthält. Auch hier sind neben den erwarteten Banden weitere, zum Teil größere Banden vorhanden.



**Abb. 4.18: Nachweis der Aktivität des Wp Promotors mit RT-PCR in den mit EBV-transfizierten ES-Zell-Linien**

**A** Schematische Darstellung des von dem Promotor Wp aus initiierten Primärtranskripts. Angegeben ist das erste Exon W0, sowie sieben der über 10 W-Repeats, die aus den Exons W1 und W2 bestehen (große schwarze Boxen). Die kleinen, schwarzen Vierecke über den Exons geben die Bindungsstellen des Upstream-Primers W0W1'B und des Downstream-Primers W2 an. W0W1'B bindet dabei im hinteren Bereich des Exons W0 und im vorderen Bereich des Exons W1 und beinhaltet nicht die dazwischen liegende DNA-Sequenz. W2 besitzt mehrere Bindungsstellen. Die darunter liegenden Striche stellen die bei der RT-PCR amplifizierte Banden schematisch dar, die den erwarteten Produkten entsprechen. Die Größe der Fragmente in bp wird ebenfalls genannt. **B** Gelbild der RT-PCR mit für Wp-spezifischen Primern. Untersucht wurden Klone der ES-Zell-Linien Bruce4 EBNA1 3314 und Bruce4 EBNA1 3053. Als Kontrolle wurden B95.8 Zellen verwendet. Am Rand des Gelbildes sind die vorhergesagten Größen der bei B95.8 entstandenen Fragmente in bp aufgeführt.

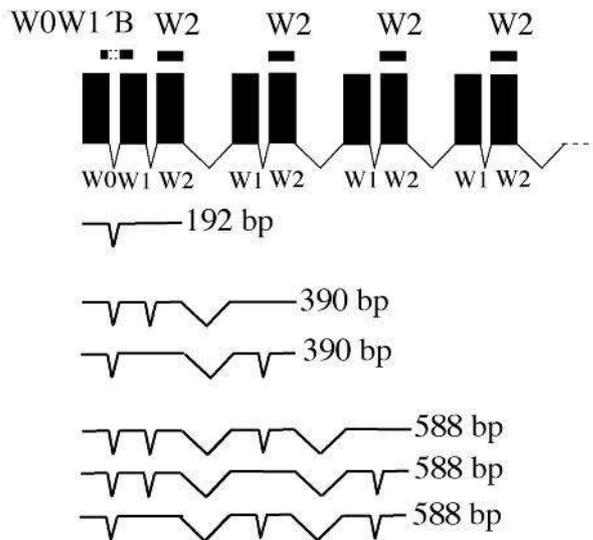
Da die zusätzlichen Banden nicht durch eine Optimierung des RT-PCR-Protokolls reduziert werden konnten, wurde angenommen, dass es sich um eine spezifische Primerbindung handelt und zusätzliche, unerwartete Transkripte in den Zellen vorliegen. Um diese Theorie zu überprüfen, wurden die Banden aus dem Agarosegel isoliert und sequenziert. Bei der Analyse der Sequenzen zeigte sich, dass neben zwei korrekt gespleißten Fragmenten zusätzliche Fragmente vorhanden waren, bei denen das Spleißen nicht erfolgreich durchgeführt worden war. Sie beinhalteten z. B. das Intron zwischen den Exons W1 und W2, das normalerweise nicht in der



**Abb. 4.19: Nachweis der Aktivität des Cp Promotors mit RT-PCR in den mit EBV-transfizierten ES-Zell-Linien**

**A** Schematische Darstellung des von dem Promotor Cp aus initiierten Primärtranskripts. Angegeben sind die beiden Exons C1 und C2, sowie sechs der insgesamt 11 W-Repeats, die aus den Exons W1 und W2 bestehen (große schwarze Boxen). Die kleinen, schwarzen Vierecke über den Exons geben die Bindungsstellen des Upstream-Primers C1 und des Downstream-Primers W2 an, wobei W2 mehrere redundante Bindungsstellen in den einzelnen Repeats besitzt. Die darunter liegenden Striche stellen die bei der RT-PCR amplifizierte Banden dar. Die Größe der Fragmente in bp wird ebenfalls genannt. **B** Gelbild der RT-PCR mit für Cp-spezifischen Primern. Untersucht wurden Klone der ES-Zell-Linien Bruce4 EBNA1 3314 und Bruce4 EBNA1 3053. Als Kontrolle wurden B95.8 Zellen verwendet. Am Rand des Gelbildes sind die vorhergesagten Größen der bei B95.8 entstandenen Fragmente in bp aufgeführt.

mRNA vorkommt. In Abb. 4.20 ist eine Zusammenstellung möglicher, nicht oder falsch gespleißter Transkripte für den Wp-Promotor zu sehen, die mit dem Primerpaar W0W1 B/W2 amplifiziert werden könnten. Da nicht alle der zu erwarteten Banden in den Maxi-EBV-Klonen vorhanden waren und zusätzlich nicht korrekt gespleißte Fragmente sowohl in den Maxi- als auch in den Mini-EBV-Klonen auftraten, lag die Vermutung nahe, dass es in murinen ES-Zellen zu Problemen bei der Transkription der EBNA-Gene bzw. der Prozessierung der mRNA kommt, die die Expression von EBNA2 und vermutlich auch der anderen Gene der EBNA-Familie, darunter EBNA1, unterbindet.



**Abb. 4.20: Schematische Darstellung der Sequenzanalyse der amplifizierten Wp-RT-PCR-Banden**

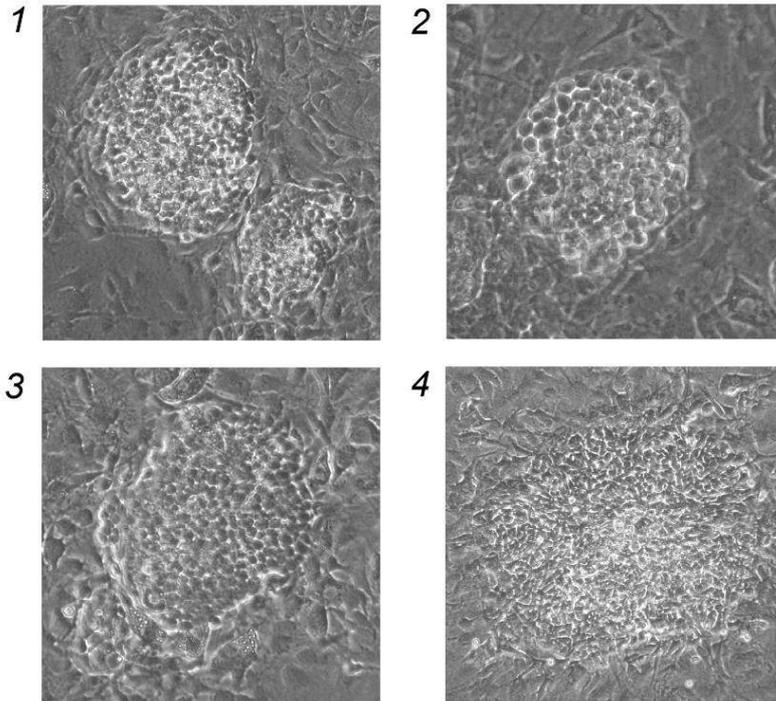
Die PCR-Banden, die bei der Untersuchung der Wp-Promotor-Aktivität der EBV-enthaltenden ES-Zell-Linien entstanden, wurden aus dem Agarose-Gel isoliert und sequenziert. Bei der Analyse der Sequenzen zeigte sich, dass neben zwei korrekt gespleißten Fragmenten der Größe 110 bp bzw. 308 bp (nicht gezeigt), zusätzliche Fragmente vorhanden waren, bei denen das Spleißen nicht vollständig durchgeführt worden war. Dargestellt ist ein Teil der möglichen nicht oder falsch gespleißten Transkripte, die mit dem Primerpaar W0W1 'B bzw. W2 amplifiziert werden können, sowie die Größe der Fragmente in bp.

#### 4.4. *In vitro* Differenzierung der EBV-tragenden ES-Zellen

Eine herausragende Eigenschaft von ES-Zellen ist es, dass sie in Zellen aller drei Keimblätter (Endoderm, Ektoderm und Mesoderm) differenzieren können, also pluripotent sind (Boiani und Scholer, 2005). Diese Eigenschaft ermöglicht es, sie auch in Kultur unter bestimmten Bedingungen gezielt zu verschiedenen Zelltypen und Geweben zu differenzieren (Wobus und Boheler, 2005).

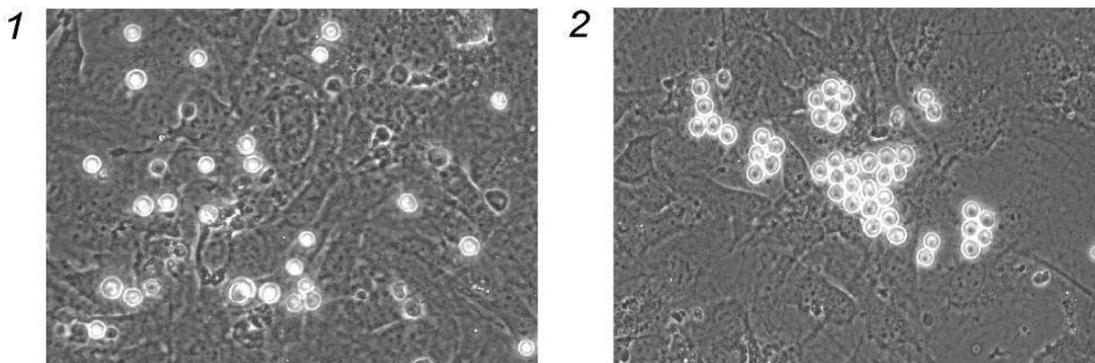
Ziel dieser Arbeit war es, etablierte, EBV-tragende ES-Zell-Linien *in vitro* zu B-Zellen zu differenzieren, da das Virus in verschiedenen Differenzierungsstadien dieser Zellen im Menschen latent vorliegt und dadurch die Möglichkeit zu haben, die Wirkung von EBV-Genen auf den Phänotyp muriner B-Zellen zu untersuchen.

Dazu wurden die murinen ES-Zellen mit einem leicht veränderten Protokoll von Cho et al. 1999 differenziert (siehe Abschnitt 3.2.1). ES-Zellen wurden an Tag 0 der Differenzierung ohne die Zugabe von LIF auf eine mit OP9-Zellen beschichtete Zellkulturplatte ausgebracht. Im Laufe der nächsten fünf Tage begannen die Zellen zu differenzieren, und die ES-Zell-Kolonien brachen in Einzelzellen auf (vgl. Abb. 4.21).



**Abb. 4.21: Durch die beginnende Differenzierung zerfallen die ES-Zell-Kolonien in Einzelzellen**

Bei der *in vitro* Differenzierung zu B-Zellen werden die ES-Zellen ohne die Zugabe von LIF auf einer Zellschicht aus OP9-Zellen kultiviert. Dabei brechen die normalerweise glatten und von einem deutlichen Rand begrenzten Kolonien auf und zerfallen in Einzelzellen. Gezeigt werden vier verschiedene Kolonien (Bilder 1 – 4) von EB5-ES-Zellen, bei denen deutlich die Koloniestruktur verändert ist und die am Rand teilweise fast nahtlos in die OP9-Zellschicht übergehen.

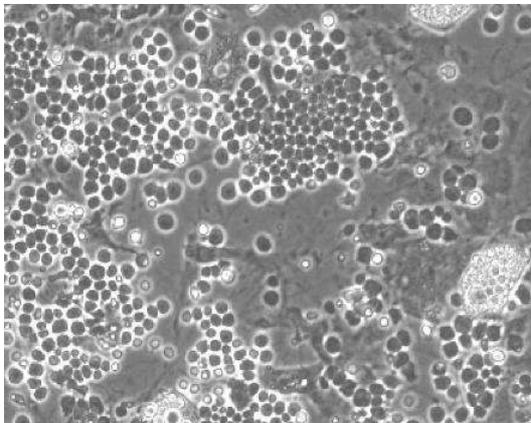


**Abb. 4.22: An Tag 8 der Differenzierung befinden sich die Vorläuferzellen im Überstand**

Zwischen Tag 5 und Tag 8 der Differenzierung wird dem Medium FLT3L zugegeben. Dieses Zytokin stimuliert in Wechselwirkung mit anderen hämatopoetischen Zytokinen die Proliferation der Zellen und die Differenzierung von frühen hämatopoetischen Vorläuferzellen. Diese befinden sich an Tag 8 in Form kleiner runder, manchmal traubenartig zusammenhängender Zellen im Überstand des Differenzierungsansatzes und können so auf eine neue OP9-Zellschicht überführt werden. Hier sind zwei Beispiele solche Vorläufer in einer Differenzierung von EB5-Zellen gezeigt (Bild 1 und 2).

An Tag 5 der Differenzierung wurden die Zellen trypsiniert, auf eine neue OP9-Zellschicht überführt und mit FLT3L-haltigem Medium für drei Tage kultiviert. Zu diesem Zeitpunkt befinden sich kleine Trauben runder, glatter Zellen mit hämatopoetischem Potential im Überstand und können erneut auf eine frische OP9-Zellschicht überführt werden (vgl. Abb. 4.22).

Die Vorläuferzellen wandern dann unter die Zellschicht und bilden so genannte „cobblestones“ aus (engl. für Kopfsteinpflaster). Die Bezeichnung beschreibt das Aussehen der Zellen unter der Zellschicht, wo man sie als dunkle, eng beieinander liegende, runde bis leicht eckige Zellen erkennen kann. Aus diesen Zellen entwickeln sich dann unreifen B-Zellen, die sich im Überstand der Kultur finden und zu reifen B-Zellen weiterentwickeln.



**Abb. 4.23: Die Bildung von „cobblestones“ ist die Voraussetzung für eine B-Zelldifferenzierung *in vitro***

Hämatopoetische Vorläufer-Zellen, die auf eine OP9-Zellschicht überführt werden, unterwandern die Zellschicht und bilden dort als „cobblestones“ bezeichnete Strukturen. Diese kann man als dunkle, eng beieinander liegende, runde bis eckige Zellen erkennen. Aus den „cobblestones“ entwickeln sich im Laufe der folgenden Tage unreife B-Zellen, die in den Überstand der Differenzierungsansätze wandern. Die hier gezeigten „cobblestones“ entstanden bei einer Differenzierung von Bruce4 EBNA1 3314 A4 Zellen.

Die etablierten ES-Zell-Linien, die ein Mini- bzw. Maxi-EBV-Plasmid tragen, wurden nach dem beschriebenen Protokoll differenziert. Als Kontrolle dienten die Zell-Linien EB5 und Bruce4 EBNA1 C1. EB5-Zellen wurden schon mehrfach erfolgreich *in vitro* zu reifen B-Zellen differenziert (C. Hömig, persönliches Gespräch) und dienten zur Kontrolle des Differenzierungsprotokolls. Die Zell-Linie Bruce4 EBNA1 C1 ist die Ausgangzell-Linie, die mit den drei verschiedenen EBV-Plasmiden transfiziert wurde.

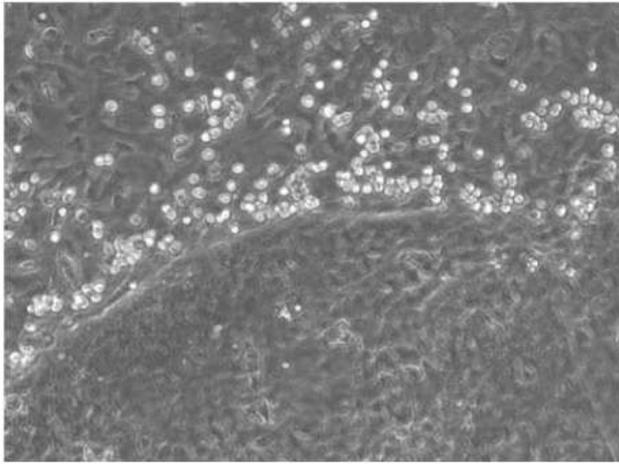
Zuerst wurde getestet, ob sich die Integration und Expression von EBNA1 auf die Differenzierung auswirkt und zu Veränderungen führt. Mit den Zell-Linien EB5 und Bruce4 EBNA1 C1 wurden parallel Differenzierungen durchgeführt. Beide Zell-Linien bildeten „cobblestones“ aus

und die an Tag 21 im Überstand schwimmenden Zellen konnten mit Hilfe des FACS-Gerätes analysiert werden (vgl. Kapitel 4.4.1). Ein Unterschied in der Differenzierung zwischen den beiden Zell-Linien konnte nicht ausgemacht werden.

Danach wurden drei ES-Zell-Klone, die stabil mit dem Mini-EBV-Plasmid (Bruce4 EBNA1 3314 A4, E3 und D5) transfiziert worden waren, *in vitro* zu B-Zellen differenziert. Nur bei dem Klon A4 war die Differenzierung mehrmals erfolgreich. Zwar bildeten sich in einigen Fällen bei den anderen beiden Klonen teilweise kleine Bereiche mit „cobblestones“, aber es wurden keine B-Zellen im Überstand gefunden (Daten nicht gezeigt). Auch von den vier untersuchten Maxi-EBV-Pools (Bruce4 EBNA1 3053 P1-4) konnte nur Pool P1 erfolgreich zu reifen B-Zellen differenziert werden. Ein Einfluss der EBV-Plasmide auf den zeitlichen Ablauf oder die phänotypische Ausprägung der Differenzierung konnte nicht festgestellt werden.

Generell ist zu der *in vitro* B-Zell-Differenzierung anzumerken, dass nicht jeder ES-Zell-Klon die Fähigkeit hat, zu B-Zellen zu differenzieren. Nur etwa zwei aus zehn Klonen können erfolgreich differenziert werden, wobei die Ursachen für diese Unterschiede nicht bekannt sind (T. Schröder, persönliche Mitteilung). Zusätzlich ist die Differenzierung von vielen Parametern abhängig, die nur bedingt bekannt sind und beeinflusst werden können. Dies führt zu einer unzulänglichen Reproduzierbarkeit. Auch die Zahl der an Tag 21 im Überstand der Ansätze befindlichen Zellen schwankte sehr, und teilweise konnten nicht genug Zellen für eine FACS-Analyse erhalten werden.

Des Weiteren kommt es im Laufe der Differenzierung zur Ausbildung anderer, z. B. mesodermaler Gewebe, die die Bildung von „cobblestones“ beeinflussen. In Abb. 4.24 ist im unteren Bereich der Abbildung mesodermales Gewebe zu sehen, das durch starke Proliferation die Zellschicht aus OP9-Zellen zurückdrängt und mit ihr „cobblestones“ und die lose adhärennten frühen B-Zellen (hier helle, runde Zellen). Zwar sollten mit dem Überführen der im Überstand befindlichen Zellen an Tag 8 der Differenzierung mesodermales Gewebe und undifferenzierte ES-Zell-Kolonien abgetrennt werden, aber es ist nicht immer zu verhindern, dass Teile dieser Gewebe mit in die neue Zellkulturschale transferiert werden und dort durch ihre starke Proliferation große Bereiche einnehmen. Dies wirkt sich insbesondere während der frühen Phase der „cobblestone“-Bildung, bei der sich die Vorläuferzellen unter der OP9-Zellschicht einnisten und dessen Unterstützung benötigen, negativ auf die B-Zell-Entwicklung aus.



**Abb. 4.24: Die bei der Differenzierung entstehenden mesodermalen Gewebe beeinflussen die B-Zell-Entwicklung**

Bei der *in vitro* Differenzierung zu murinen B-Zellen entstehen nicht nur die gewünschten Zelltypen, sondern es entwickeln sich auch eine ganze Reihe anderer, z. B. mesodermaler Gewebe. Diese Gewebe sollten an Tag 8 der Differenzierung, an dem die frühen hämatopoetischen Vorläuferzellen in eine neue Zellkultur-Schale überführt werden, zurück bleiben. Das gelang aber in den meisten Fällen nicht vollständig. Da diese unerwünschten Zellen oftmals stark proliferieren, nehmen sie bald große Bereiche der Kulturfläche ein und drängen die OP9-Zellschicht zurück. Dies beeinflusst die Bildung von „cobblestones“ und damit die Entwicklung von B-Zellen. Besonders während der frühen Phase der „cobblestone“-Bildung, bei der sich die hämatopoetischen Vorläuferzellen unter der OP9-Zellschicht einnisten, reagieren die Vorläufer-Zellen sensitiv. In dem gezeigten Beispiel, eine Differenzierung von EB5-Zellen, drängt mesodermales Gewebe am unteren Bildrand die OP9-Zellschicht und mit ihr die lose adhärenierten frühen B-Zellen (hier helle, runde Zellen) zurück.

#### 4.4.1 FACS-Analysen der *in vitro* differenzierten Zellen

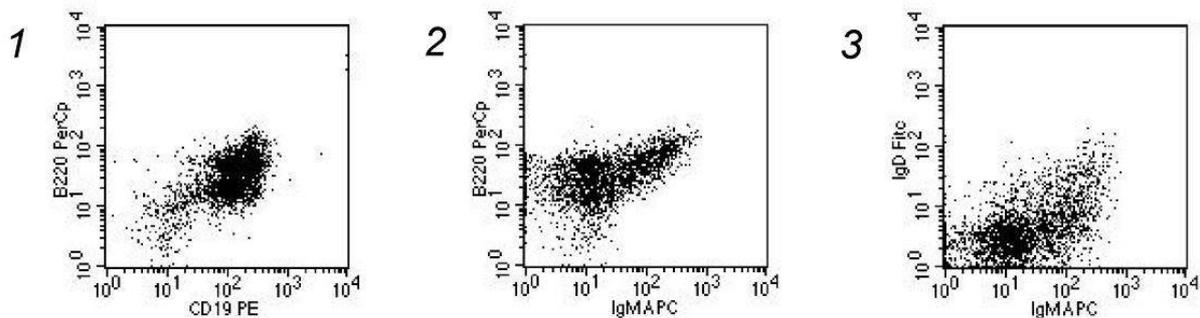
Die Überstände der Differenzierungsansätze wurden mit Hilfe des FACS-Gerätes an Tag 21 analysiert. Dazu wurden die Zellen mit verschiedenen Antikörpern gefärbt, die Oberflächenproteine erkennen, die für murine B-Zellen der unterschiedlichen Stadien charakteristisch sind.

B-Zellen entwickeln sich im Knochenmark aus hämatopoetischen Stammzellen, die zunächst zu frühen Pro-B-Zellen differenzieren. Frühe Pro-B-Zellen können durch die Markerkombination  $B220^+CD19^-$  charakterisiert werden. Der Übergang zu späten Pro-B-Zellen ist durch die Expression von CD19 gekennzeichnet. Diese beiden Marker sind auch auf allen weiteren Stadien der B-Zellen zu finden. Das Vorhandensein eines funktionalen B-Zell-Rezeptors zeigt den Übergang von kleinen Pre-B-Zellen zu unreifen B-Zellen, die deswegen mit einem IgM-spezifischen Antikörper gefärbt werden können.

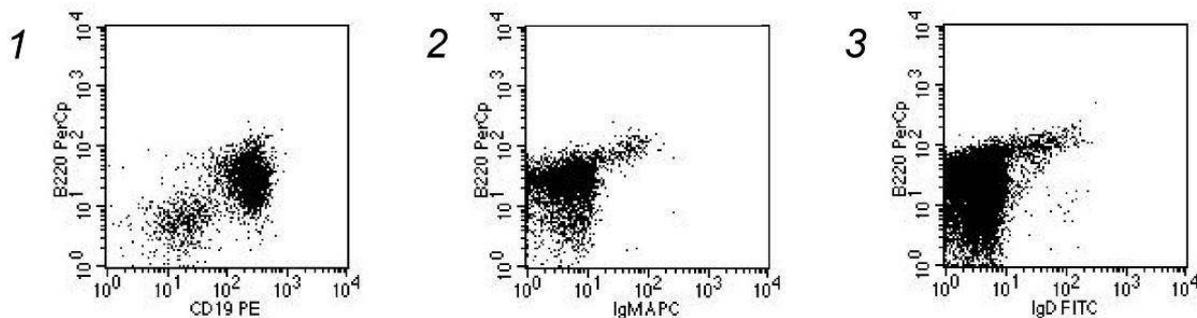
Bis zu diesem Stadium findet die gesamte Entwicklung im Knochenmark statt. Nach weiteren Selektions- und Differenzierungsschritten entwickeln sich unreifen B-Zellen zu reifen B-Zellen, die zusätzlich zu IgM das Immunglobulin IgD exprimieren.

Bei der FACS-Analyse sind B-Zellen in einem bestimmten Fenster des FSC/SSC-Blots, dem sogenannten Lymphozytenfenster, zu finden, das durch eine bestimmte Zellgröße (FSC) und Granularität (SSC) der Zellen bestimmt wird. Alle Analysen wurden deshalb mit Zellen durchgeführt, die sich im Lymphozytenfenster befinden. Dieses Vorgehen schließt auch tote Zellen aus, die mit Hilfe einer Propidium-Iodid-Färbung erkannt und abgegrenzt werden können. Als Positivkontrollen der Färbungen dienten Zellen aus der Milz von Balb/C Mäusen, da dieses Organ B-Zellen in allen möglichen Differenzierungsstadien und großer Anzahl enthält.

**A**



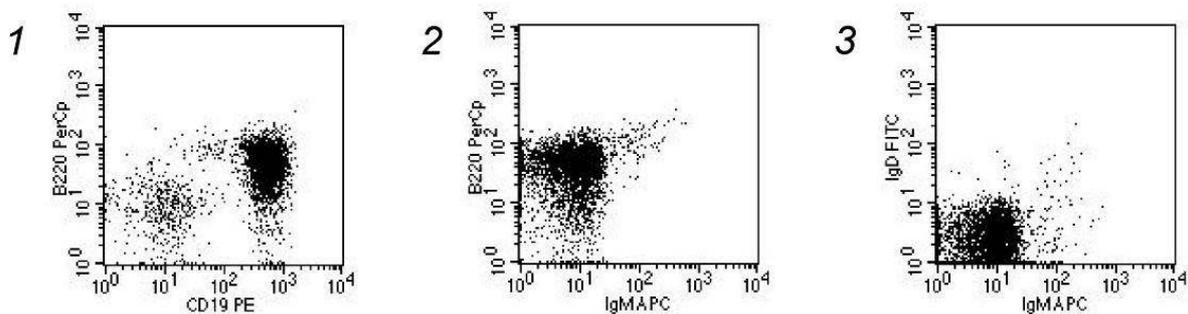
**B**



**Abb. 4.25: FACS-Analyse der aus der ES-Zell-Linie EB5 differenzierten Zellen**

Die bei den Differenzierungen der ES-Zell-Linie EB5 entstandenen Zellen wurden mit dem FACS-Gerät analysiert. Gezeigt werden zwei verschiedene Differenzierungsansätze (A und B), die beide erfolgreich waren. Die FACS-Analyse umfasst ausschließlich Zellen, die im FSC/SSC-Blot als Lymphozyten charakterisiert sind und nicht Propidium-Iodid positiv waren. Diese Zellen wurden auf die Oberflächenexpression von B220, CD19, IgM und IgD untersucht. In dieser Abbildung sind B220<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup> Zellen (Blot 1) deutlich erkennbar, von denen einige auch IgM<sup>+</sup> sind (Blot 2). Diese Markerkombination ist charakteristisch für unreife B-Zellen der Maus. In Blot 3 wird gezeigt, dass einige wenige der IgM<sup>+</sup> Zellen auch IgD<sup>+</sup> sind, ein Marker für reife B-Zellen.

In Abb. 4.25 sind die FACS-Analysen zweier Differenzierungen der ES-Zell-Linie EB5 zu sehen. In beiden Fällen waren über 80 % der Zellen  $CD19^+B220^+$ . Der Anteil an  $IgM^+$  Zellen schwankte zwischen 4 - 7 %. Eine Expression von  $IgD$  war bei 3 – 6 % der Zellen zu finden. Diese Markerkombination zeigt, dass es sich um reife, murine B-Zellen handelt. Somit wurde gezeigt, dass das leicht veränderte Protokoll für die *in vitro*-Differenzierung prinzipiell erfolgreich durchgeführt werden konnte.

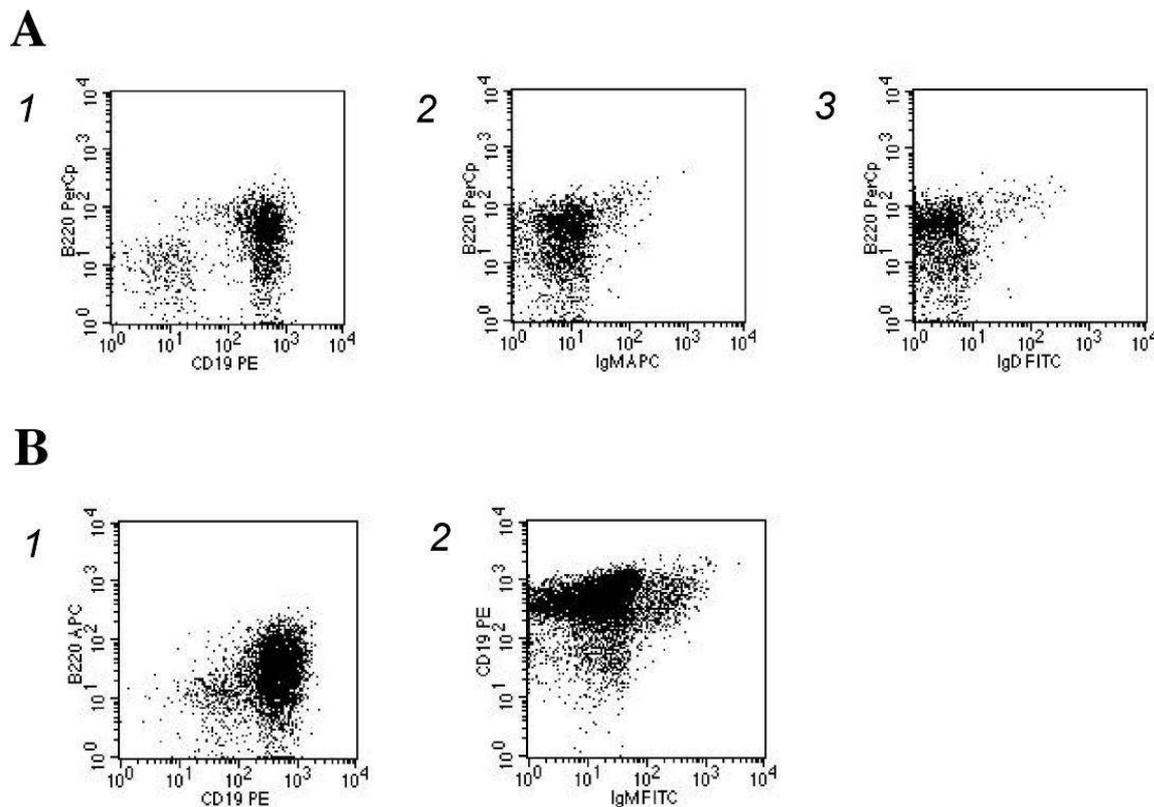


**Abb. 4.26: FACS-Analyse der differenzierten Zellen aus der ES-Zell-Linie Bruce4 EBNA1 C1**

Mit Zellen, die bei der erfolgreichen Differenzierung der ES-Zell-Linie Bruce4 EBNA1 C1 entstanden, wurde eine FACS-Analyse durchgeführt. Alle dargestellten Zellen befinden sich im Lymphozytenfenster des FSC/SSC-Blots und waren Propidium-Iodid negativ. Bei diesen Zellen wurden das Vorhandensein von B220, CD19, IgM und IgD untersucht. Deutlich erkennbar sind die  $B220^+CD19^+$  Zellen (Blot 1), von denen einige auch  $IgM^+$  sind (Blot 2). Diese Markerkombination ist charakteristisch für unreife B-Zellen der Maus. In Blot 3 wird gezeigt, dass 1 % der Zellen auch  $IgD^+$  sind, ein Marker für reife B-Zellen.

Auch die Zellen im Überstand der Differenzierung der ES-Zell-Linie Bruce4 EBNA1 C1 wurden mit dem FACS-Gerät analysiert, und es konnten  $B220^+CD19^+IgM^+$  bzw.  $IgD^+$  Zellen nachgewiesen werden (Abb. 4.26). Der Anteil an  $B220^+CD19^+$  Zellen betrug 85 %, wovon 4 %  $IgM^+$  waren.  $IgD^+$ -Zellen konnten nur zu einem geringen Anteil gefunden werden (1%).

Eine statistische Auswertung der Differenzierungen war leider nicht möglich, da aufgrund der mangelhaften Reproduzierbarkeit der Differenzierungsansätze bzw. der teilweise geringen Ausbeuten bei erfolgreicher Durchführung nicht genug Zellen zur Verfügung standen, um eine quantitative Aussage über die Vergleichbarkeit der Zell-Linien treffen zu können. Es konnte deshalb nur das Vorhandensein bzw. das Fehlen von reifen B-Zellen im Überstand bewertet werden. Nachdem diese Kontroll-Zell-Linien erfolgreich zu reifen B-Zellen differenziert werden konnten, wurden anschließend die Überstände Mini- und Maxi-EBV-tragenden ES-Zell-Linien untersucht.

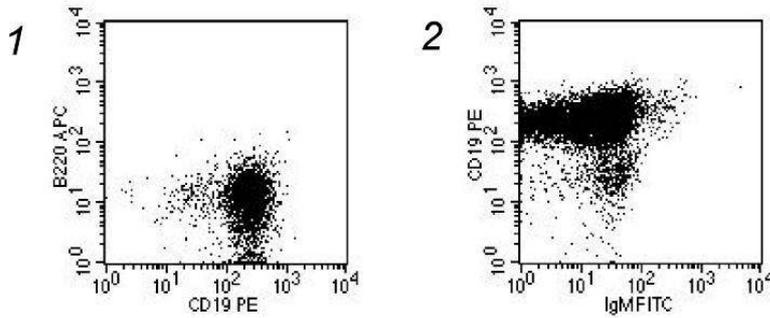


**Abb. 4.27: Analyse der differenzierten Zellen aus der ES-Zell-Linie Bruce4 EBNA1 3314 A4**

Die bei den Differenzierungen der ES-Zell-Linie Bruce4 EBNA1 3314 A4 entstandenen Zellen wurden mit dem FACS-Gerät analysiert. Gezeigt werden zwei erfolgreiche Differenzierungsansätze (A und B). Dargestellt sind Zellen, die sich im FSC/SSC-Blot im Lymphozytenfenster befinden und nicht Propidium-Iodid positiv waren. Diese wurden auf die Expression der Oberflächenproteine B220, CD19, IgM und in Differenzierung A auch auf IgD hin untersucht. In Blot 1 erkennt man  $B220^+CD19^+$  Zellen (Blot 1), von denen einige auch  $IgM^+$  sind (Blot 2). Diese Markerkombination ist charakteristisch für unreife B-Zellen der Maus. In Blot 3 der Differenzierung A wird gezeigt, dass einige der Zellen auch  $IgD^+$  sind, ein Marker für reife B-Zellen. Bei der Differenzierung B fand keine Weiterkultur der Zellen und ein Nachweis von IgD statt, da die Überstände im Anschluss an die FACS-Analyse für weitere Untersuchungen zur Extraktion von RNA benutzt wurden.

Sehr erfolgreich konnte die ES-Zell-Linie Bruce4 EBNA1 3314 A4 differenziert werden (Abb. 4.27). Wie bei den Kontrollen konnten auch hier reife B-Zellen detektiert werden. Über 70 % der Zellen der gezeigten Differenzierungsansätze waren  $B220^+CD19^+$  und 7 – 8 % auch  $IgM^+$ . Der Anteil der  $IgD^+$ -Zellen betrug 5 %.

Die Zell-Linie Bruce4 EBNA1 3053 P1 entwickelte ebenfalls  $B220^+CD19^+IgM^+$  B-Zellen (vgl. Abb. 4.28). Hier lag der Anteil von  $B220^+CD19^+$ -Zellen bei 75 %, wovon 8 % auch  $IgM^+$  waren. Auf eine Expression von IgD wurden die Zellen in diesem Fall nicht untersucht, da die Zellen des Überstandes nicht weiter kultiviert wurden, sondern für folgende Analysen die gesamtzelluläre RNA gewonnen wurde. Das Maxi-EBV-Plasmid trägt im Gegensatz zu den Mini-EBV-Plasmiden die gesamte genetische Information des Virus.



**Abb. 4.28: FACS-Analyse der aus der ES-Zell-Linie Bruce4 EBNA1 3053 P1 differenzierten Zellen**

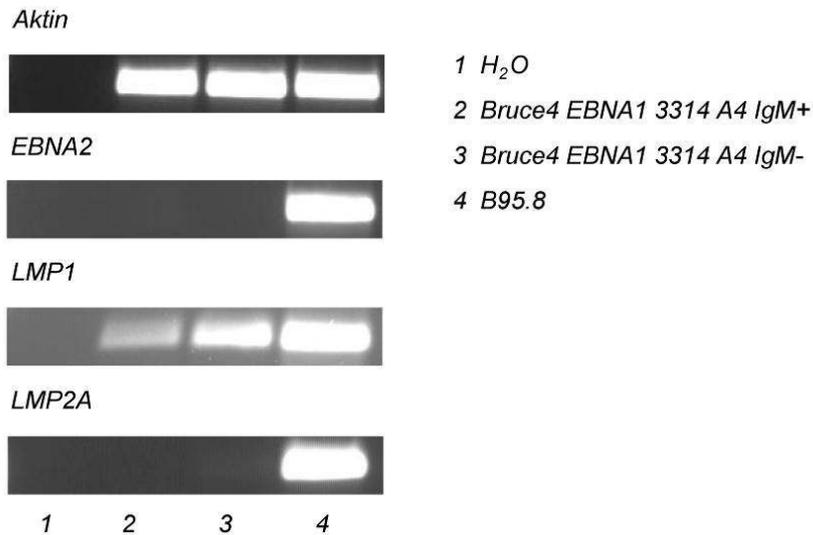
Die ES-Zell-Linie Bruce4 EBNA1 3053 P1 konnte erfolgreich differenziert werden und die entstandenen Zellen wurden mit dem FACS-Gerät analysiert. Dargestellt sind nur lebende, sich im Lymphozytenfenster befindende Zellen. Diese wurden auf das Vorhandensein der Oberflächenproteine B220, CD19, und IgM hin untersucht. Deutlich erkennbar sind B220<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup> Zellen (Blot 1), von denen einige auch IgM<sup>+</sup> sind (Blot 2). Diese Markerkombination ist charakteristisch für unreife B-Zellen der Maus.

#### 4.4.2. Expression von EBV-Genen in murinen B-Zellen

Die Überstände der Differenzierungsansätze, die reife B-Zellen enthielten, wurde durch „Magnetic Cell Sorting“ (MACS)-Separation (Miltenyi Biotec) fraktioniert (vgl. Abschnitt 3.2.1), so dass eine IgM<sup>+</sup>- und eine IgM<sup>-</sup>-Fraktion für weitere Analysen zur Verfügung standen. Sowohl aus IgM<sup>+</sup> als auch aus IgM<sup>-</sup> Zellen wurde RNA gewonnen und anschließend in cDNA umgeschrieben. Aufgrund der äußerst geringen Zellzahlen, besonders der IgM<sup>+</sup>-Fraktion, musste teilweise die gesamte RNA mit Reverser Transkriptase umgeschrieben werden.

Anschließend wurden die cDNAs durch die RT-PCR auf das Aktin-Gen überprüft und bei einem positiven Ergebnis anschließend auf die Expression von EBV-Genen getestet. Da die gleichen Primer wie bei der Analyse der EBV-Plasmid-tragenden ES-Zellen benutzt wurden, konnte auch hier gut zwischen DNA und cDNA unterschieden werden. Als Kontrolle für die Expression der EBV-Gene wurde erneut die etablierte Zell-Linie B95.8 gewählt.

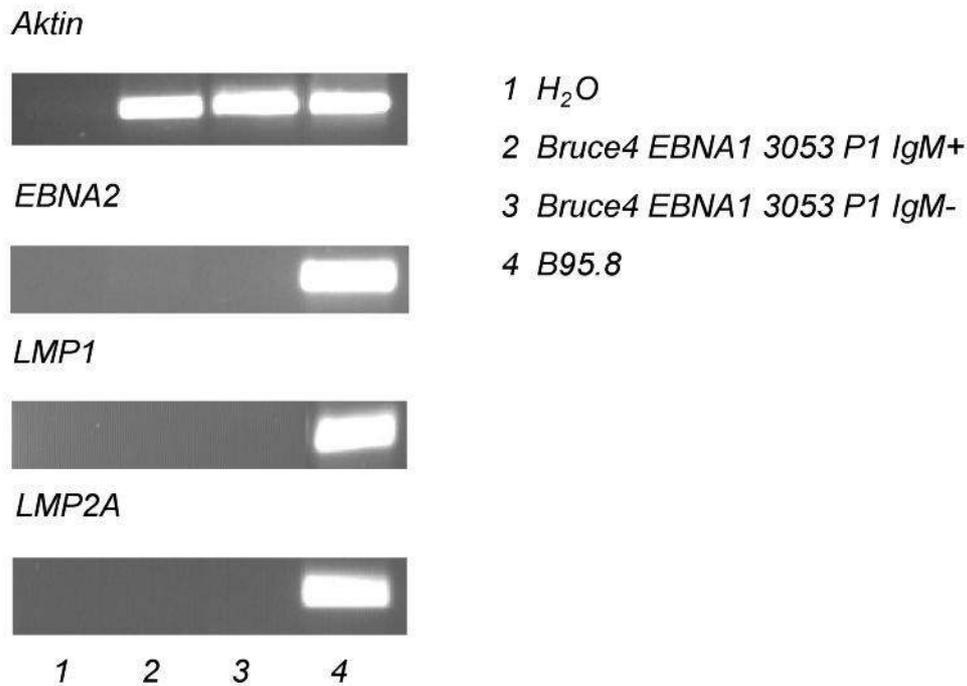
Bei dem Klon Bruce4 EBNA1 3314 A4, der mit einem Mini-EBV-Plasmid transfiziert wurde, exprimierten die differenzierten Zellen alle LMP1, aber anders als bei den ES-Zellen dieses Klons zeigte keine der beiden Fraktionen eine Expression von LMP2A. Auch die EBNA2-RT-PCR hatte ein negatives Ergebnis. Ein möglicher Grund für das Nichtvorhandensein von positiven Banden in der RT-PCR-Analyse der Zellen ist die geringe Menge an RNA, die für die cDNA-Synthese benutzt wurde. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass das eingesetzte Material nicht ausreichend war, um die mRNA der Gene detektieren zu können.



**Abb. 4.29: Expression von EBV-Genen in differenzierten Zellen aus der ES-Zell-Linie Bruce4 EBNA1 3314 A4**

Die bei dem Differenzierungsansatz der ES-Zell-Linie Bruce4 EBNA1 3314 A4 bei der FACS-Analyse gefundenen B220<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup> Zellen wurde durch „Magnetic Cell Sorting“ (MACS)-Separation (Miltenyi Biotec) fraktioniert und aus den IgM<sup>+</sup> bzw. IgM<sup>-</sup> Zellen die gesamtzelluläre RNA gewonnen. Diese wurde in cDNA umgeschrieben und mit sequenzspezifischen Primern auf das Vorhandensein von mRNA der EBV-Gene EBNA2, LMP1 und LMP2A hin untersucht. Die verwendeten Primer, die erwarteten Bandengrößen und die benutzten PCR-Programme sind in Abschnitt 3.2.3 zu finden. Zur Überprüfung der cDNA wurden die Proben auf die Expression des Aktin-Gens hin getestet. Als Expressionskontrolle wurden B95.8 Zellen benutzt.

Die differenzierten Zellen des Maxi-EBV-Klons Bruce4 EBNA1 3053 P1 waren für die analysierten EBV-Gene bei dieser Analyse negativ. Die ES-Zellen dieses Klons exprimieren sowohl LMP1 als auch LMP2A, so dass zu erwarten gewesen wäre, die mRNA dieser beiden Genprodukte auch in den differenzierten Zellen zu finden. Da hier aufgrund der geringen Zellzahlen nicht ausgeschlossen werden konnte, dass eine fehlende Expression der Gene nicht dem tatsächlichen Zustand entsprach, sondern nur ein Problem der Detektierbarkeit darstellte, wurde die cDNA mit einer anderen Methode, der Realtime-PCR, erneut auf die Expression der EBV-Gene hin untersucht.



**Abb. 4.30: Expression von EBV-Genen in differenzierten Zellen aus der ES-Zell-Linie Bruce4 EBNA1 3053 P1**

Bei dem Differenzierungsansatz der ES-Zell-Linie Bruce4 EBNA1 3053 P1 bei der FACS-Analyse wurden B220<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup> Zellen gefunden und durch „Magnetic Cell Sorting“ (MACS)-Separation (Miltenyi Biotec) fraktioniert. Aus den IgM<sup>+</sup> bzw. IgM<sup>-</sup> Zellen wurde die gesamtzelluläre RNA gewonnen und in cDNA umgeschrieben. Mit sequenzspezifischen Primern wurde die cDNA auf das Vorhandensein von mRNA der EBV-Gene EBNA2, LMP1 und LMP2A hin untersucht. Die verwendeten Primer, die erwarteten Bandengrößen und die benutzten PCR-Programme sind in Abschnitt 3.2.3 zu finden. Zur Überprüfung der cDNA wurden die Proben auf eine Expression des Gens Aktin hin getestet. Als Expressionkontrolle wurden B95.8 Zellen benutzt.

#### 4.4.3. Realtime-PCR-Analyse der in vitro differenzierten Zellen

Um eine größere Sensitivität der Analyse der cDNA-Proben zu erreichen, wurde wie schon bei der Analyse der ES-Zellen auf die Realtime-PCR zurückgegriffen. Ein großer Vorteil der Realtime-PCR ist zudem, dass nur geringe Mengen Ausgangsmaterial eingesetzt werden müssen, was bei der sehr beschränkten cDNA-Menge, die zur Verfügung stand, wichtig war.

Allen cDNA-Proben wurden erst mit Realtime-PCR auf das Gen GAPDH als endogene Kontrolle getestet (Bustin, 2000). Konnte dieses Gen nachgewiesen werden, wurden die Proben auf eine Expression der Gene EBNA2, LMP1 und LMP2A hin untersucht. Eine Unterscheidung zwischen DNA und cDNA ist auch hier in allen Fällen möglich, und vorhandene DNA wurde mit für das EBV-Plasmid spezifischen Primern detektiert. Als Kontrolle wurden erneut B95.8-Zellen herangezogen, die für alle analysierten Gene positiv sind.

	EBV	GAPDH	EBNA2	LMP1	LMP2A
Bruce4 EBNA1 3314 A4 IgM <sup>+</sup>	+	+	-	+	+
Bruce4 EBNA1 3314 A4 IgM <sup>-</sup>	+	+	-	+	-
Bruce4 EBNA1 3053 P1 IgM <sup>+</sup>	+	+	-	+	+
Bruce4 EBNA1 3053 P1 IgM <sup>-</sup>	+	+	-	-	-
B95.8	+	+	+	+	+

**Tab. 4.2: Zusammenfassung der Realtime-PCR-Auswertung**

Zum Nachweis der Expression der EBV-Gene EBNA2, LMP1 und LMP2A in den differenzierten Zellen der ES-Zell-Linien Bruce4 EBNA1 3314 A4 und Bruce4 EBNA1 3053 P1 wurde eine Realtime-PCR-Analyse durchgeführt. Die verwendeten Primer und „LightCycler“-PCR- Programme sind in Abschnitt 3.2.3 angegeben. Das Design der Primer ermöglichte es, zwischen DNA, die die RNA-Präparation verunreinigen kann, und cDNA zu unterscheiden. Zum Test der cDNAs wurde ein RT-PCR-Lauf mit Primern Außerdem wurden spezielle Primer benutzt, die ein Vorhandensein von genomischer DNA (EBV) in den spezifisch für das „Housekeeping“-Gen Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) durchgeführt. Als Kontrolle der Expression diente die etablierte Zell-Linie B95.8. Ein positives Ergebnis ist durch ein + dargestellt, ein negatives durch ein -.

Alle untersuchten Fraktionen waren für das „Housekeeping“-Gen GAPDH positiv und zeigten das Vorhandensein von EBV-DNA an. In keiner der getesteten cDNAs ergab sich ein Hinweis auf die Expression des EBNA2 Gens. In der IgM<sup>+</sup>-Fraktion des differenzierten Mini-EBV-Klons, in der sich die reifen B-Zellen befinden, konnte durch diese Methode eine Expression der Gene LMP1 und LMP2A nachgewiesen werden, was auf ein Expressionsmuster der Latenz II hindeutet. Dieses Ergebnis stimmt mit dem Bild überein, das sich auch schon in den ES-Zellen dieses Klons gezeigt hat. In der IgM<sup>-</sup> Fraktion, in der alle unreifen und Nicht-B-Zellen vorhanden sind, konnte bei der Realtime-Analyse nur die Expression des LMP1-Gens nachgewiesen werden. Sie ist negativ für LMP2A und EBNA2. Ein ähnliches Bild ergab sich bei dem Maxi-EBV-Pool Bruce4 EBNA1 3053 P1. Eine Expression von LMP2A und LMP1 konnte nur

---

in der IgM<sup>+</sup>-Fraktion gezeigt werden. Die IgM<sup>-</sup>-Fraktionen exprimieren keine EBV-Gene. Auch hier zeigt sich das gleiche Expressionsmuster wie in den ES-Zellen des Pools Bruce4 EBNA1 3053 P1.50

## 5. Diskussion

Da EBV ätiologisch eng mit verschiedenen malignen Erkrankungen des Menschen verbunden ist, liegt ein besonderes Interesse darin, den Einfluss des Virus auf die infizierten Zellen und deren Rolle in der Tumorentstehung zu verstehen. Die Forschung am Menschen ist aus offensichtlichen ethischen und praktischen Gründen auf *in vitro* Versuche beschränkt. So stammen die meisten Erkenntnisse über die Funktionen viraler Proteine, die z. B. bei der B-Zell-Transformation eine Rolle spielen, aus Zellkulturexperimenten. Diesen Systemen fehlen allerdings die Komponenten und die Komplexität eines lebenden Organismus, weswegen ein Tiermodell für das Epstein-Barr-Virus wünschenswert ist.

Für das Studium der EBV-Gene bieten sich Mäuse an, da deren Immunsystem dem von Menschen sehr ähnlich und die Haltung der Tiere in vielen Forschungseinrichtungen standardisiert ist. Das Problem ist, dass das Virus ein enges Wirtsspektrum besitzt und Mauszellen nicht infizieren kann. Ein alternativer Weg zu einem Mausmodell, das Aspekte der EBV-Tumorgene- und der Differenzierung EBV-infizierter B-Zellen abbildet, führt über die genetische Manipulation von embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) der Maus. Diese können aufgrund ihrer Pluripotenz in alle Zellen der drei Keimbahnen – Endoderm, Mesoderm, Ektoderm – differenzieren. Diese Eigenschaft erlaubt es, murine, embryonale Stammzellen gezielt *in vitro* zu verschiedenen Zelltypen zu differenzieren oder durch Injektion in eine Blastozyste eine Maus aus ihnen zu generieren.

In diesem Fall wurde die *in vitro* Differenzierung zu B-Zellen gewählt, die die natürlichen Wirtszellen des Virus darstellen. Ziel meiner Arbeit war es, die genetische Information des Epstein-Barr Virus in ES-Zellen der Maus direkt einzubringen und die Aufrechterhaltung des Gesamtgenoms als extrachromosomales Plasmid zu erreichen. Die rekombinanten ES-Zellen wurden dann *in vitro* zu B-Zellen differenziert, um den transformierenden Phänotyp dieses Virus in murinen B-Zellen zu analysieren. Ein Hauptaugenmerk liegt dabei auf der Untersuchung der Genexpression des Virus in den murinen Zellen.

### 5.1. Etablierung und Charakterisierung EBV-positiver ES-Zellen der Maus

Bevor das EBV-Genom in die murinen ES-Zellen eingebracht werden konnte, musste zuerst die Frage beantwortet werden, ob eine Aufrechterhaltung des Episoms gewährleistet werden konnte. Die Aufrechterhaltung des EBV-Genoms ist dabei von zwei Bedingungen abhängig:

einmal von der Selektionierbarkeit der eingebrachten Plasmide und zum anderen von der Expression des EBNA1-Proteins in den Zellen.

Die Proliferation von murinen ES-Zellen ist von einer Zellschicht embryonaler Fibroblasten (EF-Zellen) abhängig, die die Zellen mit zusätzlichen Faktoren versorgt. Die in dieser Arbeit benutzten EF-Zellen tragen ein chromosomal integriertes G418-Resistenzgen, was diese Zellen resistent gegen das Antibiotikum G418 macht. Aus diesem Grund wurden die EBV-Plasmide, die in die ES-Zellen eingebracht wurden, mit einem G418-Resistenzgen versehen, um die transfizierten ES-Zellen unter diesen Bedingungen selektionieren zu können.

Die beiden Maxi-EBV-Plasmide p3053 und p3298 enthielten das Resistenzgen bereits in ihrem Rückgrat, während es in das Mini-EBV-Plasmid noch eingeführt werden musste. Das Mini-EBV-Plasmid p2801 enthält nur eine Chloramphenicolresistenz zur Selektion der Plasmide in *E.coli*. Das so entstandene Konstrukt wird als p3314 bezeichnet. Damit war die erste Voraussetzung erfüllt und die transfizierten Zellen konnte mit G418 selektioniert werden, um die verschiedenen EBV-Plasmide aufrechtzuerhalten.

Es ist schon lange bekannt, dass das virale Protein EBNA1 für die Replikation und Aufrechterhaltung des episomalen EBV-Genoms essentiell ist. Es bindet den viralen Replikationsursprung oriP (Kieff und Rickinson, 2001) und vermittelt die korrekte Replikation und Segregation der Episome während der Zellteilung (Aiyar et al., 1998, Yates et al., 1985). Zur episomalen Aufrechterhaltung von EBV im Zellkern von humanen Zellen sind zwei virale Elemente notwendig, der plasmidale Replikationsursprung oriP und das EBV-Protein EBNA1 (Yates et al., 1984, Wendelburg et al., 1998). Diese Fähigkeit der beiden Elemente führte zur Entwicklung oriP/EBNA1-basierter Vektoren, die erfolgreich *in vitro* und *in vivo* in humanen Zellen eingesetzt wurden (Margolskee et al., 1988, Mazda et al., 1997, Nakanishi et al., 2003).

Da nicht vorausgesetzt werden konnte, dass EBNA1 nach Einbringen des viralen Episoms in ausreichender Menge von den viralen Promotoren exprimiert werden würde, wurde das EBNA1-Gen chromosomal in murine ES-Zellen integriert. Das EBNA1-Gen wurde stabil in den Rosa26-Lokus der ES-Zellen integriert. So konnten eine konstitutive Expression des Gens unter Kontrolle des Rosa26-Promotors in den murinen Zellen erreicht werden.

Der Rosa26-Lokus wurde gewählt, da er ubiquitär in nahezu allen Geweben der Maus exprimiert wird, insbesondere auch in den hämatolymphoiden Zellen (Zambrowicz et al., 1997). Darüber hinaus führt die Inaktivierung der Rosa26-Transkripte zu keinem offensichtlich veränderten Phänotyp, und homozygot transgene Tiere zeigen keinerlei Auffälligkeiten (Soriano et al., 1999).

Die Expression von EBNA1 in den ES-Zellen wurde mit einer Westernblot-Analyse untersucht. Alle vier analysierten Klone exprimierten EBNA1 und zeigten keinen offensichtlichen Phänotyp im Vergleich zu EBNA1-negativen ES-Zellen. Damit war auch die zweite Voraussetzung erfüllt, die generell zur Aufrechterhaltung des EBV-Genoms in Zellen nötig ist.

Die erste wichtige Frage war nun, ob das EBV-Genom in murinen ES-Zellen episomal aufrechterhalten wird. Eine Aufrechterhaltung in humanen ES-Zellen konnte bereits gezeigt werden. So wiesen Ren et al. nach, dass in humanen ES-Zellen, die EBNA1 stabil exprimierten, oriP-enhaltende Vektoren erfolgreich eingebracht und unter Selektion über Monaten hinweg aufrechterhalten werden konnten (Ren et al., 2006). Ohne Selektion kam es zu einem allmählichen Verlust des Plasmids mit einer Rate von 2 – 4 % pro Zellteilung. Die Expression von EBNA1 hatte keinerlei Einfluss auf die Eigenschaften der humanen ES-Zellen und deren Differenzierung zu embryoiden Körpern und Teratomen.

Aus diesen Ergebnissen kann allerdings nicht auf murine ES-Zellen rückgeschlossen werden. So wird die Aufrechterhaltung von oriP/EBNA1-basierten Vektoren in Nagerzellen noch kontrovers diskutiert. Yates et al. entwickelten einen EBV-basierten Vektor und zeigten, dass dieser in Primatenzellen, nicht aber in Nagerzellen repliziert (Yates et al., 1985). Auch Krysan et al. fanden keine Replikation von EBV-basierten Vektoren in Nagerzellen (Krysan und Calos, 1993).

In den letzten Jahren mehrten sich die Berichte, dass eine Aufrechterhaltung episomaler, EBV-basierter Plasmide in Nagerzellen möglich ist. So konnten Krysan und Calos zeigen, dass die Vergrößerung EBV-basierter Vektoren durch Fragmente humaner DNA, diese DNA in Nagerzellen stabilisiert (Krysan und Calos, 1993). Auch replizierten solche oriP-Plasmide als extrachromosomale Plasmide einmal pro Zellteilung, wie es auch für EBV in humanen Zellen gezeigt wurde. Mehrere, andere Forschergruppen haben auch berichtet, dass oriP/EBNA1-basierte Vektoren, die große Fragmente humaner DNA tragen, erfolgreich in Nagerzellen aufrechterhalten werden können (Black und Vos, 2002, Huertas et al., 2000).

Diesen Berichten widerspricht die Publikation von Kelleher et al., in der gezeigt werden konnte, dass EBV-Plasmide ohne humane DNA mit Hygromycinresistenz sowohl in murinen A9 Fibroblasten als auch in A9(20) Fibroblasten, die eine humane Chromosom 20 mit G418-Resistenz tragen, extrachromosomal aufrechterhalten werden können (Kelleher et al., 1998). Bei den A9(20)-Zellen konnte nur ein einziger Hygromycin-resistenter Klon gefunden werden, wohin gegen A9-Zellen eine ganze Reihe von resistenten Klonen hervorbrachten. Ein anderer EBV-basierter Vektor ohne humane DNA-Fragmente wurde von Mizuguchi et al. entwickelt

(Mizuguchi et al., 2000). Die Forscher konnten zeigen, dass das Plasmid in murinen Fibroblasten (L-Zellen) sowie L6- bzw. C6-Zellen aus Ratten unter Selektion aufrechterhalten werden konnte. Sie konnten ebenfalls eine Replikation der Plasmide in den Zellen nach zwei Monaten in Kultur nachweisen.

Meine Arbeit bestätigt diese Befunde und ergänzt sie durch murine ES-Zellen. Wir konnten zeigen, dass eine episomale Aufrechterhaltung des EBV-Genoms in murinen Zellen möglich ist, sofern EBNA1 in ausreichender Menge exprimiert wird. Die beiden Maxi-EBV-Plasmide p3053 und p3298 sowie das Mini-EBV-Plasmid p3314 wurden in die EBNA1-positiven ES-Zellen eingebracht und ihr episomaler Status untersucht. Die extrachromosomale Aufrechterhaltung der Plasmide unter G418-Selektion konnte durch Gardella-Gele und eine „plasmid rescue“-Analyse bestätigt werden. Das positive Ergebnis stimmt mit dem von Kelleher et al. überein und zeigt, dass in solchen Zellen, die EBNA1 konstitutiv exprimieren, das EBV-Genom in murinen Zellen in extrachromosomaler Weise aufrechterhalten wird (Kelleher et al., 1998).

In Versuchen, bei denen die Maxi-EBV-Plasmide bzw. das Mini-EBV-Plasmid in murine ES-Zellen ohne integriertes EBNA1 eingebracht wurden, konnte ich keine G418-resistenten Klone isolieren (Daten nicht gezeigt). Dies weist darauf hin, dass das Expressionsniveau von EBNA1 in diesem Fall nicht ausreichend ist, um eine episomale Aufrechterhaltung zu gewährleisten. Dies stimmt mit den Daten von Humme et al. überein. Sie konnten zeigen, dass ein EBNA1-defizientes Virus nicht in der Lage ist, eine episomale Aufrechterhaltung des Genoms in humanen B-Zellen zu gewährleisten (Humme et al., 2003). Die Bildung von LCLs war um den Faktor 10 000 ineffizienter als mit Wildtyp-Virus, wobei in den entstandenen Zell-Linien das virale Genom komplett chromosomal integrierte. Eine zufällige Integration der EBV-Plasmide bzw. nur des Resistenzgens ist offensichtlich ein seltenes Ereignis, das ich in meinen Versuchen nicht beobachten konnte.

Desweiteren konnten wir zeigen, dass die Aufrechterhaltung des EBV-Episoms in unserem System nicht von der Selektion abhängig war. So konnte ich auch nach drei Wochen Kultur ohne Selektion Plasmide erfolgreich aus den ES-Zellen isolieren und mit einer „plasmid rescue“-Analyse detektieren. Dieses Ergebnis ist für die spätere Differenzierung der ES-Zellen zu B-Zellen von Bedeutung, da diese Differenzierung in einem Zeitraum von drei Wochen stattfindet und eine Selektion der EBV-positiven Zellen währenddessen nicht möglich ist.

Nachdem ich die extrachromosomale Aufrechterhaltung der EBV-Plasmide in den murinen ES-Zellen bestätigen konnte, wurden die ES-Zell-Linien auf die Expression von EBV-Genen

hin untersucht. Bei einer Westernblot-Analyse konnte weder die Expression von LMP1 noch die von EBNA2 nachgewiesen werden. Dies deutet auf eine schwache oder fehlende Expression der beiden Gene hin. Aus diesem Grund wurde anschließend mit einer sensitiveren Methode, der RT-PCR, die Genexpression analysiert. Die ES-Zellen, die das Mini-EBV-Plasmid p3314 bzw. das Maxi-EBV-Plasmid p3053 tragen, zeigten beide sowohl eine Expression von LMP1 als auch von LMP2A. EBNA2 konnte in diesen Versuchen nicht nachgewiesen werden. Als negative Kontrolle diente die ES-Zell-Linie mit dem Plasmid p3298, da es durch die Invertierung eines großen Bereichs dieses Konstruktes zu einer Unterbrechung der latenten Genexpression kommt. Wie zu erwarten war, konnte bei p3298-positiven Zellen keines der drei untersuchten Gene nachgewiesen werden.

Bei einer anschließenden Analyse der ES-Zell-Linien mit Realtime-PCR konnte zwar die Expression der Gene LMP1 und LMP2A bestätigt werden, aber auch hier wurde keine Expression von EBNA2 gefunden. Dieses in den verschiedenen ES-Zell-Linien gefundene Expressionsmuster deutet auf eine Latenz II hin, bei der neben EBNA1 auch LMP1, LMP2A und die EBER RNAs exprimiert werden. In meinem Fall konnte die virale Expression von EBNA1 nicht untersucht werden, da das Gen stabil in den Rosa26-Lokus integriert wurde und unter der Kontrolle des Rosa26-Promotors steht.

Dieses Ergebnis stimmt mit den Befunden von Haan et al. überein, der in murinen B-Zell-Linien ebenfalls eine Latenz II nachweisen konnte (Haan et al., 2001), wohingegen andere Forscher nur eine EBNA1-Expression zeigen konnten (Ahearn et al., 1988, Kearns-Jonkers et al., 1997). Allerdings ist bei den Letztgenannten zu beachten, dass die Effizienz, mit der die murinen, transgenen Zellen infiziert wurden, sehr niedrig ist und die Expression nur mit Immunofluoreszenz nachgewiesen wurde. Eine schwache Expression anderer Gene konnte so eventuell nicht detektiert werden. Zudem ist diese Technik sehr anfällig für falsch positive Ergebnisse.

Da keine EBNA2-Expression in den ES-Zellen mit p3053 und p3314 detektierbar war, wurde die Aktivität der EBNA-spezifischen Promotoren in diesen Zellen untersucht. Die Transkription der EBNA-Gene wird in Form langer Primärtranskripte von den Promotoren Cp bzw. Wp aus initiiert. Durch alternatives Spleißen und 3'-Prozessierung entstehen die mRNAs, die für die unterschiedlichen EBNA-Proteine kodieren (Kerr et al., 1992). Bei der RT-PCR-Analyse der Promotoren zeigte sich, dass von den vorhergesagten Bandenmuster bei beiden EBV-positiven ES-Zell-Linien nur jeweils die beiden kleinsten Fragmente (312 bp, 510 bp bei Cp und 110 bp, 308 bp bei Wp) detektiert werden konnten. Die größeren, erwarteten Fragmente

fehlten. Zusätzlich waren aber weitere Banden zu erkennen, die dem Bandenmuster der Positivkontrolle B95.8 nicht zugeordnet werden konnten.

Da die zusätzlichen Banden nicht durch eine Optimierung des RT-PCR-Protokolls reduziert werden konnten, wurde angenommen, dass es sich um eine spezifische Primerbindung handelt und zusätzliche, unerwartete Transkripte in den Zellen vorliegen. Eine Sequenzanalyse der isolierten Banden ergab, dass neben zwei korrekt gespleißten Fragmenten zusätzliche Fragmente vorhanden waren, bei denen das Spleißen nicht erfolgreich durchgeführt worden war. Sie beinhalteten z. B. das Intron zwischen den Exons W1 und W2, das normalerweise nicht in der mRNA vorkommt. Da sowohl in den Mini-EBV-enthaltenden ES-Zellen, als auch in den Maxi-EBV-positiven ES-Zellen diese zusätzlichen Banden auftraten, liegt die Vermutung nahe, dass bei der Transkription der EBNA-Gene die Prozessierung der mRNA gestört ist.

Dies könnte auf Unterschiede in der mRNA-Prozessierung der EBV-Gene in den beiden Spezies Mensch und Maus hindeuten. Aber auch Abweichungen des Spleißmusters zwischen verschiedenen Zellarten (B-Zellen und ES-Zellen) könnten die Ursachen sein. So konnten Lemischka et al mit einer Kombination aus computergestützter und experimenteller Analyse zeigen, dass Gene, die in hämatopoetischen und embryonalen Stammzellen exprimiert werden, einem alternativen Spleißprozess unterliegen (Lemischka et al., 2006). Dabei ist die Frequenz des alternativen Spleißens in Gewebe-spezifischen Genen höher als in ubiquitär exprimierten. Eine allgemeine Konservierung des alternativen Spleißens in orthologen Genen zwischen Mensch und Maus konnte nicht nachgewiesen werden. Andere Forscher fanden dagegen, dass 74 % der konstitutiven, humanen Spleißstellen und 61 % der alternativen, humanen Spleißstellen in Mäusen konserviert sind und somit ein hoher Konservierungsgrad des alternativen Spleißens vorliegt (Thanaraj et al., 2003). Eine genauere Untersuchung der Transkripte in den murinen ES-Zellen, zusammen mit einer Analyse der Transkripte in den *in vitro* differenzierten B-Zellen, ist nötig, um die genauen Ursachen für die Probleme bei der mRNA-Prozessierung zu finden.

Daten anderer Gruppen könnten auf ein Spleißproblem hinweisen, dessen Ursache in dem Unterschied der mRNA-Prozessierung zwischen den Spezies Mensch und Maus liegt. So konnten Haan et al. zwar in den murinen B-Zellen (M12) nach einer Infektion mit EBV keine Expression von EBNA2 und den EBNA3s nachweisen, aber eine Expression von EBNA1 (Haan et al., 2001). Allerdings ist nicht untersucht worden, welche Promotoren in den M12-Zellen aktiv sind. Ebenso wurde bei weiteren Versuchen mit transgenen, murinen Zellen, die mit EBV infiziert wurden, eine Expression von EBNA1 gefunden, aber auch hier wurde nicht

analysiert, welche der Promotoren aktiv waren (Ahearn et al., 1988, Kearns-Jonkers et al., 1997).

Keine Forschergruppe konnte bisher eine Expression von EBNA2 oder EBNA3 in murinen Zellen zeigen. In allen untersuchten, EBV-positiven, murinen Zellen liegt eine Latenz I oder II vor (Haan et al., 2001, Ahearn et al., 1988, Kearns-Jonkers et al., 1997). In diesen Latenzstadien wird EBNA1 hauptsächlich von dem Promotor Qp und nicht von den Promotoren Wp bzw. Cp aus exprimiert. Eine Analyse der Qp-Aktivität in den EBV-positiven ES-Zellen konnte ich nicht durchführen, da EBNA1 in den Zellen chromosomal integriert ist. Die Expression von EBNA1 führt zur Unterdrückung der Qp-Aktivität (Tao et al., 1998). Da der Prozess dosisabhängig ist (Tsai et al., 1995), kann bei einer Überexpression des Proteins das Aktivitätsniveau des Promotors unter ein messbares Niveau fallen. Eine physiologische Expression von endogenem EBNA1 unterdrückt Qp dagegen nur moderat (Schaefer et al., 1997).

## **5.2. *In vitro* B-Zell-Differenzierung EBV-positiver ES-Zellen**

Neben der Charakterisierung EBV-positiver ES-Zellen wurden diese auch *in vitro* zu B-Zellen differenziert. Sowohl Maxi-EBV- als auch Mini-EBV-tragende ES-Zellen konnten in dem Differenzierungsassay zu reifen B-Zellen differenziert werden. Dabei wurden undifferenzierte ES-Zellen auf einer Zellschicht aus OP9-Zellen kultiviert. Im Gegensatz zu dem normalen Kulturmedium für ES-Zellen enthält das Differenzierungsmedium kein LIF, da dieses Cytokin einer Differenzierung entgegenwirken würde.

Die morphologischen Veränderungen der ES-Zellen während des Differenzierungsprozesses sind bemerkenswert. Initial beginnen die Kolonien der ES-Zellen in Einzelzellen zu zerfallen. Es bilden sich neben mesodermalen Geweben auch Vorläuferzellen mit hämatopoetischem Potential aus, deren Bildung durch die Zugabe des Zytokins FLT3L unterstützt wird. Die Vorläuferzellen wandern unter die OP9-Zellschicht und bilden so genannte „cobblestones“ aus (engl. für Kopfsteinpflaster). Die unreifen B-Zellen, die sich aus diesen Strukturen entwickeln, reifen im Überstand des Differenzierungsassays zu reifen B-Zellen heran. Diese Zellen sind durch die Oberflächenmarker CD19, B220, IgM und IgD gekennzeichnet.

Neben den EBV-Plasmid tragenden Zellen wurden auch die Ursprungszell-Linie Bruce4 EBNA1 C1 und die ES-Zell-Linie EB5 erfolgreich differenziert. Alle eingesetzten Zell-Linien konnten zu reifen B-Zellen differenziert werden, was durch eine FACS-Analyse gezeigt wer-

den konnte. Es zeigten sich keine auffälligen Unterschiede im zeitlichen Ablauf oder der phänotypische Ausprägung der Differenzierung zwischen den verschiedenen ES-Zell-Linien.

Die Reproduzierbarkeit der Differenzierungsansätze war allerdings unbefriedigend, da nicht alle Klone einer bestimmten ES-Zell-Linie erfolgreich differenziert werden konnten. Von der ES-Zell-Linie Bruce4 EBNA1 3314 konnte z. B. nur Klon A4 zu reifen B-Zellen differenziert werden. Dies deckt sich mit Erfahrungen anderer Gruppen, die sich mit der ES-Zell-Differenzierung beschäftigen. Diese haben ebenfalls beobachtet, dass nicht jeder ES-Zell-Klon die Fähigkeit hat, zu B-Zellen zu differenzieren. Nur etwa zwei aus zehn Klonen können zu reifen B-Zellen differenziert werden (T. Schröder, persönliche Kommunikation), wobei die Ursachen für das unterschiedliche Verhalten der Klone nicht bekannt sind. Ein wichtiger Parameter, um ES-Zellen erfolgreich zu B-Zellen zu differenzieren, ist sicherlich der Zustand der verwendeten Zellen. Eine nicht optimale Kultur der ES-Zellen kann zu einer Selektion von sehr gut proliferierenden Zellen führen, die aber die Fähigkeit verloren haben, zu verschiedenen Geweben zu differenzieren. Diese behalten einen undifferenzierten Phänotyp auch in Abwesenheit von LIF im Medium bei.

Generell wird die Differenzierung von vielen Parametern beeinflusst, die nur bedingt bekannt sind und verändert werden können. Dazu gehören die Variabilität der OP9-Kultur, die Zusammensetzung des Differenzierungsmediums, der zeitliche Ablauf der Experimente sowie die Entwicklung bestimmter Zelltypen in einem Differenzierungsansatz

Die Kultur der OP9-Stromazellen beeinflusst den Differenzierungsassay. Diese Zellen haben neben der Fähigkeit die Differenzierung von murinen ES-Zellen zu unterstützen auch die Eigenschaft zu Adipozyten zu differenzieren, was durch die Entstehung von Fett-Tröpfchen in den Zellen charakterisiert ist (Wolins et al., 2006). Diese Zellen unterstützen eine Differenzierung der ES-Zellen nicht mehr, so dass der Prozentsatz fetthaltiger OP9-Zellen 10 % nicht überschreiten sollte (C. Hömig, persönliche Kommunikation). Allerdings können sich die OP9-Zellen unter bestimmten Kulturbedingungen auch zu einem schnell wachsenden, Fibroblasten-ähnlichen Phänotyp hin verändern. Auch dieser Zelltyp behindert die Differenzierung von ES-Zellen (T. Schröder, persönliche Kommunikation).

Neben den eingesetzten Zellen ist auch die Zusammensetzung des Differenzierungsmediums entscheidend. Das Medium enthält z. B. 10 % FCS. Empirische Versuche haben gezeigt, dass nicht alle Seren in dem Differenzierungsassay eingesetzt werden können, da sich deutliche Unterschiede bei der Effizienz der Differenzierung gezeigt haben. Dies könnte auf unterschiedliche Konzentrationen der im Serum vorhandenen Wachstumsfaktoren hindeuten.

Auch der zeitliche Ablauf des Experiments beeinflusst die Entwicklung der B-Zellen. So entwickeln sich z. B. zwischen Tag 5 und Tag 8 des Differenzierungsansatzes Vorläuferzellen mit hämatopoetischem Potential, die sich für eine kurze Zeitspanne im Überstand des Mediums befinden. In diesem Zeitfenster müssen die Zellen auf eine neue OP9-Zellschicht überführt werden, um sich dort unter der Zellschicht einnisten zu können. Im Überstand befinden sich neben diesen Vorläuferzellen noch weitere Zelltypen, die nicht zu B-Zellen differenzieren und phänotypisch nicht von den Vorläuferzellen zu unterscheiden sind. Erfolgt das Umsetzen der im Überstand befindlichen Zellen zu früh, haften die Vorläuferzellen noch an der OP9-Zellschicht, erfolgt es zu spät, sind die Vorläufer schon dabei unter die Zellschicht zu wandern. In beiden Fällen werden die für die Differenzierung benötigten Zellen nicht in die neue Zellkulturschale transferiert.

Erschwerend kommt hinzu, dass in einer Kultur von ES-Zellen neben undifferenzierten Zellen auch immer ein gewisser Prozentsatz bereits differenzierter Zellen vorhanden ist. An Tag 0 der Differenzierung befinden sich die ES-Zellen also nicht alle im undifferenzierten Zustand, was dazu führt, dass die Entwicklung zu hämatopoetischen Vorläuferzellen zeitlich leicht unterschiedlich abläuft. Dies erschwert die Definition des günstigsten Transferszeitpunkts in eine neue Zellkulturschale erheblich.

Auch die Entwicklung anderer, z. B. mesodermaler, gewebeartige Zellverbände aus den ES-Zellen beeinflusst die Differenzierung zu B-Zellen entscheidend. Diese mesodermalen Zellen verdrängen durch starke Proliferation die OP9-Zellschicht, die für die Bildung von „cobblestones“ essentiell ist, und überwachsen sogar schon gebildete „cobblestones“, wodurch die Differenzierung zu B-Zellen ebenfalls negativ beeinflusst wird. Zwar sollten mit dem Überführen der im Überstand befindlichen Zellen an Tag 8 der Differenzierung mesodermale Gewebe und undifferenzierte ES-Zell-Kolonien abgetrennt werden, aber es ist nicht immer zu verhindern, dass Teile dieser Zellverbände mit in die neue Zellkulturschale transferiert werden und durch ihr Wachstum große Bereiche einnehmen.

Ein weiteres Problem sind die geringen B-Zell-Zahlen, die aus den Differenzierungsansätzen gewonnen werden können, was die anschließende Analyse des Zellen erheblich erschwert. Von den analysierten Zellen besteht nur ein kleiner Prozentsatz aus reifen B-Zellen (1 % - 6 %, vgl. Abschnitt 4.4.1). Um gezielt diese *in vitro* differenzierten B-Zellen zu untersuchen, mussten sie von den restlichen Zellen getrennt werden. Dazu wurden die Zellen mit dem „Magnetic Cell Sorting“ (MACS)-System fraktioniert und die Genexpression der IgM<sup>+</sup> bzw. der IgM-Fraktion untersucht. Dabei gehen verfahrensbedingt nochmals Zellen verloren.

Aufgrund all dieser technischen Probleme konnte nur eine beschränkte Anzahl von Analysen durchgeführt werden. Die Untersuchung der Genexpression von EBV-Genen mit RT-PCR bzw. Realtime-PCR ergab, dass sowohl IgM<sup>+</sup>-Zellen mit dem Mini-EBV- als auch mit dem Maxi-EBV-Plasmid eine Expression der Gene LMP1 und LMP2A zeigten. Eine Expression von EBNA2 konnte auch hier nicht nachgewiesen werden. Dieses Expressionsmuster entspricht dem der in die Differenzierung eingesetzten ES-Zellen. Der Übergang von undifferenzierten ES-Zellen zu differenzierten B-Zellen ändert das Expressionsmuster der drei Gene in den Zellen nicht. So scheint bei der Genexpression von EBV der Unterschied Mensch-Maus mehr ins Gewicht zu fallen als die Unterschiede zwischen B-Zellen und ES-Zellen.

Ein weiterer Grund, warum keine EBNA2-positiven B-Zellen detektiert wurden, könnte in einer möglichen Interferenz von EBNA2 mit dem Notch-Signaling in der B-Zell-Entwicklung liegen. EBNA2 kann als biologisches Äquivalent zu einem aktivierten Notch-Rezeptor fungieren (Zimber-Strobl et al., 2001). Von Notch1 ist bekannt, dass eine Expression in hämatopoetischen Vorläuferzellen die frühe B-Zell-Entwicklung blockiert (Pui et al., 1999). Es besteht die Möglichkeit, dass es während der *in vitro* Differenzierung zu einer negativen Selektion EBNA2-positiver Zellen kommt.

Eine Untersuchung der Promotoren-Aktivität in den *in vitro* differenzierten Zellen war aufgrund des geringen Analysematerials nicht möglich, doch lässt die Untersuchung der mRNA-Transkripte in den ES-Zellen den Schluß zu, dass es bei der Expression der EBNA2 in den murinen Zellen zu einer grundlegenden Störung der mRNA-Prozessierung kommt. Dies wirkt sich vermutlich unabhängig von dem Zelltyp auf die Expression der EBNA-Gene von den Promotoren Cp und Wp aus. Auch eine Steigerung der Effizienz des Differenzierungsassays, die zu einer größeren Anzahl reifer B-Zellen in den Ansätzen führen würde, dürfte dieses Problem nicht lösen.

Durch das Fehlen des EBNA2-Genprodukts liegt in den murinen B-Zellen ein Expressionsmuster vor, das Latenz II genannt wird. Es ist durch die Expression der Gene EBNA1, LMP1 und LMP2 sowie der EBER-Transkripte charakterisiert und wird in Zellen von Hodgkin-Lymphomen und undifferenzierten Nasopharynxkarzinomen gefunden. EBNA2 ist für die Wachstumstransformation von primären, humanen B-Zellen essentiell und ohne dieses Genprodukt entstehen *in vitro* keine LCLs (Kieff und Rickinson, 2001, Cohen et al., 1989, Hammerschmidt und Sugden, 1989). Das bedeutet, dass aus den *in vitro* differenzierten, murinen B-Zellen keine LCLs auswachsen werden, was die Möglichkeit einschränkt diese Zellen als Modellsystem für EBV zu verwenden. Die Lebensdauer der reifen B-Zellen in dem Diffe-

renzierungsansatz ist sehr kurz und eine Proliferation dieser Zellen findet *in vitro* nicht statt. Damit ist das durch die *in vitro* Differenzierung gewonnene Material stark limitiert, was eine weitergehende Untersuchung der naiven oder reifen, EBV-positiven B-Zellen nahezu unmöglich macht.

Um eine Bestätigung des Expressionsmusters von EBV in den murinen B-Zellen zu erhalten, wurde versucht, primäre, murine B-Zellen, die aus der Milz von Mäusen isoliert wurden, mit EBV-Plasmiden zu transfizieren (Daten nicht gezeigt). Da die Effizienz, mit der DNA in primäre B-Zellen elektroporiert werden kann, äußerst gering ist (W. Hammerschmidt, persönliche Kommunikation), wurde das Nukleofektionssystem von Amaxa Biosystems angewendet, das bei humanen, primären B-Zellen die Effizienz der Transfektion erheblich steigert (C. Mancao, persönliche Kommunikation). Das Nukleofektionssystem ist eine Kombination aus Elektroporation und einer Zelltyp-spezifischen Nukleofektionslösung. Da für primäre B-Zellen der Maus kein geeignetes System zur Verfügung stand, wurden die Systeme für primäre, humane B-Zellen bzw. für primäre T-Zellen der Maus verwendet. Mit dem für humane B-Zellen optimierten System konnten mit einem GFP-Kontrollplasmid (Größe 3,4 kB) keine erfolgreich transfizierten Zellen detektiert werden.

Bei dem System, das auf primäre, murine T-Zellen abgestimmt ist, konnten zwar mit einem GFP-Kontrollplasmid erfolgreich transfizierte Zellen nachgewiesen werden, aber die Effizienz war nicht ausreichend, um mit den Maxi-EBV-Plasmiden p2089 und p3053 erfolgreich zu sein. Eine Steigerung der Effizienz konnte weder durch eine Anpassung des Protokolls noch durch Verwendung einer unterstützenden Feeder-Zellschicht erreicht werden. So konnten auch keine Analysen der Genexpression EBV-positiver Zellen durchgeführt werden. Nach Auskunft von Amaxa Biosystems ist eine Effizienzsteigerung mit dem auf dem Markt befindlichen Systemen nicht möglich, da die Systeme sehr spezifisch auf die angegebenen Zelltypen abgestimmt sind. Ein für primäre B-Zellen der Maus optimiertes System ist in Vorbereitung, wird aber frühestens im Jahr 2007 auf den Markt kommen.

## 6. Zusammenfassung und Ausblick

Das Epstein-Barr Virus (EBV) steht in engem Zusammenhang mit einer Reihe lymphoproliferativer Erkrankungen, wie Hodgkin-Lymphomen, Burkitt-Lymphomen und Nasopharynxkarzinomen. Neben der Transformation primärer, humaner B-Lymphozyten, einem wertvollen *in vitro* Modellsystem, wäre es wünschenswert ein *in vivo* Modellsystem nutzen zu können, da der Beitrag der EBV-Gene zur Tumorentwicklung nur sehr eingeschränkt *in vitro* bearbeitet werden kann. Ein adäquates Tiermodell für EBV ist nicht existent. Ein möglicher Weg zur Entwicklung eines Mausmodells für EBV-assoziierte Tumoren und Veränderungen der B-Zell-Differenzierung durch EBV führt über die genetische Manipulation von embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) der Maus.

Ziel meiner Arbeit war es, die genetische Information des Epstein-Barr Virus in ES-Zellen der Maus direkt einzubringen und die Aufrechterhaltung des Gesamtgenoms zu etablieren. Die rekombinanten ES-Zellen sollten anschließend *in vitro* zu B-Zellen differenziert werden, um den transformierenden Phänotyp dieses Virus in murinen B-Zellen analysieren zu können. Neben der Untersuchung der Genexpression des Virus in den murinen Zellen, lag dabei ein Hauptaugenmerk auf der Aktivität der viralen Promotoren.

Um eine extrachromosomale Aufrechterhaltung der EBV-Plasmide in den murinen Zellen zu gewährleisten, musste neben der Selektionierbarkeit der Plasmide die Expression des EBNA1-Gens sichergestellt werden. Es ist für die Replikation und Aufrechterhaltung des episomalen EBV-Genoms wichtig und vermittelt die korrekte Segregation der Episome während der Zellteilung (Kieff und Rickinson, 2001). Dazu wurde, falls noch vorhanden, in alle verwendeten Plasmide eine G418-Resistenzkassette eingebaut. Außerdem wurde in das Genom der murinen ES-Zellen eine EBNA1-Expressionskassette in den Rosa26-Lokus integriert. Der Locus wird ubiquitär in nahezu allen Geweben der Maus exprimiert und die Inaktivierung der ROSA26-Transkripte führt zu keinem offensichtlich veränderten Phänotyp (Zambrowicz et al., 1997, Soriano et al., 1999). Alle getesteten ES-Zell-Linien exprimierten EBNA1 und zeigten keinerlei Auffälligkeiten im Vergleich zu EBNA1-negativen ES-Zellen.

Nachdem die beiden Maxi-EBV-Plasmide p3053 und p3298 sowie das Mini-EBV-Plasmid p3314 in die EBNA1-positiven ES-Zellen eingebracht waren, wurde die episodale Aufrechterhaltung der Plasmide analysiert. Die Zellen wurden mit einer „plasmid rescue“-Analyse und Gardella-Gelen untersucht und die episodale Aufrechterhaltung der EBV-Plasmide konnte bestätigt werden. Auch nach drei Wochen Kultur ohne Selektion konnten

Plasmide erfolgreich aus den ES-Zellen isoliert und mit einer „plasmid rescue“-Analyse detektiert werden. Dieses Ergebnis ist für die spätere Differenzierung der ES-Zellen zu B-Zellen wichtig, da die Differenzierung drei Wochen dauert und während dessen keine Selektion möglich ist. In ES-Zellen, in die keine EBNA1-Expressionskassette integriert wurde, konnten die EBV-Plasmide nicht erfolgreich eingebracht werden. Dies weist darauf hin, dass das Expressionsniveau von EBNA1 in diesem Fall nicht ausreichend ist, um eine episodale Aufrechterhaltung zu gewährleisten.

Eine Analyse der Genexpression EBV-positiver ES-Zell-Klone mit RT-PCR und Realtime-PCR zeigte, dass mindestens zwei EBV-Gene, LMP1 und LMP2A, in den Zellen exprimiert wurden. Eine Expression von EBNA2 konnte nicht gezeigt werden. Dieser Phänotyp entspricht einem Expressionsmuster, das als Latenz II bezeichnet wird und charakteristisch für bestimmte EBV-assoziierte Erkrankungen wie dem Hodgkin-Lymphom ist. Da keine Expression von EBNA2 nachgewiesen werden konnte, wurde die Aktivität der EBNA-spezifischen Promotoren in den ES-Zellen untersucht. Es zeigte sich, dass bei der EBNA-Transkription die Prozessierung der mRNA gestört ist und in den Zellen das Spleißen der Primärtranskripte nicht erfolgreich durchgeführt worden war. Mögliche Gründe hierfür können in der unterschiedlichen mRNA-Prozessierung der EBV-Gene in den beiden Spezies Mensch und Maus liegen, aber auch der Einfluß eines für den Virus ungewöhnlichen Zelltyps (ES-Zellen) auf das Spleißen kann nicht ausgeschlossen werden.

Neben der Charakterisierung EBV-positiver ES-Zellen wurden diese auch *in vitro* zu B-Zellen differenziert. Sowohl Maxi-EBV- als auch Mini-EBV-enthaltenden ES-Zellen konnten in dem Differenzierungsassay zu reifen B-Zellen differenziert werden. Eine anschließende Analyse der Genexpression mit RT-PCR und Realtime-PCR zeigte auch hier eine Expression von LMP1 und LMP2A, wohin gegen EBNA2 in den B-Zellen nicht vorhanden war. Ebenso wie bei den murinen ES-Zellen liegt eine Latenz II in den *in vitro* differenzierten B-Zellen vor.

Zusammen mit einer unzulänglichen Reproduzierbarkeit der Versuche und der geringen Lebensdauer der murinen B-Zellen in Kultur, schränkt es die Verwendung muriner Zellen als Modellsystem für EBV ein. Allerdings ermöglichen sowohl die EBV-positiven ES-Zellen als auch die daraus *in vitro* differenzierten B-Zellen eine Abbildung der Latenz II, was ein wichtiges Ergebnis dieser Arbeit darstellt und die Möglichkeit bietet virale Latenz II *in vitro* zu untersuchen. Dieser Phänotyp kann in primären, humanen Zellen, dem bisher genutzten *in vitro* Modellsystem, nicht dargestellt werden, da in diesen immer eine Latenz III vorliegt.

Die Ergebnisse der Versuche mit EBV-positiven, murinen ES-Zellen liefern wichtige Informationen für die Etablierung eines Mausmodells für EBV. Weitere Untersuchungen der Transkription und anschließenden mRNA-Prozessierung sind nötig, um Klarheit über die Möglichkeiten und Eigenschaften eines Mausmodellsystems zu erhalten. Besonders wünschenswert wäre eine Analyse der Promotorenaktivität in den *in vitro* differenzierten B-Zellen. Dazu ist es unabdingbar, die Reproduzierbarkeit und die Ausbeute der Differenzierungsansätze zu verbessern. Eine zusätzliche Möglichkeit die mRNA-Prozessierung in murinen B-Zellen zu untersuchen, wäre die Verwendung primärer, muriner B-Zellen. Durch innovative Entwicklungen auf dem Gebiet der Transfektion, z. B. durch Amaxa Biosystems, mag es in den nächsten Jahren möglich sein, primäre B-Zellen der Maus effizient zu transfizieren und das Bild, das sich in den murinen ES- bzw. B-Zellen in dieser Arbeit gezeigt hat, abzurunden.

.

## 7. Anhang

### 7.1. Abbildungsverzeichnis

**Abb 3.1:** Die Zeitlinie der in vitro B-Zell-Differenzierung

**Abb. 4.1:** Plasmidkarte des Maxi-EBV-Plasmids p2089

**Abb. 4.2:** Klonierungsstrategie zur Integration einer Neomycinresistenz-Kassette in das Rückgrat des Mini-EBV-Plasmids p2801

**Abb. 4.3:** Restriktionsanalyse der Plasmide p2801, p3307 und p3314 mit dem Restriktionsenzym XhoI

**Abb. 4.4:** Aufbau der EBNA1-Expressionskassette des Plasmids p3032

**Abb. 4.5:** Integration einer EBNA1-Expressionskassette in den Rosa26-Lokus der Maus

**Abb. 4.6:** Southernblot-Analyse von Bruce4 stop EBNA1 Zellen

**Abb. 4.7:** Southernblot von Bruce4 EBNA1 Zellen nach Deletion der Stopp-Kassette durch Cre-Rekombinase

**Abb. 4.8:** EBNA1-Expression in Bruce4 EBNA1 ES-Zellen nach Deletion der Stopp-Kassette

**Abb. 4.9:** Plasmidkarte des Maxi-EBV-Plasmids p3053

**Abb. 4.10:** Plasmidkarte des Maxi-EBV-Plasmids p3298

**Abb. 4.11:** Plasmidkarte des Mini-EBV-Plasmids p3314

**Abb. 4.12:** ES-Zellen, die das Maxi-EBV-Plasmid p3053 oder p3298 tragen, exprimieren GFP

**Abb. 4.13:** Expression der Gene Nanog und mOct4 in EBV-tragenden ES-Zellen

**Abb. 4.14:** Gardella-Gele der ES Zellen, die das Maxi-EBV-Plasmid p3053 oder p3298 bzw. das Mini-EBV-Plasmid p3314 enthalten

**Abb. 4.15:** „plasmid rescue“-Experiment mit der ES-Zell-Linie Bruce4 EBNA1 3314 D5, die mit und ohne Neomycin für drei Wochen kultiviert wurde

**Abb. 4.16:** Westernblot-Analyse der EBV-enthaltenden ES-Zell-Linie Bruce4 EBNA1 3314

**Abb. 4.17:** Expression von EBV-Genen in den mit EBV-transfizierten ES-Zell-Linien

**Abb. 4.18:** Nachweis der Aktivität des Cp Promotors mit RT-PCR in den mit EBV-transfizierten ES-Zell-Linien

**Abb. 4.19:** Nachweis der Aktivität des Wp Promotors mit RT-PCR in den mit EBV-transfizierten ES-Zell-Linien

**Abb. 4.20:** Schematische Darstellung der Sequenzanalyse der amplifizierten Wp-RT-PCR-Banden

**Abb. 4.21:** Durch die beginnende Differenzierung zerfallen die ES-Zell-Kolonien in Einzel-

zellen

**Abb. 4.22:** An Tag 8 der Differenzierung befinden sich die Vorläuferzellen im Überstand

**Abb. 4.23:** Die Bildung von „cobblestones“ ist die Voraussetzung für eine B-Zelldifferenzierung *in vitro*

**Abb. 4.24:** Die bei der Differenzierung entstehenden mesodermalen Gewebe beeinflussen die B-Zell-Entwicklung

**Abb. 4.25:** FACS-Analyse der aus der ES-Zell-Linie EB5 differenzierten Zellen

**Abb. 4.26:** FACS-Analyse der differenzierten Zellen, die aus der ES-Zell-Linie Bruce4 EBNA1 C1 entstanden

**Abb. 4.27:** Die differenzierten Zellen, die sich aus der ES-Zell-Linie Bruce4 EBNA1 3314 A4 entwickelten, wurden mit dem FACS-Gerät analysiert

**Abb. 4.28:** FACS-Analyse der aus der ES-Zell-Linie Bruce4 EBNA1 3053 P1 differenzierten Zellen

**Abb. 4.29:** Expression von EBV-Genen in den aus der ES-Zell-Linie Bruce4 EBNA1 3314 A4 differenzierten Zellen

**Abb. 4.30:** Expression von EBV-Genen in den aus der ES-Zell-Linie Bruce4 EBNA1 3053 P1 differenzierten Zellen

## 7.2. Abkürzungen

Abb.	Abbildung	FACS	Fluoreszenz-assoziierte Durchfluss Zytometrie
AIDS	„acquired immunodeficiency syndrome“	FCS	„fetal calf serum“
amp <sup>R</sup>	Ampizilinresistenz	FITC	„fluorescein isothiocyanate“
A-MuLV	Abelson Murine Leukemia Virus	FLP	Resolvase Flip
APC	„allophycocyanin“	FLT3-L	„fms-related tyrosine kinase 3 ligand“
<b>BL</b>	Burkit-Lymphom	FRT	Bindungsstellen für Resolvase Flip
bp	Basenpaar (e)	FSC	„forward scatter“
bpA	Polyadenylierungssignalsequenz	<b>GAPDH</b>	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
cam <sup>R</sup>	Chloramphenicolresistenz	GFP	grün fluoreszierendes Protein
CD	„cluster of differentiation“	gp	Glykoprotein
cDNA	„copy DNA“	<b>HIV</b>	„human immunodeficiency virus“
<b>DMEM</b>	„Dulbecco's Modified Eagle Medium“	HL	Hodgkin-Lymphom
DMSO	Dimethylsulfoxid	HLA	humanes Leukozytenantigen
DNA	Desoxyribonukleinsäure	HPRT	„hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase“
DTT	Dithiothreitol	HRP	„horseradish peroxidase“
<b>EBER</b>	„EBV expressed RNA“	hyg <sup>R</sup>	Hygromycinresistenz
EBNA	„EBV-nuclear-antigen“	<b>ICAM-1</b>	„intercellular adhesion molecule-1“
EBV	Epstein-Barr Virus	ICM	innere Zellmasse
E. coli	Escherichia coli	Ig	Immunoglobulin
Erk	„erk-related tyrosine kinase“	IL	Interleukin
ES-Zellen	Embryonale Stammzellen	IM	infektiöse Mononukleose

<b>Jak</b>	Janus-Tyrosinkinase	<b>TNF-R</b>	„tumor necrosis factor receptor“TR
<b>JNK</b>	c-Jun-Kinase	<b>TRIS</b>	terminale Repeats
<b>kb</b>	Kilobase	<b>tRNA</b>	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
<b>KSHV</b>	Karposi-Sarkom-assoziiertes	<b>Upm</b>	„transfer RNA“
<b>Herpesvirus</b>		<b>WT</b>	Umdrehungen pro Minute
<b>LCL</b>	Lymphoblastoide Zell-Linie		Wildtyp
<b>LCV</b>	Lymphokryptoviren		
<b>LIF</b>	Leukämie inhibierender Faktor		
<b>LIFR</b>	LIF-Rezeptor		
<b>LMP</b>	latentes Membranprotein		
<b>LPD</b>	Lymphoproliferativen Erkrankungen		
<b>LPS</b>	Lipopolysaccharid		
<b>MACS</b>	„Magnetic Cell Sorting“		
<b>MAPK</b>	Mitogen-aktivierte-Proteinkinase		
<b>M-CSF factor“</b>	„macrophage colony-stimulating		
<b>MHC</b>	„major histocompatibility complex“		
<b>MHV-68</b>	murines Gammaherpesvirus-68		
<b>mRNA</b>	„messenger RNA“		
<b>Neo</b>	Neomycin		
<b>neo<sup>R</sup></b>	Neomycinresistenz		
<b>NF-κB</b>	„nuclear factor-κB“		
<b>NOD</b>	„nonobese diabetic“		
<b>NPK</b>	Nasopharynxkarzinom		
<b>NTP</b>	Nukleosidtriphosphate		
<b>Oct4</b>	„octamer factor 4“		
<b>ORC</b>	„origin recognition complex“		
<b>parA</b>	ProteinA		
<b>parB</b>	ProteinB		
<b>PBMC</b>	periphere, mononukleare Blutzellen		
<b>PBS</b>	„phosphate buffered saline“		
<b>PCR</b>	Polymerasekettenreaktion („polymerase chain reaction“)		
<b>PE</b>	„phycoerythrin“		
<b>PerCP</b>	„peridinin chlorophyll protein“		
<b>PGK</b>	Phosphoglyceratkinase		
<b>POU</b>	„Pit-Oct-Unc“		
<b>RBP-Jκ</b>	Recombining binding protein suppressor of hairless		
<b>RFP</b>	rotes fluoreszierendes Protein		
<b>rfsF</b>	Resolvase-Bindungsstelle		
<b>RNA</b>	Ribonukleinsäure		
<b>rRNA</b>	„ribosomal RNA“		
<b>RT-PCR</b>	Reverse-Transkriptase-PCR		
<b>SCF</b>	„stem cell factor“		
<b>SCID</b>	„severe combined immunodeficient“		
<b>SDS</b>	Natriumdodecylsulfat		
<b>SSC</b>	„sideward scatter“		
<b>SSEA-1</b>	„stage-specific embryonic antigen 1“		
<b>Stat</b>	Signaltransduktions-aktivierter Transkriptionsfaktor		
<b>TEMED</b>	Tetramethyldiamin		

## 8. Literatur

- Abbot,S.D., Rowe,M., Cadwallader,K., Ricksten,A., Gordon,J., Wang,F., Rymo,L., and Rickinson,A.B. (1990). Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 induces expression of the virus-encoded latent membrane protein. *J. Virol.* *64*, 2126-2134.
- Ahearn,J.M., Hayward,S.D., Hickey,J.C., and Fearon,D.T. (1988). Epstein-Barr virus (EBV) infection of murine L cells expressing recombinant human EBV/C3d receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* *85*, 9307-9311.
- Aiyar,A., Tyree,C., and Sugden,B. (1998). The plasmid replicon of EBV consists of multiple cis-acting elements that facilitate DNA synthesis by the cell and a viral maintenance element. *Embo J* *17*, 6394-403.
- Allday,M.J., Crawford,D.H., and Thomas,J.A. (1993). Epstein-Barr virus (EBV) nuclear antigen 6 induces expression of the EBV latent membrane protein and an activated phenotype in Raji cells. *J. Gen. Virol.* *74* ( Pt 3), 361-369.
- Altmann,M., Pich,D., Ruiss,R., Wang,J., Sugden,B., and Hammerschmidt,W. (2006). Transcriptional activation by EBV nuclear antigen 1 is essential for the expression of EBV's transforming genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *103*, 14188-14193.
- Anagnostopoulos,I., Herbst,H., Niedobitek,G., and Stein,H. (1989). Demonstration of monoclonal EBV genomes in Hodgkin's disease and Ki-1-positive anaplastic large cell lymphoma by combined Southern blot and in situ hybridization. *Blood* *74*, 810-6.
- Armstrong,R.W., Imrey,P.B., Lye,M.S., Armstrong,M.J., Yu,M.C., and Sani,S. (1998). Nasopharyngeal carcinoma in Malaysian Chinese: salted fish and other dietary exposures. *Int J Cancer* *77*, 228-35.
- Babcock,G.J., Decker,L.L., Volk,M., and Thorley-Lawson,D.A. (1998). EBV persistence in memory B cells in vivo. *Immunity* *9*, 395-404.
- Babcock,G.J., Hochberg,D., and Thorley-Lawson,A.D. (2000). 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.
- Baer,R., Bankier,A.T., Biggin,M.D., Deininger,P.L., Farrell,P.J., Gibson,T.J., Hatfull,G., Hudson,G.S., Satchwell,S.C., Seguin,C., and et al. (1984). DNA sequence and expression of the B95-8 Epstein-Barr virus genome. *Nature* *310*,207-11.
- Black,J., and Vos,J.M. (2002). Establishment of an oriP/EBNA1-based episomal vector transcribing human genomic beta-globin in cultured murine fibroblasts. *Gene Ther* *9*, 1447-54.
- Blake,N.W., Moghaddam,A., Rao,P., Kaur,A., Glickman,R., Cho,Y.G., Marchini,A., Haigh,T., Johnson,R.P., Rickinson,A.B., and Wang,F. (1999). Inhibition of antigen presentation by the glycine/alanine repeat domain is not conserved in simian homologues of Epstein-Barr virus nuclear antigen 1. *J Virol* *73*, 7381-9.
- Blaskovic,D., Stancekova,M., Svobodova,J., and Mistrikova,J. (1980). Isolation of five strains of herpesviruses from two species of free living small rodents. *Acta Virol* *24*, 468.

- Boiani,M., and Scholer,H.R. (2005). Developmental cell biology: Regulatory networks in embryo-derived pluripotent stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 872-84.
- Bornkamm,G.W., and Hammerschmidt,W. (2001). Molecular virology of Epstein-Barr virus. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 356, 437-59.
- Brook,F.A., and Gardner,R.L. (1997). The origin and efficient derivation of embryonic stem cells in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 5709-12.
- Burkitt,D., and O'Connor,G.T. (1961). Malignant lymphoma in African children. I. A clinical syndrome. *Cancer* 14, 258-69.
- Bustin,S.A. (2000). Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* 25, 169-93.
- Calender,A., Billaud,M., Aubry,J.P., Banchereau,J., Vuillaume,M., and Lenoir,G.M. (1987). Epstein-Barr virus (EBV) induces expression of B-cell activation markers on in vitro infection of EBV-negative B-lymphoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 84, 8060-8064.
- Cardin,R.D., Brooks,J.W., Sarawar,S.R., and Doherty,P.C. (1996). Progressive loss of CD8+ T cell-mediated control of a gamma-herpesvirus in the absence of CD4+ T cells. *J Exp Med* 184, 863-71.
- Chambers,I., Colby,D., Robertson,M., Nichols,J., Lee,S., Tweedie,S., and Smith,A. (2003). Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell* 113, 643-55.
- Cho,S.K., Webber,T.D., Carlyle,J.R., Nakano,T., Lewis,S.M., and Zuniga-Pflucker,J.C. (1999a). Functional characterization of B lymphocytes generated in vitro from embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 9797-802.
- Cho,Y., Ramer,J., Rivaller,P., Quink,C., Garber,R.L., Beier,D.R., and Wang,F. (2001). An Epstein-Barr-related herpesvirus from marmoset lymphomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 1224-9.
- Cho,Y.G., Gordadze,A.V., Ling,P.D., and Wang,F. (1999b). Evolution of two types of rhesus lymphocryptovirus similar to type 1 and type 2 Epstein-Barr virus. *J Virol* 73, 9206-12.
- Chung,C.T., Niemela,S.L., and Miller,R.H. (1989). One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 86, 2172-2175.
- Church,G.M., and Gilbert,W. (1984). Genomic sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 81, 1991-1995.
- Cleary,M.L., Epstein,M.A., Finerty,S., Dorfman,R.F., Bornkamm,G.W., Kirkwood,J.K., Morgan,A.J., and Sklar,J. (1985). Individual tumors of multifocal EB virus-induced malignant lymphomas in tamarins arise from different B-cell clones. *Science* 228, 722-4.
- Cohen,J.I. (2000). Epstein-Barr virus infection. *N. Engl. J. Med.* 343, 481-492.
- Cohen,J.I., Wang,F., Mannick,J., and Kieff,E. (1989). Epstein-Barr virus nuclear protein 2 is a key determinant of lymphocyte transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 86, 9558-9562.

- Craig,F.E., Gulley,M.L., and Banks,P.M. (1993). Posttransplantation lymphoproliferative disorders. *Am. J. Clin. Pathol.* 99, 265-276.
- Crawford,D.H. (2001). Biology and disease associations of Epstein-Barr virus. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 356, 461-73.
- de Thoisy,B., Pouliquen,J.F., Lacoste,V., Gessain,A., and Kazanji,M. (2003). Novel gamma-1 herpesviruses identified in free-ranging new world monkeys (golden-handed tamarin [*Saguinus midas*], squirrel monkey [*Saimiri sciureus*], and white-faced saki [*Pithecia pithecia*]) in French Guiana. *J Virol* 77, 9099-105.
- Deacon,E.M., Pallesen,G., Niedobitek,G., Crocker,J., Brooks,L., Rickinson,A.B., and Young,L.S. (1993). Epstein-Barr virus and Hodgkin's disease: transcriptional analysis of virus latency in the malignant cells. *J Exp Med* 177, 339-49.
- Delecluse,H.J., Hilsendegen,T., Pich,D., Zeidler,R., and Hammerschmidt,W. (1998). Propagation and recovery of intact, infectious Epstein-Barr virus from prokaryotic to human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 8245-50.
- Dirmeier,U., Hoffmann,R., Kilger,E., Schultheiss,U., Briseno,C., Gires,O., Kieser,A., Eick,D., Sugden,B., and Hammerschmidt,W. (2005). Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus coordinately regulates proliferation with control of apoptosis. *Oncogene* 24, 1711-1717.
- Doetschman,T.C., Eistetter,H., Katz,M., Schmidt,W., and Kemler,R. (1985). The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. *J Embryol Exp Morphol* 87, 27-45.
- Dogherty,P., Einarson,T., Koren,G., and Sher,G. (1997). The effectiveness of deferiprone in thalassemia. *Blood* 90, 894.
- Dunkel,V.C., Pry,T.W., Henle,G., and Henle,W. (1972). Immunofluorescence tests for antibodies to Epstein-Barr virus with sera of lower primates. *J Natl Cancer Inst* 49, 435-40.
- Dupre,L., Andolfi,G., Tangye,S.G., Clementi,R., Locatelli,F., Arico,M., Aiuti,A., and Roncarolo,M.G. (2005). SAP controls the cytolytic activity of CD8+ T cells against EBV-infected cells. *Blood* 105, 4383-4389.
- Efstathiou,S., Ho,Y.M., and Minson,A.C. (1990). Cloning and molecular characterization of the murine herpesvirus 68 genome. *J Gen Virol* 71 ( Pt 6), 1355-64.
- Ehtisham,S., Sunil-Chandra,N.P., and Nash,A.A. (1993). Pathogenesis of murine gammaherpesvirus infection in mice deficient in CD4 and CD8 T cells. *J Virol* 67, 5247-52.
- Eliopoulos,A.G., Caamano,J.H., Flavell,J., Reynolds,G.M., Murray,P.G., Poyet,J.L., and Young,L.S. (2003). Epstein-Barr virus-encoded latent infection membrane protein 1 regulates the processing of p100 NF-kappaB2 to p52 via an IKKgamma/NEMO-independent signalling pathway. *Oncogene* 22, 7557-7569.
- Eliopoulos,A.G., Gallagher,N.J., Blake,S.M., Dawson,C.W., and Young,L.S. (1999). Activation of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway by Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1 coregulates interleukin-6 and interleukin-8 production. *J. Biol. Chem.* 274, 16085-16096.

- Eliopoulos,A.G., Stack,M., Dawson,C.W., Kaye,K.M., Hodgkin,L., Sihota,S., Rowe,M., and Young,L.S. (1997). Epstein-Barr virus-encoded LMP1 and CD40 mediate IL-6 production in epithelial cells via an NF-kappaB pathway involving TNF receptor-associated factors. *Oncogene 14*, 2899-2916.
- Epstein,M.A. (1976). Epstein-Barr virus--is it time to develop a vaccine program? *J Natl Cancer Inst 56*, 697-700.
- Epstein,M.A., Achong,B.G., and Barr,Y.M. (1964). Virus Particles in Cultured Lymphoblasts from Burkitt's Lymphoma. *Lancet 15*, 702-3.
- Epstein,M.A., Morgan,A.J., Finerty,S., Randle,B.J., and Kirkwood,J.K. (1985). Protection of cottontop tamarins against Epstein-Barr virus-induced malignant lymphoma by a prototype subunit vaccine. *Nature 318*, 287-9.
- Farrell,P.J., Rowe,D.T., Rooney,C.M., and Kouzarides,T. (1989). Epstein-Barr virus BZLF1 trans-activator specifically binds to a consensus AP-1 site and is related to c-fos. *EMBO J. 8*, 127-132.
- Feinberg,A.P., and Vogelstein,B. (1983). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem. 132*, 6-13.
- Fingerroth,J.D., Heath,M.E., and Ambrosino,D.M. (1989). Proliferation of resting B cells is modulated by CR2 and CR1. *Immunol. Lett. 21*, 291-301.
- Frank,A., Andiman,W.A., and Miller,G. (1976). Epstein-Barr virus and nonhuman primates: natural and experimental infection. *Adv Cancer Res 23*, 171-201.
- Franken,M., Devergne,O., Rosenzweig,M., Annis,B., Kieff,E., and Wang,F. (1996). Comparative analysis identifies conserved tumor necrosis factor receptor-associated factor 3 binding sites in the human and simian Epstein-Barr virus oncogene LMP1. *J Virol 70*, 7819-26.
- Freter,C.E. (1990). Acquired immunodeficiency syndrome-associated lymphomas. *J. Natl. Cancer Inst. Monogr 45-54*.
- Gaidano,G., Ballerini,P., Gong,J.Z., Inghirami,G., Neri,A., Newcomb,E.W., Magrath,I.T., Knowles,D.M., and la-Favera,R. (1991). p53 mutations in human lymphoid malignancies: association with Burkitt lymphoma and chronic lymphocytic leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 88*, 5413-5417.
- Gangappa,S., Kapadia,S.B., Speck,S.H., and Virgin,H.W.t. (2002). Antibody to a lytic cycle viral protein decreases gammaherpesvirus latency in B-cell-deficient mice. *J Virol 76*, 11460-8.
- Gires,O., Kohlhuber,F., Kilger,E., Baumann,M., Kieser,A., Kaiser,C., Zeidler,R., Scheffer,B., Ueffing,M., and Hammerschmidt,W. (1999). Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus interacts with JAK3 and activates STAT proteins. *EMBO J. 18*, 3064-3073.
- Gires,O., Zimmer-Strobl,U., Gonnella,R., Ueffing,M., Marschall,G., Zeidler,R., Pich,D., and Hammerschmidt,W. (1997). Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus mimics a constitutively active receptor molecule. *EMBO J. 16*, 6131-6140.

Goff,S.P., Tabin,C.J., Wang,J.Y., Weinberg,R., and Baltimore,D. (1982). Transfection of fibroblasts by cloned Abelson murine leukemia virus DNA and recovery of transmissible virus by recombination with helper virus. *J. Virol.* *41*, 271-285.

Goldman,J.P., Blundell,M.P., Lopes,L., Kinnon,C., Di Santo,J.P., and Thrasher,A.J. (1998). Enhanced human cell engraftment in mice deficient in RAG2 and the common cytokine receptor gamma chain. *Br J Haematol* *103*, 335-42.

Goldman,M., Landon,J.C., and Reisher,J.I. (1968). Fluorescent antibody and gel diffusion reactions of human and chimpanzee sera with cells cultured from Burkitt tumors and normal chimpanzee blood. *Cancer Res* *28*, 2489-95.

Gratama,J.W., Zutter,M.M., Minarovits,J., Oosterveer,M.A., Thomas,E.D., Klein,G., and Ernberg,I. (1991). Expression of Epstein-Barr virus-encoded growth-transformation-associated proteins in lymphoproliferations of bone-marrow transplant recipients. *Int. J. Cancer* *47*, 188-192.

Gregory,C.D., Rowe,M., and Rickinson,A.B. (1990). Different Epstein-Barr virus-B cell interactions in phenotypically distinct clones of a Burkitt's lymphoma cell line. *J Gen Virol* *71* ( Pt 7), 1481-95.

Grossman,S.R., Johannsen,E., Tong,X., Yalamanchili,R., and Kieff,E. (1994). The Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 transactivator is directed to response elements by the J kappa recombination signal binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *91*, 7568-7572.

Grundhoff,A., and Ganem,D. (2004). Inefficient establishment of KSHV latency suggests an additional role for continued lytic replication in Kaposi sarcoma pathogenesis. *J Clin Invest* *113*, 124-36.

Gutierrez-Ramos,J.C., and Palacios,R. (1992). In vitro differentiation of embryonic stem cells into lymphocyte precursors able to generate T and B lymphocytes in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* *89*, 9171-5.

Haan,K.M., Aiyar,A., and Longnecker,R. (2001). Establishment of latent Epstein-Barr virus infection and stable episomal maintenance in murine B-cell lines. *J Virol* *75*, 3016-20.

Hammerschmidt,W., and Sugden,B. (1989). Genetic analysis of immortalizing functions of Epstein-Barr virus in human B lymphocytes. *Nature* *340*, 393-397.

Hart,A.H., Hartley,L., Ibrahim,M., and Robb,L. (2004). Identification, cloning and expression analysis of the pluripotency promoting Nanog genes in mouse and human. *Dev Dyn* *230*, 187-98.

Hatzubai,A., Anafi,M., Masucci,M.G., Dillner,J., Lerner,R.A., Klein,G., and Sulitzeanu,D. (1987). Down-regulation of the EBV-encoded membrane protein (LMP) in Burkitt lymphomas. *Int J Cancer* *40*, 358-64.

Hayashi,K., Teramoto,N., and Akagi,T. (2002). Animal in vivo models of EBV-associated lymphoproliferative diseases: special references to rabbit models. *Histol. Histopathol.* *17*, 1293-1310.

- Henderson, J.K., Draper, J.S., Baillie, H.S., Fishel, S., Thomson, J.A., Moore, H., and Andrews, P.W. (2002). Preimplantation human embryos and embryonic stem cells show comparable expression of stage-specific embryonic antigens. *Stem Cells* 20, 329-37.
- Henderson, S., Rowe, M., Gregory, C., Croom-Carter, D., Wang, F., Longnecker, R., Kieff, E., and Rickinson, A. (1991). Induction of bcl-2 expression by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 protects infected B cells from programmed cell death. *Cell* 65, 1107-1115.
- Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P.S., and Griffith, R. (1992). Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N. Y.)* 10, 413-417.
- Holmes, D.S., and Quigley, M. (1981). A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal. Biochem.* 114, 193-197.
- Huen, D.S., Henderson, S.A., Croom-Carter, D., and Rowe, M. (1995). The Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 (LMP1) mediates activation of NF-kappa B and cell surface phenotype via two effector regions in its carboxy-terminal cytoplasmic domain. *Oncogene* 10, 549-560.
- Huertas, D., Howe, S., McGuigan, A., and Huxley, C. (2000). Expression of the human CFTR gene from episomal oriP-EBNA1-YACs in mouse cells. *Hum Mol Genet* 9, 617-29.
- Humme, S., Reisbach, G., Feederle, R., Delecluse, H.J., Bousset, K., Hammerschmidt, W., and Schepers, A. (2003). The EBV nuclear antigen 1 (EBNA1) enhances B cell immortalization several thousandfold. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100, 10989-10994.
- Hummeler, K., Henle, G., and Henle, W. (1966). Fine structure of a virus in cultured lymphoblasts from Burkitt lymphoma. *J. Bacteriol.* 91, 1366-1368.
- Islas-Ohlmayer, M., Padgett-Thomas, A., Domiati-Saad, R., Melkus, M.W., Cravens, P.D., Martin Mdel, P., Netto, G., and Garcia, J.V. (2004). Experimental infection of NOD/SCID mice reconstituted with human CD34+ cells with Epstein-Barr virus. *J Virol* 78, 13891-900.
- Janz, A., Oezel, M., Kurzeder, C., Mautner, J., Pich, D., Kost, M., Hammerschmidt, W., and Delecluse, H.J. (2000). Infectious Epstein-Barr virus lacking major glycoprotein BLLF1 (gp350/220) demonstrates the existence of additional viral ligands. *J. Virol.* 74, 10142-10152.
- Jenson, H.B., Ench, Y., Gao, S.J., Rice, K., Carey, D., Kennedy, R.C., Arrand, J.R., and Mackett, M. (2000). Epidemiology of herpesvirus papio infection in a large captive baboon colony: similarities to Epstein-Barr virus infection in humans. *J Infect Dis* 181, 1462-6.
- Jiang, H., Cho, Y.G., and Wang, F. (2000). Structural, functional, and genetic comparisons of Epstein-Barr virus nuclear antigen 3A, 3B, and 3C homologues encoded by the rhesus lymphocryptovirus. *J Virol* 74, 5921-32.
- Jin, X.W., and Speck, S.H. (1992). Identification of critical cis elements involved in mediating Epstein-Barr virus nuclear antigen 2-dependent activity of an enhancer located upstream of the viral BamHI C promoter. *J. Virol.* 66, 2846-2852.
- Johannessen, I., and Crawford, D.H. (1999). In vivo models for Epstein-Barr virus (EBV)-associated B cell lymphoproliferative disease (BLPD). *Rev. Med. Virol.* 9, 263-277.

- Kang, M.S., Lu, H., Yasui, T., Sharpe, A., Warren, H., Cahir-McFarland, E., Bronson, R., Hung, S.C., and Kieff, E. (2005). Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 does not induce lymphoma in transgenic FVB mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 820-5.
- Kaye, K.M., Izumi, K.M., and Kieff, E. (1993). Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 is essential for B-lymphocyte growth transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 90, 9150-9154.
- Kearns-Jonker, M., Monell-Torrens, E., Abbasi, F., Holers, V.M., Notkins, A.L., and Sigounas, G. (1997). EBV binds to lymphocytes of transgenic mice that express the human CR2 gene. *Virus Res* 50, 85-94.
- Kelleher, Z.T., Fu, H., Livanos, E., Wendelburg, B., Gulino, S., and Vos, J.M. (1998). Epstein-Barr-based episomal chromosomes shuttle 100 kb of self-replicating circular human DNA in mouse cells. *Nat Biotechnol* 16, 762-8.
- Kempkes, B., Pich, D., Zeidler, R., Sugden, B., and Hammerschmidt, W. (1995). Immortalization of human B lymphocytes by a plasmid containing 71 kilobase pairs of Epstein-Barr virus DNA. *J Virol* 69, 231-8.
- Kerr, B.M., Lear, A.L., Rowe, M., Croom-Carter, D., Young, L.S., Rookes, S.M., Gallimore, P.H., and Rickinson, A.B. (1992). Three transcriptionally distinct forms of Epstein-Barr virus latency in somatic cell hybrids: cell phenotype dependence of virus promoter usage. *Virology* 187, 189-201.
- Kieser, A., Kaiser, C., and Hammerschmidt, W. (1999). LMP1 signal transduction differs substantially from TNF receptor 1 signaling in the molecular functions of TRADD and TRAF2. *EMBO J.* 18, 2511-2521.
- Kieser, A., Kilger, E., Gires, O., Ueffing, M., Kolch, W., and Hammerschmidt, W. (1997). Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 triggers AP-1 activity via the c-Jun N-terminal kinase cascade. *EMBO J.* 16, 6478-6485.
- Kontgen, F., Suss, G., Stewart, C., Steinmetz, M., and Bluethmann, H. (1993). Targeted disruption of the MHC class II Aa gene in C57BL/6 mice. *Int Immunol* 5, 957-64.
- Krysan, P.J., and Calos, M.P. (1993). Epstein-Barr virus-based vectors that replicate in rodent cells. *Gene* 136, 137-43.
- Kulwichit, W., Edwards, R.H., Davenport, E.M., Baskar, J.F., Godfrey, V., and Raab-Traub, N. (1998). Expression of the Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 induces B cell lymphoma in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95, 11963-11968.
- Kurth, J., Spieker, T., Wustrow, J., Strickler, G.J., Hansmann, L.M., Rajewsky, K., and Kuppers, R. (2000). EBV-infected B cells in infectious mononucleosis: viral strategies for spreading in the B cell compartment and establishing latency. *Immunity*. 13, 485-495.
- Kvell, K., Balogh, P., and Nemeth, P. (2000). Fine-tuning the EBV+ hu-PBL-SCID xenogeneic chimera model using in vivo superinfection. *Pathol Oncol Res* 6, 280-6.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

- Lemischka,I.R., and Pritsker,M. (2006). Alternative splicing increases complexity of stem cell transcriptome. *Cell Cycle* 5, 347-351.
- Levine,P.H., Leiseca,S.A., Hewetson,J.F., Traul,K.A., Andrese,A.P., Granlund,D.J., Fabrizio,P., and Stevens,D.A. (1980). Infection of rhesus monkeys and chimpanzees with Epstein-Barr virus. *Arch Virol* 66, 341-51.
- Levitskaya,J., Coram,M., Levitsky,V., Imreh,S., Steigerwald-Mullen,P.M., Klein,G., Kurilla,M.G., and Masucci,M.G. (1995). Inhibition of antigen processing by the internal repeat region of the Epstein-Barr virus nuclear antigen-1. *Nature* 375, 685-688.
- Levitskaya,J., Sharipo,A., Leonchiks,A., Ciechanover,A., and Masucci,M.G. (1997). Inhibition of ubiquitin/proteasome-dependent protein degradation by the Gly-Ala repeat domain of the Epstein-Barr virus nuclear antigen 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94, 12616-12621.
- MacMahon,B. (1966). Epidemiology of Hodgkin's disease. *Cancer Res* 26, 1189-201.
- Mancao,C., Altmann,M., Jungnickel,B., and Hammerschmidt,W. (2005). Rescue of "crippled" germinal center B cells from apoptosis by Epstein-Barr virus. *Blood* 106, 4339-44.
- Mao,X., Fujiwara,Y., Chapdelaine,A., Yang,H., and Orkin,S.H. (2001). Activation of EGFP expression by Cre-mediated excision in a new ROSA26 reporter mouse strain. *Blood* 97, 324-6.
- Marafioti,T., Pozzobon,M., Hansmann,M.L., Gaulard,P., Barth,T.F., Copie-Bergman,C., Robertson,H., Ventura,R., Martin-Subero,J.I., Gascoyne,R.D., Pileri,S.A., Siebert,R., Hsi,E.D., Natkunam,Y., Moller,P., and Mason,D.Y. (2005). Expression pattern of intracellular leukocyte-associated proteins in primary mediastinal B cell lymphoma. *Leukemia* 19, 856-861.
- Margolskee,R.F., Kavathas,P., and Berg,P. (1988). Epstein-Barr virus shuttle vector for stable episomal replication of cDNA expression libraries in human cells. *Mol. Cell Biol.* 8, 2837-2847.
- Matsuda,T., Nakamura,T., Nakao,K., Arai,T., Katsuki,M., Heike,T., and Yokota,T. (1999). STAT3 activation is sufficient to maintain an undifferentiated state of mouse embryonic stem cells. *Embo J* 18, 4261-9.
- Mazda,O., Satoh,E., Yasutomi,K., and Imanishi,J. (1997). Extremely efficient gene transfection into lympho-hematopoietic cell lines by Epstein-Barr virus-based vectors. *J. Immunol. Methods* 204, 143-151.
- Mazurier,F., Fontanellas,A., Salesse,S., Taine,L., Landriau,S., Moreau-Gaudry,F., Reiffers,J., Peault,B., Di Santo,J.P., and de Verneuil,H. (1999). A novel immunodeficient mouse model--RAG2 x common cytokine receptor gamma chain double mutants--requiring exogenous cytokine administration for human hematopoietic stem cell engraftment. *J Interferon Cytokine Res* 19, 533-41.
- Miller,G., Shope,T., Lisco,H., Stitt,D., and Lipman,M. (1972). Epstein-Barr virus: transformation, cytopathic changes, and viral antigens in squirrel monkey and marmoset leukocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 69, 383-387.

- Mitsui,K., Tokuzawa,Y., Itoh,H., Segawa,K., Murakami,M., Takahashi,K., Maruyama,M., Maeda,M., and Yamanaka,S. (2003). The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell* 113, 631-42.
- Mizuguchi,H., Hosono,T., and Hayakawa,T. (2000). Long-term replication of Epstein-Barr virus-derived episomal vectors in the rodent cells. *FEBS Lett* 472, 173-8.
- Moghaddam,A., Rosenzweig,M., Lee-Parritz,D., Annis,B., Johnson,R.P., and Wang,F. (1997). An animal model for acute and persistent Epstein-Barr virus infection. *Science* 276, 2030-3.
- Mosier,D.E., Gulizia,R.J., Baird,S.M., and Wilson,D.B. (1988). Transfer of a functional human immune system to mice with severe combined immunodeficiency. *Nature* 335, 256-259.
- Murphy,W.J., Taub,D.D., and Longo,D.L. (1996). The huPBL-SCID mouse as a means to examine human immune function in vivo. *Semin Immunol* 8, 233-41.
- Nakanishi,H., Mazda,O., Satoh,E., Asada,H., Morioka,H., Kishida,T., Nakao,M., Mizutani,Y., Kawachi,A., Kita,M., Imanishi,J., and Miki,T. (2003). Nonviral genetic transfer of Fas ligand induced significant growth suppression and apoptotic tumor cell death in prostate cancer in vivo. *Gene Ther.* 10, 434-442.
- Nakano,T., Kodama,H., and Honjo,T. (1994). Generation of lymphohematopoietic cells from embryonic stem cells in culture. *Science* 265, 1098-101.
- Namikawa,R., Muench,M.O., de Vries,J.E., and Roncarolo,M.G. (1996). The FLK2/FLT3 ligand synergizes with interleukin-7 in promoting stromal-cell-independent expansion and differentiation of human fetal pro-B cells in vitro. *Blood* 87, 1881-1890.
- Nichols,J., Evans,E.P., and Smith,A.G. (1990). Establishment of germ-line-competent embryonic stem (ES) cells using differentiation inhibiting activity. *Development* 110, 1341-8.
- Niedobitek,G., Agathangelou,A., Finerty,S., Tierney,R., Watkins,P., Jones,E.L., Morgan,A., Young,L.S., and Rooney,N. (1994). Latent Epstein-Barr virus infection in cottontop tamarins. A possible model for Epstein-Barr virus infection in humans. *Am J Pathol* 145, 969-78.
- Niedobitek,G., Meru,N., and Delecluse,H.J. (2001). Epstein-Barr virus infection and human malignancies. *Int. J. Exp. Pathol.* 82, 149-170.
- Niwa,H. (2001). Molecular mechanism to maintain stem cell renewal of ES cells. *Cell Struct Funct* 26, 137-48.
- Niwa,H., Miyazaki,J., and Smith,A.G. (2000). Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet* 24, 372-6.
- Nonkwelo,C., Skinner,J., Bell,A., Rickinson,A., and Sample,J. (1996). Transcription start sites downstream of the Epstein-Barr virus (EBV) Fp promoter in early-passage Burkitt lymphoma cells define a fourth promoter for expression of the EBV EBNA-1 protein. *J Virol* 70, 623-7.
- Old,L.J., Boyse,E.A., Oettgen,H.F., Harven,E.D., Geering,G., Williamson,B., and Clifford,P. (1966). Precipitating Antibody in Human Serum to an Antigen Present in Cultured Burkitt's Lymphoma Cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 56, 1699-1704.

- Peng,R., Gordadze,A.V., Fuentes Panana,E.M., Wang,F., Zong,J., Hayward,G.S., Tan,J., and Ling,P.D. (2000). Sequence and functional analysis of EBNA-LP and EBNA2 proteins from nonhuman primate lymphocryptoviruses. *J Virol* 74, 379-89.
- Pesce,M., Gross,M.K., and Scholer,H.R. (1998). In line with our ancestors: Oct-4 and the mammalian germ. *Bioessays* 20, 722-32.
- Pui,J.C., Allman,D., Xu,L., DeRocco,S., Karnell,F.G., Bakkour,S., Lee,J.Y., Kadesch,T., Hardy,R.R., Aster,J.C., and Pear,W.S. (1999). Notch1 expression in early lymphopoiesis influences B versus T lineage determination. *Immunity*. 11, 299-308.
- PULVERTAFT,J.V. (1964). CYTOLOGY OF BURKITT'S TUMOUR (AFRICAN LYMPHOMA). *Lancet* 39, 238-240.
- Purtilo,D.T., Cassel,C.K., Yang,J.P., and Harper,R. (1975). X-linked recessive progressive combined variable immunodeficiency (Duncan's disease). *Lancet* 1, 935-940.
- Raab-Traub,N., and Flynn,K. (1986). The structure of the termini of the Epstein-Barr virus as a marker of clonal cellular proliferation. *Cell* 47, 883-9.
- Rao,P., Jiang,H., and Wang,F. (2000). Cloning of the rhesus lymphocryptovirus viral capsid antigen and Epstein-Barr virus-encoded small RNA homologues and use in diagnosis of acute and persistent infections. *J Clin Microbiol* 38, 3219-25.
- Raz,R., Lee,C.K., Cannizzaro,L.A., d'Eustachio,P., and Levy,D.E. (1999). Essential role of STAT3 for embryonic stem cell pluripotency. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 2846-51.
- Ren,C., Zhao,M., Yang,X., Li,D., Jiang,X., Wang,L., Shan,W., Yang,H., Zhou,L., Zhou,W., and Zhang,H. (2006). Establishment and Applications of Epstein-Barr Virus-based Episomal Vectors in Human Embryonic Stem Cells. *Stem Cells*, 1338-47.
- Rivailler,P., Carville,A., Kaur,A., Rao,P., Quink,C., Kutok,J.L., Westmoreland,S., Klumpp,S., Simon,M., Aster,J.C., and Wang,F. (2004). Experimental rhesus lymphocryptovirus infection in immunosuppressed macaques: an animal model for Epstein-Barr virus pathogenesis in the immunosuppressed host. *Blood* 104, 1482-9.
- Rivailler,P., Jiang,H., Cho,Y.G., Quink,C., and Wang,F. (2002). Complete nucleotide sequence of the rhesus lymphocryptovirus: genetic validation for an Epstein-Barr virus animal model. *J Virol* 76, 421-6.
- Rivailler,P., Quink,C., and Wang,F. (1999). Strong selective pressure for evolution of an Epstein-Barr virus LMP2B homologue in the rhesus lymphocryptovirus. *J Virol* 73, 8867-72.
- Robertson,E.S., Grossman,S., Johannsen,E., Miller,C., Lin,J., Tomkinson,B., and Kieff,E. (1995). Epstein-Barr virus nuclear protein 3C modulates transcription through interaction with the sequence-specific DNA-binding protein J kappa. *J. Virol.* 69, 3108-3116.
- Robertson,E.S., Lin,J., and Kieff,E. (1996). The amino-terminal domains of Epstein-Barr virus nuclear proteins 3A, 3B, and 3C interact with RBPJ(kappa). *J. Virol.* 70, 3068-3074.
- Rowe,D.T. (1999). Epstein-Barr virus immortalization and latency. *Front Biosci* 4, 346-71.

- Rowe,M., Khanna,R., Jacob,C.A., Argaet,V., Kelly,A., Powis,S., Belich,M., Croom-Carter,D., Lee,S., Burrows,S.R., and . (1995). Restoration of endogenous antigen processing in Burkitt's lymphoma cells by Epstein-Barr virus latent membrane protein-1: coordinate up-regulation of peptide transporters and HLA-class I antigen expression. *Eur. J. Immunol.* 25, 1374-1384.
- Schaefer,B.C., Strominger,J.L., and Speck,S.H. (1997). Host-cell-determined methylation of specific Epstein-Barr virus promoters regulates the choice between distinct viral latency programs. *Mol Cell Biol* 17, 364-77.
- Schepers,A., Pich,D., Mankertz,J., and Hammerschmidt,W. (1993). cis-acting elements in the lytic origin of DNA replication of Epstein-Barr virus. *J Virol* 67, 4237-45.
- Schepers,A., Ritzi,M., Bousset,K., Kremmer,E., Yates,J.L., Harwood,J., Diffley,J.F., and Hammerschmidt,W. (2001). Human origin recognition complex binds to the region of the latent origin of DNA replication of Epstein-Barr virus. *Embo J* 20, 4588-602.
- Schlager,S., Speck,S.H., and Woisetschlager,M. (1996). Transcription of the Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 (EBNA1) gene occurs before induction of the BCR2 (Cp) EBNA gene promoter during the initial stages of infection in B cells. *J Virol* 70, 3561-70.
- Silins,S.L., and Sculley,T.B. (1994). Modulation of vimentin, the CD40 activation antigen and Burkitt's lymphoma antigen (CD77) by the Epstein-Barr virus nuclear antigen EBNA-4. *Virology* 202, 16-24.
- Simas,J.P., and Efstathiou,S. (1998). Murine gammaherpesvirus 68: a model for the study of gammaherpesvirus pathogenesis. *Trends Microbiol* 6, 276-82.
- Soriano,P. (1999). Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain. *Nat Genet* 21, 70-1.
- Southern,E.M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98, 503-517.
- Stevenson,P.G., Belz,G.T., Altman,J.D., and Doherty,P.C. (1999). Changing patterns of dominance in the CD8+ T cell response during acute and persistent murine gamma-herpesvirus infection. *Eur J Immunol* 29, 1059-67.
- Stevenson,P.G., and Efstathiou,S. (2005). Immune mechanisms in murine gammaherpesvirus-68 infection. *Viral Immunol* 18, 445-56.
- Stewart,J.P., Usherwood,E.J., Ross,A., Dyson,H., and Nash,T. (1998). Lung epithelial cells are a major site of murine gammaherpesvirus persistence. *J Exp Med* 187, 1941-51.
- Sung,N.S., Kenney,S., Gutsch,D., and Pagano,J.S. (1991). EBNA-2 transactivates a lymphoid-specific enhancer in the BamHI C promoter of Epstein-Barr virus. *J. Virol.* 65, 2164-2169.
- Sunil-Chandra,N.P., Arno,J., Fazakerley,J., and Nash,A.A. (1994). Lymphoproliferative disease in mice infected with murine gammaherpesvirus 68. *Am J Pathol* 145, 818-26.
- Sunil-Chandra,N.P., Efstathiou,S., and Nash,A.A. (1992). Murine gammaherpesvirus 68 establishes a latent infection in mouse B lymphocytes in vivo. *J Gen Virol* 73 ( Pt 12), 3275-9.

- Taga, T., and Kishimoto, T. (1997). Gp130 and the interleukin-6 family of cytokines. *Annu Rev Immunol* *15*, 797-819.
- Tao, Q., Robertson, K.D., Manns, A., Hildesheim, A., and Ambinder, R.F. (1998). The Epstein-Barr virus major latent promoter Qp is constitutively active, hypomethylated, and methylation sensitive. *J Virol* *72*, 7075-83.
- Thanaraj, T.A., Clark, F., and Muilu, J. (2003). Conservation of human alternative splice events in mouse. *Nucleic Acids Res.* *31*, 2544-2552.
- Thomas, J.A., Cotter, F., Hanby, A.M., Long, L.Q., Morgan, P.R., Bramble, B., and Bailey, B.M. (1993). Epstein-Barr virus-related oral T-cell lymphoma associated with human immunodeficiency virus immunosuppression. *Blood* *81*, 3350-3356.
- Thompson, M.P., and Kurzrock, R. (2004). Epstein-Barr virus and cancer. *Clin Cancer Res* *10*, 803-21.
- Thomsen, M., Yacoub-Youssef, H., and Marcheix, B. (2005). Reconstitution of a human immune system in immunodeficient mice: models of human alloreaction in vivo. *Tissue Antigens* *66*, 73-82.
- Thorley-Lawson, D.A. (2001). Epstein-Barr virus: exploiting the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* *1*, 75-82.
- Thorley-Lawson, D.A., and Mann, K.P. (1985). Early events in Epstein-Barr virus infection provide a model for B cell activation. *J Exp Med* *162*, 45-59.
- Traggiai, E., Chicha, L., Mazzucchelli, L., Bronz, L., Piffaretti, J.C., Lanzavecchia, A., and Manz, M.G. (2004). Development of a human adaptive immune system in cord blood cell-transplanted mice. *Science* *304*, 104-7.
- Tripp, R.A., Hamilton-Easton, A.M., Cardin, R.D., Nguyen, P., Behm, F.G., Woodland, D.L., Doherty, P.C., and Blackman, M.A. (1997). Pathogenesis of an infectious mononucleosis-like disease induced by a murine gamma-herpesvirus: role for a viral superantigen? *J Exp Med* *185*, 1641-50.
- Tsai, C.N., Liu, S.T., and Chang, Y.S. (1995). Identification of a novel promoter located within the Bam HI Q region of the Epstein-Barr virus genome for the EBNA 1 gene. *DNA Cell Biol.* *14*, 767-776.
- Usherwood, E.J., Stewart, J.P., Robertson, K., Allen, D.J., and Nash, A.A. (1996). Absence of splenic latency in murine gammaherpesvirus 68-infected B cell-deficient mice. *J Gen Virol* *77* (Pt 11), 2819-25.
- Veiby, O.P., Lyman, S.D., and Jacobsen, S.E. (1996). Combined signaling through interleukin-7 receptors and flt3 but not c-kit potently and selectively promotes B-cell commitment and differentiation from uncommitted murine bone marrow progenitor cells. *Blood* *88*, 1256-1265.
- Virgin, H.W.t., Latreille, P., Wamsley, P., Hallsworth, K., Weck, K.E., Dal Canto, A.J., and Speck, S.H. (1997). Complete sequence and genomic analysis of murine gammaherpesvirus 68. *J Virol* *71*, 5894-904.

- Wang,D., Liebowitz,D., and Kieff,E. (1985). An EBV membrane protein expressed in immortalized lymphocytes transforms established rodent cells. *Cell* 43, 831-840.
- Wang,F., Gregory,C., Sample,C., Rowe,M., Liebowitz,D., Murray,R., Rickinson,A., and Kieff,E. (1990). Epstein-Barr virus latent membrane protein (LMP1) and nuclear proteins 2 and 3C are effectors of phenotypic changes in B lymphocytes: EBNA-2 and LMP1 cooperatively induce CD23. *J. Virol.* 64, 2309-2318.
- Wang,F., Rivaller,P., Rao,P., and Cho,Y. (2001). Simian homologues of Epstein-Barr virus. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 356, 489-97.
- Wang,S.H., Tsai,M.S., Chiang,M.F., and Li,H. (2003). A novel NK-type homeobox gene, ENK (early embryo specific NK), preferentially expressed in embryonic stem cells. *Gene Expr Patterns* 3, 99-103.
- Weck,K.E., Barkon,M.L., Yoo,L.I., Speck,S.H., and Virgin,H.I. (1996). Mature B cells are required for acute splenic infection, but not for establishment of latency, by murine gammaherpesvirus 68. *J Virol* 70, 6775-80.
- Wedderburn,N., Edwards,J.M., Desgranges,C., Fontaine,C., Cohen,B., and de The,G. (1984). Infectious mononucleosis-like response in common marmosets infected with Epstein-Barr virus. *J Infect Dis* 150, 878-82.
- Weiss,L.M., Strickler,J.G., Warnke,R.A., Purtilo,D.T., and Sklar,J. (1987). Epstein-Barr viral DNA in tissues of Hodgkin's disease. *Am J Pathol* 129, 86-91.
- Wendelburg,B.J., and Vos,J.M. (1998). An enhanced EBNA1 variant with reduced IR3 domain for long-term episomal maintenance and transgene expression of oriP-based plasmids in human cells. *Gene Ther.* 5, 1389-1399.
- Wiles,M.V., and Keller,G. (1991). Multiple hematopoietic lineages develop from embryonic stem (ES) cells in culture. *Development* 111, 259-67.
- Willer,D.O., and Speck,S.H. (2003). Long-term latent murine Gammaherpesvirus 68 infection is preferentially found within the surface immunoglobulin D-negative subset of splenic B cells in vivo. *J Virol* 77, 8310-21.
- Wilson,J.B., Weinberg,W., Johnson,R., Yuspa,S., and Levine,A.J. (1990). Expression of the BNLF-1 oncogene of Epstein-Barr virus in the skin of transgenic mice induces hyperplasia and aberrant expression of keratin 6. *Cell* 61, 1315-1327.
- Wobus,A.M., and Boheler,K.R. (2005). Embryonic stem cells: prospects for developmental biology and cell therapy. *Physiol Rev* 85, 635-78.
- Wolf,H., zur Hausen,H., and Becker,V. (1973). EB viral genomes in epithelial nasopharyngeal carcinoma cells. *Nat New Biol* 244, 245-7.
- Wolins,N.E., Quaynor,B.K., Skinner,J.R., Tzekov,A., Park,C., Choi,K., and Bickel,P.E. (2006). OP9 mouse stromal cells rapidly differentiate into adipocytes: characterization of a useful new model of adipogenesis. *J Lipid Res* 47, 450-60.

- Yang,L., Ikeda,H., Lai,Y., Yoshiki,T., and Takada,K. (2003). Epstein-Barr virus infection of rat lymphocytes expressing human CD21 results in restricted latent viral gene expression and not in immunoblastic transformation. *J Med Virol* 70, 126-30.
- Yang,L., Maruo,S., and Takada,K. (2000). CD21-mediated entry and stable infection by Epstein-Barr virus in canine and rat cells. *J Virol* 74, 10745-51.
- Yao,Q.Y., Rickinson,A.B., and Epstein,M.A. (1985). A re-examination of the Epstein-Barr virus carrier state in healthy seropositive individuals. *Int J Cancer* 35, 35-42.
- Yates,J., Warren,N., Reisman,D., and Sugden,B. (1984). A cis-acting element from the Epstein-Barr viral genome that permits stable replication of recombinant plasmids in latently infected cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 81, 3806-3810.
- Yates,J.L., Warren,N., and Sugden,B. (1985). Stable replication of plasmids derived from Epstein-Barr virus in various mammalian cells. *Nature* 313, 812-815.
- Yoshida,H., Hayashi,S., Kunisada,T., Ogawa,M., Nishikawa,S., Okamura,H., Sudo,T., Shultz,L.D., and Nishikawa,S. (1990). The murine mutation osteopetrosis is in the coding region of the macrophage colony stimulating factor gene. *Nature* 345, 442-4.
- Young,L.S., Finerty,S., Brooks,L., Scullion,F., Rickinson,A.B., and Morgan,A.J. (1989). Epstein-Barr virus gene expression in malignant lymphomas induced by experimental virus infection of cottontop tamarins. *J. Virol.* 63, 1967-1974.
- Young,L.S., and Murray,P.G. (2003). Epstein-Barr virus and oncogenesis: from latent genes to tumours. *Oncogene* 22, 5108-21.
- Young,L.S., and Rickinson,A.B. (2004). Epstein-Barr virus: 40 years on. *Nat Rev Cancer* 4.
- Yu,M.C., Ho,J.H., Lai,S.H., and Henderson,B.E. (1986). Cantonese-style salted fish as a cause of nasopharyngeal carcinoma: report of a case-control study in Hong Kong. *Cancer Res.* 46, 956-961.
- Zambrowicz,B.P., Imamoto,A., Fiering,S., Herzenberg,L.A., Kerr,W.G., and Soriano,P. (1997). Disruption of overlapping transcripts in the ROSA beta geo 26 gene trap strain leads to widespread expression of beta-galactosidase in mouse embryos and hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 3789-94.
- Zimber-Strobl,U., and Strobl,L.J. (2001). EBNA2 and Notch signalling in Epstein-Barr virus mediated immortalization of B lymphocytes. *Semin Cancer Biol* 11, 423-34.
- Zimber-Strobl,U., Suentzenich,K.O., Laux,G., Eick,D., Cordier,M., Calender,A., Billaud,M., Lenoir,G.M., and Bornkamm,G.W. (1991). Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 activates transcription of the terminal protein gene. *J. Virol.* 65, 415-423.
- zur Hausen,H., Schulte-Holthausen,H., Klein,G., Henle,W., Henle,G., Clifford,P., and Santesson,L. (1970). EBV DNA in biopsies of Burkitt tumours and anaplastic carcinomas of the nasopharynx. *Nature* 228, 1056-8.

## 9. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Im Besonderen bedanke ich mich bei:

Herrn Prof. Dr. Wolfgang Hammerschmidt für die interessante Themenstellung, die sehr gute Betreuung während der Doktorarbeit und die stets offene Tür.

Frau Dr. Ulla Zimmer-Strobl für die Bereitschaft meine Doktorarbeit zu betreuen, die immer gewährte Unterstützung und die vielen, guten Diskussionen.

Herrn Prof. Dr. Dirk Eick für die Bereitschaft die Aufgaben und Pflichten des offiziellen Betreuers der Arbeit zu übernehmen, seinen wissenschaftlichen Rat und für die schnelle Korrektur trotz engen Terminkalenders.

Den Mitgliedern der Abteilung Genvektoren für die sehr gute Zusammenarbeit, die praktische Unterstützung und die gute Arbeitsatmosphäre.

Den Mitgliedern des Labors von Dr. Ulla Zimmer-Strobl für die gute Einarbeitung in die ES-Zell-Kultur, die stete Hilfsbereitschaft und die interessanten Diskussionen.

Allen weiteren Kolleginnen und Kollegen des Hämatologikums für die gute Zusammenarbeit und das freundliche Arbeitsklima.

---

## 10. Lebenslauf

### Persönliche Angaben

Name: Heidrun Herrmann

Geburtsdatum: 01.01.1977

Geburtsort: München

Staatsangehörigkeit: deutsch

### Ausbildung

1987 - 1996 Gymnasium Starnberg

05/1996 Abitur

1996 - 2002 Biologie-Studium, TU München

01/2002 - 09/2002 Diplomarbeit am Lehrstuhl für Biotechnologie,  
Prof. Dr. J. Buchner, TU München

09/2002 Abschluss des Biologie-Studiums (Diplom)

2003 - 2006 Promotion in der Abteilung Genvektoren,  
Prof. Dr. W. Hammerschmidt, GSF, München