
Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Funktion früher Gene des Epstein-Barr Virus
bei der Immortalisierung
humaner primärer B-Lymphozyten**

von

Markus Altmann

aus

Gräfelfing

2003

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von §13 Absatz 3 bzw. 4 der Promotionsordnung von 29. Januar 1998 von apl. Prof. Dr. Wolfgang Hammerschmidt betreut.

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbständig und ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, 18.10.2002

(Markus Altmann)

Dissertation eingereicht am 22.10.2002

1. Gutachter apl. Prof. Dr. Wolfgang Hammerschmidt

2. Gutacher Hon.-Prof. Dr. Horst Domdey

Tag der mündlichen Prüfung: 13.02.2003

Teile dieser Arbeit wurden patentiert

**„Einsatz mutierter Erkennungssequenzen für mehrfache aufeinander folgende
Rekombinase-vermittelte Rekombinationen in einem genetischen System“**

Deutsche Patentanmeldung 101 40 030.6

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	7
1.1 Apoptose, der programmierte Selbstmord der Zelle	7
1.1.1 Mechanismen der Apoptose.....	8
1.1.2 Regulation der Apoptose durch virale Genprodukte	12
1.1.2.1 Virale Promotoren der Apoptose	12
1.1.2.2 Virale Inhibitoren der Apoptose	12
1.1.3 Die Familie der BCL-2 ähnlichen Proteine.....	15
1.1.4 Epstein-Barr Virus kodiert für zwei virale Homologe zu BCL-2	16
1.1.4.1 Das Epstein-Barr Virus.....	16
1.1.4.2 Die BCL-2 homologen Proteine im Genom von EBV	18
1.2 LMP2A als B-Zell-Rezeptor Homolog	22
1.2.1 Signaltransduktion durch den B-Zell-Rezeptor	22
1.2.2 Signaltransduktion durch LMP2A	23
1.3 Aufgabenstellung	27
2. Material	29
2.1 Antikörper	29
2.2 Bakterien	29
2.3 Oligonukleotide	30
2.4 Plasmide	32
2.5 Zelllinien	36
2.6 Chemikalien, Enzyme, Geräte und sonstiges	37
3. Methoden	40
3.1 Bakterienkultur	40
3.1.1 Vermehrung und Aufbewahrung von Bakterien.....	40
3.1.2 Transformation und Elektroporation von E.coli.....	40
3.1.3 Fermentation von E.coli	41
3.2 Zellkultur und Analyse von Zellen	42
3.2.1 Zellkulturbedingungen.....	42
3.2.2 Aufbewahrung von Zellen	43
3.2.3 Präparation primärer B-Zellen	43
3.2.4 Transfektion von Zellen und Selektion stabiler Zellklone mit Hygromycin	44
3.2.5 Produktion infektiöser Viruspartikel und Titerquantifizierung	45
3.2.6 Konzentration von Virusüberständen	45

3.2.7 Infektion von primären B-Zellen mit Maxi-EBVs zur Bestimmung der Immortalisierungseffizienz.....	46
3.2.8 Infektion von primären B-Zellen mit Maxi-EBVs für Immunfluoreszenz- oder FACS Analysen	46
3.2.9 Immunfluoreszenzanalysen.....	47
3.2.10 FACS-Analysen.....	48
3.3 DNA-Arbeitstechniken.....	49
3.3.1 Extraktion zellulärer DNA aus eukaryotischen Zellen	50
3.3.2 Schnellaufreinigung von Plasmiden mit einer Größe von bis zu 30kb	50
3.3.3 Präparative Plasmidreinigung.....	50
3.3.4 Präparation von EBV-Plasmid-DNA aus E.coli.....	51
3.3.5 Homologe Rekombination in E.coli zur Konstruktion von Maxi-EBV-Mutanten.....	51
3.3.6 Southern-Blot-Hybridisierung	52
3.3.7 Radioaktive Markierung von DNA	53
3.3.8 PCR-Analysen.....	53
3.4 RNA-Arbeitstechniken.....	57
3.4.1 Isolierung von gesamtzellulärer RNA.....	57
3.5 Proteinarbeitstechniken.....	57
3.5.1 Immunoblot Analyse.....	57
4. Ergebnisse.....	59
4.1. Herstellung rekombinanter Epstein-Barr Viren.....	60
4.1.1 Das rekombinante Maxi-EBV Plasmid p2089.....	61
4.1.2 Das Rekombinationssystem in E.coli DH10B.....	61
4.1.3 Multiple Deletionen in einem Maxi-EBV Plasmid durch ein mutiertes Cre-loxP System.....	63
4.1.3.1 Das Cre-loxP-System.....	64
4.1.3.2 loxP – Cre Rekombinase - lockP.....	65
4.1.4 Mutanten auf der Basis des Maxi-EBV Plasmids p2089.....	69
4.1.5 Etablierung stabiler, virusproduzierender, EBV-positiver HEK293 Zelllinien	76
4.1.6 Induktion des lytischen Zyklus und Bestimmung des Virustiters	77
4.2 Funktion von BALF1 und BHRF1 bei der B-Zell-Immortalisierung und der Initiation der Latenz.....	79
4.2.1 Infektion von humanen primären B-Lymphozyten mit infektiösen Maxi-EBV Partikeln.....	79
4.2.2 Proliferation/Apoptose infizierter primärer B-Lymphozyten.....	80
4.2.3 Expression sehr früher und früher Gene des EBV bei der Infektion humaner primärer B- Lymphozyten	84
4.2.4 BZLF1 Expression in infizierten primären B-Lymphozyten ist nicht hinreichend für die Induktion des lytischen Zyklus von EBV.....	87

4.2.5 Bestimmung der Immortalisierungseffizienz rekombinanter Maxi-EBVs.....	88
4.2.6 Neukonstruktion der BALF1/BHRF1 Doppeldeletionsmutante	91
4.2.7 Nachweis von BALF1 und BHRF1	93
4.2.7.1 Immunfluoreszenz gegen BHRF1 in etablierten Zelllinien	93
4.2.7.2 RT-PCR gegen BALF1 und BHRF1 in lytisch replizierenden Zellen	94
4.2.7.3 Nachweis von BALF und BHRF1 mittels „real-time“ PCR in frisch infizierten primären B-Lymphozyten	95
4.2.8 Transkomplementation der Δ BALF1/ Δ BHRF1 Doppeldeletions-mutante	97
4.3 LMP2 und die Aufrechterhaltung der Latenz.....	100
4.3.1 LMP2A induziert BZLF1, aber nicht die vollständige lytische Replikation von EBV	100
4.3.2 Bestimmung der Immortalisierungseffizienz von Δ LMP2A-EBV	102
Maxi EBV Konstrukt.....	102
4.3.3 LMP2A reguliert zelluläre Zielgene in der Zelle.....	103
4.3.3.1 Konstruktion eines induzierbaren LMP2A Expressionssystems	104
4.3.3.2 Nachweis der Induzierbarkeit von LMP2A:ProTNF α :His ₆ -tag.....	107
5. Diskussion	109
5.1 Charakterisierung der ΔBALF1- und ΔBHRF1-Maxi-EBV Deletionsmutanten	109
5.1.1 Funktion von BALF1 und BHRF1 bei der Immortalisierung primärer humaner B- Lymphozyten	109
5.1.1.1 Komplementation des immortalisierungsdefizienten Δ BALF1/ Δ BHRF1-Maxi-EBV	112
5.1.2 Expression von BZLF1 nach Infektion primärer B-Lymphozyten.....	116
5.1.3 Expression von EA-D nach Infektion primärer B-Lymphozyten.....	118
5.2 Initiation der Latenz als dritter Abschnitt im Lebenszyklus von EBV	120
5.3 LMP2A.....	123
5.3.1 Funktionen bei der Aufrechterhaltung der Latenz	123
5.3.2 Funktionen bei der Etablierung der Latenz.....	125
5.3.3 Das konditionale LMP2A Zellsystem.....	126
6. Zusammenfassung.....	128
7. Abkürzungen	130
8. Literatur.....	132
Anhang.....	152
Danksagung.....	159
Lebenslauf	160

1. Einleitung

1.1 Apoptose, der programmierte Selbstmord der Zelle

Der Abbau nicht mehr benötigter, irreversibel geschädigter, viral infizierter oder durch die Deregulierung eines Onkogens oder Tumorsuppressorgens fehlgesteuerter Zellen ist für die Entwicklung und den Fortbestand vielzelliger Organismen essentiell. Diese Eliminierung von Zellen in einem Organismus kann durch Nekrose oder durch Apoptose geschehen. Nekrotische Zerstörung von Zellen löst immer eine Entzündungsreaktion im umliegenden Gewebe und eine Antwort des Immunsystems aus. Diese Art der Eliminierung ist zeitintensiv und benötigt eine Vielzahl von unterschiedlichen Zelltypen die an den Ort der nekrotischen Zelle dirigiert werden müssen. Apoptose, der programmierte Selbstmord der Zelle, hingegen ist ein zellinnerer Prozess, der keine Entzündungsreaktion hervorruft und sehr schnell aktiviert werden kann. Der Begriff „Apoptose“ ist dem Griechischen entlehnt und bedeutet „von etwas abfallen“. Gemeint waren eigentlich die Blätter eines Baumes im Herbst (Kerr et al., 1972). Wie von Kerr et al. zum ersten Mal beschrieben, sind Apoptose und Nekrose grundsätzlich unterschiedliche Vorgänge (Kerr et al., 1972). Apoptotische und nekrotischen Zellen unterscheiden sich schon makroskopisch aufgrund morphologischer Kriterien. So kondensiert bei apoptotischen Zellen das Chromatin im Zellkern, die Plasmamembran stülpt sich an vielen Stellen aus („membrane blebbing“) und die Chromosomen zerbrechen in kleine DNA-Bruchstücke. Zuletzt bilden sich „apoptotic bodies“, kleine membranumschlossene Zellbruchstücke, die von anderen Zellen phagozytiert werden können (Vaux and Strasser, 1996; White, 1996). Die Apoptose einer Zelle kann durch eine Vielzahl von äußeren und inneren Umständen ausgelöst werden (Li and Yuan, 1999). Die Regulation innerhalb der Zelle für oder gegen die Einleitung der Apoptose ist genau kontrolliert. Dafür ist eine immer weiter wachsende Zahl von pro- und anti-apoptotischen Proteinen verantwortlich. Apoptose scheint ein in der Evolution vielzelliger Organismen bereits sehr früh entstandener Mechanismus zu sein, sich nicht mehr gewollter Zellen zu entledigen. So findet man Homologe zu pro- und anti-apoptotisch wirkenden Proteinen im Genom von Säugern, Reptilien, Drosophila und C.elegans. Die Konservierung dieses Signalwegs ist so umfassend, dass das

menschliche, anti-apoptotisch wirkende Protein BCL-2 in evolutionär weit entfernten Fadenwürmern das Fehlen seines anti-apoptotischen Proteins Ced9 komplementieren kann. Die Erforschung der Vorgänge, die zur Apoptose führen, ist wissenschaftlich von großem Interesse und eine Vielzahl von Gruppen arbeiten daran, diese besser zu verstehen.

1.1.1 Mechanismen der Apoptose

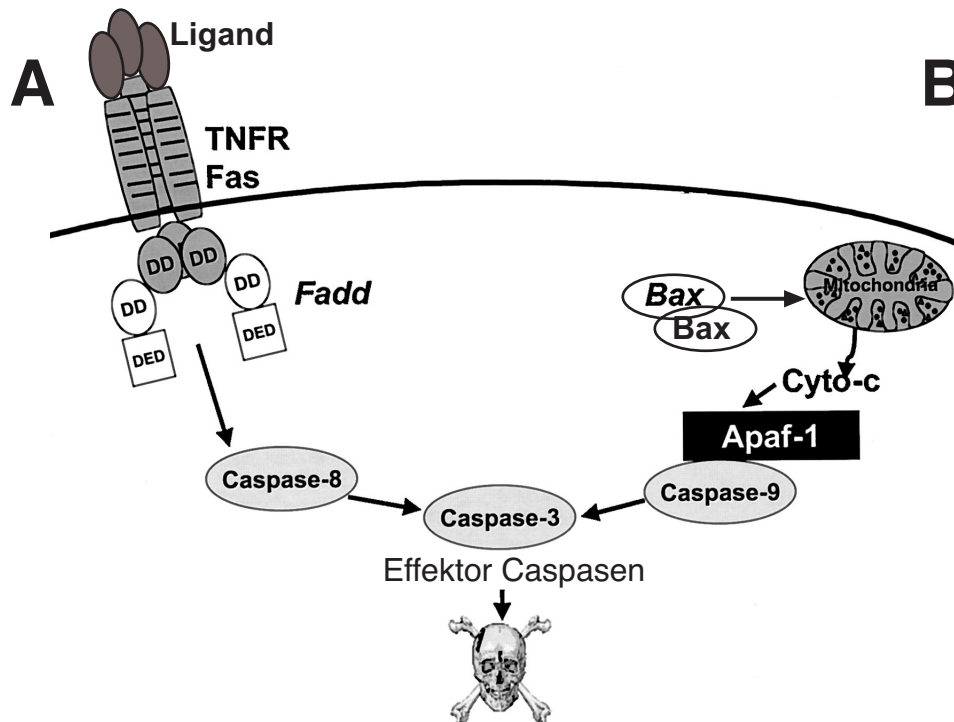


Abb.1.1: Darstellung extrinsisch und intrinsisch ausgelöster Apoptose

(A) Fas, ein Mitglied der TNF-Rezeptorfamilie (tumor-necrosis-factor) trimerisiert durch die Bindung seines Liganden und wird dadurch aktiviert. An die zytosolische „death domain“ (DD) des aktivierten Rezeptors bindet Fadd ebenso über seine DD. Die Verbindung von Fadd zu Prokaspase-8 erfolgt über gemeinsame „death effector domain“ (DED). Prokaspase-8 wird proteolytisch gespalten und löst in seiner aktiven Konformation eine Kaspasen-Kaskade aus, die zum apoptotischen Zelltod führt. Nachdem das erste Signal von außerhalb der Zelle kommt, wird dieser Weg als der extrinsische Weg der Apoptose bezeichnet.

(B) Ein apoptotischer Stimulus innerhalb der Zelle führt zur Homodimerisierung des pro-apoptotischen BCL-2 Familienmitglieds Bax. Dieser Dimer lagert sich in die äußere mitochondriale Membran ein und bewirkt die Freisetzung von Cytochrom-c aus der Atmungskette. Einmal im Zytoplasma der Zelle bindet Cytochrom-c an Apaf-1. Dieses Heterodimer bindet Prokaspase-9, das durch die Bindung seine Konformation ändert, und in seine aktive Form übergeht. Wie unter (A) beschrieben, löst auch diese nun aktive Kaspase eine Kaspasen-Kaskade aus, die zum apoptotischen Zelltod führt. Dieser Weg wird als der intrinsische Weg der Apoptose bezeichnet.

Abbildung verändert nach Reed JC, mechanisms of apoptosis (Reed, 2000)

Eine Vielzahl von Signalen kann in einer Zelle Apoptose auslösen (Li and Yuan, 1999). Aufgrund der großen Zahl an unterschiedlichen Auslösern gibt es vermutlich auch viele unterschiedliche, unmittelbar dem auslösendem Stimulus nachfolgende Signaltransduktionswege, über die die apoptotischen Signale weitergeleitet werden. Bisher sind aber nur zwei davon bis ins Detail erforscht. Ein Weg beschreibt die Aktivierung der Apoptose in der Zelle durch die Proteinfamilie der TNF-Rezeptoren („tumor necrosis factor receptor“). Die Bindung des Liganden an den Rezeptor auf der Zelloberfläche führt zur Aktivierung einer Signalkaskade im Zellinneren, die über die Aktivierung von Kaspasen die Apoptose im Zellkern auslöst (Salvesen and Dixit, 1997; Wallach et al., 1999; Yuan, 1997). Dieser Mechanismus wird als der extrinsische Weg der Apoptose bezeichnet (siehe Abb.1.1.A). Der zweite, detailliert erforschte Weg wird durch die Freisetzung von Proteinen aus den Mitochondrien eingeleitet, die die Kaspasen aktivieren (Green and Reed, 1998; Reed, 1997). Dieser Mechanismus wird als der intrinsische Weg der Apoptose bezeichnet (siehe Abb.1.1.B).

Vom einleitenden apoptotischen Stimulus bis zur Exekution der Zelle sind eine Vielzahl von zellulären Proteinfamilien beteiligt, die mit der Regulation der Apoptose eng in Verbindung gebracht werden. Anhand von Effektordomänen mit gleichen Aminosäuresequenzen oder strukturalen Ähnlichkeiten, über die die Interaktionen zwischen Proteinen dieser Familien stattfinden, lassen sich diese Proteine in Gruppen einteilen. Zu diesen Effektordomänen zählt man „caspase-associated recruitment domains“ (CARDs), „death domains“ (DDs), „death effector domains“ (DEDs), „BCL-2 homology“ (BH) Domänen, „nucleotide binding oligomerisation“ Domänen der CED4-Apaf1 Proteinfamilie (NB-ARC) und „baculovirus inhibitor of apoptosis proteins“ (IAPs). Der extrinsische Signalweg wird zum Beispiel durch Fas, ein Mitglied der TNFR Familie, durch Ligandenbindung aktiviert. Aktiviertes Fas rekrutiert sodann Fadd über dessen „death domain“ an die eigene DD. Nachfolgend bindet Fadd über seine „death effector domain“ Prokaspase-8, die ebenso eine „death effector domain“ besitzt (Reed, 2000) (siehe Abb. 1.1.A). Analog dazu bindet das Protein Raid über eine CARD Domäne an Prokaspase-8, statt über eine DED Domäne (Ahmad et al., 1997; Duan and Dixit, 1997). Prokaspase-8 wird nach der Bindung proteolytisch gespalten und dadurch aktiviert. Kaspase-8 löst eine

Kaspasen-Kaskade aus, die die Apoptose vollendet. Der intrinsische Signalweg der Apoptose wird durch Mitglieder der BCL-2 Familie gesteuert. Es sind sowohl pro- als auch anti-apoptotische Proteine in dieser Familie vertreten.

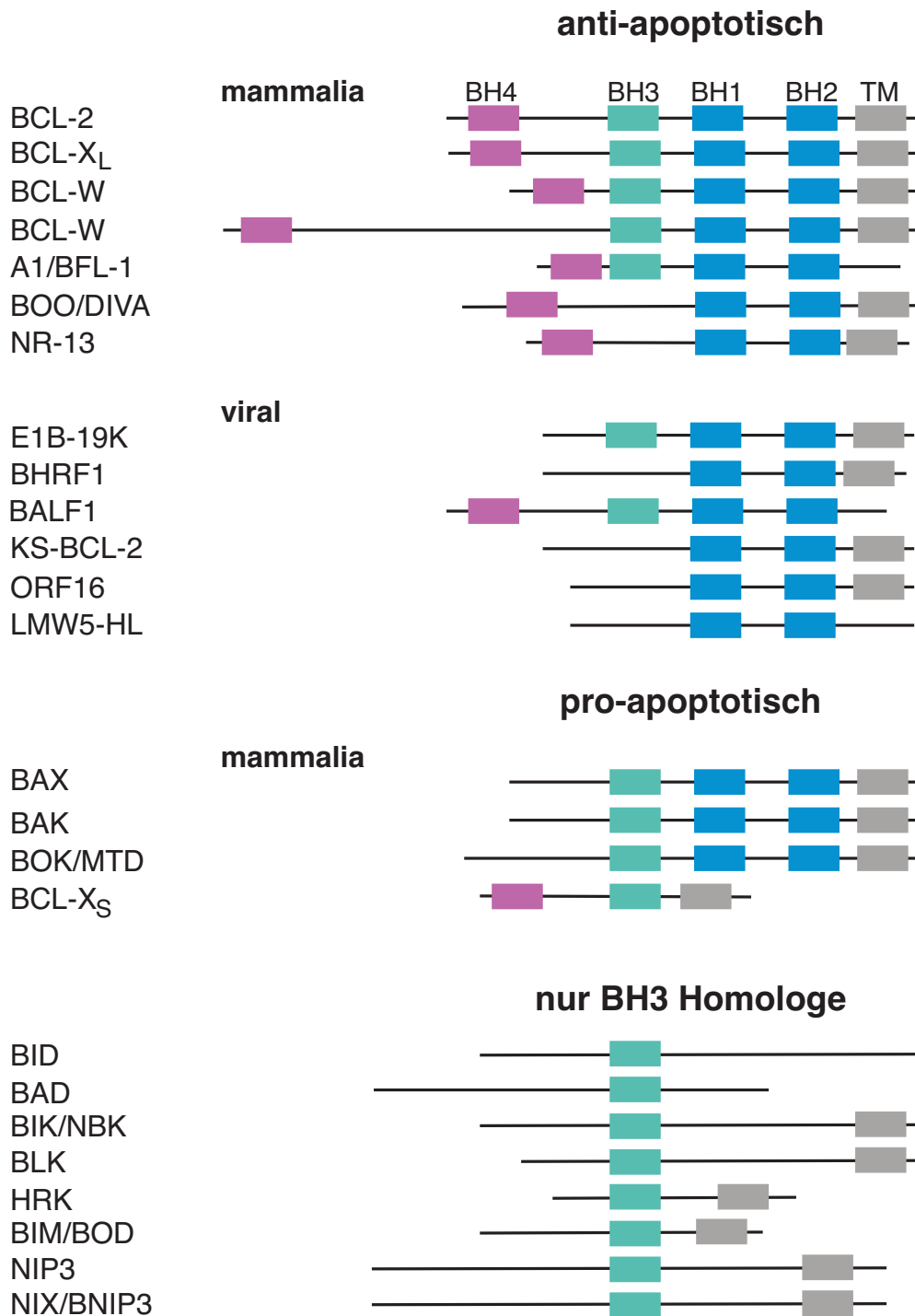


Abb.1.2: schematische Darstellung der Mitglieder der BCL-2 Proteinfamilie

Die Familie der BCL-2 Homologen umfasst in Mammalia bisher 19 Mitglieder. Es sind bis zu vier Homologiedomänen (BH1-4, BCL-2 homology domain1-4) konserviert. Dabei gilt BH2 und BH1 als wichtig für die Dimerisierung, ebenso wird ihnen eine Funktion bei der anti-apoptotischen Wirkung der Proteine zugeschrieben. BH4, die am wenigsten konservierte Domäne ist bei BCL-2 essentiell für die anti-apoptotische Wirkung. BH3 ist bei allen pro-apoptotischen Proteinen hoch konserviert. Über diese

Domäne dimerisieren pro-apoptische Proteine mit ihren Bindungspartnern. Die vier Homologiedomänen sind farbig hervorgehoben. Deren Position und die relative Größe der Proteine untereinander sind schematisch dargestellt. Die Familie ist in anti- und pro-apoptische Mitglieder unterteilt, wobei letztere nochmals eine Subgruppe von Proteinen beinhaltet, die nur in ihrer BH3 Domäne Homologie zu BCL-2 aufweist. Alle bisher bekannten viralen Homologe zu BCL-2 wirken anti-apoptisch, wobei BALF1 auch als dominant negativer Partner für BHRF1 diskutiert wird.

Die Proteine dieser Familie binden physikalisch aneinander und tragen durch ein komplexes Netzwerk von Homo- und Heterodimeren zur Regulation der Apoptose bei (Gross et al., 1999; Reed, 1998) (Abb. 1.2). Nach einem apoptotischen Stimulus wie z.B. γ -oder UV-Strahlung, wird zum Auslösen des apoptotischen Prozesses ein Apoptose-inaktiver Heterodimer aus BCL-2 und BAX aufgelöst, und ein Apoptose-induzierender BAX-Homodimer gebildet. Dieser transloziert in die äußere mitochondriale Membran und bewirkt die Freisetzung von Cytochrom-c aus den Mitochondrien ins Zytoplasma. Freies Cytochrom-c bindet an Apaf-1, welches dadurch seine Konformation ändert und über seine NB-ARC Domäne oligomerisiert. Dieser Komplex bindet und aktiviert Prokaspase-9 (siehe Abb.1.1.B). Prokaspase-9 ändert nach der Bindung seine Konformation und wird dadurch aktiviert. Kaspase-9 löst ebenso wie Kaspase-8 eine Kaspasen-Kaskade aus, die die Apoptose vollendet.

Die Eliminierung der Zellen erfolgt unabhängig vom einleitenden Stimulus fast immer uniform durch die Aktivierung einer Kaspasen-Kaskade. In nicht-apoptischen Zellen liegen Kaspasen als inaktive Zymogene im Zytoplasma vor. Zur Aktivierung werden sie nach ihrer Rekrutierung an einem spezifischen Aspartat in eine große (ca. 20kD) und eine kleine (ca. 10kD) Untereinheit gespalten. Dabei wird das N-terminale aktive Zentrum des Enzyms freigesetzt (Cryns and Yuan, 1998; Thornberry and Lazebnik, 1998). Die aktive Kaspase ist eine Heterotetramer, das aus zwei großen und zwei kleinen Untereinheiten besteht und sein Substrat wiederum an Aspartaten spaltet. Die Familie der Kaspasen ist als Untergruppe der Cystein-Aspartyl-spezifischen Proteasen definiert (Alnemri et al., 1996). Bisher sind im menschlichen Genom 11, bei der Maus 10, bei Vögeln und Fischen vier, bei Insekten sieben und bei Nematoden drei Kaspasen bekannt (Lamkanfi et al., 2002).

1.1.2 Regulation der Apoptose durch virale Genprodukte

1.1.2.1 Virale Promotoren der Apoptose

Nur von wenigen Viren ist bekannt, dass sie direkt und gezielt Apoptose in ihrer Wirtszelle auslösen. Dies betrifft bisher allerdings nur hüllenlose, nicht-lytisch replizierende Viren. Das „human immunodeficiency Virus“ (HIV) treibt durch Bindung seines Glykoproteins gp120 an den CD4 Rezeptor cytotoxischer T-Zellen diese in die Apoptose und schwächt so das Immunsystem nachhaltig (Guillerm et al., 1998; Ohnimus et al., 1997). Adenovirus benötigt während eines späten Stadiums der Infektion ein pro-apoptotisches Protein namens ADP („adenovirus death protein“) (Tollefson et al., 1996a; Tollefson et al., 1996b) zur effizienten Lyse der Wirtszelle. Nur so kann die Tochtergeneration an Viren freigesetzt werden. Die Apoptose von Virus-infizierten Zellen wird aber indirekt durch viele Viren ausgelöst, die z.B. die Energiebilanz oder Metabolisierung der Zelle massiv beeinträchtigen oder zur Schädigung der DNA beitragen.

1.1.2.2 Virale Inhibitoren der Apoptose

Normalerweise sind Viren bestrebt, die Apoptose infizierter Zellen zu unterdrücken. Dies ermöglicht ihnen, die Replikationszeit zur Bildung neuer Viren möglichst lange zu erhalten oder latent in der Wirtszelle zu überdauern, bevor die Wirtszellen lysieren. Zellen höherer Vertebraten haben zwei evolutionär hoch konservierte Mechanismen zum programmierten Selbstmord nach einer Infektion entwickelt. Zum einen werden virale Peptide mit MHC Klasse II komplexiert und auf der Oberfläche der Zelle präsentiert. Diese werden von zytotoxischen T-Zellen erkannt, die daraufhin auf dem extrinsischen Weg die Apoptose in der infizierten Zelle auslösen (Oldstone, 1997). Zum anderen erkennen Zellen die ungewollte Aktivierung des Zellzyklus durch virale Proteine, da eigene Wachstumsfaktoren sowohl Zellzyklus-aktivierend, als auch Apoptose-unterdrückend sind (Harrington et al., 1994). Virale Proteine hingegen aktivieren meist nur den Zellzyklus der Zelle um die eigene Replikation zu ermöglichen. Um benachbarte Zellen vor einer Infektion zu schützen, werden von der infizierten Zelle zusätzlich Interferone ausgeschüttet, die in den Nachbarzellen virale Abwehrmechanismen auslösen.

Meist wird die Apoptose infizierter Zellen durch das Tumorsupressorgen p53 vermittelt (Eick and Hermeking, 1996; White et al., 1992). Dieses Protein induziert eine Vielzahl von Zellantworten. Am besten erforscht ist die Fähigkeit von p53, einen Zellzyklusarrest auszulösen. Dies gibt den Reparaturmechanismen der Zelle die Möglichkeit, Schäden im Erbgut zu beheben, bevor diese durch eine Replikation der DNA manifestiert werden. Sollte dies nicht mehr möglich sein, kann p53 sowohl auf dem extrinsischen, als auch auf dem intrinsischen Weg Apoptose auslösen (Bates and Vousden, 1999; Vousden, 2000). Virale Strategien, p53 abhängige Apoptose zu unterdrücken, sind sehr genau erforscht. So bindet „SV40 large T antigen“ direkt an die DNA Binderegion von p53 und blockiert damit die Interaktion mit p53 spezifischen Promotorelementen (Bargonetti et al., 1992). Das E1B-55K Protein von Adenovirus bindet an die Aktivierungsdomäne von p53 und blockiert dadurch dessen Aktivierung (Yew et al., 1994). Das menschliche Papillomavirus bindet mit seinem Protein E4orf6 direkt an p53 und markiert dieses für eine Ubiquitinligase, was letztendlich zum Abbau von p53 führt (Scheffner et al., 1990). Als weitere viraler Mechanismus zur Unterdrückung der Apoptose in infizierten Zellen verhindert bei Reovirus das $\sigma 3$ Protein die Interaktion von doppelsträngiger viraler RNA mit PKR, einer RNA-Doppelstrang abhängige Kinase, und damit die weiterführende Signalkaskade (Denzler and Jacobs, 1994). Bei HSV-1 sorgt $\gamma_1 34.5$ für eine Dephosphorylierung und die damit verbundene Inaktivierung des Transkriptionsfaktors eIF-2 α . Dies hebt den von PKR ausgelösten Stopp der Proteinneusynthese und die Induktion der Apoptose wieder auf (He et al., 1997).

Virale Wirkungsmechanismen zur Verhinderung der zellulären Apoptose

Mechanismus	detailliert	Genprodukt	Virus	Referenz
Inhibition von p53	Interaktion mit Promotorelementen	Large-T-antigen	SV40	(Bargonetti et al., 1992)
	Interaktion mit Aktivierungsdomäne	E1B-55K	Adeno	(Yew et al., 1994)
	Ubiquitinierung von p53	E4orf6	HPV	(Scheffner et al., 1990)
Inhibition der Interferonantwort	Interaktion von PRK mit doppelsträngiger RNA	$\alpha 3$	Reovirus	(Denzler and Jacobs, 1994)
	Dephosphorylierung von eIF-2 α	$\gamma_1 34.5$	HSV-1	(He et al., 1997)
Block extrinsischer Signalwege	Interaktion mit TNF Rezeptor	core protein	HCV	(Ray et al., 1998)
	v-FLIPs	K13	HHV8	(Wang et al., 1997)
	Interaktion mit TRAFs und TRADD	LMP1	EBV	(Sandberg et al., 1997)
Kaspase Inhibitoren	Serpin	B22R	Vaccinia	(Dobbelstein and Shenk, 1996)
	IAP	Cp-IAP	CpGV	(Crook et al., 1993)
BCL-2 Homologe	BCL-2 ähnliche anti-apoptotische Aktivität	E1B-19K	Adeno	(Han et al., 1996)
		ORF16	HSV	(Nava et al., 1997)
		BHRF1	EBV	(Henderson et al., 1993)

Tab.1.1: Virale Mechanismen zur Verhinderung zellulärer Apoptose.

Zur besseren Übersichtlichkeit wurden die Mechanismen einiger ausgewählter Viren zur Unterdrückung der zellulären Apoptose tabellarisch dargestellt. Zusätzlich angegeben sind die Genprodukte der Viren, die die Apoptose verhindern, und in welchen apoptotischen Weg sie eingreifen.

1.1.3 Die Familie der BCL-2 ähnlichen Proteine

Die Familie der BCL-2 ähnlichen Proteine und deren virale Homologe sind Gegenstand intensiver Forschung und auch für meine Untersuchungen von Bedeutung. Das namensgebende, Apoptose-reprimierende Gen BCL-2 wurde bei B-Zell-Lymphomen als proto-Onkogen am chromosomalen Translokationspunkt t(14;18) entdeckt. Diese Lymphome stehen beispielhaft für eine Art der zellulären Transformation, die nicht auf rasche Zellteilung, sondern auf dem Ausbleiben der Apoptose in den transformierten Zellen zurückzuführen ist. Transfektionsstudien mit BCL-2 konnten belegen, dass eine Überexpression dieses Proteins die Lebensdauer der transfizierten Zellen trotz gleichzeitiger apoptotischer Stimuli signifikant verlängert (Reed, 1994). Im Gegensatz dazu konnte durch BCL-2-antisense-RNA Apoptose induziert oder verstärkt werden. Bei genetischen Studien im Fadenwurm *C.elegans* wurde das erste anti-apoptotische Homolog zu BCL-2, Ced9, beschrieben. Nachdem menschliches BCL-2 weitgehend den normalen Phänotyp von Ced9-defizienten Würmern wieder herstellen konnte (Hengartner and Horvitz, 1994; Vaux et al., 1992), kann man von einem in der Evolution konservierten Schritt beim programmierten Selbstmord einer Zelle ausgehen. Bisher sind mindestens 19 Mitglieder der BCL-2 Proteinfamilie im Menschen bekannt (Gross et al., 1999). Diese und die viralen Homologe sind in Abbildung 1.2 schematisch dargestellt. Die Familie beinhaltet sowohl pro- als auch anti-apoptotische Proteine. Typisch für alle anti-apoptotischen und viele pro-apoptotischen Mitglieder dieser Familie ist es, Homo- und Heterodimere zu bilden, um sich und andere Homologe dadurch zu aktivieren oder zu reprimieren. Einige besitzen zudem die Fähigkeit, Ionenkanäle oder Poren zu bilden, mit anderen, nicht BCL-2 Homologen zu dimerisieren, sowie sich in Membranen zu verankern (Nguyen et al., 1993; Schendel et al., 1997; Zamzami et al., 1998). Die Mitglieder dieser Familie besitzen bis zu vier homologe Bereiche (BCL-2 homology, BH1-4), die aus α -helicalen Abschnitten bestehen (Adams and Cory, 1998) (siehe Abb.1.2). Viele der anti-apoptotischen Mitglieder haben Homologien zu allen vier Domänen. Pro-apoptotische Proteine haben geringer

ausgeprägte Homologien, es fehlt vor allen Dingen das erste, α -helicale Segment BH4. Neben BH1 und BH2, die auch zur Dimerisierung gebraucht werden, wurde diese Domäne in Deletionsstudien als essentiell für die anti-apoptotische Wirkung kartiert (Hunter et al., 1996). Die etwas weiter carboxyterminal gelegene BH3 Domäne scheint die wesentliche „death domain“ bei pro-apoptotischen Mitgliedern dieser Familie zu sein. So gibt es eine ganze Untergruppe von pro-apoptotischen Proteinen, die einzig in der BH3 Region Sequenzhomologien aufweist (siehe Abb.1.2). Trotz großer Sequenzunterschiede sind sich pro- und anti-apoptotische Proteine, wie z.B. das „BH3 only“ Protein BID und BCL-X_S in ihrer Kristallstruktur wiederum sehr ähnlich (McDonnell et al., 1999).

Die Regulation dieser pro- und anti-apoptotischen Proteine, und damit die Entscheidung über Leben und Tod in einer Zelle, ist fein reguliert. Die Regulation findet sowohl auf Transkriptionsebene als auch durch Steuerung der post-transkriptionellen Genexpression und die Regulation der Lebensdauer der einzelnen Proteine statt (Boise et al., 1995; Miyashita et al., 1995). Von Reed et al. ist weiterhin die Regulation der Apoptose durch Konformationsänderungen und Proteinhyperphosphorylierung, durch Heterodimerisierung und durch Unterschiede in der subzellulären Lokalisation pro- und anti-apoptotischer Proteine in Abwesenheit eines apoptotischen Signals beschrieben (Reed, 1998).

1.1.4 Epstein-Barr Virus kodiert für zwei virale Homologe zu BCL-2

Virale Homologe zu BCL-2 wurden in allen bisher bekannten γ -Herpesviren, darunter auch Epstein-Barr Virus, gefunden (Hardwick, 1997).

1.1.4.1 Das Epstein-Barr Virus

Das Epstein-Barr Virus ist ein humanes γ -Herpesvirus. Es ist in der Lage, nach Primärinfektion im Wirt lebenslang in einem latenten Zustand zu persistieren. In diesem Zustand liegt das EBV-Genom als zirkuläres, kovalent geschlossenes, doppelsträngiges DNA-Genom mit einer Größe von 172kb vor. Der Lebenszyklus von EBV weist wie anderer Herpesviren auch eine lytische und eine latente Phase auf. Die Primärinfektion verläuft über Epithelzellen des Oropharynx. Sie ist durch lytische DNA-Replikation, Expression nahezu aller viraler Gene, Virusproduktion und Lyse

der befallenen Zellen gekennzeichnet. Diese akute Phase der EBV-Infektion verläuft in der Regel im frühen Kindesalter ohne Symptome. Im weiteren Verlauf der Virus-Wirt-Beziehung herrscht eine latente Infektion vor, die nur zeitweilig von einer lytischen Phase der Virusproduktion unterbrochen wird. Während der Latenz werden nur noch elf der ca. 90 viralen Gene exprimiert. In diesem Zustand, der als Latenz III bezeichnet wird, verändern sich die infizierten B-Zellen zu proliferierenden lymphoblastoiden Zellen (LCLs, lymphoblastoid cell lines) und induzieren in der Folge eine massive humorale und zelluläre Immunantwort des Wirts. Proliferierende B-Zellen werden auf diese Weise eliminiert und es entsteht ein EBV-spezifisches, immunologisches Gedächtnis. In einigen B-Zellen, vermutlich Gedächtnis-B-Zellen, ändert EBV das Muster seiner Genexpression zur sogenannten Latenz I oder II. Es werden nur noch ein oder zwei virale Gene exprimiert, die Zellen ändern sowohl ihren Phänotyp als auch die Expression von zellulären Oberflächenproteinen und hören auf zu proliferieren. Diese Latenz I oder Latenz II B-Zellen entgehen der Überwachung durch das Immunsystem und können somit im Wirt lebenslang persistieren. Die Frequenz infizierter B-Zellen im peripheren Blut liegt im Bereich von 1-30 infizierten Zellen pro 5×10^6 Zellen. Sporadisch kann es zu erneuter Aktivierung lytischer Gene und der Proliferation solcher Zellen kommen, die in der Regel sofort durch das Immunsystem eliminiert werden. In Fällen von geschwächter Immunabwehr wie z.B. bei einer HIV-Infektion oder nach Immunsuppression im Verlauf von allogenen Transplantationen kann EBV jedoch an der Entstehung von B-Zell-Tumoren, den lymphoblastischen Lymphomen beteiligt sein.

EBV ist ätiologisch eng mit einer Reihe von Krebserkrankungen assoziiert, wie z.B. dem Burkitt-Lymphom, dem Hodgkin-Lymphom, dem Nasopharynx-Karzinom, bestimmten T-Zell-Lymphomen und dem Immunoblastischen Lymphom (Übersichtsartikel: Kieff and Rickinson, 2001). Tumore entstehen oft erst viele Jahre nach der primären EBV-Infektion, was auf einen mehrstufigen Entstehungsprozess hinweist. Burkitt-Lymphome zeichnen sich durch spezifische chromosomale Translokationen des Protoonkogens c-myc aus, die zu einer konstitutiven Aktivierung des Gens führen. Das Hodgkin-Lymphom ist das in der westlichen Welt am häufigsten auftretende maligne Lymphom. Es zeichnet sich durch eine veränderte Struktur des betroffenen Lymphknotens und die Anwesenheit polynukleärer Hodgkin-

und Reed-Sternberg Zellen aus. Nasopharynxkarziome sind epitheliale Tumore des Nasen-Rachenraums. Sie treten besonders gehäuft in China auf, was eine zusätzliche genetische oder umweltbedingte Komponente vermuten lässt.

Proliferierende, EBV-infizierte B-Zellen stehen in einem engen Zusammenhang mit einer fehlenden Immunabwehr. Generell variiert die Expression der viralen Gene zwischen den verschiedenen Tumoren. Das Expressionsmuster der Latenz III, d.h. die Expression der EBV nukleären Antigene EBNA1, 2, 3A, 3B, 3C und EBNA-LP, der drei latenten Membranproteine LMP1, 2A und 2B, sowie von kleinen, nicht-polyadenylierten RNAs, EBER1 und 2, ist charakteristisch für immunoblastische B-Zell-Lymphome. Die Expression von EBNA1, LMP1, LMP2A und 2B entspricht der Latenz II. Diese tritt in Nasopharynxkarzinomen, Hodgkin- und T-Zell-Lymphomen auf. Burkitt-Lymphome exprimieren nur EBNA1 und zwei kurze, nicht kodierende virale RNAs, ein Zustand, der der Latenz I entspricht.

Lymphoblastoide Zelllinien, sogenannte LCLs, exprimieren virale Proteine, wie sie für die Latenzstufe III beschrieben sind. Diese können als in vitro Modell für die latente EBV-Infektion und die pathogenetischen Mechanismen bei der Tumorentstehung durch die Immortalisierung primärer B-Zellen mit EBV leicht in vitro etabliert werden (Thorley-Lawson and Mann, 1985). Nicht alle der oben genannten Gene sind absolut notwendig für den Prozess der B-Zell-Immortalisierung. EBERs und EBNA3B scheinen keine Rolle zu spielen, EBNA1, 2, 3A und 3C sowie LMP1 gelten als essentiell. EBNA-LP soll lediglich die Effizienz der Immortalisierung verbessern (Übersichtsartikel Young et al., 2000). Die Rolle von LMP2A und B wird kontrovers diskutiert (Briemeier et al., 1996; Speck et al., 1999).

1.1.4.2 Die BCL-2 homologen Proteine im Genom von EBV

Epstein-Barr Virus kodiert für zwei BCL-2 homologe Proteine, BHRF1 und BALF1. Beide Proteine werden in latent infizierten B-Lymphocyten nicht exprimiert. BHRF1 wird nur in wenigen EBV-assoziierten Tumoren wie dem Nasopharynx Karzinom exprimiert. Von diesem Karzinom ist bekannt, dass auch lytische Gene von EBV exprimiert werden. Nicht exprimiert ist es aber in anderen Tumoren, in denen nur latente Proteine von EBV exprimiert werden. Eine Expression von BALF1 wurde bisher in keinem EBV-assoziierten Tumor nachgewiesen.

Die Funktion dieser Proteine im Lebenszyklus des Virus und/oder ihre Rolle bei der viralen Pathogenese ist unbekannt. Die für eine Dimerisierung und anti-apoptotische Wirkung nötigen Domänen BH2 und BH1 sind bei beiden Proteinen hoch konserviert, augenfällig ist aber ein Aminosäureaustausch an Position 147 von Glycin zu Serin in der BH1 Domäne von BALF1 (siehe Abb.1.3, rote Markierung). Diese Position ist bei allen anti-apoptotischen Proteinen der BCL-2 Familie konserviert, eine Mutation führt bei BCL-2 selbst zum Verlust der anti-apoptotischen Eigenschaften (Yin et al., 1994). Die für pro-apoptotische Proteine wichtige BH3 Domäne ist bei beiden Proteinen nur schwach konserviert. BHRF1 besitzt keine BH4 Homologiedomäne, die bei BCL-2 für die anti-apoptotische Wirkung mitverantwortlich ist (Hunter et al., 1996), bei BALF1 ist sie hoch konserviert. Ein Vergleich der Proteinsequenzen von BCL-2 und BCL-X zu BALF1, BHRF1 und ORF16, dem BCL-2 Homolog von „Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus“ (HHV8) ist in Abbildung 1.3 dargestellt.

				BH4	
bcl2	1	----	MAHAGRTGYDNRREIVMKYIHWKLSQRGYEW-DAGDVGAAPPGAAPAGIFSSQPGH		
bclx	1	-----	MSQSNRELVVDFLSYKLSQKGYSSWSQFSDV-EENRTEAPEGTESEMETPS		
balf1	1	MNLAIALDSPHPGLASYTILPRFFVHISLKPVSW----	PD--ETMRPAKSTSDSVFVRTPVE		
bhrf1	1	-----	-----		
KSHVorf16	1	-----	-----		
				BH3	
bcl2	56	TPHTAASRDP-VLA--RTSPLQTPAA--PGAAAGPALS	P--VFPV--VHITLRLRQAGDDFS		
bclx	50	AINGNPSWH--LA--DSPAVNGATAH--SSSLDAREVI	P--MAA--VKQALREAGDFE		
balf1	56	AWVAPSPPDDKVA--ESSYLMFRAMY-AVFTRDEKDL	P--LPAL--VLCRLIKASLR--		
bhrf1	1	--MAYSTRILLALCIRDSTRVHGNGTLHPVLELAARET	PLRLSPEDTVVIRYHVLLLEEII		
KSHVorf16	1	MDEDVLPGE-VLAI--EGIFMAC--GLNEPEYLYH	PL--LSP--TKLYITGLM----		
				BH1	
bcl2	106	RRYRRDFAEMS-RQLHLTPFTARGR--FATVVEELFRDGVN	WGRIVAFFEFGGVMCVES		
bclx	99	LRYRRAESDLT-SQLHITPGTAYQS--FEQVVELFRDGVN	WGRIVAFFSFGGALCVES		
balf1	106	KDRKLYAELACRTADIGGKDTVRL-IISVLRAVYNDHYDY	WSRLRVVLCYTVVFAVRN		
bhrf1	59	ERNSETTE--TWNRFITHTEVVDLDFNSVLEIFHRGDP	SLGRALANMAW-CMHACRT		
KSHVorf16	45	RDKESLFEAMLANVRFHSTTGINQ--LGLSLQVSGDGN	MNNWGRALALTE-GSFVAQK		
				BH2	
bcl2	162	VNREMSPLVDNIALWTEYL--NRHLHTWIQDNGGWD	AFVLEYGSEMRPLDFDWSLKLK		
bclx	155	VDKEMQVLVSRIAAWMATYL--NDHLEPWIQEMCG	WDTFVLEYGNNAAESRKGQERFNR		
balf1	164	YLDDEKSAAFVVLGA-TAHYLL--ALYRRLWFA	RLCGMPSRLRRQFVVTWALASLTDFLKSL		
bhrf1	115	YCCNQSTPYYVVDLSVRGMLEASEGDDGWLHQ	CGWSTLIDNIEGSRRFSWTLFLAGLT		
KSHVorf16	101	LSNEPHLRDFALAA--VLPVYAYEATGPPQW	FRARCGWRGLKAYCTQVLTTRRRGRMRTALLG		
bcl2	220	LLSMAI-VGACITLCAYLGHK			
bclx	213	WFLTGMTVAGVLLGSLFSRK			
balf1	221	-----			
bhrf1	175	LSLIVICSYLFISRGRH----			
KSHVorf16	159	SIALLATILAAVAMSRR----			

Abb.1.3: Vergleich der Aminosäuresequenzen zellulärer und viraler Proteine der BCL-2 Familie
 Die Aminosäuresequenzen der zellulären Proteine BCL-2 und BCL-X, der viralen Proteine BALF1, BHRF1 aus dem EBV Genom, sowie ORF16 aus Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (HHV8) sind vergleichend gestellt. Identische Aminosäuren sind schwarz hinterlegt, die aufgrund der Ladung der Aminosäuren konservierte Bereiche grau. Die vier BCL-2 Homologiedomänen (BH1-4) sind durch Klammern über der Sequenz gekennzeichnet (Abbildung nach Marshall et al., 1999). Rot umrandet ist eine Aminosäure in der Homologiedomäne BH1. Diese Aminosäure ist bei allen bisher bekannten BCL-2 Familienmitgliedern als Glycin konserviert. Eine Mutation an dieser Position zerstört alle anti-apoptotischen Eigenschaften bei BCL-2 (Yin et al., 1994). Bei BALF1 ist diese Position zu einem Serin mutiert.

Trotz zweier BCL-2 ähnlicher Proteine bleibt bisher die Frage offen, wann und wofür EBV sie eigentlich in seiner Wirtszelle benötigt. Schon für LMP1 ist die Aktivierung der anti-apoptotischen zellulären Gene BCL-2 und MCL-1 bekannt, die die Apoptose infizierter Zelle verhindern können (Rowe et al., 1994; Wang et al., 1996). Weitere anti-apoptotische Gene scheinen entbehrlich zu sein. Eine Heterodimerisierung von Bax oder Bak, den Apoptose-auslösenden Proteinen dieser Familie, mit BHRF1 konnte widerlegt werden (Cheng et al., 1997a), wobei die Heterodimerisierung auch nicht zwingend für eine anti-apoptotische Wirkung ist (Cheng et al., 1997b). Ebenso konnte durch die Deletion von BHRF1 kein Effekt auf die Infektiosität oder die Fähigkeit, primäre B-Lymphocyten zu immortalisieren gezeigt werden (Lee and Yates, 1992; Marchini et al., 1991)

BHRF1 ist in Zellkultursystemen aber eindeutig als anti-apoptotisches Protein identifiziert worden, jedoch abhängig vom Apoptose-auslösenden Stimulus und Zelltyp. So konnte die Expression von BHRF1 die durch anti-Fas-Antikörper, TNF oder aktivierten Monocyten ausgelöste Apoptose verhindern, nicht aber Apoptose, die in der selben Zelllinie von „lymphkine-activated killer cells“ ausgelöst wurde (Foghsgaard and Jaattela, 1997). Ebenso wurde von diesen Autoren eine direkte Interaktion von BHRF1 mit Kaspasen nachgewiesen, wie sie auch für BCL-2 beschrieben worden ist (Clem et al., 1998). Eine spezifische Interaktion von BHRF1 mit Prokaspase-3 führt zu einer Inaktivierung dieses Zymogens (Foghsgaard and Jaattela, 1997). Damit kann BHRF1 sowohl extrinsisch, als auch intrinsisch induzierte Apoptose blockieren (siehe Abb. 1.1.A/B).

Während BHRF1 seit langem als BCL-2 Homolog bekannt ist, wurde BALF1 in dieser Funktion erst 1999 beschrieben (Marshall et al., 1999). BALF1 wird früh während der lytischen Virusreplikation transkribiert und kodiert für ein Protein von 182 Aminosäuren Länge. Marshall et al. konnten eine anti-apoptotische Wirkung von BALF1 zeigen (Marshall et al., 1999). So waren stabil mit BCL-X oder BALF1 transfizierte HeLa-Zellen sowohl gegen durch anti-Fas-Antikörper und Interferon- γ ausgelöste Apoptose, als auch gegen Camptothecin resistent. Bei Bellows et al. hingegen war BALF1 im Gegensatz zu BHRF1 nicht in der Lage, in Rat-1 Zellen Sindbis-Virus induzierte Apoptose zu verhindern (Bellows et al., 2002). Auch eine transiente Überexpression von Bax und die damit ausgelöste Apoptose konnte nur

von BHRF1, nicht von BALF1 unterdrückt werden. In den meisten Fällen ist die anti-apoptotische Wirkung von Mitgliedern der BCL-2 Familie durch die Heterodimerisierung mit pro-apoptotischen Mitgliedern aus der selben Familie wie Bak oder Bax bedingt. Obwohl BALF1 Bax-induzierte Apoptose nicht verhindern konnte, konnte in Kopräzipitationsexperimenten eine Heterodimerisierung zwischen diesen Proteinen nachgewiesen werden (Marshall et al., 1999), die jedoch für eine Unterdrückung der Apoptose nicht ausreichend zu sein scheint. Eine Konversion von BALF1 und BHRF1 in pro-apoptotisch wirkende Proteine und damit ein Verlust der anti-apoptotischen Wirkung in ausgewählten Zellsystemen, wurde von Bellows et al. diskutiert (Bellows et al., 2000). An einem konserviertem DXXD Aminosäuremotiv können zunächst anti-apoptotische Mitglieder der BCL-2 Familie durch Kaspase-3 in pro-apoptotisch wirkende Proteinbruchstücke gespalten werden (Thornberry et al., 1997). Eine Verstärkung der Apoptose durch diese zuerst anti-apoptotisch wirkenden Proteine nach Induktion der Apoptose wurde von Cheng et al. beschrieben (Cheng et al., 1997a). Inkubation mit apoptotisch-aktiven Zellextrakten führt jedoch nicht zu einer proteolytischen Spaltung von BALF1 oder BHRF1, wie es bei BCL-2 oder BCL-X zu beobachten ist. Eine pro-apoptotische Wirkung von BALF1 und BHRF1, zumindest durch diesen Mechanismus, kann also ausgeschlossen werden.

Die Funktion zweier unterschiedlicher BCL-2 Homologe im Genom von EBV bleibt weiterhin Gegenstand wissenschaftlicher Diskussion. So schlagen Marshall et al. vor, dass beide Proteine zu unterschiedlichen Zeiten im viralen Lebenszyklus benötigt werden. Sie begründen dies mit den unterschiedlichen Fähigkeiten, wie der Heterodimerisierung mit Bax und Bak, die sie zwischen BALF1 und BHRF1 gefunden haben (Marshall et al., 1999). Bellows et al. nehmen eher eine antagonistische Funktion der beiden Proteine an (Bellows et al., 2002). Sie konnten zeigen, dass BALF1 den Effekt von BHRF1 oder ORF16 von HHV8 bei der Unterdrückung von Bax-ausgelöster Apoptose aufheben kann. Zelluläre Inhibitoren der Apoptose, wie zum Beispiel BCL-2, konnten durch BALF1 allerdings nicht inhibiert werden. Wie BALF1 BHRF1 oder ORF16 inhibiert bleibt allerdings weiterhin offen. Ausgeschlossen werden konnte nur eine direkten Interaktion, denn eine Kollokalisierung der Proteine in der Zelle konnte nicht nachgewiesen werden.

1.2 LMP2A als B-Zell-Rezeptor Homolog

LMP2A kann indirekt als weiteres anti-apoptotisches Protein gelten. Es besitzt zwar selbst keine nachgewiesenen anti-apoptotischen Eigenschaften, aber es verstärkt signifikant die durch LMP1 induzierten Signalwege, in dem es die Halbwertszeit der Lebensdauer von LMP1 mehr als verdoppelt (Dawson et al., 2001). Unter 1.1.4.2 habe ich bereits die Aktivierung anti-apoptotischer Mechanismen von LMP1, wie die Steigerung der BCL-2 Expression, beschrieben (Rowe et al., 1994; Wang et al., 1997). Für eine indirekte anti-apoptotische Wirkung von LMP2A besonders bedeutsam erscheint die konstitutive Phosphorylierung von Akt-Kinase durch LMP2A und die damit verbundene Aktivierung des Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Signaltransduktionsweges. Bisher ist dieser als einziger, von LMP2A aktivierter Signaltransduktionsweg bekannt (Scholle et al., 2000; Swart et al., 2000). In verschiedenen Zelltypen verhindert die Akt-Kinase induzierte Apoptose aufgrund unterschiedlicher Stimuli (Datta et al., 1999; Franke et al., 1997; Khwaja, 1999). Bekannte Mechanismen einer anti-apoptotischen Wirkung des Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Signaltransduktionsweges sind unter anderem die Unterbindung einer Konformationsänderung des pro-apoptotisch wirkenden Proteins Bax durch Akt-Kinase. Danach kann Bax auch nach einem apoptotischen Stimulus nicht in die mitochondriale Membran translozieren und die Freisetzung von Cytochrom-c bewirken. Ebenso wird durch Akt-Kinase die proteolytische Spaltung von BID, einem dadurch erst pro-apoptotisch wirkendem Protein, verhindert (Yamaguchi and Wang, 2001).

1.2.1 Signaltransduktion durch den B-Zell-Rezeptor

Der Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Signaltransduktionsweg wird auch in B-Lymphocyten nach Ligandenbindung an den B-Zell-Rezeptor aktiviert und zur Regulation der Apoptose benützt. Akt-Kinase leitet bei unreifen B-Lymphocyten nach Aktivierung des B-Zell-Rezeptors die Apoptose ein, da der Rezeptor eine körpereigene Struktur erkannt hat. Im Gegensatz dazu wird bei ausdifferenzierten B-Lymphocyten der Eintritt in den Zellzyklus und damit die klonale Expansion des aktivierten B-Lymphocyten nach Antigenkontakt durch Akt-Kinase unterstützt. Dieser gegensätzliche Effekt wird durch die unterschiedliche Dosierung von Cyclin D2 und

p27^{Kip1} erreicht (Banerji et al., 2001). Die Aktivierung des Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Signaltransduktionsweges in B-Lymphocyten erfolgt ebenso wie die Aktivierung anderer Signaltransduktionswege des B-Zell-Rezeptors über phosphorylierte Syk Protein Tyrosin Kinase, die an diesen Rezeptor gebunden hat (Campbell, 1999; Kurosaki, 1999; Wienands, 2000). Die Signalkaskade des B-Zell-Rezeptors beginnt mit der Quervernetzung der Membranimmunoglobuline (IgG) durch Antigen-Ligandenbindung und der Translokation in cholesterin- und sphingolipid-reiche Microdomänen („lipid rafts“) der Plasmamembran (Brown and Rose, 1992; Simons and Ikonen, 1997). Dies aktiviert „non-receptor“ Protein Tyrosin Kinasen (PTKs) wie Lyn, Fyn und Blk, die sich selbst und konservierte Tyrosine (Y) innerhalb des ITAM (immunoreceptor tyrosin-based activation motiv) Motivs (siehe Abb.1.4.B) der zytoplasmatischen Domänen von Ig- α und Ig- β phosphorylieren. An diese phosphorylierten Tyrosine binden Kinasen wie Syk über ihre Src-Homologie Domäne (SH-2). Syk phosphoryliert direkt Proteine des Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Signaltransduktionsweges. Zusätzlich rekrutiert Syk weitere Proteine an den B-Zell-Rezeptor, die zusammen ein so genanntes Signalosom, einen Signalkomplex, bilden. Dieses konvertiert Ras-GDP zu Ras-GTP. Ras-GTP aktiviert den MAPK Signaltransduktionsweg. MAPK transloziert in den Kern und induziert dort die Transkription von Proteinen, die zum Eintritt in den Zellzyklus benötigt werden (Portis et al., 2002). Für eine Aktivierung einer B-Zell-Antwort ist zusätzlich noch eine Internalisierung des Antigens notwendig. Das Antigen wird in intrazellulären Kompartimenten als Peptid-MHC Klasse II Komplex formiert, um es T-Helferzellen zu präsentieren und eine Immunantwort zu initiieren. Dies ist die zweite wesentliche Aufgabe des B-Zell-Rezeptors (Watts, 1997).

1.2.2 Signaltransduktion durch LMP2A

In der Literatur wird die Blockade der B-Zell-Rezeptor Funktionen durch LMP2A als dessen Hauptaufgabe beschrieben (Portis et al., 2002). LMP2A ist ein Typ II Transmembranprotein. Es besteht aus drei Abschnitten: einer amino-terminalen, 119 Aminosäuren langen Domäne, 12 Transmembrandurchgängen und einer 27 Aminosäuren langen carboxy-terminalen Domäne. Sowohl die amino-terminale als auch die carboxy-terminale Domäne befindet sich im Zytoplasma (Abb.1.4 A). Der genetische Locus besteht aus neun Exons, die über die „terminal repeats“ hinweg zu

einer mRNA gespleißt werden. Dies ist nur möglich, wenn das Genom von EBV wie unter 1.1.4.1 beschrieben in der zirkulären Form als extrachromosomales Plasmid vorhanden ist (Laux et al., 1988). In der Plasmamembran liegt das Protein in hoher lokaler Dichte als Oligomer aktiviert in „lipid rafts“ (cholesterin- und sphingolipidreiche Microdomänen) vor (Dykstra et al., 2001) und stellt vermutlich einen konstitutiv aktiven Pseudorezeptor dar. Zur Homooligomerisierung wird ein Motiv benötigt, das innerhalb der kurzen carboxy-terminalen Domäne zu finden ist (Matskova et al., 2001). Die Homologie von LMP2A zum B-Zell-Rezeptor wird durch ein ITAM Aminosäuremotiv, sowie zwei PY Motiven (siehe Abb.1.4.B/C) und mehreren konservierten potentiellen Bindestellen für Proteine mit Scr-Homologie Domänen in der größeren, amino-terminalen Domäne bestimmt (Portis et al., 2002).

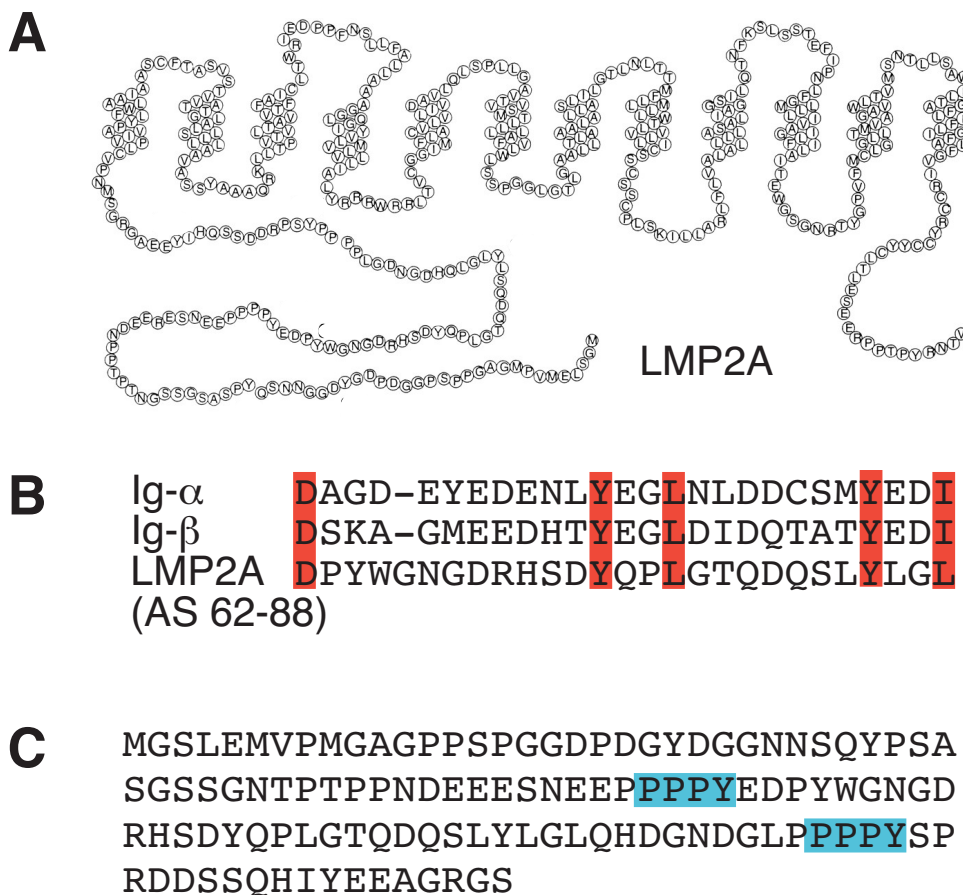


Abb.1.4: Struktur und Aminosäuresequenz von LMP2A

(A): Durch Computerprogramme vorhergesagte Sekundärstruktur von LMP2A. Das Protein besteht aus einer 119 Aminosäuren langen, amino-terminalen zytoplasmatischen Domäne, 12 hydrophoben Transmembrandurchgängen und einer 27 Aminosäuren langen carboxy-terminalen zytoplasmatischen Domäne. In latent infizierten B-Lymphozyten ist es in der Plasmamembran aggregiert exprimiert. (Abbildung modifiziert nach Fruehling et al., 1998)

(B): Die zu vergleichenden Aminosäuresequenzbereiche der zellulären Immunrezeptoren Ig- α und Ig- β , sowie von LMP2A sind untereinander angeordnet dargestellt. Die gemeinsamen Aminosäuren des ITAM (immunoreceptor tyrosin-based activation motif) Motivs sind rot hinterlegt.

(C): Aminosäuresequenz der amino-terminalen zytoplasmatischen Domäne von LMP2A. Die Prolinreichen PY-Motive (PPxY) PY1 und PY2 sind blau hinterlegt.

Die Blockade von B-Zell-Rezeptor Signaltransduktionsfunktionen und der Internalisierung des gebundenen Antigens durch LMP2A erfolgt durch unterschiedliche Mechanismen. Durch die Homooligomerisierung aktiviertes LMP2A verhindert die Translokation des aktivierten B-Zell-Rezeptors in die „lipid rafts“ und die Internalisierung des gebundenen Antigens (Dykstra et al., 2001). Die Sequestrierung von Lyn und Syk an LMP2A verhindert die Teilnahme dieser essentiellen Kinasen an der B-Zell-Rezeptor Signaltransduktion (Miller et al., 1995). Nach der Bindung der Protein Kinasen Lyn und Syk an LMP2A werden Nedd4-ähnliche Ubiquitin Protein Ligasen über deren WW-Domänen an den LMP2A Signalkomplex rekrutiert (Ikeda et al., 2000a) (Abb.1.5.B).

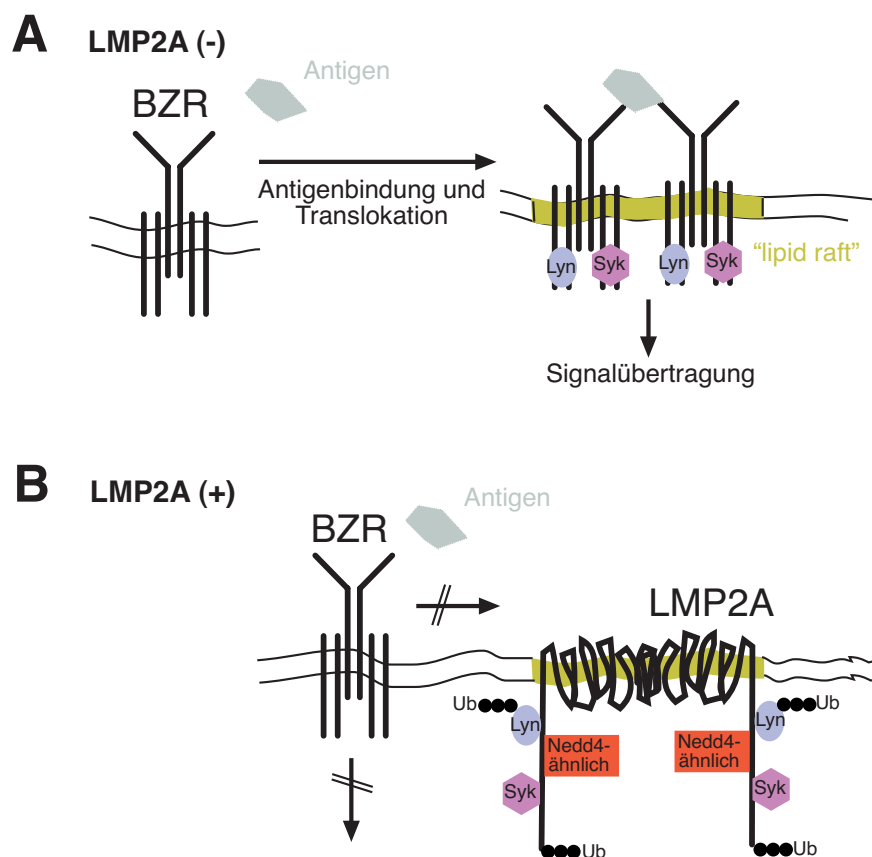


Abb.1.5: Signaltransduktion des B-Zell-Rezeptors und von LMP2A

(A) In ausdifferenzierten B-Lymphozyten führt die Bindung des B-Zell-Rezeptors mit seinem Antigen zur Aktivierung des Rezeptors. Dieser Komplex transloziert in cholesterin- und sphingolipid-reiche Microdomänen („lipid rafts“). Dort phosphoryliert die „non receptor“-Protein Tyrosin Kinase Lyn sich selbst und zwei Tyrosine des ITAM Motivs (immunoreceptor tyrosin-based activation motif) innerhalb der zytoplasmatischen Domänen von $Ig\alpha/\beta$ (siehe Abb.1.4.B). An dieses Aminosäuremotiv bindet die Protein Tyrosin Kinase Syk und wird phosphoryliert. Sie aktiviert direkt den Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Signaltransduktionsweg, und rekrutiert gleichzeitig weitere Proteine an den B-Zell-Rezeptor-Proteinkomplex. Diese bilden zusammen ein Signalosom, das den MAPK Signaltransduktionsweg aktiviert.

(B) LMP2A aggregiert über ein „clustering“ Signal in seiner carboxy-terminalen Domäne in den „lipid rafts“. Dadurch wird die Translokation des B-Zell-Rezeptors in diese Mikrodomäne der Plasmamembran verhindert. Zusätzlich bindet die amino-terminale Domäne von LMP2A die Protein-Kinasen Lyn und Syk, die damit nicht zur Ausbildung des Signalosoms am B-Zell-Rezeptor zur Verfügung stehen. Durch Nedd4 ähnliche Protein Ubiquitin Ligasen, die ebenso an LMP2A binden, wird LMP2A selbst, sowie Lyn ubiquitiniert und zum Abbau in einem Proteasom gekennzeichnet.

Diese binden an die PY Motive von LMP2A (Abb.1.4.C) und führen zu einer raschen Degradierung von LMP2A selbst, sowie gebundener Kinasen wie Lyn (Ikeda et al., 2001b). Die Quervernetzung des B-Zell-Rezeptors durch sein Antigen führt in LMP2A positiven Zellen nicht zu dessen Phosphorylierung. Die Signaltransduktionsaktivität des B-Zell-Rezeptors kann jedoch durch Mutation von Tyrosin 112 in der aminoterminalen Domäne von LMP2A wieder hergestellt werden (Fruehling et al., 1998; Miller et al., 1994). Dadurch kann die Protein Kinase Lyn als initiierender Schritt nicht an LMP2A binden und Tyrosine innerhalb des ITAM Motivs phosphorylieren. Die Internalisierung des an den B-Zell-Rezeptor gebundenen Antigens bleibt aber trotz dieser Mutation in LMP2A weiterhin unterbunden (Dykstra et al., 2001).

In knock-in Experimenten wurde eine cDNA für LMP2A nach konventionellen Techniken in das Mausgenom eingefügt. Die Analyse der entstandenen Mauslinien zeigt B-Lymphozyten, die ohne einen funktionsfähigen B-Zell-Rezeptor zu exprimieren das Knochenmark verlassen und periphere, lymphoide Organe besiedelt hatten (Caldwell et al., 2000; Caldwell et al., 1998). In nicht genetisch veränderten Organismen werden derartige Zellen bereits im Knochenmark durch Apoptose eliminiert. Dieser Befund stützt die Hypothese, dass LMP2A nicht nur die Funktion eines vorhandenen B-Zell-Rezeptors unterdrückt, sondern sogar für die Reifung früher B-Lymphozyten nötige Entwicklungssignale des B-Zell-Rezeptors nachahmt und ein Ausdifferenzieren von frühen B-Lymphozyten ohne funktionsfähigen B-Zell-Rezeptor ermöglicht.

Von Daibata et al. ist der Eintritt von EBV in den lytischen Zyklus nach Quervernetzung des B-Zell-Rezeptors in EBV-positiven Akata-Zellen beschrieben (Daibata et al., 1990). In vivo sollten B-Lymphozyten ohne funktionsfähigen B-Zell-Rezeptor oder Zellen, deren B-Zell-Rezeptor Signale durch LMP2A blockiert sind, dieser Aktivierung entgehen und in latent infizierten B-Lymphozyten persistieren können. Nachdem in der latenten Phase von EBV nur neun Proteine und zwei RNAs exprimiert werden (siehe 1.1.4.1), entgehen sie auch besser einer Immunantwort von zytotoxischen T-Zellen. In wieweit LMP2A an der Aufrechterhaltung der Latenz und die Unterdrückung des lytischen Zyklus beteiligt ist, ist nicht bekannt.

1.3 Aufgabenstellung

Die viralen Proteine BALF1 und BHRF1 sind als Homologe zu dem anti-apoptotisch wirkenden zellulären Protein BCL-2 beschrieben (Bellows et al., 2002; Henderson et al., 1993). Die Rolle von BHRF1 bei der Proliferationskontrolle von B-Lymphozyten durch EBV wurde als eher untergeordnet beschrieben, da lymphoblastoide Zelllinien auch ohne BHRF1 generiert werden können (Lee and Yates, 1992; Marchini et al., 1991). Über die Funktion von BALF1 im Kontext mit einer EBV Infektion ist nichts bekannt. Ziel meiner Arbeit war es, den Beitrag von BALF1 und BHRF1 zum Immortalisationsprozess zu bestimmen. Dazu habe ich sechs EBV-Mutanten mit Einzel- und Mehrfachdeletionen etabliert und deren Beitrag zur Immortalisierung von humanen primären B-Zellen untersucht. Als methodische Grundlage diente das Maxi-EBV-System (Delecluse et al., 1998), das es erstmals erlaubte, Mutationen im Kontext des gesamten EBV-Genoms zu analysieren. Erste Versuche während dieser Arbeit führten dabei zu der Theorie, dass die Initiation der Latenz unabhängig von dem lytischen und dem latenten Lebenszyklus von EBV von entscheidender Bedeutung ist. Der Beitrag von BALF1 und BHRF1 zur Initiation der Latenz sollte mit diesen oben genannten Mutanten untersucht werden.

LMP2A gilt als B-Zell-Rezeptor Homolog und soll die Signaltransduktion durch den B-Zell-Rezeptor unterdrücken (Fruehling and Longnecker, 1997). In EBV infizierten Zellen soll LMP2A zur Aufrechterhaltung der Latenz nötig sein (Portis et al., 2002). Der Beitrag von LMP2A zur B-Zell Immortalisierung wird kontrovers diskutiert (Brielmeier et al., 1996; Speck et al., 1999). Um die Notwendigkeit von LMP2A für die

B-Zell Immortalisierung genetisch zu analysieren, habe ich zwei Maxi-EBV Mutanten konstruiert, die diese Frage beantworten sollten. Gleichzeitig kann mit diesen Mutanten auch ein möglicher Einfluss von LMP2A auf die Unterdrückung des lytischen Zyklus und die Aufrechterhaltung der Latenz greifbar gemacht werden. Von LMP2A ist nur die Aktivierung des Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Signaltransduktionsweges bekannt. Es war bisher mit keinem System möglich, die von LMP2A regulierten Gene umfassend zu bestimmen und somit Einblick in die Funktionsweise dieses Proteins zu erhalten. Daher sollte die Etablierung eines induzierbaren LMP2A Systems im Maxi-EBV Kontext Teil meiner Arbeit sein. Dieses System sollte es möglich machen, LMP2A induzierte Signaltransduktion innerhalb eines möglichst kurzen, definierten Zeitraums zu aktivieren. Ziel dieser Experimente ist es, LMP2A aktivierte Signalwege und Zielgene von LMP2A in der Zelle als differentiell exprimierte Gene zu identifizieren, um dadurch die Funktion von LMP2A in einer infizierten Zelle zu verstehen.

2. Material

2.1 Antikörper

gekoppelte Antikörper

α Ratte IgG; Meerrettich-Peroxidase-gekoppelt; Ziege	Promega
α Ratte IgG; PE-gekoppelt; Esel	Dianova
α Maus IgG; Cy5-gekoppelt; Ziege	Dianova
α Maus IgG; Cy3-gekoppelt; Ziege	Dianova
α Kaninchen IgG; FITC-gekoppelt; Ziege	Dianova

sonstige Antikörper

α LMP2A (14B6); Ratte	E.Kremmer, GSF
α EBNA2 (R3+1E6); Ratte	E.Kremmer, GSF
α gp350/220 (72A1); Maus	ATCC (Hybridom)
α BZLF1 (BZ1); Maus	Dako/M.Rowe
α EA-D (MAB818); Maus	Chemicon
α BHRF1 (5G2.2); Ratte	E.Kremmer, GSF
α His ₆ ; Kaninchen, Azid frei	Dianova
α His ₆ (3D5-1); Maus	E.Kremmer, GSF

2.2 Bakterien

E.coli DH5a	F-, <i>lacI</i> -, <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> , Δ (<i>lacZYA-argF</i>), U169, F80d <i>lacZ</i> Δ M15, <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> (Hanahan, 1985)
E.coli DH10B	F-, <i>mcrA</i> , Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>), Φ 80d <i>lacZ</i> Δ M15, Δ <i>lacX74</i> , <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>araD139</i> , Δ (<i>ara, leu</i>)7697, <i>galU</i> , <i>galK</i> , λ -, <i>rpsL</i> , <i>nupG</i> (Life Technologies)
E.coli GM2163	F-, <i>ara-14</i> , <i>leuB6</i> , <i>tonA31</i> , <i>lacY1</i> , <i>tsx-78</i> , <i>supE44</i> , <i>galK2</i> , <i>galT22</i> , <i>hisG4</i> , <i>rpsL136</i> , <i>xyl-5</i> , <i>mt1-1</i> , <i>thi-1</i> , <i>dam-13</i> , Tn9 (Crr), <i>dcm-6</i> , <i>hsdR2</i> , <i>mcrA</i> -, <i>mcrB</i> - (Life Technologies)

- Primer zum Nachweis von BALF1 und BHRF1 mittels „real-time“-PCR:

LC-BALF1-F2: GTG GTC ATC CAG GTA GTT TCG
 LC-BALF1-R2: TAC GGC TCA TCA TCA GCG TC
 LC-BHRF1-F1: ACA CAC TAA GCC CCT GCT AAT CC
 LC-BHRF1-R1: ACG AAA CCT TGA CCC TCC TTG TC

- Primer für die Konstruktion des LMP2A-proTNF α -His₆ Gens:

TP1 TNF α -tag1: GCG GGG ATC CGG ATG GGT ACG
 Bsp EI
 TP1 TNF α -tag2: CAA GCA CCG CCT AGG ATT CAT ACT TCC TCT G
 Avr II
 TP1 TNF α -tag3: CAG GGC TCC TAG GCG GTG CTT GTT CC
 Avr II
 TP1 TNF α -Histag4: GGG GGT ATG CAT TTA **GTG GTG GTG GTG GTG**
 Nsi I His₆-tag
 GTG AGA TCT TGC CTG GGC TAG CGG GCT GAT TAG

- Primer zum Einfügen des LMP2A-proTNF α -His₆ Gens in ein Maxi-EBV:

delta LMP2 PCR1: GGG GGC CCT TAT TGC CCT GTT TAG
 delta LMP2 PCR2: GGG GAG CTC GAT ATC GGG ATC GAT ACT AAG AAA
 Sac I Eco RV Cla I
 GAG AAC GGG CAA
 delta LMP2 PCR3: GGG GAG CTC GGG GCG GCC GCC TCT TTG GGG
 Sac I Not I
 TCA TTA GAT GC
 delta LMP2 PCR4: CTC CTG TAT GTT TGC CTC TCC

2.4 Plasmide

Ein Teil der folgenden Plasmide war bereits in der Arbeitsgruppe vorhanden oder wurden freundlicherweise 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.

p509	pCMV:BZLF1 (Hammerschmidt and Sugden, 1988)
p528	EBV # 52368 - # 56086 (Baer et al., 1984)
p925	EBV # 163473 - # 172281, # 1 - # 3960 (Baer et al., 1984)
p1352	EBV # 163473 - # 172281, # 1 - # 644 (Baer et al., 1984)
p2266.8	Cre-Expressionsplasmid mit Ampicillin-Resistenz
p2465	pIRES2eGFP cloning vector (Hildinger et al., 1999)
p2466	pSF11(SHX) retroviral cloning vector (Hildinger et al., 1999)
p2564*	Δ BALF1, Tet.-Fragment aus pCP16 (PvuII) in p1352 (BsiWI T4 Pol) zur homologen Rekombination
p2566.12*	LMP2A-proTNF α -His ₆ Chimär, PCR Produkte (NsiI-AvrII, AvrII-BspEI) in pMLP TP1 (NsiI, AvrII)
p2627*	mutierte loxP-Sequenzen in pACYC184, „anealed“ Oligos (HindIII, Aval) in pACYC184 (HindIII, Aval)
p2631.3*	Tet.-Resistenz zwischen mutierten loxP-Sequenzen, aufgefülltes XbaI-Aval Fragment aus pACYC184 in p2627 (EcoRV)
p2632*	Δ BHRF1, aufgefülltes HindIII-XmaI Fragment aus pCP15 in p528 (NheI, Klenow) zur homologen Rekombination
p2642*	pCMV:BALF1, PCR Produkt (EcoRI,HindIII) in pRK5 (EcoRI, HindIII)
p2643.4*	LMP2A-proTNF α -His ₆ Chimär unter SV40 Promotor, HindIII-PsiI Fragment aus p2566.12 in pSV-TP1 (HindIII-PsiI)
p2650	recA/red γ in pST76-amp
p2670	pCMV:BALF4
p2676*	Cre-Expressionsplasmid mit Kanamycinresistenz, aufgefülltes XbaI Fragment aus pCP15 in p2266.8 (Bmrl, Bsal, Klenow)

p2681*	pCMV:BHRF1, PCR Produkt (EcoRI, HindIII) in pRK5 (EcoRI, HindIII)
p2694*	LMP2A-proTNF α -His ₆ Chimär unter CMV Promotor, PstI (Klenow)-NsiI Fragment aus p2643.4 in pRK5 (EcoRI (Klenow), NsiI)
p2722*	Zwischenkonstrukt für loxP/lockP Testsystem, AseI - partiell PvuII Fragment aus p2631.5 in pUC19 (NdeI, SmaI)
p2723*	nach Cre-Expression in p2722
p2724*	loxP/lockP Testsystem, Aval-AseI Fragment aus p2631.3 in p2723 (BamHI, Klenow)
p2725*	identisch zu p2724, aber Fragment in umgekehrter Orientierung
p2750*	human BCL-2 Expressionsplasmid, ApeI-HindIII Fragment aus IMAG clone p998E188705Q2 in pRK5 (EcoRI, HindIII)
p2766*	EBV #163473-#172281, #1-#960 (Baer et al., 1984), MunI, partieller EcoRI Verdau von p925, Selbstligation
p2768.5*	Zwischenkonstrukt für LMP2A-proTNF α -His ₆ Chimär in Maxi-EBV Kontext, PCR-Produkt (PmlI, EcoRI) in p2766 (PmlI, EcoRI)
p2772.7*	Zwischenkonstrukt für LMP2A-proTNF α -His ₆ Chimär in Maxi-EBV Kontext, Tet.-Fragment aus pCP16 (EaeI, SacI) in p2768.5 (NotI, SacI)
p2779.4*	Zwischenkonstrukt für LMP2A-proTNF α -His ₆ Chimär in Maxi-EBV Kontext, HindIII (Klenow) - ClaI Fragment aus p2694 in p2768 (EcoRV, ClaI)
p2789.6*	Zwischenkonstrukt für LMP2A-proTNF α -His ₆ Chimär in Maxi-EBV Kontext, Tet.-Fragment aus pCP16 (EaeI, SacI) in p2779.4 (NotI, SacI)
p2807*	Δ BZLF1, Zeozin Resistenz aus pSV40Zeo2 (BamHI (Klenow), AvrII) in p2084 (HindIII (Klenow), NheI) zur homologen Rekombination
p2823	oriP/oriLyt/TR/DsRed2/hyg (EBV packaging reporter plasmid)
p2938.5*	mini-EBV Verpackungsplasmid, statt DsRed2 fluoreszentes pHcred-N1 Fragment (SnaBI, NotI) in p2823 (SnaBI, NotI)

p2941.16*	Δ BHRF1 Komplementationsplasmid, OLR von BHRF1 (p2681, PvuII) in p2938.5 (Bst1107)
p2942.28*	BCL2 Komplementationsplasmid für Δ BALF1/ Δ BHRF1, OLR von BCL-2 (p2750, partiell PvuII) in p2938.5 (Bst1107)
p2943.2*	Δ BALF1 Komplementationsplasmid, OLR von BALF1 (p2642, PvuII) in p2938.5 (Bst1107)
p2945*	OLR für BALF1 Expression in pIRES2eGFP, HindIII (Klenow) - EcoRI Fragment von p2642 in p2465 (EcoRI, SmaI)
p2946*	OLR für BHRF1 Expression in pIRES2eGFP, HindIII (Klenow) - EcoRI Fragment von p2681 in p2465 (EcoRI, SmaI)
p2948*	OLR für BCL-2 Expression in pIRES2eGFP, HindIII (Klenow) - EcoRI Fragment von p2750 in p2465 (EcoRI, SmaI)
p2951*	retroviraler Verpackungsvektor für BHRF1 Expression, NotI (Klenow) - EcoRI Fragment von p2946.18 in p2466 (HindIII (Klenow) - EcoRI)
p2952.25*	retroviraler Verpackungsvektor für BALF1 Expression, NotI (Klenow) - EcoRI Fragment von p2945.1 in p2466 (HindIII (Klenow) - EcoRI)
p2953.3*	retroviraler Verpackungsvektor für BCL-2 Expression, NotI (Klenow) - Apol Fragment von p2948.25 in p2466 (HindIII (Klenow) - EcoRI)
pACYC184	low copy-number E.coli cloning vector (New England Biolabs)
pCP15	FRT-flankiertes Kanamycin Gen mit einer MCS (Cherepanov and Wackernagel, 1995)
pCP16	FRT-flankiertes Tetrazyclin Gen mit einer MCS (Cherepanov and Wackernagel, 1995)
pHCred-N1	commercial vector (CLONTECH)
pMLP-TP1	LMP2A (TP1) cDNA exprimiert vom major late adenovirus promoter/enhancer
pRK5	basierend auf pUC19 das myc-epitope (MASMEQKLISEEDLGIP) an eine multiple cloning site (MCS) angefügt

pSV-TP1	LMP2A (TP1) cDNA exprimiert vom SV40 early promoter/enhancer
pSV40Zeo2	commercial vector (Stratagene)
pUC19	commercial cloning vector (Pharmacia)

Maxi-EBV-Plasmide

p2089	Wildtyp Maxi-EBV: F-Plasmid (pMBO131) mit eGFP Gen und Hygromycin-Resistenzgen in B95.8 DNA (Delecluse et al., 1998)
p2190new	wie p2089, Promotor und erstes Exon von LMP2A loxP flankiert
p2512*	Δ BALF1, homologe Rekombination von p2089 mit p2564 (AvrII, FspI)
p2525*	Δ LMP2A, Cre Rekombination in p2190new
p2636*	Δ BALF1/ Δ BHRF1, homologe Rekombination von p2512 mit p2632 (EcoRI, BstEII)
p2637*	Δ BHRF1, homologe Rekombination von p2089 mit p2632 (EcoRI, BstEII)
p2765*	Δ BALF1/ Δ BHRF1, homologe Rekombination von p2637 mit p2564 (AvrII, FspI)
p2790*	Δ LMP2A/B, homologe Rekombination von p2525 mit p2772.7 (Eam1105I)
p2792*	LMP2A-proTNF α -His ₆ Chimär unter Kontrolle des LMP2B Promotors, gleichzeitig Δ LMP2A/B, homologe Rekombination von p2525 mit p2789.6 (XhoI, MscI)
p2809*	Δ BZLF1, homologe Rekombination von p2089 mit p2807.4 (PvuII)
p2810*	Δ BZLF1/ Δ LMP2A, homologe Rekombination von p2525 mit p2807.4 (PvuII)
p2850*	Δ BZLF1/ Δ BALF1/ Δ BHRF1, homologe Rekombination von p2636 mit p2807.4 (PvuII)

2.5 Zelllinien

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

HEK293	humane embryonale Nierenepithel-Zelllinie, die durch die Gene E1a und E1b von Adenovirus Typ 5 transformiert wurde (Graham et al., 1977)
WI38	humane Fibroblasten-Zelllinie (ATCC)
B95.8	lymphoblastoide Affen-Zelllinie (Miller et al., 1972)
Raji	humane EBV-positive Burkitt-Lymphom-Zelllinie (Pulvertaft, 1964)

293-Zelllinien, stabil transfiziert mit Maxi-EBV Plasmiden

HEK293/2089	p2089, Wildtyp
HEK293/2190new	p2190new, Wildtyp, Promotor/Exon1 von LMP2A loxP flankiert
HEK293/2512*	p2512, Δ BALF1
HEK293/2525*	Δ 2525, Δ LMP2A
HEK293/2636*	p2636, Δ BALF1/ Δ BHRF1
HEK293/2637*	p2637, Δ BHRF1
HEK293/2765*	p2765, Δ BALF1/ Δ BHRF1 identisch zu p2636
HEK293/2792*	p2792, LMP2A-proTNF α Chimär / Δ LMP2A/B
HEK293/2809*	p2809, Δ BZLF1
HEK293/2810*	p2810, Δ LMP2A/ Δ BZLF1
HEK293/2850*	p2850, Δ BALF1/ Δ BHRF1/ Δ BZLF1

Lymphoblastoide Zelllinien, mit den angegebenen Maxi-EBV Plasmiden aus den jeweiligen 293-Zelllinien immortalisiert

B2089*	etabliert mit 2089-EBV
B2190new*	etabliert mit 2190new-EBV
B2525*	etabliert mit 2525-EBV
B2792*	etabliert mit 2792-EBV

2.6 Chemikalien, Enzyme, Geräte und sonstiges

Alle hier nicht aufgeführten Chemikalien wurden von der Firma Merck, Darmstadt, in reinster Form pro analysis bezogen.

An der Grub, Salzburg

FIX and PERM Cell Permeabilisation Kit

Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg

Hybond™-ECL-Zellulosemembran, Hybond™-N+-Nylonmembran, a³²P-dCTP (3000 Ci/mmol), ECL™-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™

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

Röntgenfilme XAR5

Eppendorf Gerätebau, Hamburg

Tischzentrifuge 5415, Reaktionsgefäße verschiedener Größe, BioPhotometer

Eurogentec, Seraing

Goldstar-Polymerase

Genomed, Bad Oeynhausen

Maxi-Präparations-Kit für Plasmidpräparationen (Jetstar)

Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, USA

Mighty Small II Gel Elektrophorese Einheit, SemiPhor, Semidry Blottingsystem

Infors GmbH, Einsbach

Labfors®, Klein Fermenter System

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™ II-Reverse Transkriptase Kit, BenchMark™ 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, Tetramethyldiamin (TEMED), Triton-X-100,

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, 0,8µm

PE Biosystems, Weiterstadt

PCR-Reaktionsgefäße

Peqlab, Erlangen

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

Pierce, Rockford

BCA Protein Assay

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

Qiagen

Polyfect Zelltransfectionsreagenz

Sigma Chemie, München

Ampicillin, Bromphenolblau, b-Glyzerophosphat, 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

Filtereinheit 1,2 µm

Zeiss, Oberkochen

Axiovert 10 Fluoreszenzmikroskop

3. Methoden

3.1 Bakterienkultur

3.1.1 Vermehrung und Aufbewahrung von Bakterien

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

LB-Medium: 1 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 0,5 % NaCl
LB-Agar-Platten: 15 g Bacto-Agar ad 1 l LB-Medium

3.1.2 Transformation und Elektroporation von E.coli

Transformation:

Die Herstellung transformationskompetenter E.coli Stämme erfolgte nach einem Protokoll von Hanahan (Hanahan, 1983). Die kompetenten Bakterien wurden bei -80°C aufbewahrt. Für eine Transformation wurden 200 μ l dieser Bakterien zusammen mit ca. 50 ng eines Ligationsansatzes und 7 μ l DMSO gemischt und anschließend für 90 sec 42°C im Wasserbad inkubiert. Nach sofortiger Zugabe von einem Milliliter SOC-Medium und einer 60-minütigen phänotypischen Expression bei 37°C wurde die Zellsuspension auf Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

Alternativ dazu wurde auch nach einem Transformationsprotokoll von Chung et al. gearbeitet (Chung et al., 1989). Hierbei wurden die zu transformierenden Bakterien in LB Medium bis zu einer OD₆₀₀ von 0,3-0,4 angezogen. Ein Milliliter dieser Kultur wurde bei 3000rpm in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert und die sedimentierten Bakterien zusammen mit 100ng Plasmid-DNA in 100 μ l TSS-Puffer resuspendiert. Der Transformationsansatz wurde 30min auf Eis inkubiert, anschließend 90sec bei 42°C. Nach sofortiger Zugabe von einem Milliliter SOC-Medium und einer 60-minütigen phänotypischen Expression bei 37°C wurde die Zellsuspension auf

Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

<u>SOC-Medium:</u>	2% Trypton; 0,5% Hefeextrakt; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl ₂ ; 10 mM MgSO ₄ ; 0,2% Glukose
<u>TFB-Puffer:</u>	10 mM K-Mes (pH 6,2), 50 mM CaCl ₂ , 45 mM MnCl ₂ , 100 mM RbCl
<u>TSS-Puffer:</u>	LB-Medium, 10% (wt/vol) PEG (Molekulargewicht 3350 oder 8000), 5% (vol/vol) DMSO, 20-50mM Mg ²⁺ , pH von 6,5

Elektroporation:

Lineare DNA Fragmente zur homologen Rekombination wurde durch Elektroporation mit einem Gene-Pulser (Bio-Rad) in DH10B E. coli transfiziert, die bereits ein Maxi-EBV und p2650 trugen. Die Herstellung elektrokompetenter DH10B Bakterien erfolgte nach einem Protokoll von Sheng et al. (Sheng et al., 1995). 50 µl kompetente Bakterien wurden mit bis zu 3 µg Plasmid-DNA 5 min lang auf Eis inkubiert und anschließend in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (0,2 cm Elektrodenabstand) überführt. Die Elektroporation erfolgte bei 1,8 kV, 200 Ω und 25 µF mit einer Zeitkonstante von 2 sec. Die Bakterien wurden sofort in SOC-Medium überführt und nach einer 120-minütigen phänotypischen Expression bei 30°C (wegen des temperatursensitiven Rekombinationssystems) zur homologen Rekombination auf Agarplatten mit entsprechenden Antibiotika ausplattiert. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 42°C damit nur Kolonien entstehen konnten, die bereits homolog rekombiniert hatten.

3.1.3 Fermentation von E.coli

Zur Gewinnung von EBV Plasmid-DNA wurden DH10B Bakterien in einem 5 l Tischfermenter (LABFORS) kultiviert. 800 ml einer stationär gewachsenen Vorkultur wurden in den Fermenter überführt und 3,8 l LB-Medium, 300 ml 5M NaCl, 100 ml 87%-iges Glycerin und die entsprechenden Antibiotika (siehe Endkonzentrationen unter 3.1.1) hinzugegeben. Die Kultivierung erfolgte bei 37°C, pH 7,0 und einer Rührerdrehzahl von 400 rpm. Die Werte der einzelnen Parameter wurden durch entsprechende Elektroden und Sensoren gemessen und vom digitalen Mess- und Regelsystem der Fermenterkonsole erfasst und reguliert (Handbuch 1.4, LABFORS Klein Fermenter System). Die pH-Regulation erfolgte dabei mit einmolarer Natronlauge, der 50%-iges Glycerin als zusätzliche Kohlenstoffquelle für die Bakterien zugemischt war. Um zu heftiges Schäumen zu vermeiden wurde zu Beginn 500µl

Speiseöl zugegeben. Die weitere Antischaum-Zugabe wurde durch eine entsprechende Antischaum-Elektrode geregelt. Die Belüftung des Fermenters erfolgte durch ein Begasungsrohr mit einer konstanten Begasungsrate von 1 Vol. Luft/Vol. Kultur x min. Die Kultivierung der DH10B E.coli Bakterien erfolgte bis zu einer OD₆₀₀ von 4 bis 5. Nach Erreichen dieser Zelldichte wurden die Bakterien für die anschließende DNA-Präparation geerntet (siehe 3.3.4).

3.2 Zellkultur und Analyse von Zellen

3.2.1 Zellkulturbedingungen

Alle Zellen wurden in einem Inkubator bei 37°C unter einer Atmosphäre von 5 % CO₂ kultiviert. Das Kulturmedium RPMI 1640 wurde mit 10% Kälberserum (Seromed®), 100 µg/ml Streptomycin, 100 IE/ml Penicillin, 0,5 µg/ml Amphotericin B, 1 mM Natriumpyruvat und 5 mM HEPES versetzt. Bei der Kultur von stabilen Maxi-EBV Zelllinien wurde 100 µg/ml Hygromycin zur Aufrechterhaltung des episomalen Plasmids zugesetzt.

Adhärente Zelllinien

Die adhärente Zelllinie HEK293 wurden in RPMI 1640 Kulturmedium mit den angegebenen Zusätzen vermehrt und alle 2-3 Tage 1:6 verdünnt. Die adhärente Fibroblastenzelllinie WI-38 wurde in RPMI 1640 Kulturmedium mit den angegebenen Zusätzen vermehrt und ebenfalls alle 2-3 Tage 1:6 verdünnt. Vor Kokultur mit primären B-Lymphozyten wurden die Zellen für 90 min mit einer 50Gy γ -Strahlung behandelt, um die Proliferation zu stoppen. Zum Ablösen und Verdünnen von adhären Zellen wurde den Zellen Trypsin zugesetzt, so dass sie gerade vollständig benetzt waren. Nach 10 minütiger Inkubation bei RT wurden die Zellen abgespült und (ein Teil) in frisches Vollmedium überführt.

Induktion des LMP2A:proTNF α :His₆-tag Rezeptors

Die Induktion des chimären Rezeptors auf der Oberfläche von B2792-Zellen erfolgte bei einer Zellkonzentration von 5×10^5 Zellen/ml in RPMI 1640 Kulturmedium. Für die Quervernetzung über den anti-His₆ tag wurden der Zellsuspension 2,5 μ g Kaninchen-anti-His₆ Antikörper pro ml Kulturmedium zugesetzt. Nach 30-minütiger Inkubation bei 37°C wurde die Quervernetzung durch Zugabe von 50 μ g/ml Sekundärantikörper (Ziege-anti-Kaninchen, FITC gekoppelt) verstärkt. Die Induktion erfolgte für 48 h.

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte in einer Neubauer Zählkammer. Um tote von lebenden Zellen unterscheiden zu können, wurde die Zellsuspension mit einem Volumen einer 0,1%-igen Eosin-Lösung (in PBS) gemischt. Tote Zellen nehmen den Farbstoff auf und sind deshalb im Mikroskop an ihrer Rotfärbung im Gegensatz zu vitalen Zellen zu erkennen. Alternativ dazu wurde die Zellzahl mittels eines Partikelzählers der Firma Coulter nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

3.2.2 Aufbewahrung von Zellen

Zellen können in Gegenwart von DMSO in flüssigem Stickstoff eingefroren und über längere Zeit gelagert werden. Zum Einfrieren wurden etwa 10^7 Zellen abzentrifugiert (1200 rpm, 5 min., 20°C) und in 1 ml RPMI-Medium mit 30 % FKS und 10 % DMSO resuspendiert und in ein 2 ml-Gefäß (NUNC-Cryotube™) pipettiert. Um die Zellen schonend abzukühlen, wurde das Röhrchen in einer Einfrierbox der Firma NUNC® mit Isopropanolmantel auf -80°C abgekühlt. Zur längeren Lagerung wurden die Zellen anschließend in flüssigen Stickstoff überführt. Zur Wiederverwendung wurden die Zellen in einem 37°C warmen Wasserbad schnell aufgetaut. Anschließend wurden die Zellen vorsichtig in 30 ml vorgewärmten Kulturmedium gewaschen und in ein Kulturgefäß mit frischem Medium überführt.

3.2.3 Präparation primärer B-Zellen

Humane primäre B-Zellen wurden aus Routineentnahmen von Adenoiden oder „buffy-coats“ gewonnen. „buffy-coats“ sind durch Zentrifugation aufkonzentrierte Blutproben, in denen das Plasma und der überwiegende Teil der Erythrozyten entfernt worden ist. Aus den Adenoiden wurde durch mechanisches Zerkleinern und Filtrieren durch ein Zellsieb mit einer Porengröße von 100 μ m eine Einzel-

zellsuspension hergestellt. Diese Zellsuspension bzw. jeweils 10 ml „buffy-coat“ wurden mit PBS auf ein Volumen von 35 ml aufgefüllt. Durch Zugabe von 0,5 ml Schaferthozyten wurden T-Lymphozyten für 15 min. bei Raumtemperatur rossettiert. Die B-Lymphozyten wurden anschließend über einen 30%-igen Ficoll-Gradienten (Ficoll-Dichte 1.077) aufgereinigt. Dafür wurden je 15 ml Ficoll mit 35 ml Zellsuspension überschichtet. Es folgte eine Zentrifugation bei 1850 rpm (750g) für 45 min. bei 10°C. Die Interphase des Gradienten, die neben Monozyten fast ausschließlich B-Lymphozyten enthält, wurde abgenommen und Ficollreste und restliche Thrombozyten durch dreimaliges fraktioniertes Waschen der Zellen (Zentrifugationen: 1700 rpm, 1500 rpm, 1200 rpm, je 7 min. bei 10°C) mit PBS entfernt. Anschließend wurden die primären B-Zellen in Kulturmedium suspendiert und meist direkt verwendet. Die Zellen können auch über Nacht bei 37°C im Inkubator aufbewahrt und am nächsten Tag für Experimente eingesetzt werden.

3.2.4 Transfektion von Zellen und Selektion stabiler Zellklone mit Hygromycin

Die zu transfizierenden Zellen wurden in 6-Loch-Platten bis zu einer 70%-igen Konfluenz kultiviert. Die Transfektion mit Lipofectamin™ in serumfreiem Medium (Optimem I, Life Technologies) wurde nach Angaben des Herstellers (Life Technologies) durchgeführt (6 µl Lipofectamin™-Reagenz pro 1 µg transfizierter DNA). Alternativ dazu wurde auch ein modifiziertes Protokoll für die Transfektion mit Polyfect™ der Firma Qiagen verwendet. Hierbei wurde entgegen den Angaben des Herstellers die Menge an Polyfect™ auf 4 µl pro µg transfizierter DNA verringert, das zu einer besseren Transfektionseffizienz führte.

Für die Etablierung EBV-positiver stabiler Zelllinien wurden 293 Zellen in 6-Loch-Platten mit 1 µg DNA des entsprechenden Maxi-EBV Plasmids transfiziert. Am nächsten Tag wurden die Zellen in Zellkulturschalen (Durchmesser 140 mm) überführt und Hygromycin (100 µg/ml Endkonzentration) dem Kulturmedium hinzugegeben. In den ersten Tagen nach Transfektion wurde das Kulturmedium täglich vorsichtig gewechselt, um die toten Zellen zu entfernen. Drei bis vier Wochen später wurden auswachsende Zellklone, die sich bei der Fluoreszenzmikroskopie als

positiv für die GFP Expression erwiesen, mit einem in Trypsin getränkten Filterpapier von der Zellkulturschale abgelöst und klonal expandiert.

3.2.5 Produktion infektiöser Viruspartikel und Titerquantifizierung

Stabile 293-Maxi-EBV-Zellklone, die lytisch induziert werden sollten, wurden in 6-Loch-Platten bis zu einer 50%-igen Konfluenz kultiviert. Danach wurden sie mit Expressionsplasmiden für BZLF1 (p509; 0,3 µg/Loch) und BALF4 (p2670; 0,5 µg/Loch) nach Angaben der Hersteller der Transfektionsreagenzien transfiziert, um den lytischen Zyklus zu induzieren. Die Überstände wurden nach 72h Kultivierung bei 37°C geerntet und filtriert, um Zelltrümmer abzutrennen (Porengröße 0,8 µm). Die Quantifizierung verschiedener Virusüberstände erfolgte mit Hilfe der GFP-Expression infizierter Raji-Zellen. 3×10^5 Raji-Zellen wurden mit unterschiedlichen Volumina an Kulturüberständen für 4 Tage bei 37°C in 24-Loch-Platten inkubiert. Am Tag nach der Infektion wurde das Medium gewechselt. Vier Tage nach Infektion wurden die Zellen in PBS gewaschen und der Prozentsatz GFP-positiver Zellen durch UV-Mikroskopie bestimmt. Auf Basis dieser Daten wurden „grüne Raji-Einheiten“ (GRE) pro ml Kulturüberstand als Maß für die absolute Zahl infektiöser Maxi-EBV-Partikel in den einzelnen Kulturüberständen von 293-Maxi-EBV Zelllinien definiert.

3.2.6 Konzentration von Virusüberständen

Bei Experimenten, in denen eine höhere Konzentration an Viruspartikel benötigt wurde, als mit den gereinigten Überständen erreicht werden konnte, wurden die infektiösen Partikel in den Überständen aufkonzentriert. Dies geschah durch zwei bis drei Stunden lange Ultrazentrifugation bei 20000xg und 4°C in einem Ausschwingrotor. Die Viruspellets wurden in einen zehntel Volumen Zellkulturmedium aufgenommen und über Nacht bei 4°C zur vollständigen Resuspendierung inkubiert.

3.2.7 Infektion von primären B-Zellen mit Maxi-EBVs zur Bestimmung der Immortalisierungseffizienz

Primäre humane B-Lymphozyten aus Adenoiden oder „buffy-coats“ wurden mit verschiedenen Verdünnungen angeglicherer Virusüberstände infiziert. Die Infektion erfolgte für 24h in Zellkulturflaschen ohne „feeder-layer“. Um die Infektion abzuschließen, wurden die Zellen danach abzentrifugiert (1200rpm, 7min, 20°C) und in frischen Medium wieder aufgenommen. 1×10^5 infizierte B-Zellen wurden in einem Volumen von 100 μ l pro Loch in 96-Loch-Platten auf γ -bestrahlten WI38-Zellen als „feeder-layer“ ausplattiert. Einmal wöchentlich wurde ein Teil des Kulturmediums durch frisches ersetzt. Nach 4-6 Wochen konnte der prozentuale Anteil der Kulturgefäße mit proliferierenden B-Lymphozyten bestimmt und einzelne Klone weiter expandiert werden. Für die Bestimmung der Immortalisierungsfrequenzen verschiedener Maxi-EBV Mutanten wurden nur Verdünnungsstufen in die Kalkulation einbezogen, die die statistischen Voraussetzungen einer „one hit“-Kinetik erfüllten (Frisan et al., 2001). Das ist der Fall bei einer 63%-igen (oder kleineren) Häufigkeit positiver Ereignisse bzw. bewachsener Löcher. Wie in Abbildung 4.11 zu sehen ist, wurden in einem Koordinatensystem die eingesetzten grünen Raji Einheiten (GRE) gegen den prozentualen Anteil bewachsener Löcher aufgetragen. Die Bestimmung der Immortalisierungseffizienz für ein Experiment erfolgte graphisch durch Fällen des Schnittpunktes der 63% Linie mit der Kurve eines Immortalisierungsexperimentes auf die X-Achse.

3.2.8 Infektion von primären B-Zellen mit Maxi-EBVs für Immunfluoreszenz- oder FACS Analysen

Primäre B-Lymphozyten, die nach der Infektion für spätere FACS Analysen oder Immunfluoreszenzen verwendet werden sollten, wurden zunächst für 24 Stunden in Zellkulturflaschen infiziert und danach gewaschen, dann aber in einem zweikammrigen Kultursystem weiter kultiviert. Dazu wurden WI38-Zellen in 6-Loch-Platten ausplattiert und γ -bestrahlt. Die infizierten B-Lymphozyten wurden dazu in ein Zellsieb mit einem Porendurchmesser kleiner als ihr eigener Durchmesser

(Porengröße 0,4 μm) ausplattiert. So konnten Zellen entnommen werden, ohne den „feeder-layer“ zu beschädigen, oder störende WI38 Zellen mit zu analysieren.

3.2.9 Immunfluoreszenzanalysen

Die Expression des lytisch induzierten EBV-Proteins gp350 in induzierten 293-Zellen wurde durch Immunfärbungen nachgewiesen. Ebenso die Expression von EA-D, EBNA2, BHRF1 und BZLF1 in infizierten B-Lymphozyten.

Die Zellen wurden mit PBS gewaschen, auf markierten Objektträgern der Firma MEDCO, München getrocknet und für 20 min. in Aceton fixiert und permeabilisiert. Anschließend wurden sie mit spezifischen monoklonalen Antikörpern 30 min. lang bei 37°C in einer „feuchten Kammer“ (erhöhte Luftfeuchte durch Wasser auf dem Boden eines geschlossenen Gefäßes) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Objektträger mit PBS in einer Glasküvette wurden die Zellen mit einem zweiten, Cy3-konjugierten Sekundärantikörper für weitere 30 min. bei 37°C inkubiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen mit PBS wurden die Zellen in einer 1%-igen PBS/Glyzerin-Lösung eingebettet. Zur Analyse wurden die gefärbten Zellen mit Licht der Wellenlänge 546 nm bestrahlt und mit einem invertierten Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Axiovert 10) mit dem geeigneten Filtersatz mikroskopiert.

Nicht-permeabilisierte Zellen zum Nachweis von extrazellulären Antigenen wie dem LMP2A:proTNF α :His₆-tag Chimärs wurden in Suspension mit Antikörpern inkubiert. Dabei wurden die gewaschenen Zellen in 50 μl PBS/3%FCS resuspendiert und mit 1 μl anti-His₆-Antikörper (0,1mg/ml) versetzt. Nach 30min Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Zellen mit einem ml PBS gewaschen, abzentrifugiert, in 50 μl PBS/3%FCS resuspendiert und mit 1 μl Zweitantikörper (1mg/ml) versetzt. Die Inkubation erfolgte wiederum für 30 min bei Raumtemperatur im Dunklen. Nach erneutem Waschen wurden die Zellen wie oben beschrieben mikroskopiert.

3.2.10 FACS-Analysen

Einzelzellen einer Zellsuspension können durch Durchflußzytometrie in einem FACS™-Gerät analysiert werden. Nach Färbung von Zellen mit Antikörpern, die mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt sind, kann man in der FACS-Analyse auf der Basis einzelner Zellen bestimmen, wie viele Zellen einer Population ein bestimmtes Protein exprimieren und welches relative Expressionsniveau erreicht wird. Erkennt der verwendete Antikörper ein Antigen, das sich im Zytoplasma oder im Zellkern befindet, müssen die Zellen vor der Färbung permeabilisiert werden.

Nachweis von Oberflächenmolekülen

Für die Detektion des His₆-tags wurden ca. 1×10^6 Zellen in PBS /1%FCS /0,1%Azid gewaschen und mit 1µl eines anti-His₆ Antiköpers (0,1mg/ml) für 20 min inkubiert. Nach Waschen in PBS /1%FCS /0,1%Azid wurden die Zellen mit einem PE-konjugiertem Sekundärantikörper 20 min. lang im Dunklen inkubiert. Als Negativkontrolle wurden Zellen anstelle des spezifischen Erstantikörpers mit einem irrelevanten Antikörper gleichen Isotyps (z.B. im Falle von humanen B-Zellen anti-CD4) oder nur mit Sekundärantikörper inkubiert. Diese Zellen wurden als sogenannte Isotypkontrolle eingesetzt.

Intrazellulärer Nachweis von Proteinen

Für die Detektion der sich im Zellkern befindlichen Proteine EA-D, EBNA2, BHRF1 und BZLF1 mussten die Zellen für die FACS Analyse fixiert und permeabilisiert werden. Dies geschah mit dem „FIX and PERM permeabilisation kit“ der Firma „An Der Grub“, Austria. Bis zu 1×10^7 Zellen wurden in einem ml Waschpuffer (PBS/1%FCS/0,1%Azid) gewaschen und die abzentrifugierten Zellen in 100µl Lösung A für 15 min fixiert. Nach erneutem Waschen wurden die Zellen in 100µl Lösung B permeabilisiert. Dabei wurden entweder 1µl des anti-EA-D Antikörpers (0,1mg/ml), jeweils 20µl der Kulturüberstände mit den anti- BHRF1, EBNA2 und BZLF1 Antikörpern, oder ein irrelevanter Antikörper als Isotypkontrolle zugegeben und für 15 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Waschen in PBS/1%FCS/0,1%Azid erfolgte die Inkubation mit PE- und Cy5-konjugierten Sekundärantikörpern, wiederum in 100µl Lösung B für 15 min. bei Raumtemperatur im Dunklen. Vor der FACS-Analyse wurden die Zellen ein weiteres Mal in PBS/1%FCS/0,1%Azid gewaschen

Propidium Iodid (PI) Färbung fixierter und permeabilisierter Zellen

Vergleichbar mit Ethidiumbromid bei der Gelelektrophorese lagert sich Propidiumiodid in die DNA ein und kann durch Licht geeigneter Wellenlänge zum Fluoreszieren angeregt werden. In unbehandelten Zellen dient die Propidiumiodidfärbung zur Unterscheidung zwischen lebenden und toten Zellen. Der Farbstoff kann nur in tote Zellen eindringen, deren Membran permeabilisiert ist. Bei fixierten und permeabilisierten Zellen ist die Intensität der Propidiumiodidfluoreszenz ein Maß für den DNA-Gehalt der Zelle. Sich teilende Zellpopulationen besitzen bei der Analyse zwei Spitzen in der Fluoreszenz. Der erste wird von Zellen in der G1-Phase gebildet, der zweite in doppelter Intensität von Zellen, die sich gerade in G2 befinden. Apoptotische Zellen haben einen „sub-G1-peak“, sie zeigen starke Fluoreszenz bei geringerer PI-Intensität als die Spitze um die Zellen in G1. Zur Messung des DNA-Gehalts wurden Zellen wie für ein intrazelluläres FACS fixiert und permeabilisiert. Allerdings wurde zu Lösung B und dem Waschpuffer Propidiumiodid (50µg/ml Endkonzentration) zugegeben.

3.3 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, Ligierung 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).

3.3.1 Extraktion zellulärer DNA aus eukaryotischen Zellen

Ca. 1×10^7 Zellen wurden abzentrifugiert, mit PBS gewaschen, in 2,1 ml TE aufgenommen und durch Zugabe von 1% SDS lysiert. Das Lysat wurde 2 h lang bei 50°C, alternativ über Nacht bei 37°C, mit Proteinase K (50 µg/ml Endkonzentration) verdaut. Nach Zusetzen von 1 ml 5M NaCl wurde die Suspension kräftig geschüttelt und für 30 min. bei 15300 rpm 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.

3.3.2 Schnellaufreinigung von Plasmiden mit einer Größe von bis zu 30kb

Die Plasmidpräparation erfolgte nach der modifizierten „Boiling Method“ (Holmes and Quigley, 1981). 1/4 eines konfluenten Bakterienrasens auf einer Agarplatte wurde abgeschabt und in 200 µl Lysispuffer resuspendiert. Durch Zugabe von 3 µl Lysozym-Lösung (10 mg/ml) wurde die Zellwand aufgelöst. Zur Denaturierung der Proteine wurde der Ansatz für 2 min bei 100°C erhitzt und 5 min auf Eis abgekühlt. Durch Zentrifugation (10 min, 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 H₂O gelöst.

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

3.3.3 Präparative Plasmidreinigung

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

3.3.4 Präparation von EBV-Plasmid-DNA aus E.coli

Die 5 l Fermenterkultur wurde für 15 min. bei 5000 rpm 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 100 ml 5xTE Puffer aufgenommen. 110 g CsCl wurden hinzugegeben und aufgelöst. Diese Mischung wurde auf 4 Ultrazentrifugenröhrchen (Sorvall, 35 ml), in denen je 800 µl Ethidiumbromid (1%w/v, Merck) vorgelegt wurde, verteilt. Die UZ-Röhrchen wurden mit 1,55 g/ml CsCl-Lösung aufgefüllt. Die Zentrifugation erfolgte 72 h lang bei 35000 rpm und 20°C in einem TFT 70.38 Festwinkelrotor einer Beckmann L-60 Ultrazentrifuge. Nach dieser Zeit wurden die DNA-Banden unter UV-Licht (365 nm) sichtbar gemacht und die jeweils unteren Banden, die der „supercoiled“-Plasmid-DNA entsprechen, mit einer Einmalkanüle (2,1x38 mm, BOVI•VET) abgezogen. Die Plasmid-DNA-Mischung wurde in zwei neue 11,5 ml UZ-Röhrchen überführt und diese mit 1,55 g/ml CsCl-Lösung aufgefüllt. Nach erneuter Zentrifugation in einem 70 TI-Festwinkelrotor für 48 h bei 35000 rpm wurde wiederum die untere Plasmid-DNA-Bande 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 400ml einer stationär gewachsenen Kultur ausgegangen. Die Menge und Reinheit der erhaltenen DNA war geringer als nach Fermentation und CsCl-Gradient, aber für eine Transfektion der DNA in HEK293 Zellen ausreichend.

3.3.5 Homologe Rekombination in E.coli zur Konstruktion von Maxi-EBV-Mutanten

Lineare DNA Fragmente zur homologen Rekombination mit einem Maxi-EBV Plasmid, wurden in E.coli DH10B durch Elektroporation (3.1.2) transformiert. Dieser E.coli -Stamm trug das Rezipienten-Maxi-EBV Plasmid p2089 oder ein Derivat davon, sowie das Plasmid p2650. Dieses Rekombinationssystem in E.coli DH10B

wurde während dieser Arbeit 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 einem Maxi-EBV Plasmid das Plasmid p2650, das unter Kontrolle eines temperatursensitiven Replikationsursprungs für die Rekombinase RecA und den Exonukleaseinhibitor Red γ kodiert. Nach Transformation des linearen DNA-Fragments und zweistündiger phänotypischer Expression bei 30°C wurden doppelresistente Klone (Chloramphenicolresistenz durch das Maxi-EBV vermittelt, eine weitere Resistenz durch das rekombinierte Fragment) bei 42°C stabil propagiert. Dabei ging das temperatursensitive und Ampizillinresistenz vermittelnde Plasmid p2650 verloren, was leicht an der Sensitivität der gewachsenen Kolonien gegen Ampicillin nachzuprüfen war.

3.3.6 Southern-Blot-Hybridisierung

15 μ g zelluläre DNA wurden mit entsprechenden Restriktionsenzymen gespalten und in einem 0,7%-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 10 min. lang mit 0,25 M HCl behandelt, um Strangbrüche in den DNA-Fragmenten durch Hydrolyse hervorzurufen. Danach wurde die DNA in 1,5 M NaCl; 1,5 N NaOH denaturiert und durch kapillaren Transfer auf eine Nylon-Membran (Hybond N+) übertragen. Der Transfer wurde nach 2 h beendet (nach: Southern et al., 1975). Die Membran wurde kurz in 2xSSC geschwenkt und anschließend für die Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten Probe verwendet. Die Prähybridisierung erfolgte in 15 ml Hybridisierungspuffer nach Church 60 min. lang bei 65°C (Church and Gilbert, 1984). Nach dieser Zeit wurde der Puffer erneuert, die radioaktiv markierte Probe (3×10^7 dpm) zugegeben und die Hybridisierung an homologe DNA-Bereiche über Nacht bei 65°C durchgeführt. Die hybridisierten Nylonfilter wurden 3x für je 15min bei 65°C in 0,1xSSC; 1% SDS gewaschen, getrocknet und bei -80°C autoradiographiert. Die Dauer der Exposition richtete sich nach der Intensität der Signale.

<u>1xTAE-Puffer:</u>	40 mM Tris-HCl (pH8,0); 5 mM NaAc; 1mM EDTA
<u>2xSSC:</u>	300 mM NaCl, 30 mM Natriumcitrat
<u>Church-Puffer:</u>	400 mM Na ₂ HPO ₄ , 100 mM NaH ₂ PO ₄ , 7% SDS, 1 mM EDTA (pH7,2)

3.3.7 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 and 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 min. bei 95°C, 5 min. Eis) konnte die markierte Sonde direkt zur Hybridisierungslösung gegeben werden.

3.3.8 PCR-Analysen

„Taq“ 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 Temperaturgradienten in einer speziellen PCR Maschine (Robocycler, Stratagene) ermittelt. Für die Extension wurden 90sec pro 1000 zu amplifizierenden Basen angenommen. In der Regel wurden 35 Zyklen für die PCR Amplifikation durchlaufen.

Standardprotokoll für die Amplifikation von Maxi-EBV-DNA Fragmenten:

Reaktionsansatz:

100 ng Maxi-EBV Plasmid-DNA

2 µl MgCl (Promega, 25mM)

1 µl dNTP-Mix (je 10 mM)

je 1 µl Primer (10 mM)

5 µl 10x Taq-Polymerase Puffer

0,2 µl Taq-DNA-Polymerase (5U/ml)

H₂O ad 50 µl

PCR-Programm: 95°C/ 5 min.; 35 Zyklen: 95°C/ 1 min., 53°-58°C/ 1,5 min., 72°C/ 1,5 min.; 72°C/ 10 min., 4°C

Die Oligonukleotide zur Amplifikation und Klonierung der offenen Leserahmen (OLR) von BALF1 und BHRF1 enthielten zusätzlich Restriktionsschnittstellen für die nachfolgende Klonierung der amplifizierten DNA in einen Vektor. Als Matrize diente p2089 DNA.

Die Klonierung des LMP2A:proTNF α :His₆-tag Chimärs erfolgte nach der „overlap and extension“ Technik von Ho et al. (Ho et al., 1989). Bei dieser Art von Mutations-PCR wurden zunächst in zwei getrennten PCR-Reaktionen die beiden Fragmente des LMP2A- und des proTNF α -Anteils amplifiziert. In der einen Reaktion wurde ein flankierender Primer eingesetzt, der an das 3' Ende der Sequenz von proTNF α hybridisiert und an seinem 5' Ende die Sequenz für einen His₆-tag trägt, sowie ein interner Primer, der an die zu erzeugende Übergangsstelle der beiden Proteine bindet und selbst Mutationen für stille Basenaustausche zur Erzeugung einer Restriktionsschnittstelle trägt, die die Aminosäuresequenz nicht verändert. Als Matrize diente eine cDNA von proTNF α , die freundlicherweise von Jürgen Mühlberg, Mainz, zur Verfügung gestellt wurde. In der zweiten Reaktion wurde ein flankierender Primer eingesetzt, der an das 5'-Ende der Sequenz von LMP2A hybridisiert und ein interner Primer, der zu dem 5'-Ende des internen Mutationsprimers der ersten PCR Reaktion komplementär ist. Als Matrize diente das Plasmid pMLP-TP1. Beide PCR Reaktionen wurden wie in Abschnitt 3.3.8 beschrieben durchgeführt. Die beiden Produkte enthalten eine Überlappung, die im Übergangsbereich von LMP2A zu proTNF α liegt. In einem zweiten Schritt wurden diese beiden PCR-Produkte in einer weiteren PCR-Reaktion als Matrize eingesetzt. Durch die Überlappung konnte ein Strang von jedem Fragment als Primer für das andere Fragment verwendet werden. Zusammen mit den beiden flankierenden Primern konnte so das gesamte chimäre Gen amplifiziert werden. Da die 5' und 3'-flankierenden Primer Restriktionsschnittstellen enthielten, konnte das PCR-Produkt geschnitten und in das Plasmid pMLP-TP1 eingefügt werden.

Reverse Transkriptase (RT)-PCR

Jeweils 0,5 μ g gesamtzelluläre RNA der Zelllinien B95.8 und HEK293/2089 wurde mit 100 pmol Oligo-(dT₁₅)-Primern 10 min lang bei 70°C denaturiert und sofort auf Eis gestellt. Die Elongationsreaktion mit Superscript™ II-Reverse Transkriptase (Life Technologies) erfolgte nach Angaben des Herstellers. In die anschließende PCR-Reaktion wurden 2 μ l aus 20 μ l des RT-Reaktionsansatz eingesetzt. Um Kontaminationen der RNA-Präparation mit genomischer DNA zu kontrollieren, wurden zusätzlich 0,05 μ g RNA der Zelllinien in der PCR-Reaktion ohne vorherige Umschreibung in cDNA getestet.

„real-time“-PCR

Konventionelle PCR Reaktionen sind schwierig zu quantifizieren, da die Amplifikation des Produkts sich in den ersten Zyklen nicht über den Hintergrund abhebt, dann nur für kurze Zeit exponentiell ist und eine Quantifizierung erlauben würde, um anschließend in ein Plateau überzugehen. Daher kann die amplifizierte Menge an Produkt am Ende der PCR-Reaktion nicht mehr in Relation zu der Ausgangsmenge an Matrize gesetzt werden. Quantitative Aussagen können nur während der wenigen, exponentiellen Zyklen gemacht werden. Diese können nach der von Higuchi et al. (Higuchi et al., 1992) eingeführten Fluoreszenzbeobachtung nach jedem Zyklus während einer „real-time“-PCR Reaktion leicht identifiziert werden. Während dieser Zyklen kann die Menge an Amplifikat des Produktes nach der Formel: $T_n = T_0(E)^n$ berechnet werden, wobei T_n die Anzahl der amplifizierten Kopien zum Zyklus n , T_0 die Anzahl der Ausgangsmenge an Matrize, E die Effizienz der PCR-Reaktion und n die Zykluszahl ist, an der zum ersten Mal ein PCR Produkt über dem Schwellenwert des Hintergrundes nach zuweisen ist. Die Bestimmung des Zyklus n ist für das Oligonukleotidpaar zur Amplifikation von BALF1 graphisch in der Abb. 3.1.A dargestellt. Hierbei wird durch den linearen Bereich (durch logarithmische Auftragung der exponentielle Amplifikation des PCR Produktes) der Amplifikationskurve eine Ausgleichsgerade gelegt (a). Eine zweite Gerade wird senkrecht zur X-Achse durch den Schnittpunkt der Ausgleichsgerade mit dem Hintergrund der Wasserkontrolle gelegt (b). Der Schnittpunkt dieser Gerade mit der X-Achse (c) gibt die Zyklusanzahl (n) an, die benötigt wird um ein detektierbares Produkt zu erhalten. Die Effizienz einer PCR-Reaktion, abhängig vom verwendeten Oligopaar, muss durch eine Standardreihe mit bekannter Ausgangsmenge an eingesetzter Matrize bestimmt werden Dies ist exemplarisch in Abb. 3.1.A dargestellt. Zur Bestimmung der Effizienz sind in Abb.3.1.B die Anzahl der Zyklen (n) bis zur ersten Detektion eines Produktes über der Wasserkontrolle auf der Y-Achse gegen den Logarithmus der initial benötigten Kopienanzahl auf der X-Achse aufgetragen. Die abgelesene Steigung der Geraden ist dabei mit $\frac{-1}{\log(\text{Effizienz})}$ gleichzusetzen. Dabei ist der Wert der Effizienz immer zwischen 1 (keine Amplifikation des Produktes) und 2 (Verdopplung des Produktes bei jedem Zyklus). Die Steigung der Geraden ist immer negativ. In einer PCR-Standardreaktion kann die Effizienz der PCR Reaktion auch nach Formel

$T_n = T_0(E)^n$ berechnet werden, wobei T_0 bekannt ist, der Zyklus n aus dem Graph ermittelt und T_n nach Angaben des Herstellers bei „real time“ PCR Reaktionen mit einem „Light-cycler“ (Roche Diagnostics, Mannheim) mit 10^{10} Kopien angenommen wird.

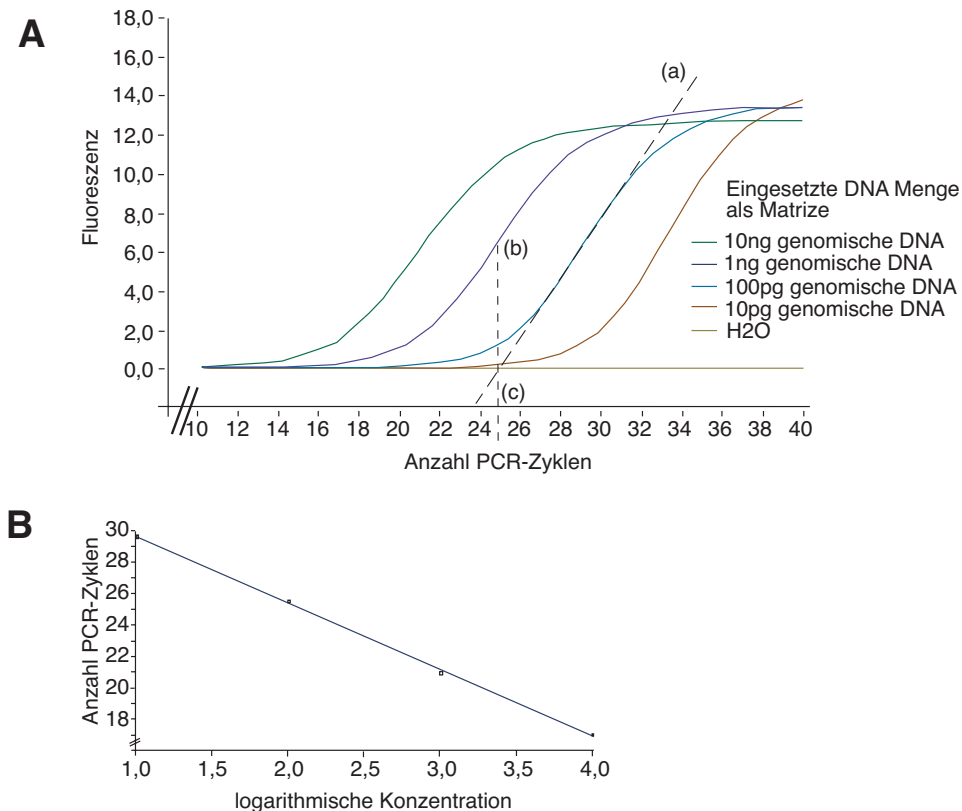


Abb.3.1: Quantifizierung der Menge der eingesetzten Matrice bei der real-time PCR

A: Bestimmung der anfänglich in die PCR Reaktion eingesetzten Menge an Matrice: durch den linearen Bereich (logarithmischer Auftrag der exponentiellen Amplifikation des PCR Produktes) der Amplifikationskurve wurde eine Ausgleichsgerade gelegt (a). Eine zweite gerade wird senkrecht zur X-Achse durch den Schnittpunkt der Ausgleichsgeraden mit dem Hintergrund der Wasserkontrolle gelegt (b). Der Schnittpunkt dieser Gerade mit der X-Achse (c) gibt die Zyklenzahl an, die benötigt wird um ein detektierbares Produkt zu erhalten. Dies ist nach Angaben des Herstellers bei der „real-time“ PCR Reaktionen mit dem „Light Cycler“ (Roche Diagnostics, Mannheim) bei ca. 10^{10} Moleküle der Fall. Die Anzahl der anfänglich eingesetzten Kopien berechnet sich damit aus 10^{10} Moleküle / (Effizienz der PCR Reaktion)^{Zyklenzahl}. Bei dem Standardwert, durch den die Geraden gelegt wurden, beträgt die anfänglich eingesetzte Kopienanzahl $10^{10}/1,72^{25,5}$ also $9,8 \times 10^3$ Kopien.

B: Bestimmung der Effizienz der PCR-Reaktion: die Y-Achse beschreibt die benötigte Anzahl an PCR-Zyklen, um ein detektierbares Produkt über dem Hintergrund zu erhalten. Auf der X-Achse ist der Logarithmus der dazu initial benötigten Kopienanzahl aufgetragen. Die Steigung der Geraden ergibt sich aus $\frac{-1}{\log(\text{Effizienz})}$. Dabei beträgt die Effizienz zwischen 1 (keine Amplifikation des Produktes) und 2 (Verdopplung des Produktes bei jedem Zyklus). Die Steigung der Geraden ist immer negativ. In diesem Beispiel (für das Oligopaar zur Amplifikation von BALF1) beträgt die Steigung der Geraden $-4,241$. Damit beträgt die Effizienz 1,72.

Zur Detektion von BALF1 und BHRF1 in frisch infizierten B-Lymphozyten wurden 1 µg gesamtzelluläre RNA mit dem cDNA-Synthese-System der Firma Roche diagnostics nach Angaben des Herstellers revers transkribiert. 4 von 20 µl der amplifizierten cDNA wurden in eine „real time“ PCR Reaktion mit einem „Light-cycler“ eingesetzt. Die Amplifikation erfolgte wie bereits bei Schepers et al. (Schepers et al., 2001) beschrieben.

Reaktionsansatz:

4 µl cDNA

0,8 µl MgCl (Roche, 25mM)

1 µl Primer Mix (5 mM zur Amplifikation von BHRF1, 2,5 mM zur Amplifikation von BALF1)

2 µl Polymerase Mix (enthält dNTPs, „hot-start“-DNA-Polymerase, CYBR-green I)

12,2 µl H₂O

3.4 RNA-Arbeitstechniken

3.4.1 Isolierung von gesamtzellulärer RNA

Die Isolierung gesamtzellulärer RNA erfolgte mit dem „High Pure RNA Isolation Kit“ der Firma Roche Diagnostics, Mannheim. Alle Puffer und Lösungen sind Bestandteil des Kits. Die Präparation erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

3.5 Proteinarbeitstechniken

3.5.1 Immunoblot Analyse

Ca. 10⁷ Zellen pro Ansatz wurden in 200 µl NP40-Puffer resuspendiert, mechanisch gemischt (Vortex) und eine Stunde lang über Kopf rollend bei 4°C lysiert. Die unlösliche Fraktion wurde durch zweimalige Zentrifugation (15 min, 15000 Upm, 4°C) abgetrennt. Dabei wurde der Überstand immer in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zur Denaturierung der Proteine wurden die Lysate mit SDS-Probenpuffer versetzt und 10 min lang bei 70°C erhitzt. Anschließend wurden die Proteine durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) in „mighty small“-Gelapparaturen (Hofer) nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Als Molekulargewichtsstandard wurde die „BenchMark™ Prestained Protein Ladder“ (Life Technologies, Eggenstein) verwendet. Die SDS-PAGE erfolgte bei 35 mA und maximaler Voltzahl in 12%igen SDS-Gelen, die mit Sammelgel überschichtet wurden

(Laemmli, 1970). Unmittelbar nach der Elektrophorese wurden die aufgetrennten Proteine mit Hilfe des „SemiPhor“-Elektroblotsystems von Hoefer auf eine Hybond-C Membran (Amersham) transferiert. Der Transfer erfolgte bei 80mA innerhalb von 40 min. Nach dem Transfer der Proteine auf die Membran wurde diese eine Stunde lang in Blocklösung geschwenkt, um unspezifische Proteinbindestellen abzusättigen. Anschließend wurde die Membran über Nacht mit dem primären Antikörper gegen LMP2A (14B6, 0,8µg/ml) in Waschpuffer bei 4°C inkubiert. Vor Zugabe des Zweitantikörpers wurde die Membran fünfmal für 5 min in Waschpuffer geschwenkt. Die Inkubation mit dem gegen den Primärantikörper gerichteten und Peroxidasegekoppelten Sekundärantikörper in Waschpuffer (anti-Ratte-HRP gekoppelt, Verdünnung 1:10000) erfolgte bei Raumtemperatur für 2 h. Der Immunoblot wurde wieder dreimal für 5 min in Waschpuffer gewaschen, anschließend zweimal für 5 min in PBS. Danach wurde er mit Hilfe von verstärkter Chemilumineszenz (ECL, Amersham) nach Angaben des Herstellers entwickelt. Die Auflagezeit des Films musste auf mindestens 12 h ausgedehnt werden um LMP2A Proteine zuverlässig zu detektieren.

<u>NP40-Puffer:</u>	1% Nonidet P40; 50mM Tris-HCL (pH 7,4); 150mM NaCl; 2mM EDTA; 0,5 mM Phenylmethylsulfonylfluorid; Aprotinin (10µg/ml); Leupeptin (10µg/ml); Pepstatin A (10µg/ml); 1 mM Natriumorthovanadat;
<u>SDS-Probenpuffer (4 fach):</u>	100 mM Tris-HCl (pH 6,8); 4 % SDS; 20 % Glyzerin; 0,2 % Bromphenolblau
<u>12 % SDS-Gel (100 ml):</u>	40,0 ml H ₂ O; 25,0 ml 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8); 1 ml SDS (10%); 33,33 ml Acrylamid (30%)/Bisacrylamid (0,8%)-Lösung; 1,0 ml Ammoniumpersulfat (APS)-Lösung (10%) und 40 µl N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)
<u>Sammelgel (10 ml):</u>	5,62 ml H ₂ O; 2,5 ml 0,5 M Tris-HCl (pH 6,8); 100µl 10 % SDS; 1,68 ml Acrylamid (30%)/Bisacrylamid (0,8%)-Lösung; 100 µl Ammoniumpersulfat (APS)-Lösung (10%) und 6 µl N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (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
<u>Waschlösung:</u>	20 mM Tris-HCl (pH 7,4); 150 mM NaCl; 1% Magermilchpulver; 0,04% Tween-20

4. Ergebnisse

Zum besseren Verständnis habe ich den Ergebnissteil in drei Abschnitte gegliedert. Der erste Teil beschreibt die Herstellung rekombinanter Viren (Maxi-EBVs), die in unterschiedlichen Kombinationen in den Genen BALF1, BHRF1, BZLF1 und LMP2A deletiert sind. Dieser Abschnitt beschreibt allgemein die genetische Manipulation der DNA in E.coli, die Transfektion und Selektion von stabilen HEK293 Zelllinien, sowie die Induktion des lytischen Zyklus zur Produktion von infektiösen Partikeln. Deren Quantifizierung schließt sich an, um Virusüberstände verschiedener Mutanten aneinander anzugleichen. Ein Fließschema dieses Ablaufes ist in Abbildung 4.1 dargestellt. Quantifizierte Virusüberstände sind der Ausgangspunkt für die nachfolgenden beiden Abschnitte. Der zweite Abschnitt beschreibt die Funktionsanalyse der beiden Gene BALF1 und BHRF1, die homolog zum zellulären BCL-2 Gen sind. Mit Hilfe von rekombinanten Deletionsmutanten wurde die Funktion dieser beiden Gene bei der Initiation der latenten Phase des Epstein-Barr Virus und bei der Immortalisierung primärer B-Lymphozyten untersucht. Der dritte Abschnitt behandelt die Funktion des B-Zell-Rezeptor Homologs LMP2A. Dabei wurde mit Deletionsmutanten der Einfluss dieses Proteins auf die Immortalisierungseffizienz und die Unterdrückung des lytischen Zyklus untersucht. Ebenso wird in diesem Abschnitt die Etablierung eines induzierbaren Systems für LMP2A durch genetische Manipulation des Maxi-EBVs beschrieben.

4.1. Herstellung rekombinanter Epstein-Barr Viren

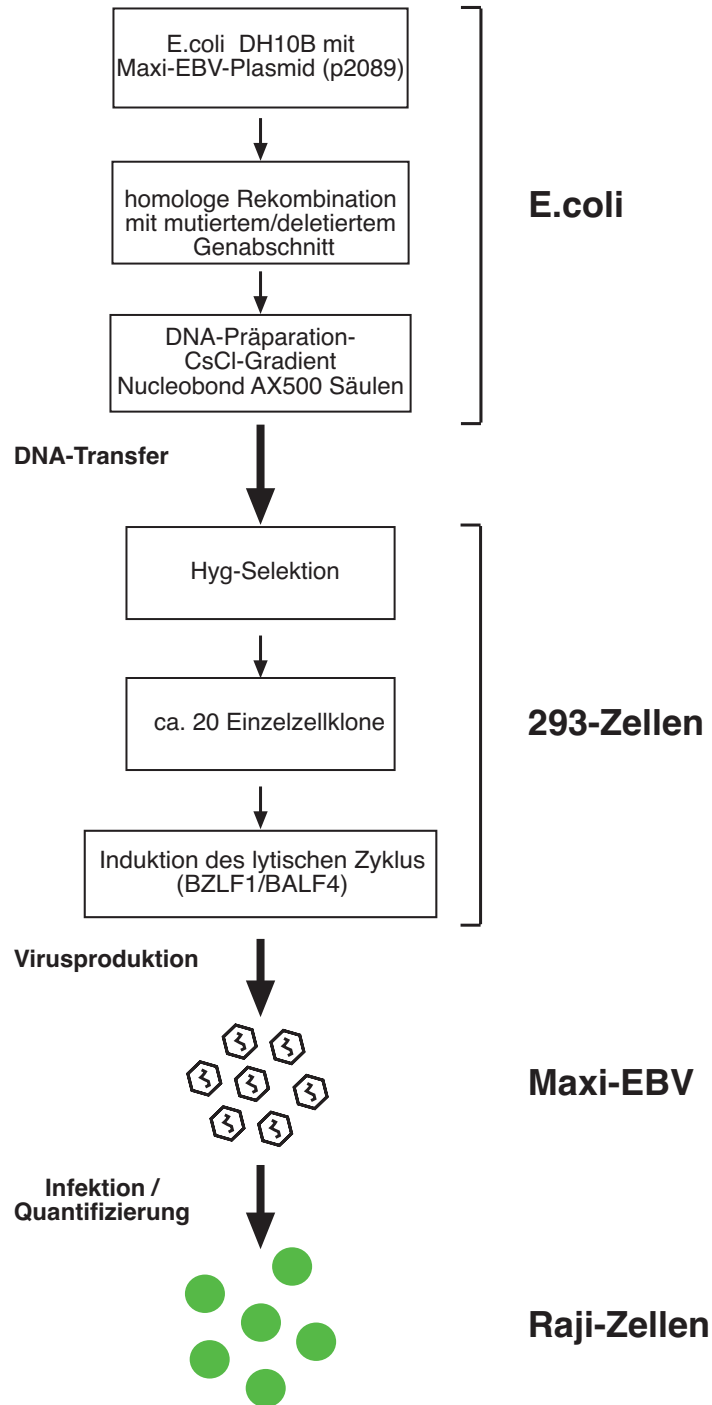


Abb.4.1: Prozessschritte zur Herstellung rekombinanter Epstein-Barr Viren

Dargestellt ist eine schematische Übersicht zur Herstellung rekombinanter Maxi-EBVs von der homologen Rekombination in *E. coli* über die Selektion stabiler 293-Zelllinien als Virusproduzenten bis zum Nachweis und der Quantifizierung infektiöser Partikel in Raji-Zellen.

4.1.1 Das rekombinante Maxi-EBV Plasmid p2089

Durch die Integration eines bakteriellen F-Faktor Plasmids in das Genom des EBV-Stammes B-95.8 wurde dieser für jede beliebige genetische Manipulation in *E.coli* zugänglich gemacht (Delecluse et al., 1998). Zusätzlich wurden in den Bereich der bakteriellen DNA die Gene für die Chloramphenicol-Acetyltransferase zur Selektion in prokaryotischen, sowie für die Hygromycinphosphotransferase zur Selektion in eukaryotischen Zellen eingebracht. Des weiteren trägt das so genannte Maxi-EBV Plasmid 2089 (p2098) das Gen für das „green fluorescent protein“ (GFP) unter der Kontrolle eines CMV Promotors. Durch die GFP vermittelte Fluoreszenz ist eine einfache Identifizierung von erfolgreich transfizierten bzw. infizierten Zellen möglich. Stabil mit p2089 transfizierte HEK293 Zellen ermöglichen die Virusproduktion nach Induktion des lytischen Zyklus von EBV. Die dabei entstehenden Viruspartikel infizieren und immortalisieren effizient primäre humane B-Lymphozyten. Es konnte gezeigt werden, dass das 2089-Virus alle Eigenschaften von Wildtyp EBV besitzt (Delecluse et al., 1998). p2089 dient als Ausgangsplasmid für alle später beschriebenen Mutanten, die durch homologe Rekombination in *E.coli* entstanden sind.

4.1.2 Das Rekombinationssystem in *E.coli* DH10B

Lineare DNA Fragmente werden in *E.coli* Zellen schnell durch die endogenen Exonukleasen degradiert. Homologe Rekombinationen mit linearen DNA Fragmenten können also nur in geeigneten Bakterienstämmen ohne eine funktionsfähige ExonukleaseV durchgeführt werden. Die ExonukleaseV ist ein trimerer Komplex, der von drei Genen (*recBCD*) kodiert wird. Der *E.coli* Stamm BJ5183 eignet sich aufgrund seines *recA*-positiven, *recBC*-negativen Genotyps dafür und bewährte sich lange in diesem Labor. Durch die konstitutive Expression des *recA* Gens wird das Maxi-EBV Genom in diesem Stamm nicht stabil propagiert. Dies machte nach erfolgreicher Rekombination einen Übertrag der DNA in den *E.coli* Stamm DH10B (*recA*⁻, *recBCD*⁺) nötig. Um diese aufwendigen Arbeitsschritte zu vereinfachen, wurde von B. Neuhierl ein temperatursensitives Rekombinationssystem (*ts*) entwickelt (persönliche Mitteilung, zur Veröffentlichung vorbereitet). In den rekombinationsinkompetenten *E.coli* Stamm DH10B wurde zusätzlich zu einem Maxi-EBV Plasmid

das temperatursensitive Plasmid p2650 stabil eingebracht. Dieses enthält die offenen Leserahmen für die Rekombinase *recA* und den ExonukleaseV Inhibitor *red γ* (Muyrers et al., 2000), sowie zur Selektion in Bakterien das Resistenzgen gegen Ampicillin (Abb.4.2.A). Die Replikation erfolgt wegen des temperatursensitiven Replikationsursprungs von p2650 bei einer permissiven Temperatur von 30°C. Nach Elektroporation des linearen Fragments in diese Zellen erfolgt die homologe Rekombination während der Phase der phänotypischen Expression bei 30°C. Nach Temperaturerhöhung auf 42°C, sowie Selektion auf Chloramphenicol (Resistenz des Maxi-EBV Plasmids) und die durch das lineare Fragment neu eingebrachte Resistenz wachsen nur noch Kolonien, die beide Resistenzgene tragen und das lineare Fragment über die homologen Bereiche in das Maxi-EBV integriert haben. Gleichzeitig geht bei dieser Temperatur das ts-Plasmid p2650 verloren (Abb.4.2.B). Dieser Phänotyp der E.coli Kolonien ist durch Replikaplattierung leicht zu überprüfen. Auf richtig erfolgte Rekombination getestet werden anschließend nur Kolonien, die durch den Verlust des ts-Plasmids p2650 sensitiv gegen Ampicillin (Amp^s) und resistent gegen Chloramphenicol (Cam^r) (vermittelt durch das Maxi-EBV), sowie durch das eingebrachte Resistenzgen gegen dieses Antibiotikum resistent sind. Abbildung 4.2 zeigt dieses Vorgehen schematisch und entspricht der „homologen Rekombination mit mutiertem/deletiertem Genabschnitt“ in Abbildung 4.1.

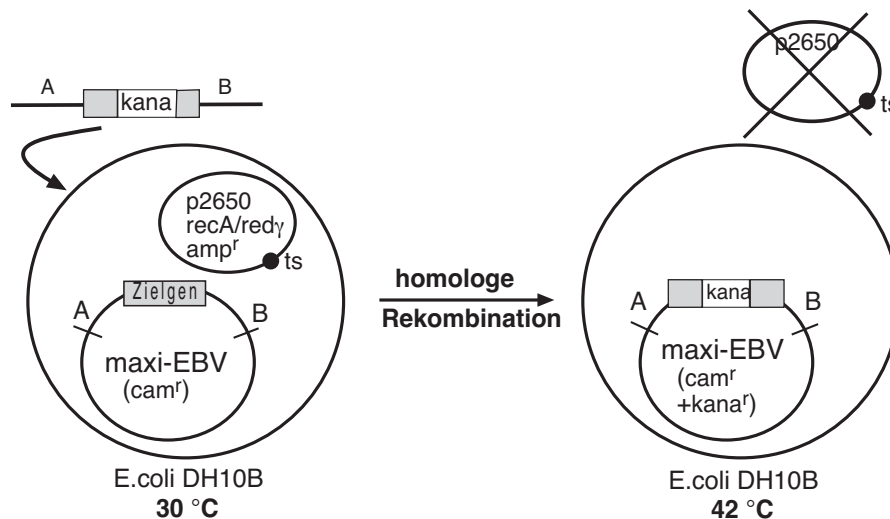


Abb.4.2: Insertionsmutagenese des Maxi-EBV Genoms durch homologe Rekombination in E.coli DH10B.

Die Abbildung zeigt schematisch ein Maxi-EBV Plasmid und das temperatursensitive Plasmid p2650 in dem E.coli Stamm DH10B. Das Maxi-EBV Plasmid vermittelt Resistenz gegen Chloramphenicol (cam^r) und kodiert für ein hier als Zielgen bezeichnetes Gen. Das Plasmid p2650 kodiert für das E.coli Protein $recA$ und das λ -Phagen Protein $red\gamma$. Während von $red\gamma$ die ExonukleaseV der Zelle gehemmt wird, so dass lineare DNA Fragmente eine längere Halbwertszeit haben, vermittelt das $recA$ Protein die effiziente homologe Rekombination im $recA$ defizienten E.coli Stamm DH10B. p2650 vermittelt Resistenz gegen Ampicillin und repliziert ausschließlich bei niedrigerer Temperatur ($30^\circ C$), da es einen temperatur-sensitiven (ts) Replikationsursprung trägt.

Zur homologen Rekombination mit dem Zielgen wurde ein lineares DNA Fragment elektroporiert, das zuvor in einem kleineren Plasmid auf konventionelle Weise kloniert worden war. Dieses Fragment trägt den durch eine Antibiotikaresistenz unterbrochenen Leserahmen des Zielgens, sowie beidseitig davon mindestens 200bp lange, homologe Sequenzen zum Zielgen (in der Abbildung A und B genannt). Nach zwei Stunden phänotypischer Expression bei $30^\circ C$ und über Nacht bei $42^\circ C$ in Anwesenheit von Kanamycin und Chloramphenicol zeigen nur Kolonien Wachstum, in denen eine Rekombination von linearem Fragment und Maxi-EBV Plasmid stattgefunden hat. Gleichzeitig geht bei dieser Temperatur das nicht mehr replikationsfähige Plasmid p2650 verloren. Dies führt zu einer genetischen Stabilität des Maxi-EBV Plasmids.

4.1.3 Multiple Deletionen in einem Maxi-EBV Plasmid durch ein mutiertes Cre-loxP System

Die Insertion von Antibiotikaresistenzen ermöglicht die Selektierbarkeit auf das gewünschte Rekombinationsereignis. Trotzdem sollte, um möglichst nahe an der Wildtyp-Sequenz zu bleiben, diese Resistenz anschließend wieder entfernt werden. Dies kann durch die Rekombinase Cre des E.coli Bakteriophagen P1 erfolgen, so der zu entfernende Bereich mit loxP-Sequenzen flankiert ist (Sternberg et al., 1978).

4.1.3.1 Das Cre-loxP-System

LoxP-Sequenzen bestehen aus einer acht Basenpaaren langen Kernsequenz flankiert von zwei 13 Basenpaaren langen identischen Sequenzen mit umgekehrter Orientierung („inverted repeats“) (Abb.4.3 loxP WT). Die invertierten Positionen dienen als Erkennungssequenzen für die Cre-Rekombinase (Hoess et al., 1990; Mack et al., 1992).

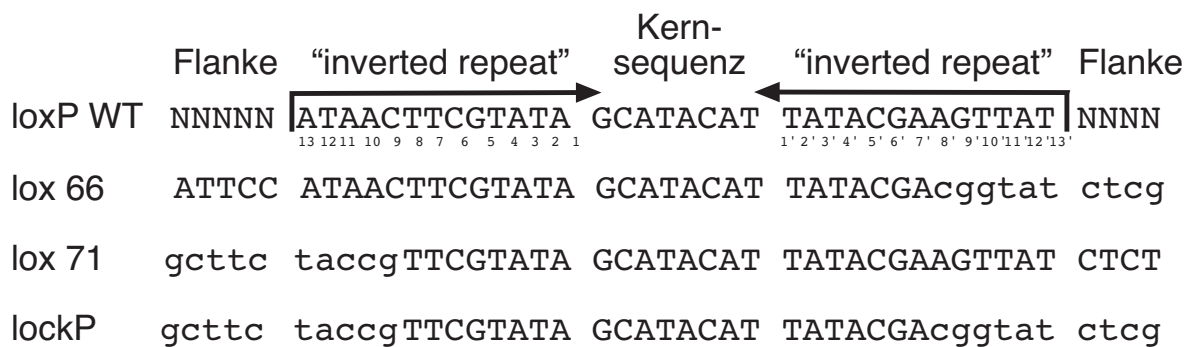


Abb.4.3: Sequenzvergleich unmutierter und mutierter loxP Sequenzen

Die Abbildung zeigt schematisch die Sequenz von loxP (Wildtyp), lox66 und lox71 (je eine Flanke mutiert) sowie lockP (aus der Cre-Rekombination von lox66 und lox71). Eine loxP Sequenz ist aus identischen Regionen in umgekehrter Orientierung („inverted repeats“) und der Kernsequenz („spacer“) aufgebaut. Die einzelnen Bereiche sind durch Leerzeichen voneinander getrennt. Die flankierenden Bereiche (Flanke) gehören nicht zur eigentlichen loxP-Sequenz, scheinen aber für die Bindung von Cre von Bedeutung zu sein. Die Pfeile bezeichnen die Orientierung der „inverted repeats“ zueinander, die Zahlen die Position der Nukleotide von der Kernsequenz aus. Die gegenüber der Wildtyp loxP-Sequenz mutierten Nukleotide sind in Kleinbuchstaben dargestellt. Veränderungen zu den veröffentlichten lox66/71-Sequenzen sind in Kleinbuchstaben und kursiv dargestellt.

Das Cre-loxP System, wie auch das Flp-FRT System von *S.cerevisiae*, eignet sich für Rekombinationsereignisse sowohl in prokaryotischen, wie auch in eukaryotischen Zellen und wird deswegen häufig für konditionale genetische Veränderungen benützt (Dymecki, 2000; Torres and Kühn, 1997). Die Rekombination ist nur von der Cre-Rekombinase und den loxP-Sequenzen abhängig und wird mit absoluter Zuverlässigkeit durchgeführt. Bei zwei identisch orientierten loxP Motiven wird das ausgeschnittene DNA Fragment zirkularisiert und geht verloren, eine funktionale loxP-Sequenz bleibt dagegen am veränderten Genort zurück. Die Präsenz des loxP Motivs verhindert jegliche weitere Cre-vermittelte Modifikation, da ein erneutes Einfügen eines loxP-flankierten, selektierbaren Markers mit anschließender Deletion durch Cre-Expression zu einer ungewollten Rekombination der ersten loxP Sequenz mit der am weitesten davon entfernten loxP-Sequenzen führt.

Die Konstruktion von Plasmiden in *E.coli* mit Fremdsequenzen von mehr als 100kb Größe oder das Klonieren von kompletten herpesviralen Genomen mit einer Größe von bis zu 250kb stellt einen relativ neuen methodischen Ansatz dar (Brune et al., 2000; O'Connor et al., 1989). Mehrere unabhängige Veränderungen in einem einzigen Plasmid dieser Größe machen jedoch die Entfernung der selektierbaren Markergene nach jeder genetischen Veränderung nötig. Alternativ muss für jede Veränderung ein anderer selektierbarer Marker verwendet werden. Allerdings ist die Anzahl der selektierbaren Marker und der sequenzspezifischen Rekombinationssysteme begrenzt.

Um die Möglichkeiten des loxP-Systems zu erhöhen, wurden sowohl Veränderungen in der Kernsequenz (Lee and Saito, 1998) als auch in den „inverted repeats“ (Albert et al., 1995) eingeführt. LoxP-Motive mit veränderter Kernsequenz können nur mit identischen loxP-Motiven rekombinieren, nicht aber mit einer Wildtyp- oder einer in der Kernsequenz andersartigen Sequenz (Sauer, 1996). Dagegen kommt es bei bestimmten Veränderung der „inverted repeats“ in zwei loxP-Motiven (siehe Abb.4.3 lox66/71, Veränderungen sind in Kleinbuchstaben dargestellt) nach der Cre-vermittelte Rekombination zu einer doppelt mutierten loxP-Sequenz sowie zu einer Wildtyp-loxP-Sequenz (Albert et al., 1995) (Abb.4.3 lockP). Die doppelt mutierte loxP-Sequenz sollte von der Cre-Rekombinase nur noch schlecht oder gar nicht mehr erkannt werden. Allerdings wurde dieses System als nicht besonders zuverlässig beschrieben, da es doch vereinzelt zu Rekombinationen mit der doppelt mutierten loxP Sequenz kommt (Araki et al., 1997).

4.1.3.2 loxP – Cre Rekombinase - lockP

Hier möchte ich die Modifikationen eines bereits veröffentlichten Paars loxP-Sequenzen beschreiben, das in den inverted repeats mutiert ist, jedoch außerhalb der flankierenden Sequenzen noch weitere Veränderungen gegenüber den veröffentlichten Sequenzen aufweist (siehe Abb.4.3 lox66/71, Nukleotide in Kleinbuchstaben kursiv). In mehreren Klonierungsschritten und einer Cre vermittelten Rekombination entstanden die Testplasmide p2724 und p2725. Die genaue Abfolge der einzelnen Klonierungsschritte ist unter Material, Punkt 2.4 beschrieben. Die Testplasmide sind schematisch in Abbildung 4.4 dargestellt. Sie bestehen aus einer

in beiden „inverted repeats“ mutierten loxP Sequenz, die als lockP bezeichnet wird, einem von lox66 und lox71 flankierten Resistenzgen gegen Tetrazyclin, sowie zweier weiterer Resistenzgene gegen Ampicillin und Chloramphenicol. Die Plasmide p2724 und p2725 unterscheiden sich nur in der Orientierung der loxP flankierten Tetrazyclinresistenz in Bezug auf die Kernsequenz in lockP. Im Folgenden soll die Stabilität der lockP-Sequenz im Kontext weiterer loxP-Motive überprüft werden.

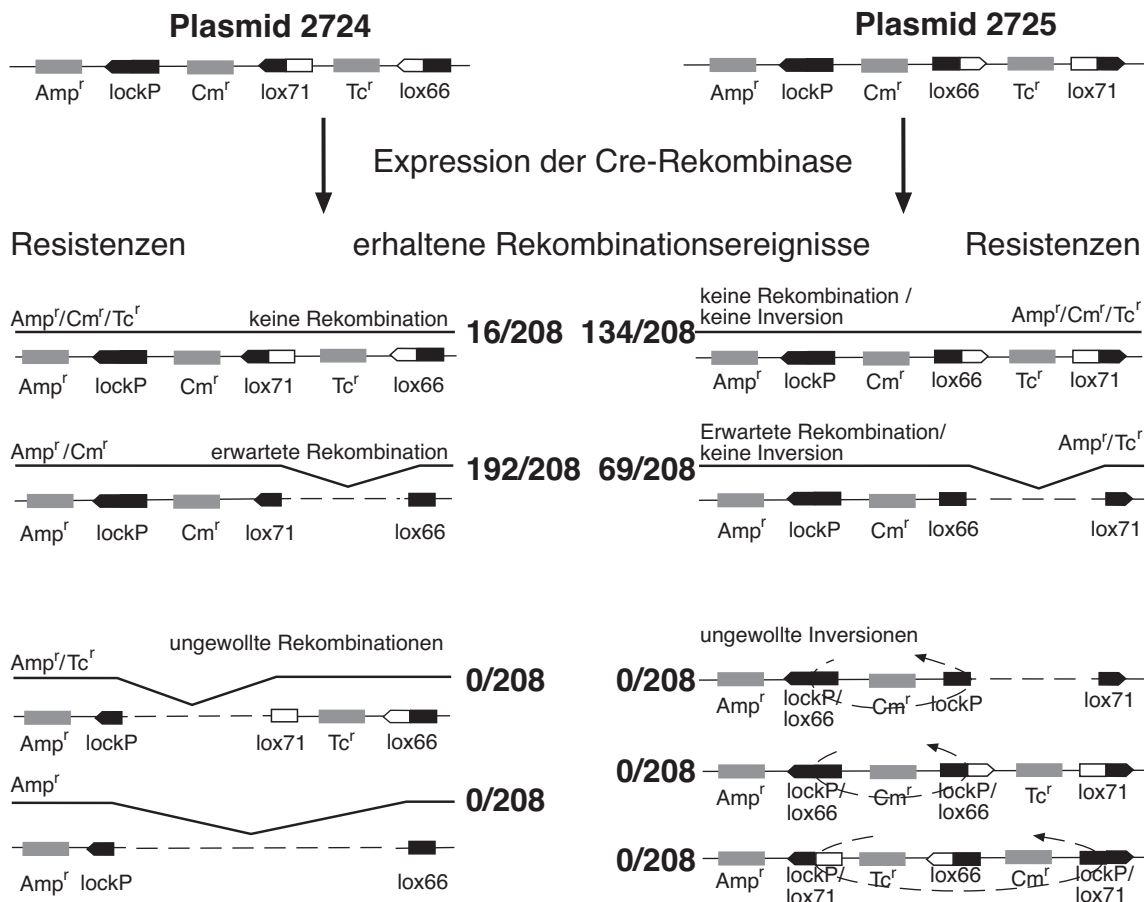


Abb.4.4: Schematischer Aufbau des loxP-lockP Testsystems.

Die Abbildung zeigt schematisch das Testsystem mit dem geprüft werden sollte, ob mutierte lockP-Sequenzen noch von der Cre-Rekombinase erkannt werden. Als Ausgangsplasmide dienen die beiden Reporterplasmide p2724 und p2725. Diese bestehen aus der lockP-Sequenz, einer von lox66 und lox71 flankierten Tetrazyclinresistenz, sowie zwei unflankierten Resistenzgenen gegen Chloramphenicol und Ampicillin. Die beiden Plasmide unterscheiden sich in der Orientierung der die Tetrazyclinresistenz flankierenden loxP Sequenzen bezogen auf die lockP Sequenz.

Nach erfolgter transienter Expression der Cre-Rekombinase sind schematisch alle theoretisch möglichen Rekombinationsereignisse dargestellt. Sind alle drei Antibiotikaresistenzen weiterhin vorhanden, hat keine Rekombination stattgefunden, bzw. fand eine Inversion der DNA zwischen zwei der drei loxP-Sequenzen statt. Des weiteren ist das Resistenzmuster für die gewollte Rekombination ohne Beteiligung von lockP, sowie die Rekombinationen unter Beteiligung von lockP dargestellt. In der Mitte der Abbildung steht die ermittelte Anzahl der jeweiligen Ereignisse. Die lockP Sequenz war nie an der Rekombination beteiligt, das loxP-Sequenzenpaar lox66 und lox71 stellt demnach nach erfolgter Rekombination kein Substrat für die Cre-Rekombinase mehr dar.

E.coli Zellen mit p2724 oder p2725 wurden mit einem Expressionsplasmid für die Rekombinase Cre (p2676) transfiziert. Dieses Plasmid trägt zusätzlich eine Resistenz gegen Kanamycin und repliziert über einen temperatursensitiven Ursprung bei der permissiven Temperatur von 30°C. Eine Stunde nach Transformation von p2676 in E.coli mit p2724 oder p2725 und phänotypischer Expression bei 30°C wurde der Flüssigkultur Ampicillin (100µg/ml Endkonzentration) und Kanamycin (30µg/ml Endkonzentration) zugesetzt. Nach 16 Stunden Inkubation bei 30°C wurden die Plasmide aus den Zellen isoliert, 10pg davon in E.coli DH5α nach Standardmethoden transfiziert (Hanahan, 1985) und unter Ampicillinselektion auf LB-Platten über Nacht inkubiert. Ampicillin resistente Kolonien wurden anschließend auf Replika-Platten, die entweder Ampicillin oder Kombinationen von Ampicillin/Tetrazyclin, Ampicillin/Chloramphenicol und Ampicillin/Tetrazyclin/Chloramphenicol enthalten, nach erneuter Übernachtinkubation analysiert. Das Wachstum von Kolonien auf den verschiedenen Replika-Platten in Anwesenheit der verschiedenen Antibiotika gab den ersten phänotypischen Hinweis auf die bei der Rekombination benützten loxP Sequenzen (Abb.4.4 „erhaltene Rekombinationsereignisse“). Kolonien, die in Anwesenheit aller drei Antibiotika gewachsen waren, tragen entweder ein unverändertes Testplasmid p2724 oder p2725 oder Testplasmide mit Inversionen zwischen den verschiedenen loxP Sequenzen. Ampicillin und Chloramphenicol resistente Kolonien, die zugleich Tetrazyclin sensitiv waren, haben wahrscheinlich zwischen lox66 und lox71, nicht aber unter Einbindung von lockP rekombiniert. Chloramphenicol sensitive Kolonien konnte ich nie beobachten. Ein Verlust der Chloramphenicolresistenz (oder auch noch zusätzlich der Tetrazyclin Resistenz) würde auf die ungewollte Verwendung der lockP Sequenz bei der Rekombination hindeuten. Alle möglichen Rekombinationsereignisse der beiden Testplasmide p2724 und p2725 sind schematisch in der Abbildung 4.4 dargestellt.

Jeweils acht Kolonien, die den gewünschten Phänotyp (resistent gegen Ampicillin und Chloramphenicol, sensitiv gegen Tetrazyclin) aufwiesen, wurden durch Restriktionsenzymanalyse weiter untersucht. Alle Plasmide der einzelnen Kolonien zeigten das vorhergesagte Restriktionsbandenmuster. Eine Inversion der DNA zwischen den verschiedenen loxP Sequenzen war nicht nachzuweisen (Daten nicht

gezeigt). Acht Einzelklone mit p2724 und 48 Einzelklone mit p2725, die nach Transfektion der Cre-Rekombinase gegen Ampicillin, Chloramphenicol und Tetrazyclin resistent waren und durch diesen Phänotyp den Eingangskolonien entsprachen, entsprachen auch im Resistenzmuster den unveränderten Testplasmiden. Diese Plasmide zeigten auch keine Inversion. Sie hatten offensichtlich überhaupt nicht rekombiniert. Die fünf mit p2725 entstandenen Kolonien mit unerwarteten Resistenzmustern waren auf eine vollkommene Neuordnung des Plasmids zurückzuführen, die nicht auf die Cre-Rekombinase vermittelte Rekombination zurückgeführt werden konnte. Somit war die modifizierte loxP Sequenz lockP in keinem der 416 analysierten Fälle ein Substrat für die Cre-Rekombinase.

Sind alle loxP Sequenzen wie in p2724 relativ zu ihrer Kernsequenz in derselben Orientierung angeordnet, so findet die Rekombination zwischen lox66 und lox71 sehr effizient statt (siehe Abb.4.4, 192 von 208 beobachteten Fälle). Warum die Effizienz in dem fast identischen, nur in der Orientierung der loxP-Sequenzen zur lockP-Sequenz verschiedenem Plasmid p2725 deutlich geringer ist, ist nicht nachvollziehbar (siehe Abb.4.4, 69 von 208 beobachteten Fälle). In beiden Fällen war die lockP Sequenz entgegen den veröffentlichten Daten (Albert et al., 1995) kein Substrat für Cre-vermittelte Rekombination. Biochemische Protein-DNA-Bindungsexperimente, sowie der Strukturkomplex aus Cre-Rekombinase und dem loxP-Motiv zeigen nur an Position 2,3,6 und 7 der „inverted repeats“ Kontakte (Positionen siehe Abbildung 4.3). Kontakte der Cre-Rekombinase distal der Position 9 scheinen dagegen nur von geringer oder keiner Bedeutung für die Bindung zu sein (Guo et al., 1997; Hartung and Kisters-Woike, 1998). In einer früheren Veröffentlichung wurde aber durch Fe-EDTA-footprinting (Hoess et al., 1990) gezeigt, dass auch weiter außen gelegene Nukleotide (Position 9 und 10, sowie 12 und 13) der loxP Sequenz sowie die gesamte Kernsequenz geschützt sind und somit Kontakt zu Cre haben. Nach dieser Vorstellung lässt sich vielleicht auch der Einfluss der Nukleotide des hier beschriebene loxP Sequenzenpaares außerhalb der „inverted repeats“ erklären. Mit meinem Befund konnte erstmals gezeigt werden, dass dieses loxP Sequenzenpaar nach Rekombination durch Cre nachweisbar kein Substrat für

die Rekombinase mehr ist. Es eignet sich für mehrere aufeinanderfolgende Runden der Rekombination.

4.1.4 Mutanten auf der Basis des Maxi-EBV Plasmids p2089

Im Verlauf dieser Arbeit habe ich zehn verschiedene Maxi-EBV Mutanten auf der Basis von p2089 etabliert. Zur genetischen Modifikation des Genoms von EBV wurden intermediäre, konventionell hergestellte Plasmide etabliert, die den mutierten Genort im Kontext von flankierenden EBV Abschnitten tragen. Die Herstellung eines intermediären Plasmids zur genetischen Modifikation des Genortes von BHRF1 möchte ich beispielhaft darstellen (Abb.4.5). Die Modifikation der anderen Genloci erfolgte prinzipiell gleich. Die Mutationen in den jeweiligen Genen mussten zunächst in konventionellen Plasmiden hergestellt werden. Für die Modifikation im BHRF1 Gen diente das Plasmid p528 als Basis. p528 enthält die EBV-Wildtyp Sequenz mit den Nukleotid-Koordinaten #52386 bis #56086 des B95.8 Genoms (Baer et al., 1984). Durch die Insertion des Resistenzgens gegen Kanamycin aus einem weiteren Plasmid (pCP15; Cherepanov, P.P. und Wackernagel, W 1995) wurde der offene Leserahmen für BHRF1 unterbrochen. Nach Restriktionsverdau mit EcoRI entstand ein lineares Fragment, in dem das Kanamycinresistenzgen von EBV-Sequenzen flankiert ist. Diese vermitteln die homologe Rekombination mit den entsprechenden Sequenzen des Maxi-EBV Plasmids p2089 (siehe Abb.4.2). Die homologe Rekombination in E.coli wurde wie unter 4.1.2 beschrieben durchgeführt. Die Insertion des mutierten Fragments an der richtigen Stelle wurde durch Restriktionslängenanalyse und Southern-Blot-Hybridisierung überprüft (siehe Anhang I). Eine E.coli Kolonie mit korrekt rekombiniertem Maxi-EBV Plasmid wurde expandiert und die DNA daraus isoliert.

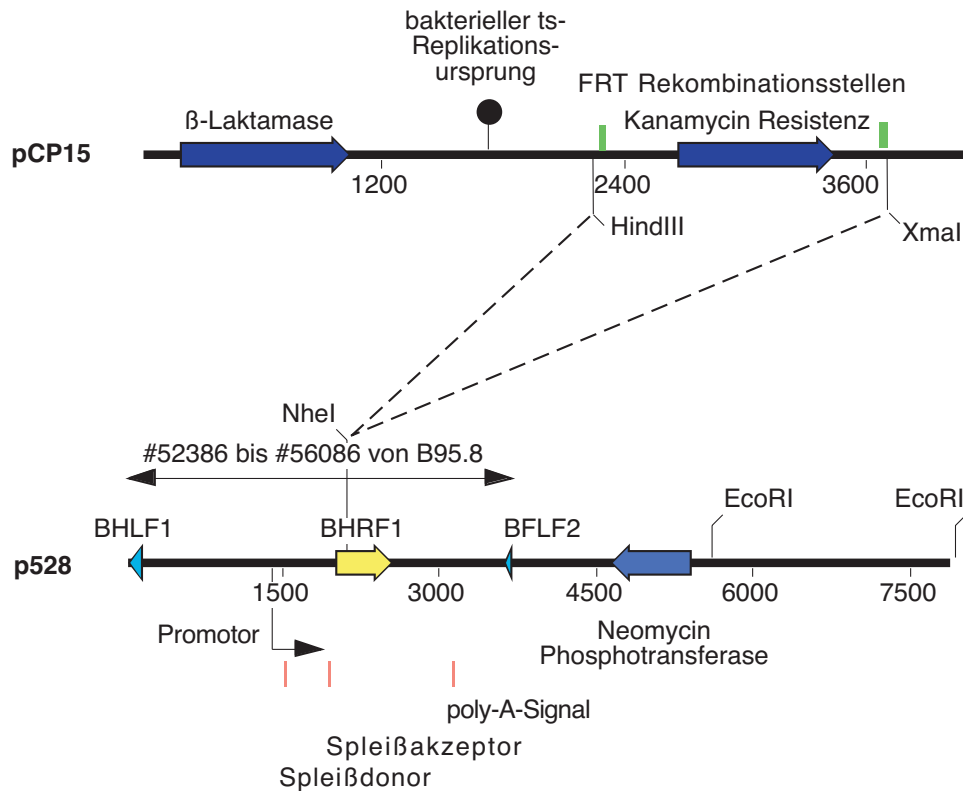


Abb.4.5: Konstruktion der BHRF1- Deletionsmutante innerhalb eines Maxi-EBV Genoms durch homologe Rekombination in E.coli.

Schematische Darstellung des intermediären Plasmids zur homologen Rekombination mit dem Maxi-EBV. Das Plasmid p528 trägt die B95.8 Sequenzabschnitte mit den EBV Nucleotid-Koordinaten von #52386 bis #56086 (veröffentlichte B95.8-Sequenz: Baer et al., 1984). Der kodierenden Bereich für das BHRF1 Gen wurde durch die Insertion eines 1472bp langen Fragmentes aus dem Plasmid pCP15 (Cherepanov, P.P. und Wackernagel, W, 1995) unterbrochen. Dieses Fragment enthält das Kanamycinresistenzgen, flankiert von zwei FRT-Rekombinationssequenzen. Zusätzlich dargestellt sind die beiden in diesem Sequenzbereich von B95.8 liegenden Genorte für BHLF1 und BFLF2. Nach Restriktionsverdau mit EcoRI entsteht ein lineares Fragment, in dem das Kanamycinresistenzgen von EBV-Sequenzen flankiert ist. Diese vermitteln die homologe Rekombination mit den entsprechenden Sequenzen des Maxi-EBV Plasmids.

Die zehn von mir hergestellten Mutanten lassen sich formal in zwei Gruppen einteilen. Zum einen handelt es sich um Mutanten, die die anti-apoptischen Gene von EBV betreffen. Zum anderen sind es Mutanten des LMP2A Genlokus. LMP2A scheint in primären humanen B-Lymphozyten die Rolle des B-Zell-Rezeptors teilweise oder ganz zu übernehmen (Caldwell et al., 1998), bzw. die Funktion des B-Zell-Rezeptors zu blockieren (Fruehling and Longnecker, 1997).

Die erste Gruppe betrifft im speziellen die Genorte für BALF1 und BHRF1. Beide Proteine sind als Sequenzhomologe zu BCL-2 in der Literatur beschrieben (Henderson et al., 1993; Marshall et al., 1999). Um die Funktionen dieser Genprodukte während des lytischen Zyklus, der Initiation der Latenz und bei der B-Zell-Immortalisierung zu untersuchen, wurde jeder offene Leserahmen einzeln sowie

beide zusammen im Kontext des Maxi-EBV deletiert. Es entstanden in diesem Zusammenhang mehrere Maxi-EBV Plasmide (siehe Tabelle 4.1). Bei dem Plasmid p2512 (Δ BALF1) wurde an der Nukleotid-Koordinate #163751 des B95.8 Genoms (Baer et al., 1984) der offene Leserahmen von BALF1 durch Insertion einer Tetrazyklinresistenz unterbrochen. Plasmid p2637 (Δ BHRF1) trägt an der Position #52479 des B95.8 Genoms (Baer et al., 1984) eine Kanamycinresistenz, die den offenen Leserahmen von BHRF1 unterbricht. Das Plasmid p2636 (Δ BALF1/ Δ BHRF1) stellt eine Kombination aus beiden vorhergegangenen Deletionen dar. Das Plasmid p2765 trägt ebenso wie p2636 sowohl eine Deletion in BALF1, als auch in BHRF1 (Δ BALF1/ Δ BHRF1). Es wurde allerdings unabhängig von p2636 in umgekehrter Reihenfolge der Deletionen hergestellt. Da die Expression von lytischen Genen, speziell BZLF1, einen Schutz vor Apoptose bieten soll (Inman et al., 2001), wurde der offene Leserahmen für BZLF1, dem Hauptaktivator des lytischen Zyklus (Schepers et al., 1993a), alleine, als auch im Kontext des doppelt Δ BALF1/ Δ BHRF1 deletierten MAXI-EBV Plasmons p2636 deletiert. Dazu wurde im Maxi-EBV Plasmid p2809 (Δ BZLF1) der offene Leserahmen für BZLF1 von Nukleotid-Koordinate #100403 bis #101091 des B95.8 Genoms (Baer et al., 1984) durch die Insertion einer Zeozinresistenz deletiert. Als letztes Plasmid dieser ersten Gruppe entstand das dreifach deletierte Plasmid p2850, eine Kombination aus p2636 und p2809.

Zur besseren Übersichtlichkeit sind alle oben beschriebenen Maxi-EBV Plasmide noch einmal tabellarisch dargestellt.

Maxi-EBV	BALF1	BHRF1	BZLF1	mutierter Bereich im B95.8 Genom
p2089	+	+	+	EBV Wildtypsequenz
p2512	Δ	+	+	Insertion einer Tetrazyklinresistenz an #163751
p2637	+	Δ	+	Insertion einer Kanamycinresistenz an #52479
p2636	Δ	Δ	+	Kombination von p2512 und p2637
p2765	Δ	Δ	+	Kombination von p2637 und p2512
p2809	+	+	Δ	Deletion von #100403 bis #101091 durch Insertion einer Zeozinresistenz
p2850	Δ	Δ	Δ	Kombination von p2636 und p2809

Tabelle 4.1 Maxi-EBV Mutanten mit Deletionen im BALF1, BHRF1 und BZLF1 Genlokus

Zur besseren Übersichtlichkeit, besonders bei Mehrfachdeletionen, sind alle in dieser Gruppe entstandenen Maxi-EBV Plasmide tabellarisch mit den dazugehörigen Deletionen und der Art der Veränderungen dargestellt (+ Genort unverändert, Δ Leserahmen des Proteins unterbrochen oder deletiert).

Die zweite Gruppe betrifft den Genort für LMP2A. Wie in Abb.4.6.A gezeigt, sind in diesem Bereich Gene auf beiden Strängen des EBV-Genoms kodiert. Außerdem besitzt LMP2 zwei alternative erste Exons samt eigener Promotoren, die zwei Spleißvarianten des LMP2 Gens, LMP2A und LMP2B, bilden. Exon zwei bis neun hingegen sind für beide Gene identisch. Beide Proteine können nur gebildet werden, wenn das Genom von EBV in seiner latenten Phase zirkulär vorliegt, da nur dann eine mRNA über die „terminal repeats“ hinweg abgelesen werden kann. Als erste Mutante wurde der Promotor für LMP2A sowie das erste Exon mit loxP-Sequenzen flankiert, um eine konditionale LMP2A-Deletionsmutante zu ermöglichen. Dieses Plasmid wurde p2190new genannt (Abb.4.6.B). In Plasmid p2525 (ΔLMP2A) habe ich durch transiente Cre-Expression den Promotor und das erste Exon von LMP2A

deletiert (Abb.4.6.C). Dies entspricht den Nukleotid-Koordinaten #174015 bis #174781 des B95.8 Genoms (Baer et al., 1984).

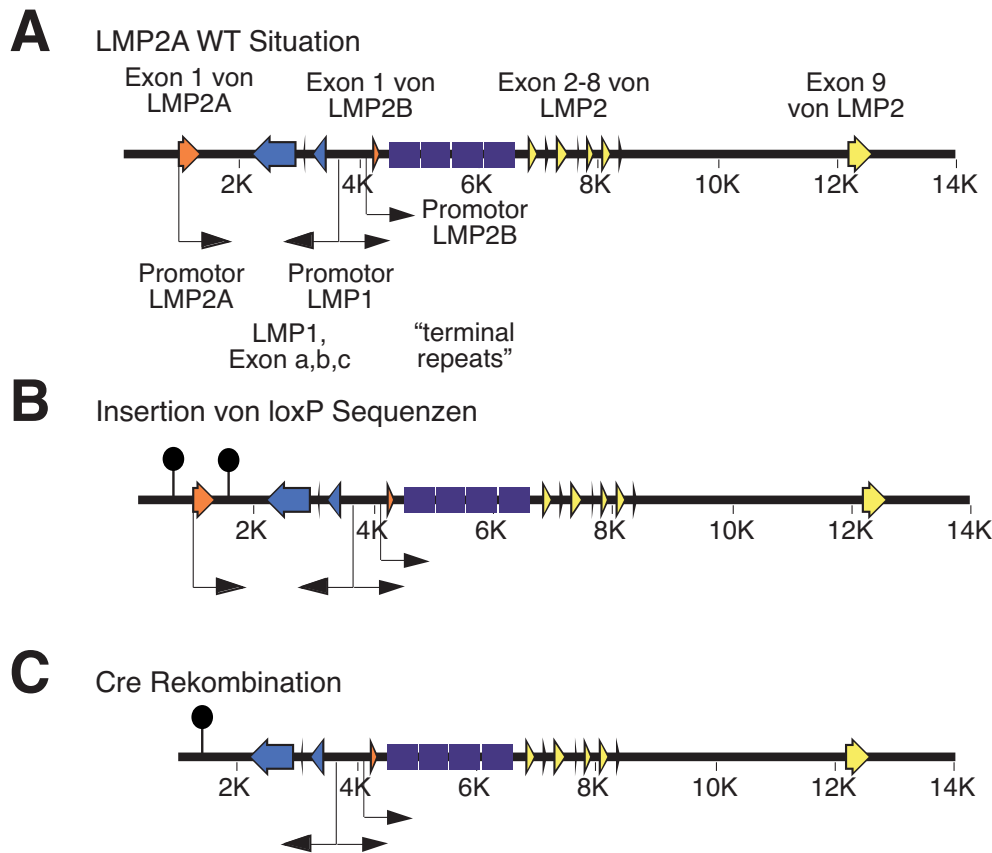


Abb.4.6: Genlokus des EBV Gens LMP2A

(A) Gezeigt ist die genomische Struktur des Genlokus von LMP2A und B entsprechend der veröffentlichten Sequenz des B95.8 Genoms (Baer et al., 1984). LMP2A und B besitzen jeweils ein eigenes erstes Exon samt zugehörigem Promotor, wobei das erste Exon des LMP2B Gens nicht kodierend ist. Zwischen den beiden alternativen ersten Exons des LMP2 Gens liegt auf dem Gegenstrang die kodierende Sequenz für LMP1. Der Promotor von LMP1 stellt einen bidirektionalen Promotor dar, LMP1 und LMP2B sind deshalb transkriptionell gleichzeitig reguliert. Die ersten Exons von LMP2A und B werden über die „terminal repeats“ hinweg mit der Gruppe der gemeinsamen Exons zwei bis neun verknüpft. Dies ist nur in der zirkulären Form des viralen Genoms möglich, wie es als extrachromosomales Plasmid in infizierten Zellen vorliegt.

(B) Zur Vorbereitung eines Δ LMP2A Maxi-EBV Plasmids wurde der Promotor und das erste Exon von LMP2A, das für den gesamten cytoplasmatischen Anteil des Proteins kodiert, mit loxP Sequenzen flankiert. Das dabei entstandene Plasmid p2190new sollte dem Wildtyp Maxi-EBV p2089 möglichst ähnlich sein.

(C) Durch transiente Expression der Bakteriophagen Rekombinase Cre wurde der Bereich zwischen den beiden loxP Sequenzen deletiert. Dadurch entstand das Δ LMP2A Maxi-EBV Plasmid p2525.

Um Effekte des lytischen Programms von EBV bei der Funktion von LMP2A auszuschließen, wurde die bereits in der ersten Gruppe bei p2809 und p2850 beschriebene Deletion von BZLF1 auch in p2525 eingeführt. Es entstand p2810 mit dem Genotyp Δ LMP2A/ Δ BZLF1.

Wie unter 1.2.2 ausgeführt, handelt es sich bei dem integralen Plasmamembranprotein LMP2A sehr wahrscheinlich um einen konstitutiv aktiven Pseudorezeptor. Über die Transmembrandurchgänge kommt es zu einer Aggregation des LMP2A Proteins in Mikrodomänen der Plasmamembran und zu einer konstitutiven Aktivierung des Pseudorezeptors. Über Signaltransduktionswege in der Wirtszelle, die von LMP2A beeinflusst werden, ist bisher wenig bekannt. Es ist nur veröffentlicht, dass LMP2A Akt Kinase aktivieren (Scholle et al., 2000) und die Mitglieder der Src-Kinase Familie reprimieren soll (Fruehling and Longnecker, 1997). Deswegen sollte im zweiten Teil dieser Arbeit auch ein System etabliert werden, das es ermöglicht, LMP2A konditional zu induzieren. Analog zu Arbeiten über das andere Membranprotein von EBV - LMP1 - sollten die Transmembrandomänen durch eine extrazelluläre, optional vernetzbare Domäne ersetzt werden (Abb.4.7.A). Zu diesem Zweck wurde von mir das Maxi-EBV Plasmid p2792 etabliert, das an Stelle von Exon zwei bis acht von LMP2 ein chimäres LMP2A:proTNF α (Tumor Nekrosis Faktor α): His₆-tag Oberflächenmolekül trägt. Transkriptionell ist es unter der Kontrolle des LMP2B Promotors, der Teil des bidirektionalen LMP1 Promotors ist (Abb.4.7.B).

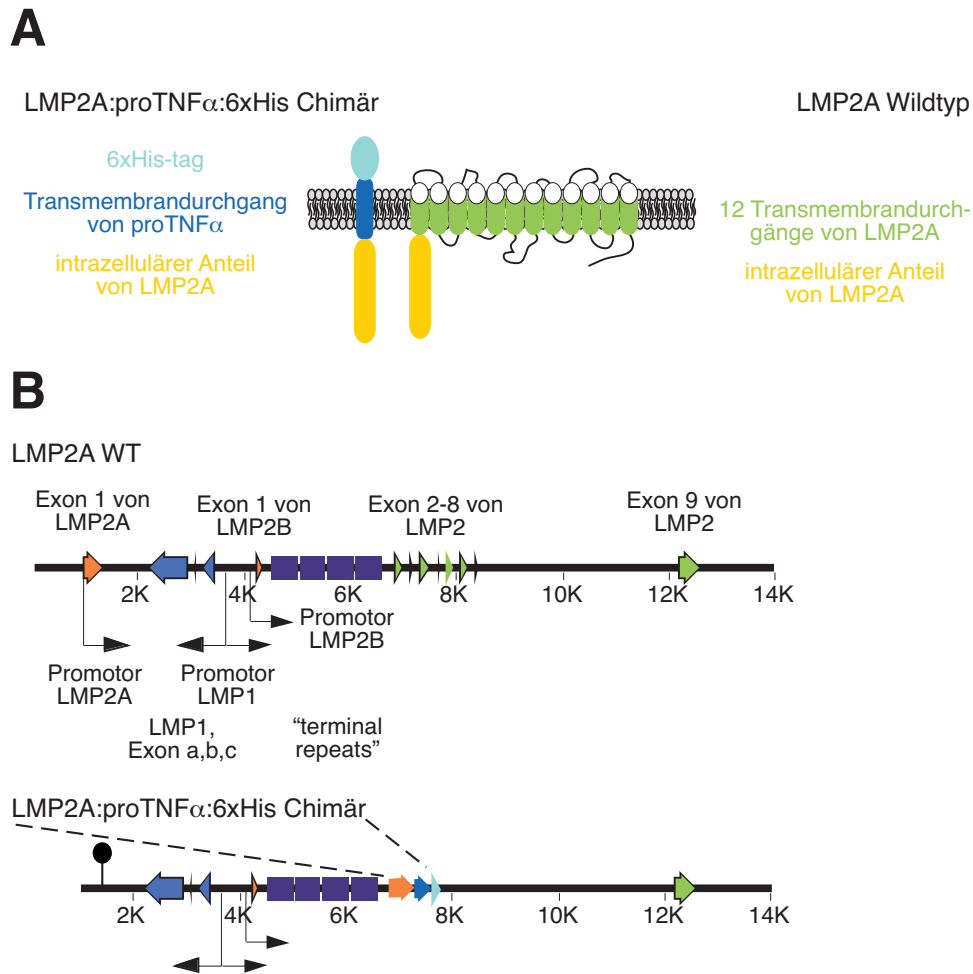


Abb.4.7: Proteindomänen von LMP2A und dem chimären Protein LMP2A:proTNF α :His₆-tag

(A) Das chimäre Protein LMP2A:proTNF α :His₆-tag gliedert sich in drei Domänen. Der zytoplasmatische Anteil besteht aus dem N-terminalen, zytoplasmatischen Anteil von LMP2A. Diese Domäne ist durch den Transmembrandurchgang von proTNF α in der Plasmamembran verankert. Extrazellulär kann dieses Protein über einen His₆-tag nachgewiesen oder quervernetzt werden. Es liegt singulär in der Plasmamembran vor. Das Wildtyp LMP2A Protein aggregiert von selbst über seine 12 Transmembranregionen.

(B) Der genomische Locus von LMP2 besteht aus alternativen ersten Exons für LMP2A und B, sowie acht gemeinsamen Exons. Das chimäre Protein LMP2A:proTNF α :His₆-tag wurde in mehreren Schritten in den Maxi-EBV Kontext eingefügt. Wie in Abbildung 4.6.B/C dargestellt, wurde das erste Exon von LMP2A und der dazugehörige Promotor deletiert. Exon zwei bis acht von LMP2 wurde durch ein cDNA Konstrukt des chimären LMP2A:proTNF α :His₆-tag Proteins ersetzt. Nachdem der Spleißakzeptor am Anfang von Exon zwei erhalten wurde, steht dieses chimäre Protein unter der Kontrolle des LMP2B Promotors.

Das induzierbare LMP2A Protein besteht aus einem extrazellulären His₆-tag zur Quervernetzung, dem Transmembrandurchgang von proTNF α zur Verankerung in der Zellmembran und dem intrazellulären Anteil von LMP2A als „signaling“-Domäne. In dem chimären Protein liegt LMP2A in inaktiver Form vor, da es nicht spontan aggregiert. Erst nach der Quervernetzung sollte es in seine aktive Form übergehen.

Zur besseren Übersichtlichkeit sind alle in diesem Abschnitt beschriebenen Maxi-EBV Plasmide noch einmal tabellarisch dargestellt.

Maxi-EBV	Mutation	mutierter Bereich im B95.8 Genom
p2089	Wildtyp	
p2190new	Wildtyp	Flankierung des Promotors und des ersten Exons von LMP2A durch loxP Sequenzen
p2525	Δ LMP2A	Deletion von #174015- #174781 durch Cre
p2810	Δ LMP2A/ Δ BZLF1	Deletion von #100403 bis #101091 durch Insertion einer Zeozinresistenz und Deletion von #174015- #174781 durch Cre
p2792	Δ LMP2A/B, Insertion chimäres Protein	Deletion von #58 bis #1582 durch Insertion eines chimären LMP2A:proTNF α :His ₆ -tag Proteins in p2525

Tabelle 4.2 Maxi-EBV Mutanten mit Veränderungen im LMP2A Genlokus

In das Wildtyp Maxi-EBV Plasmid p2089 wurden zwei loxP Sequenzen eingeführt, die den Promotor und das erste Exon von LMP2A flankieren (p2190new). Durch transiente Expression der Rekombinase Cre in 2190new wurde der Bereich zwischen den beiden loxP Sequenzen deletiert. Es entstand p2525, das in LMP2A deletiert ist. Für p2810 wurde zusätzlich zu LMP2A auch BZLF1 deletiert. Dies geschah identisch zu p2809 in Tabelle 4.1. Für p2792 wurde in p2525 Exon zwei bis acht des LMP2 Genlokus deletiert. Anschließend wurde an identischer Position ein DNA Fragment für das LMP2A:proTNF α :His₆-tag Gen eingesetzt. Dabei wurde die Spleißakzeptorstelle des zweiten Exons von LMP2 wieder hergestellt und das chimäre Protein unter die Kontrolle des LMP2B Promotors gebracht.

4.1.5 Etablierung stabiler, virusproduzierender, EBV-positiver HEK293 Zelllinien

Unter 4.1.4 habe ich die Herstellung der zehn Maxi-EBV Plasmide beschrieben, die ich während meiner experimentellen Arbeiten etabliert habe. Die Einführung dieser genetischen Modifikationen in das Maxi-EBV p2089 erfolgte in E.coli durch homologe Rekombination mit linearen DNA Fragmenten wie unter 4.1.4 und Abbildung 4.2 beschrieben. Nach erfolgter homologer Rekombination in E.coli und anschließender Überprüfung des Genotyps durch Southern-Blot-Hybridisierung (siehe Anhang I) wurden die Bakterien in einem fünf Liter Ansatz fermentiert, die Maxi-EBV Plasmid DNA daraus präpariert und über zwei CsCl-Ethidiumbromid-Gradienten aufgereinigt.

Alternativ erfolgte die Aufreinigung der DNA auch über Nucleobond AX500 Säulen nach Angaben des Herstellers. In der Abbildung 4.1 sind alle diese Vorgänge im oberen Drittel (E.coli) dargestellt. Die aufgereinigten DNAs der in Tabelle 4.1 und 4.2 beschriebenen Maxi-EBV Plasmide wurden einzeln wie unter 3.4.2 beschrieben in HEK293 Zellen transfiziert. Nach mehreren Wochen Selektion in Gegenwart von Hygromycin (100µg/ml Endkonzentration) im Zellkulturmedium konnten GFP-positive Einzelkolonien expandiert werden. 20 Einzelkolonien, die zuvor aus jeder Transfektion eines Maxi-EBV Plasmids expandiert worden waren, wurden auf ihre Fähigkeit hin untersucht, nach Induktion das lytische Programm von EBV zu unterstützen (siehe Abb.4.1, mittlerer Abschnitt). Gleichzeitig wurde die Identität und die Integrität des EBV Genoms in den HEK293 Zellen mittels geeigneter Sonden durch Southern-Blot-Hybridisierung überprüft.

4.1.6 Induktion des lytischen Zyklus und Bestimmung des Virustiters

In stabil transfizierten HEK293 Zellen replizieren Maxi-EBV Plasmide extrachromosomal und etablieren einen der latenten EBV Infektion entsprechenden Zustand. Viruspartikel werden in der latenten Phase nicht produziert. Der Übergang von der Latenz in den lytischen Zyklus von EBV kann durch die transiente Expression des viralen Transaktivatorgens BZLF1 (Hammerschmidt and Sugden, 1988) eingeleitet werden. Die Menge der produzierten infektiösen Partikel kann zusätzlich durch Kotransfektion des viralen Glycoproteins BALF4 (Neuhierl et al., 2002) deutlich gesteigert werden. Vier Tage nach Kotransfektion der Expressionsplasmide für BZLF1 und BALF4 wurde die Induktion des lytischen Zyklus durch Immunfärbung von gp350, dem viralen Bindepartner des zellulären CD21 bei der Infektion von primären B-Lymphozyten (Janz et al., 2000), nachgewiesen (Abb.4.8.A/B). Das Glykoprotein gp350 ist ein Leitprotein für die späte lytische Phase von EBV. Der Kulturüberstand der induzierten 293 Zellen wurde zur Infektion von Raji-Zellen, einer Burkitt-Lymphom-Zelllinie, verwendet. Es wurden jeweils 3×10^5 Raji-Zellen mit definierten Mengen des Kulturüberstandes für 72 h bei 37°C inkubiert. Das Kulturmedium wurde nach 24h gewechselt. Der Virustiter wurde

anhand GFP positiver Raji-Zellen bestimmt, die leicht mittels eines invertierten Fluoreszenzmikroskopes sichtbar gemacht werden konnten (Abb.4.8.C/D).

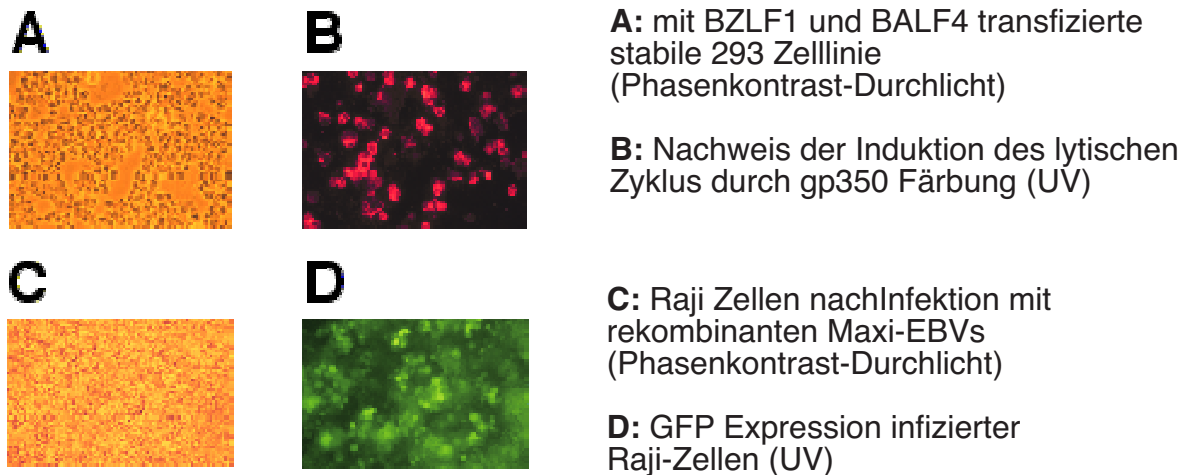


Abb.4.8: Induktion des lytischen Zyklus eines stabil mit einem Maxi-EBV Plasmid transfizierten HEK293-Einzelzellklons und GFP-Expression infizierter Raji-Zellen.

(A/B) In einem stabil mit einem Maxi-EBV Plasmid transfizierten HEK293-Einzelzellklon wurde der lytische Zyklus durch transiente Kotransfektion von Expressionsplasmiden für die Aktivatoren BZLF1 und BALF4 induziert. Die Kulturüberstände wurden vier Tage nach transients Transfektion geerntet, die Zellen auf Objektträgern getrocknet und in Aceton permeabilisiert. Als Nachweis der erfolgreichen Induktion des lytischen Zyklus von EBV wurde eine Immunfärbung mit einem monoklonalen Antikörper gegen gp350/220 (virales Glykoprotein) durchgeführt, das ein Leitprotein für die späte lytische Phase von EBV ist. Die Detektion erfolgte mit einem Cy3-gekoppelten Sekundärantikörper in einem invertierten Fluoreszenzmikroskop. Der Kulturüberstand der induzierten 293-Zellen wurde nach 3 Tagen geerntet. 3×10^5 Raji-Zellen wurden für 72h mit 1 ml dieses Kulturüberstands bei 37°C inkubiert (C/D). Anhand der GFP-Expression der Raji-Zellen, die in einem invertierten Fluoreszenzmikroskop visualisiert wurde, konnte auf eine erfolgreiche Infektion geschlossen und die Anzahl der infektiösen Partikel im Kulturüberstand durch Auszählen der GFP-positiven Raji-Zellen bestimmt werden. Eine grüne Raji-Zelle pro ml Kulturüberstand wurde dabei als eine grüne Raji Einheit (GRE) definiert. Dadurch können unterschiedliche Kulturüberstände verschiedener Maxi-EBV Mutanten aneinander angeglichen werden.

Dieses Vorgehen ermöglichte eine direkte Konzentrationsbestimmung der infektiösen Viruspartikel im Kulturüberstand. Es wurden zwischen 5×10^3 - 3×10^5 infektiöse Partikel/ml erhalten. Eine grüne Raji-Zelle wurde dabei als „Grüne-Raji-Einheit“ (GRE), dem Äquivalent eines infektiösen Partikels definiert. Dadurch konnten auch sehr unterschiedlich produzierende Maxi-EBV Mutanten einander angeglichen werden, um gleiche Mengen infektiöser Partikel für die Immortalisierung primärer B-Lymphozyten einzusetzen.

Die Induktion des lytischen Zyklus in HEK293 Zellen und die Quantifizierung der Kulturüberstände entspricht in der Abbildung 4.1 dem unteren Drittel des Fließschemas.

4.2 Funktion von BALF1 und BHRF1 bei der B-Zell-Immortalisierung und der Initiation der Latenz

Im zweiten Abschnitt des Ergebnisteils möchte ich auf die speziellen Versuche eingehen, die ich durchgeführt habe, um den quantitativen Beitrag von BALF1 und BHRF1 bei der B-Zell-Immortalisierung zu bestimmen. Bisher war nur bekannt, dass es mit BHRF1 Deletionsmutanten möglich ist, lymphoblastoide Zelllinien zu generieren. Unbekannt war, ob Unterschiede zur Effizienz von Wildtyp EBV bestehen. Mit weiteren Versuchen mit BALF1 und BHRF1 Deletionsmutanten möchte ich auch die Rolle dieser beiden Gene bei der Initiation der Latenz als dritten Abschnitt im Lebenszyklus von EBV zeigen.

4.2.1 Infektion von humanen primären B-Lymphozyten mit infektiösen Maxi-EBV Partikeln

Frisch aus Nasenpolypen präparierte B-Lymphozyten wurden in mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchsansätzen mit Kulturüberständen der infektiöse Partikel produzierenden HEK293 Zellen infiziert. Das genaue Vorgehen ist in Material und Methoden unter 3.2.7 beschrieben. Zur Bestimmung der Immortalisierungseffizienz wurde eine konstante Menge primärer B-Lymphozyten mit infektiösen Partikeln aus einer Verdünnungsreihe in 96-Loch-Platten infiziert. Um das Auswachsen von immortalisierten B-Zelllinien zu verbessern, wurden die infizierten Zellen auf letal γ -bestrahlten humanen embryonalen Fibroblasten (WI38) gehalten. Der oder die wahrscheinlich löslichen Faktoren, die zum verbesserten Auswachsen beitragen, sind nicht bekannt (Sugden and Mark, 1977). Nachdem die B-Lymphozyten innerhalb von vier bis sechs Wochen als Zellklone in den Einzelgefäßen der 96-Loch-Platte etabliert sind, lassen sich diese in der Regel auch ohne Fibroblasten in Kokultur expandieren. Bei kürzeren Experimentzeiten, wie z.B. für Expressionsstudien von BALF1/BHRF1 mittels „real-time-PCR, die sich nur auf einige Tage erstreckten, wurde auf die Kokultivierung mit Fibroblasten verzichtet. In diesen Fällen wurden die B-Zellen zusammen mit einem Kulturüberstand in einer Zellkulturflasche für 24 Stunden inkubiert, danach das Medium gewechselt und weiter kultiviert. Die infizierten B-Lymphozyten, die mittels FACS-Analyse weiter analysiert wurden, wurden in einem zweikammrigen Kultursystem inkubiert. Dabei

waren sie von den Fibroblasten im unteren Teil der Kulturschale durch eine Membran getrennt und konnten leicht und ohne störende Fibroblasten abgenommen werden. Bei allen diesen Infektionen wurden die Anzahl der infektiösen Partikel anhand des GRE Parameters für alle unterschiedlichen Mutanten und Wildtyp-EBV angeglichen, so dass gleiche Mengen eingesetzt wurden. Zur Bestimmung der Immortalisierungsfrequenz der einzelnen Maxi-EBV Mutanten wurden je nach Mutante zwischen 0,25 und 600 grünen Raji-Einheiten pro Loch einer 96-Loch Platte eingesetzt. Für alle anderen Experimente sollte eine möglichst vollständige Infektion aller eingesetzten B-Lymphozyten erreicht werden. Deswegen wurden sie mit einer MOI (multiplicity of infektion) von 0,05 infiziert. Bei B95.8 Kulturüberständen war eine Bestimmung des Virustiters nicht möglich. Die B-Lymphozyten wurden nach Erfahrungswerten des Labors mit einer geschätzten MOI von 0,5 infiziert.

4.2.2 Proliferation/Apoptose infizierter primärer B-Lymphozyten

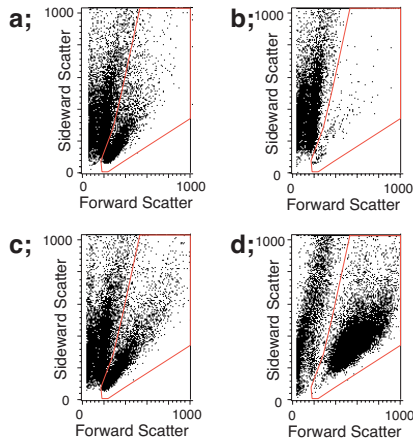
Bei allen bisher bekannten γ -Herpesviren findet sich mindestens ein BCL-2 Homolog. Zum Beispiel kodiert EBV für BHRF1 und BALF1, das humane Herpesvirus 8 (HHV8) für KSbcl-2 (Cheng et al., 1997b) und Herpesvirus saimiri für ORF16 (Hardwick, 1998). Vermutlich sollen diese Proteine die durch die Infektion ausgelöste Immunantwort der Wirtszelle und letztlich die Apoptose der Zelle verhindern und eine dauerhafte Persistenz in der Wirtszelle ermöglichen. In vitro könnte diese Funktion zu einer unbegrenzten Proliferation der B-Lymphozyten beitragen. Bei allen BCL-2 Homologen soll die Aktivierung von Caspasen verhindert werden, teilweise sogar durch eine direkte Bindung der Proteine an die Caspasen (Cheng et al., 1997a; Clem et al., 1998). Für BHRF1 wurde schon mehrfach eine anti-apoptotische Wirkung gezeigt (Fanidi et al., 1998; Foghsgaard and Jaattela, 1997), für BALF1 ist bisher nur eine antagonistische Funktion zu BCL-2 beschrieben (Bellows et al., 2002).

Zuerst habe ich untersucht, ob die in ihren BCL-2 Homologen deletierten, rekombinanten Viren noch das Potential besitzen, primäre humane B-Lymphozyten (pBIs) zum Proliferieren zu bringen, oder ob die infizierten Zellen in Apoptose gehen. Mittels FACS-Analysen konnte die beginnende Proliferation der infizierten Zellen durch die Zunahme der Zellzahl bestimmt werden. Die selbe Methode erlaubt es, die Anzahl an apoptotischen Zellen durch die Einlagerung von Propidiumiodid in die

DNA der Zellen und eine Erhöhung der sogenannten sub-G1-Population zu bestimmen. Die Verringerung des DNA Gehalts der einzelnen Zelle gilt als Merkmal apoptotischer Zellen (Boersma et al., 1996).

Zur Analyse des Proliferations- bzw. Apoptoseverhaltens wurden pro gemessenen Zeitwert $4,5 \times 10^5$ primäre B-Lymphozyten mit jeweils $2,25 \times 10^4$ GRE von WT-EBV (2089), Δ BALF1 (2512), Δ BHRF1 (2637) und Δ BALF1/ Δ BHRF1 (2636) in einem zweikammrigen Kultursystem infiziert. Als Negativkontrolle dienten nicht infizierte, als Positivkontrolle mit B95.8 Kulturüberstand infizierte pBIs. Die Menge an infektiösen Partikeln in der Positivkontrolle konnte nicht bestimmt werden. Anhand der Erfahrung des Labors wurde eine ca. 10fach erhöhte Menge an infektiösen Partikeln, bezogen auf die rekombinanten Viren, eingesetzt. Nach 2, 5, 8, 12 und 18 Tagen wurden Zellen entnommen und wie unter Material und Methoden, Abschnitt 3.2.8 beschrieben für die FACS-Analyse weiterbehandelt.

A

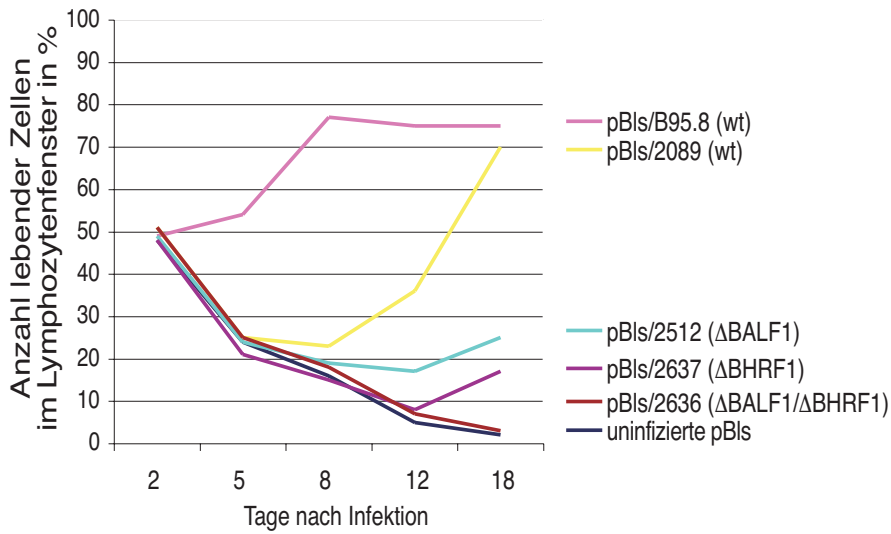


uninfizierte primäre B-Lymphozyten, zwei (a) und 18 Tage (b) nach Präparation

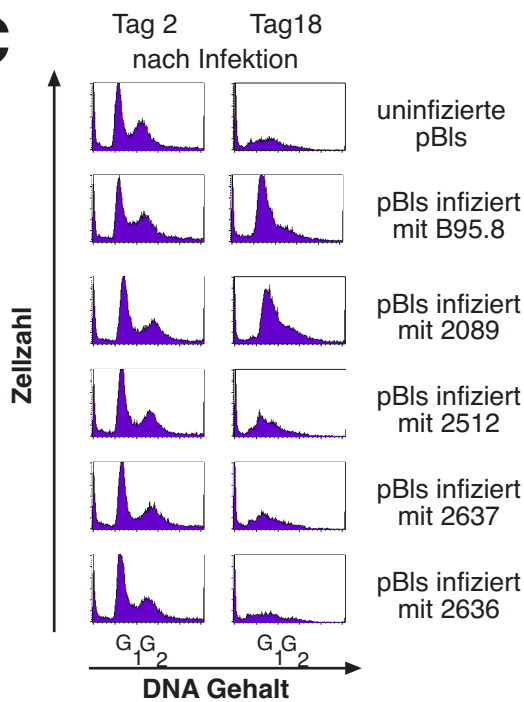
mit B95.8 Kulturüberstand infizierte primäre B-Lymphozyten, zwei (c) und 18 Tage (d) nach Präparation und Infektion

lebende Zellen sind im rot umrandeten Lymphozytenfenster markiert

B



C



Zellzyklusprofile von primären B-Lymphozyten zwei und 18 Tage nach Infektion. Die Zellen wurden mit Wildtyp Viren - B95.8 oder 2089 - bzw. drei unterschiedlichen Maxi-EBVs - 2512, 2637 und 2636 - infiziert.

Abb.4.9: Proliferation infizierter primärer B-Lymphozyten nach Infektion mit verschiedenen rekombinanten Maxi-EBV Mutanten

(A): FACS Analyse infizierter und nichtinfizierter primärer B-Lymphozyten. Zwei Tagen nach Präparation sind bei nativen (a) und nach Infektion mit B95.8 Kulturüberstand (c) annähernd gleich viele lebende Zellen in dem roten Lymphozytenfenster vorhanden. 16 Tage danach sind die nicht infizierten Zellen nahezu komplett zugrunde gegangen (b), wohingegen bei den infizierten Zellen eine starke Proliferation eingesetzt hat (d). Durch die Infektion nehmen die Zellen stark an Größe und Granularität zu. Dies ist durch ein Auffächern der Zellpopulation im „forward-sideward scatter“ zu erkennen.

(B): Darstellung des Anteils proliferierender und apoptotischer primärer B-Lymphozyten nach Infektion mit rekombinanten Maxi-EBV Mutanten als Liniendiagramm. Aufgetragen wurde der prozentuale Anteil der Zellen im Lymphozytenfenster bei 20000 analysierten Zellen. Uninfizierte und mit 2636 (Δ BALF1/ Δ BHRF1) infizierte Zellen sterben mit zunehmender Versuchsdauer immer mehr ab. Es ist keine beginnende Proliferation zu erkennen. Mit B95.8 infizierte Zellen beginnen sofort nach Infektion zu proliferieren, der Anteil an lebenden Zellen steigt kontinuierlich an. Mit 2089 (WT), 2512 (Δ BALF1) und 2637 (Δ BHRF1) infizierte Zellen zeigen bei den ersten Messwerten eine Erhöhung der apoptotischen Zellen, beginnen dann aber ebenso mit der Proliferation. Der gegenüber B95.8 verzögerte Anstieg lebender Zellen bei 2089 Maxi-EBV ist mit der geringeren Menge an eingesetzten infektiösen Partikeln zu erklären.

(C): Nachweis des Anteils proliferierender und apoptotischer Zellen nach Infektion anhand des zellulären DNA Gehaltes. Am Tag zwei nach Infektion zeigen alle Zellen eine normale Verteilung der Zellen in G1 (linke, spitz zulaufende Spitze) und G2 (rechte, breitere und flachere Spitze). Vergleichbar mit der Zellzahlbestimmung im „forward-sideward scatter“ nehmen am Tag 18 nach Infektion die Intensitäten der Propidiumiodideinlagerungen mit dem Proliferieren der Zellen zu, bzw. mit dem Absterben der Zellen ab.

Wie erwartet zeigten die uninfizierten Zellen einen dramatischen Rückgang vitaler Zellen über die Zeit. In Abbildung 4.9.A(a/b) ist dies durch einen Rückgang der Zellen im rot umrandeten Leukozytenfenster dargestellt. Ebenso ist eine Verringerung der Propidiumiodidintensität (Linksverschiebung der Population zur geringeren Intensität hin) ablesbar (Abbildung 4.9.C, oberste Reihe). Dies ist mit einer steigenden Zahl apoptotischer Zellen gleichzusetzen. Das Gegenteil trifft bei der Positivkontrolle zu. Die mit B95.8 Kulturüberstand infizierten B-Lymphozyten nehmen an Größe und Granularität zu, was sich deutlich durch das Auffächern der Population im „forward-sideward scatter“ erkennen lässt. Ebenso steigt die Anzahl der vitalen Zellen im Leukozytenfenster kontinuierlich an (Abb.4.9.A c/d). Die Zellpopulation zeigt kaum apoptotische Zellen in der Propidiumiodidfärbung (Abbildung 4.9.C, zweite Reihe). Wie in Abbildung 4.9.B zu sehen ist, sind mit dem rekombinanten Wildtyp EBV 2089 infizierte B-Lymphozyten im Proliferationsbeginn deutlich zeitlich versetzt und folgen der Positivkontrolle verzögert, zeigen aber ebenso eine stark proliferierende Zellpopulation und kaum apoptotische Zellen. Dies lässt sich durch die wahrscheinlich um einen Faktor 10 geringere Menge an eingesetzten infektiösen Partikeln erklären. Die mit der BALF1 Deletionsmutante (2512) infizierten B-

Lymphozyten beginnen ihre Proliferation im Vergleich zu mit Wildtyp 2089 infizierten Zellen zeitlich etwas verzögert, die mit der BHRF1 Deletionsmutante (2637) infizierten Zellen wiederum verzögert im Vergleich zu den mit der BALF1 Deletionsmutante infizierten B-Lymphozyten. Wenn die Proliferation der infizierten Zellen auch etwas verlangsamt einsetzt, zeigen beide Deletionen für sich genommen keinen Einfluss auf die Fähigkeit der rekombinanten Viren, humane B-Lymphozyten zum Proliferieren zu bringen. Auch hier nimmt die Menge der lebenden lymphoblastoiden Zellen nach einem Tiefpunkt wieder zu, die Population der apoptotischen Zellen nimmt ab. Einen ganz anderen Verlauf zeigen Zellen, die mit der Doppeldeletionsmutante Δ BALF1/ Δ BHRF1 (2636) infiziert worden waren. Wie bei den uninfizierten Zellen nimmt die Anzahl der lebenden Zellen im Leukozytenfenster kontinuierlich ab, die Anzahl der apoptotischen Zellen zu. Die beiden im Phänotyp unauffälligen Einzeldelationen führen also in ihrer Kombination zu einem sehr ausgeprägten Phänotyp. Die Doppeldeletionsmutante Δ BALF1/ Δ BHRF1 ist nicht mehr in der Lage, primäre B-Lymphozyten zum Proliferieren zu bringen.

4.2.3 Expression sehr früher und früher Gene des EBV bei der Infektion humaner primärer B-Lymphozyten

Bei der Infektion von B-Lymphozyten mit Epstein-Barr-Virus ist EBNA2 als eines der ersten viralen Genprodukte bereits wenige Tage nach der Infektion nachweisbar. Nach Infektion mit B95.8 Kulturüberstand oder rekombinanten Viren kann durch Immunfluoreszenz die kontinuierlich ansteigende EBNA2 Expression gut nachgewiesen werden. Dies ist in der Abb.4.10.A exemplarisch an mit B95.8 Kulturüberstand infizierten humanen B-Lymphozyten dargestellt, trifft aber auch auf alle anderen bereits beschriebenen rekombinanten Viren zu. In nur wenigen Arbeiten sind weitere Gene, die sehr früh bei der Infektion von primären humanen B-Lymphozyten mit EBV exprimiert werden, untersucht worden. Sehr gut charakterisiert sind dagegen die in latent infizierten B-Lymphozyten in vivo exprimierten verschiedenen Expressionsmuster. Um den Verlauf der viralen Infektion in vitro zu charakterisieren, habe ich die Expression zweier Gene von EBV - BZLF1 und EA-D - mit den zuvor beschriebenen rekombinanten Viren analysiert. Die Expression von

EBNA2 diente als Positivkontrolle für den Verlauf der Infektion (siehe Abb.4.10.A). Zunächst habe ich die Expression von EA-D (auch BMRF1 genannt) untersucht. Das Protein EA-D ist eine Komponente der viralen DNA Polymerase und essentiell für die lytische DNA Replikation (Zhang et al., 1997). Nachdem eine direkte Bindung von EA-D an Proteine des zellulären Replikationskomplexes bekannt ist (Zeng et al., 1997), ist dieses Protein vielleicht auch an der initialen Vervielfältigung des viralen Genoms in der infizierten Zelle beteiligt. Von Inman et al. wird auch der Expression lytischer Genprodukte eine anti-apoptotische Wirkung zugeschrieben (Inman et al., 2001), deswegen wurde von mir auch die Expression von BZLF1, dem Aktivator des lytischen Zyklus (Hammerschmidt and Sugden, 1988) untersucht.

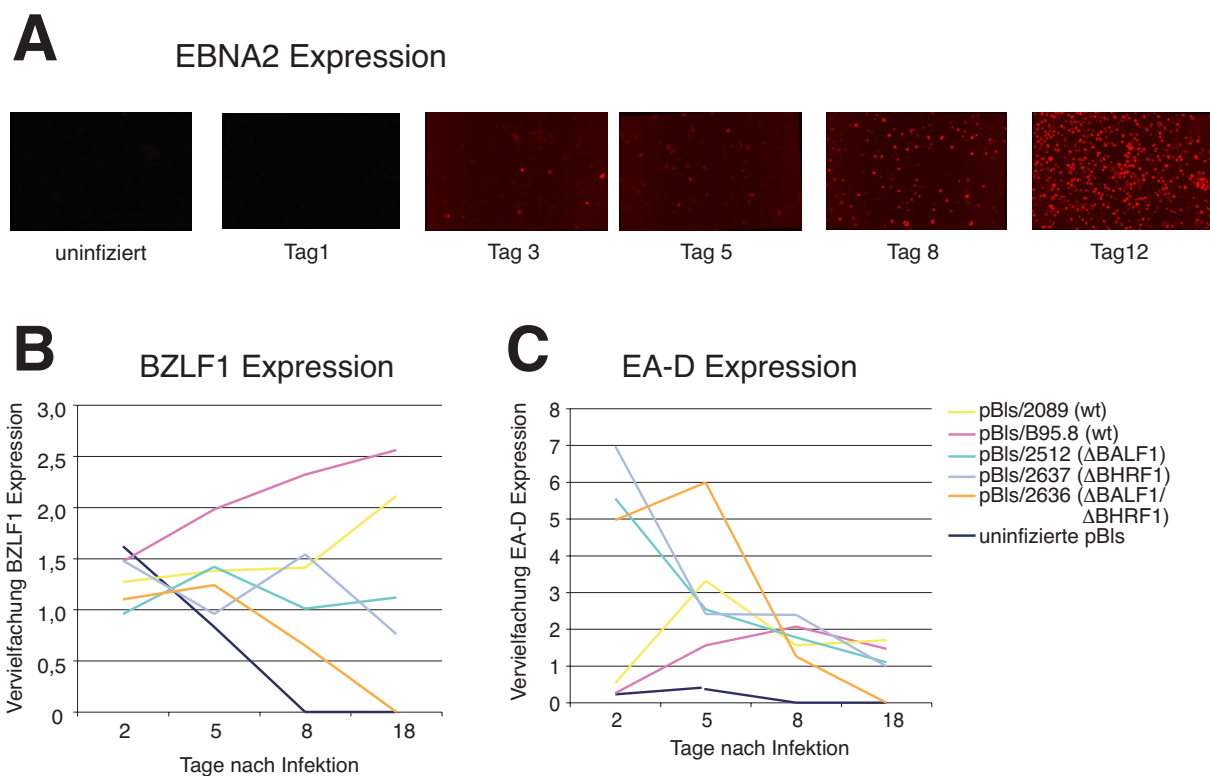


Abb.4.10: Expression von EBNA2, BZLF1 und EA-D in frisch infizierten B-Lymphozyten

(A) EBNA2 ist eines der ersten nach einer Infektion mit EBV nachweisbaren viralen Proteine. Die Zunahme EBNA2 positiver Zellen über die Zeit ist anhand von mit B95.8 Kulturüberstand infizierten primären B-Lymphozyten dargestellt. Dieser Verlauf ist aber mit allen rekombinaten Viren, die eine Proliferation der infizierten Zellen bewirken, vergleichbar.

(B) Die unterschiedlich ablaufende BZLF1 Expression in frisch infizierten primären B-Lymphozyten kurze Zeit nach der Infektion mit verschiedenen rekombinaten Viren wurde mittels FACS Analyse bestimmt. Diese scheint mit der Proliferation der Zellen zu korrelieren. Mit Wildtyp-Viren (B95.8 und 2089) infizierte Zellen zeigen mit einer zunehmenden Anzahl proliferierender Zellen eine immer stärker werdende BZLF1 Expression. Mit den Einzeldelentionsmutanten (Δ BALF1, Δ BHRF1) infizierte B-Lymphozyten sind in ihrer Proliferation verzögert. Auch die BZLF1 Expression ist stark verringert und nur in der Immunfluoreszenz sind einzelne BZLF1 positive Zellen zu erkennen (Daten nicht gezeigt). Erst am Ende der Versuchsreihe beginnt in mit der Δ BALF1 Deletionsmutante infizierten

Zellen die BZLF1 Expression in der Immunfluoreszenz anzusteigen. Die in ihrer beginnenden Proliferation noch stärker verzögerten, mit der Δ BHRF1 Einzeldelentionsmutante infizierten B-Lymphozyten zeigen bis zum Ende der Versuchsreihe keine deutliche, in der FACS Analyse signifikante BZLF1 Expression. In uninfizierten Zellen, sowie in mit der Δ BALF1 Δ BHRF1 Doppeldeletionsmutante (2636) infizierten Zellen ist weder in der FACS Analyse noch in der Immunfluoreszenz eine BZLF1 Expression nachweisbar.

(C) Die EA-D Expression in mit rekombinaten Viren infizierten primären B-Lymphozyten verläuft grundlegend anders als die BZLF1 Expression. Mit Wildtyp-Viren (B95.8 und 2089) infizierte Zellen zeigen über den gesamten Versuchszeitraum eine kaum nachweisbare EA-D Expression. Mit den Einzeldelentionsmutanten Δ BALF1 und Δ BHRF1 infizierte Zellen exprimieren hingegen EA-D bereits kurz nach der Infektion sehr stark. Diese Induktion geht aber bis zum Ende des Versuchszeitraumes auf das Niveau von Wildtyp-EBV (B95.8 und 2089) zurück. Mit der Δ BALF1/ Δ BHRF1 Doppeldeletionsmutante (2636) infizierte Zellen zeigen ebenso schon zu Beginn der Versuchsreihe eine starke Expression von EA-D. Mit dem Absterben der Zellen in vitro fällt die Expression auf ein nicht mehr nachweisbares Niveau ab. In uninfizierten Zellen ist keine EA-D Expression nachweisbar.

Wie schon unter 4.2.2 beschrieben, wurden wiederum frisch aus Nasenpolypen präparierte humane primäre B-Lymphozyten mit angeglichenen Mengen rekombinanter Viren infiziert. Nach 2, 5, 8 und 18 Tagen wurde Zellen entnommen und wie in Material und Methoden beschrieben für die FACS-Analyse vorbereitet (siehe 3.2.9). Die Expression von BZLF1 und EA-D in den infizierten B-Lymphozyten wurde aus der mittleren Fluoreszenz des Messwertes geteilt durch die mittlere Fluoreszenz der Isotypkontrolle ermittelt. Dabei entspricht ein Wert von eins einer gleichstarken mittleren Fluoreszenz von Messwert und Isotypkontrolle, also keiner signifikanten Expression des Genprodukts. Die Liniendiagramme stellen die Tendenz für Zu- oder Abnahme der Expression von BZLF1 (Abb.4.10.B) und EA-D (Abb.4.10.C) über 18 Tage hinweg dar. Beide Gene wurden exprimiert gefunden. Für die BZLF1 Expression ist dies überraschend, da man bisher angenommen hat, dass die Expression von BZLF1 mit der Induktion des lytischen Zyklus einhergeht. Es bestehen deutliche Unterschiede in der Expressionshöhe von BZLF1 und EA-D, abhängig von den verschiedenen rekombinanten Viren. Die Expression von BZLF1 steigt bei den mit Wildtyp-EBV (B95.8 und 2089) infizierten Zellen kontinuierlich an. Im Beobachtungszeitraum folgt die BZLF1 Expression der Zunahme der lebenden Zellen, die zu proliferieren begonnen haben. Bei den mit der Δ BALF1 Deletionsmutante (2512) und der Δ BHRF1 Deletionsmutante (2637) infizierten Zellen ist zuerst keine signifikante BZLF1 Expression zu erkennen. Nur mittels Immunfluoreszenz konnten einige BZLF1-positive Zellen ausgemacht werden. Erst am Ende des Untersuchungszeitraumes scheint die BZLF1 Expression in der Immunfluoreszenz bei der Δ BALF1 Deletionsmutante (2512) anzusteigen. Dieser

Effekt wird von dem zeitlich verzögerten Verlauf der Proliferation der Zellen abgeleitet. Keine Expression von BZLF1 ist bei primären B-Lymphozyten nachweisbar, die mit der Δ BALF1/ Δ BHRF1 Doppeldelentionsmutante (2636) infiziert wurden. Diese Zellen beginnen nicht zu proliferieren, sondern starten ihr apoptotisches Programm (Abb.4.10.B).

Ganz anders ist das Bild der EA-D Expression, wie sie in Abbildung 4.10.C dargestellt ist. Zwei Tage nach Infektion zeigen mit der Δ BALF1 Deletionsmutante (2512) und der Δ BHRF1 Deletionsmutante (2637) infizierte Zellen eine starke Expression von EA-D. Diese fällt kontinuierlich bis zum Ende der Versuchsreihe hin auf ein nur leicht erhöht liegendes Niveau ab. Mit der Δ BALF1/ Δ BHRF1 Doppeldelentionsmutante infizierte Zellen zeigen zu Beginn auch eine sehr starke Expression von EA-D. Wie bereits beschrieben, sterben die mit dieser Mutante infizierten Zellen langsam in vitro, die Expression von EA-D ist dann auch nicht mehr nachweisbar. Die Expression von EA-D bei den Infektionen mit Wildtyp Viren (B95.8 und 2089) erreicht nicht die vorher beschriebenen Expressionshöhe. Nach 18 Tagen befindet sie sich auf einem gemeinsamen Niveau mit der Expressionshöhe von EA-D bei der Δ BALF1 Deletionsmutante (2512) und der Δ BHRF1 Deletionsmutante (2637).

4.2.4 BZLF1 Expression in infizierten primären B-Lymphozyten ist nicht hinreichend für die Induktion des lytischen Zyklus von EBV

Die Expression von BZLF1 wurde bisher immer mit dem lytischen Programm von EBV gleichgesetzt, an dessen Ende neue infektiöse Partikel gebildet werden. Die BZLF1 Expression bei frisch infizierten primären B-Lymphozyten legte nahe, dass auch hier lytische Replikation stattfindet und Viren gebildet werden. Um diese Vermutung zu überprüfen, wurden primären B-Lymphozyten für 24h mit rekombinaten Wildtyp-EBV (2089) mit einer MOI von 1,0 infiziert. Anschließend wurden die Zellen sedimentiert und in frischem Medium aufgenommen, um noch im Überstand vorhandene infektiöse Partikel zu entfernen. Drei und fünf Tage nach Infektion wurden Zellen geerntet und wie unter 4.1.6 beschrieben auf die Expression von gp350 in der Immunfluoreszenz analysiert. Bekanntermaßen erfolgt die Expression dieses viralen Glycoproteins erst sehr spät im lytischen Zyklus und gilt als Anzeichen für die Zusammensetzung infektiöser Partikel. Bei diesen Versuchen

waren in der Immunfluoreszenz keine gp350 positiven Zellen zu erkennen. Dies lässt darauf schließen, dass keine neu gebildeten infektiösen EBV Partikel im Kulturüberstand der frisch infizierten B-Lymphozyten vorhanden waren. Trotzdem wurden mit dem Kulturüberstand, wie unter 4.1.6 beschrieben, Raji Zellen infiziert. Vier Tage nach Infektion waren jedoch keine grünen Raji Zellen nachzuweisen. Trotz Expression von BZLF1 in frisch infizierten primären B-Lymphozyten wird der lytische Zyklus von EBV offensichtlich nicht vollständig durchlaufen.

4.2.5 Bestimmung der Immortalisierungseffizienz rekombinanter Maxi-EBVs

Wie unter 4.2.1 beschrieben, wurde zur Bestimmung der Immortalisierungseffizienz eine konstante Menge primärer B-Lymphozyten mit einer Verdünnungsreihe infektiöser Partikel in 96-Loch-Platten infiziert (Einzelheiten in Material und Methoden). Nach fünf Wochen wurde die Frequenz bewachsener Löcher gegenüber Löchern, die keine proliferierenden Zellen aufwiesen, bestimmt. Zur Auswertung wurden nur Verdünnungsstufen verwendet, die die statistische Voraussetzung einer „one hit“ Kinetik erfüllen (Frisan et al., 2001). Dies ist der Fall, wenn bei einer Verdünnungsstufe höchstens 63%, also 60 von 96 Löchern einer 96-Loch-Platte, proliferierende Zellen enthalten. In die Berechnung der Immortalisierungseffizienz gingen die Ergebnisse von mindestens drei unabhängigen Experimenten ein. Die Bestimmung der Immortalisierungseffizienz erfolgte anhand der Anzahl benötigter Viruspartikel pro ausgewachsenem Einzelklon, ausgedrückt in grünen Raji Einheiten (GRE) pro Einzelklon. Die graphische Bestimmung der Immortalisierungseffizienz ist in Abbildung 4.11 beispielhaft für drei unabhängige Experimente des rekombinanten Wildtyp-Virus 2089 dargestellt.

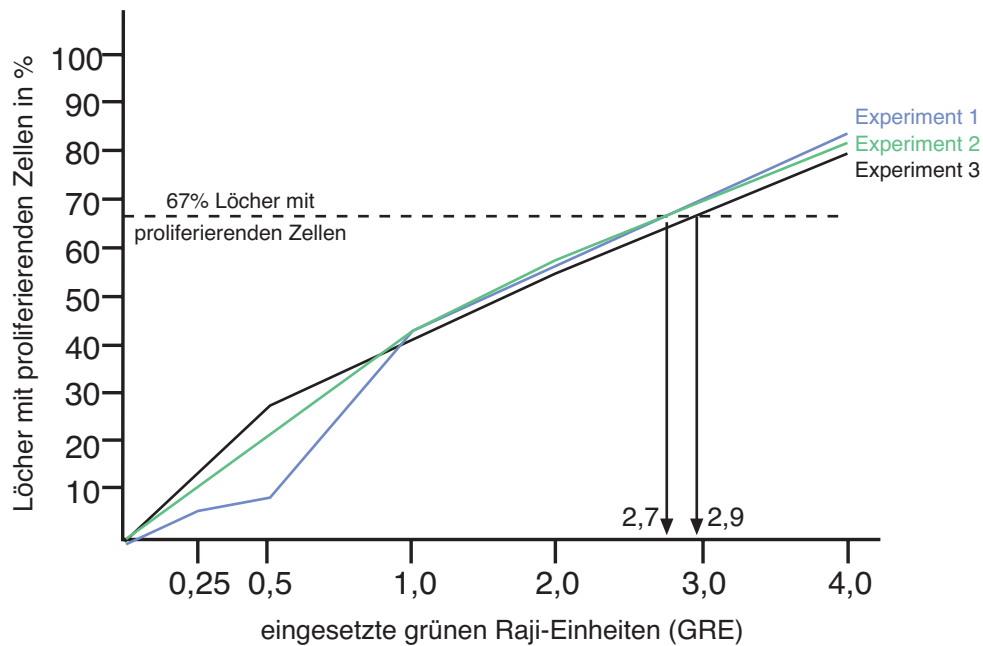


Abb.4.11: Graphische Ermittlung der Immortalisierungseffizienz des rekombinanten Wildtyp-Virus 2089

Die Bestimmung der Immortalisierungseffizienz erfolgte aus mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Zur Auswertung wurden nur Verdünnungsstufen verwendet, die die statistische Voraussetzung einer „one hit“ Kinetik erfüllen (Frisan et al., 2001). Dies ist der Fall, wenn bei einer Verdünnungsstufe höchstens 63%, also 60 von 96 Löchern einer 96-Loch-Platte, proliferierende Zellen enthalten. Die bewachsenen Löcher jeder Verdünnungsstufe in einem Experiment wurden in Prozent auf die Gesamtzahl der Löcher umgerechnet und als Kurve in einem Koordinatensystem aufgetragen. Die Immortalisierungseffizienz jedes einzelnen Experiments wurde durch Fällen des Schnittpunktes der Kurve mit der 67% Linie auf die X-Achse ermittelt. Bei diesem Beispiel wurden in drei Experimenten 2,7 GRE, 2,7 GRE und 2,9 GRE benötigt, um einen lymphoblastoiden Zellklon zu erhalten. Die Immortalisierungseffizienz des rekombinanten Wildtyp-Virus 2089 wird als der Mittelwert der drei Einzelexperimente definiert. Sie beträgt 2,8 GRE.

Bestimmt wurde nicht nur die Immortalisierungseffizienz des rekombinanten Wildtyp-Virus 2089, sondern auch die der Maxi-EBV Einzeldelentionsmutanten Δ BALF1 (2512) und Δ BHRF1 (2637), sowie der Doppeldelentionsmutante Δ BALF1/ Δ BHRF1 (2636). Zusätzlich sollte die Theorie von Inman et al. überprüft werden, ob die Expression von frühen lytischen Genen wie BZLF1 in frisch infizierten B-Lymphozyten vor Apoptose schützt (Inman et al., 2001). Damit müssten Δ BZLF1 Deletionsmutanten wegen der erhöhten Apoptoserate in den infizierten Zellen in ihrer Immortalisierungseffizienz absinken. Dagegen steht die Theorie, dass BZLF1 in infizierten B-Lymphozyten den lytischen Zyklus von EBV und letztendlich Apoptose auslöst. Dies sollte durch den Effekt der anti-apoptotischen Gene im Genom von EBV wieder ausgeglichen werden. In Δ BZLF1 Deletionsmutanten sollte die Immortalisierungseffizienz demnach deutlich verbessert sein. Deswegen habe ich die Immortalisierungseffizienz von Δ BZLF1 (2809) und Δ BALF1/ Δ BHRF1/ Δ BZLF1 (2850), zweier weiterer bereits in 4.1.4 beschriebener rekombinanter Viren bestimmt.

Maxi EBV Konstrukt	Grüne Raji Einheiten (GRE)/Einzelzellklon
WT EBV (2089)	2,8
Δ BALF1 (2512)	3,9
Δ BHRF1 (2637)	7,4
Δ BALF1/ Δ BHRF1 (2636)	nicht bestimmbar
Δ BZLF1 (2809)	15,9
Δ BALF1/ Δ BHRF1/ Δ BZLF1 (2850)	nicht bestimmbar

Tabelle 4.3 Immortalisierungseffizienz verschiedener Maxi-EBV Mutanten

Die Immortalisierungseffizienz wurde für jedes einzelne in der Tabelle aufgeführte Maxi-EBV Konstrukt aus mindestens drei unabhängigen Experimenten ermittelt. Zur Auswertung wurden nur Verdünnungsstufen verwendet, die die statistische Voraussetzung einer „one hit“ Kinetik erfüllen (Frisan et al., 2001). Dies ist der Fall, wenn bei einer Verdünnungsstufe höchstens 63%, also 60 von 96 Löchern einer 96-Loch Platte, proliferierende Zellen enthalten. Die Bestimmung erfolgte graphisch, wie dies in Abbildung 4.11 für das Wildtyp-Virus 2089 dargestellt ist.

Ebenso wie mit Wildtyp-EBV war es auch mit der Δ BALF1- und der Δ BHRF1-Deletionsmutante möglich, lymphoblastoide Zelllinien zu generieren. Für die Etablierung eines immortalen B-Zell Klons wurden annähernd gleiche Mengen an infektiösen Partikeln von Wildtyp 2089 sowie den Deletionsmutante Δ BALF1 und Δ BHRF1 benötigt. Dieser Befund bestätigt die zuvor gewonnenen Daten. Beide Einzeldelentionsmutanten waren in der Lage, die Proliferation von primären B-Lymphozyten zu induzieren. Die unter 4.2.3 beschriebene FACS-Analyse zeigte in den Einzeldelentionsmutanten eine zeitliche Verzögerung bis zum Beginn der Proliferation. Diese Verzögerung war bei der Auswertung der Immortalisierungsexperimente nach vier bis sechs Wochen nicht mehr feststellbar. Bei Infektionsexperimenten mit der Δ BALF1/ Δ BHRF1 Doppeldelentionsmutante wuchsen in jedem Experiment nur sehr vereinzelt immortalisierte Zellklone aus. Diese Klone zeigten bei Überprüfung der genomischen DNA durch Southern-Blot-Hybridisierung auch das erwartete Bandenmuster, waren also mit dieser Deletionsmutante infiziert (siehe Anhang I). Die Entstehung dieser wenigen Einzelereignisse scheint aber mehr zufälligen Charakter zu haben, wie auch in der Negativkontrolle uninfizierter primärer B-Lymphozyten in der Regel einige proliferierende Zellklone durch die Präsenz von EBV in der primären B-Zell

Präparation auswachsen. Die Anzahl der mit der Δ BALF1/ Δ BHRF1 Doppeldelentionsmutante infizierten Zellklone korrelierte nicht mit der Anzahl eingesetzter infektiöser Partikel. Obwohl bis zum 600fachen der Menge an infektiösen Partikeln eingesetzt wurde, die zur Generierung eines Zellklons durch Wildtyp-EBV nötig waren, war es nicht möglich, genügend Immortalisierungsereignisse zu erhalten, um die Immortalisierungseffizienz für die Δ BALF1/ Δ BHRF1 Doppeldelentionsmutante zu bestimmen.

Für das rekombinante Δ BZLF1 Virus 2809 habe ich eine verminderte Effizienz bei der Immortalisierung von primären B-Lymphozyten festgestellt. Dieses Ergebnis spricht für den von Inman et al. beschriebenen anti-apoptotischen Effekt der Expression lytischer Gene (Inman et al., 2001) und für einen positiven Einfluss von BZLF1 auf die B-Zell Immortalisierung. Die zusätzliche Deletion von BZLF1 zu BALF1 und BHRF1 im rekombinanten Virus 2850 konnte nicht bestätigen, dass BZLF1 den lytischen Zyklus von EBV und damit die Apoptose in infizierten Zellen auslöst und diese Induktion der Apoptose durch eine entgegenwirkende Funktion von BALF1 und/oder BHRF1 verhindert werden sollte. Dies wäre mit der Δ BALF1/ Δ BHRF1 Doppeldelentionsmutante 2636 nicht mehr möglich und der Einbruch in der Immortalisierungseffizienz zu erklären gewesen. Durch eine zusätzliche Deletion von BZLF1 im rekombinanten Virus 2850 wäre der die Apoptose auslösende Stimulus nicht mehr existent gewesen, und die Immortalisierungsfähigkeit des dreifach deletierten Maxi-EBV hätte deutlich steigen müssen. Dieser Effekt konnte aber in Immortalisierungsexperimenten mit dem dreifach deletierten Maxi-EBV 2850 nicht beobachtet werden. Im Gegensatz zur Infektion mit dem zweifach deletierten Maxi-EBV 2636, wobei noch einzelne lymphoblastoide Zellklone entstanden waren, waren bei der Infektion mit der Δ BALF1/ Δ BHRF1/ Δ BZLF1 Dreifachdelentionsmutante keine lymphoblastoiden Zellklone mehr zu erhalten.

4.2.6 Neukonstruktion der BALF1/BHRF1 Doppeldelentionsmutante

Der drastische Einbruch bei der in vitro Immortalisierung der Δ BALF1/ Δ BHRF1 Doppeldelentionsmutante 2636 war besonders überraschend, da die Einzeldelentionsmutanten keinen signifikanten phänotypischen Unterschied zu

Wildtyp-EBV aufwiesen. Es war nicht auszuschließen, dass dieser Effekt nicht ursächlich mit den beiden Deletionen zusammenhing, sondern auf einen in dem 180kb großen Genom stattgefundenen Fehler bei der homologen Rekombination zurückzuführen war. Um dies auszuschließen, wurde ein zweites rekombinante Virus unabhängig von p2636 auf der Basis von Wildtyp EBV konstruiert. Es wurden die Gene jedoch in umgekehrter Reihenfolge deletiert. Bei dem rekombinanten Virus 2636 wurde zuerst BALF1 und anschließend BHRF1, bei dem neu konstruierten rekombinanten Virus 2765 zuerst BHRF1, dann BALF1 deletiert. Für die homologe Rekombination wurden dieselben linearen Fragmente verwendet, mit denen auch die Δ BALF1 und Δ BHRF1 Einzeldelationen in den rekombinanten Viren 2512 und 2637 konstruiert wurden.

Die Integrität des Plasmids p2765 habe ich in E.coli überprüft, Produzenten infektiöser Partikel in HEK293 Zellen selektioniert, sowie rekombinante Viren hergestellt und quantifiziert (Daten nicht gezeigt). Wie zuvor mit dem rekombinante Virus 2636 konnten mit etwa gleicher Effizienz infektiöse Partikel hergestellt werden. Diese wurde in die für das rekombinante Virus 2636 beschriebenen Experimente eingesetzt. Das neue rekombinante Virus 2765 war ebenso wenig wie sein Vorläufer in der Lage, infizierte primäre B-Lymphozyten zum Proliferieren zu bringen oder in berechenbarer Effizienz zu immortalisieren. Der Anstieg der apoptotischen Zellen, gemessen durch die sub-G1 Population, war mit den Daten des rekombinanten Virus 2636 identisch.

Die unabhängig voneinander konstruierten rekombinanten Viren 2636 und 2765 mit Deletionen in den Genorten für BALF1 und BHRF1 waren in ihrem Phänotyp nicht unterscheidbar. Die Ergebnisse der oben beschriebenen Experimente wurden durch die Kombination der phänotypisch unauffälligen Einzeldelationen in den Doppeldeletionsmutanten hervorgerufen. Die unabhängige Bestätigung des Ergebnisses spricht dafür, dass BALF1 und BHRF1 ähnliche, wenn nicht sogar identische Funktionen bei der B-Zell-Immortalisierung aufweisen und damit funktionell kompletiv sind.

4.2.7 Nachweis von BALF1 und BHRF1

Der Phänotyp meiner unterschiedlichen BALF1 und BHRF1 Mutanten lässt den Schluss zu, dass die Gene BALF1 und BHRF1 ähnliche Funktionen bei der in vitro Immortalisierung primärer B-Lymphozyten übernehmen. Die Vermutung lag nahe, dass beide Gene zumindest in der frühen Phase infizierter primärer B-Lymphozyten exprimiert werden oder aber direkt als Protein im Viruspartikel in die infizierte Zelle eingebracht werden. Deswegen sollte zunächst die Expression von BALF1 und BHRF1 bestimmt werden. Insbesondere galt es, die Expression während der Infektion von primären B-Lymphozyten sowie während der lytischen Replikation und der viralen Latenz in etablierten B-Zelllinien zu untersuchen.

4.2.7.1 Immunfluoreszenz gegen BHRF1 in etablierten Zelllinien

Antikörper gegen BHRF1 sind bereits publiziert worden (Nicholls et al., 2001). Diese wurden von mir zum Nachweis dieses Proteins in etablierten Zelllinien verwendet, um die Expression in lytisch replizierenden und latent ruhenden Zellen zu untersuchen.

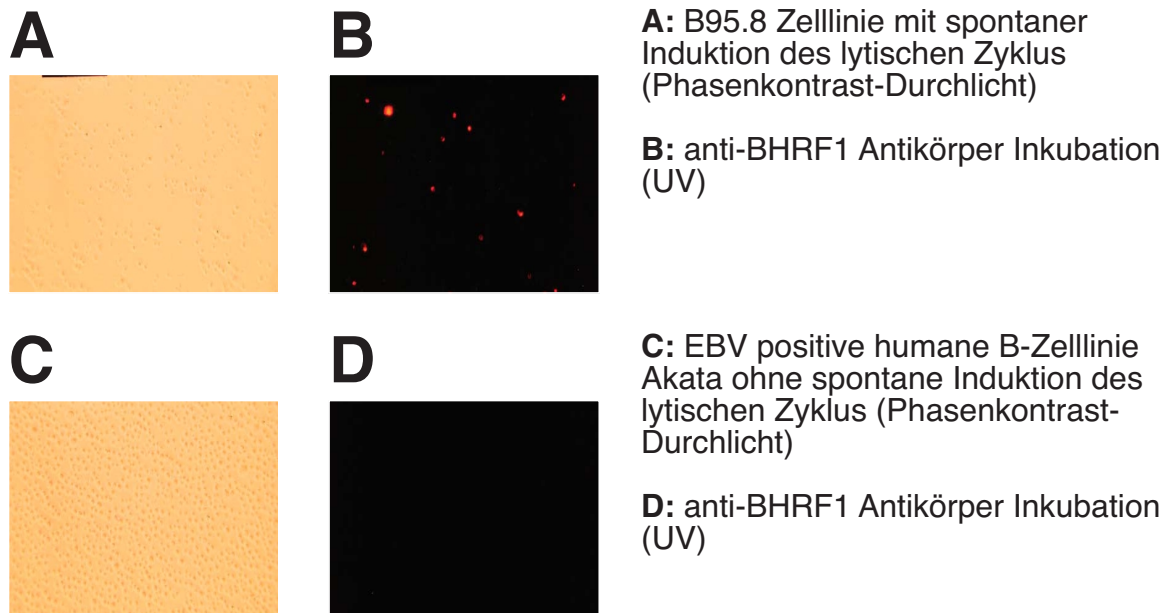


Abb.4.12: Detektion von BHRF1 in der Immunfluoreszenz

Dargestellt ist die EBV positive, spontan den lytischen Zyklus unterstützende Zelllinie B95.8 im Phasenkontrast (**A**) und unter UV Licht (**B**), sowie die EBV positive, aber nicht spontan den lytischen Zyklus unterstützende Zelllinie Akata im Phasenkontrast (**C**) und unter UV Licht (**D**)

Zellen beider Linien wurden auf Objektträgern hitzefixiert und mit Aceton permeabilisiert. Der Nachweis der BHRF1 Expression erfolgte mittels des monoklonalen Antikörpers 5G2.2 gegen BHRF1 und eines Cy-3 gekoppelten Sekundärantikörpers in einem invertierten Fluoreszenzmikroskop. BHRF1 Expression konnte nur in der spontan lytisch replizierenden Zelllinie B95.8 nachgewiesen werden.

Zellen der Linien Akata (keine spontane Induktion des lytischen Zyklus) und B95.8 (spontane Induktion des lytischen Zyklus in 10-15% der Zellen) wurden wie in Material und Methoden unter 3.2.9 beschrieben fixiert, permeabilisiert und mit einem monoklonalen Antikörper gegen BHRF1 (5G2.2) sowie einem dazu passenden Cy3-gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert. Wie in Abbildung 4.12 deutlich zu erkennen ist, konnten mittels eines invertierten Fluoreszenzmikroskops nur bei der spontan lytisch replizierenden Zelllinie B95.8 BHRF1-positive Zellen festgestellt werden. In der nicht lytisch replizierenden Zelllinie Akata war keine BHRF1 Expression nachweisbar.

4.2.7.2 RT-PCR gegen BALF1 und BHRF1 in lytisch replizierenden Zellen

Nachdem in lytisch replizierenden Zellen BHRF1 nachweisbar war, soll auch die Expression von BALF1 untersucht werden. Da keine Antikörper für den Nachweis von BALF1 in der Immunfluoreszenz zur Verfügung stehen, wurde aus B95.8 Zellen und lytisch induzierten HEK293/2089 Zellen RNA gewonnen. 0,5µg dieser RNAs wurden revers transkribiert und 10% davon als Substrat für eine PCR Reaktion eingesetzt (Mullis and Faloona, 1987). Als Kontrolle diente nicht revers transkribierte RNA in gleicher Menge, um genomische DNA Verunreinigungen auszuschließen. Die mRNAs beider Proteine waren durch die RT-PCR Reaktion in lytisch replizierenden Zellen nachweisbar (Abb.4.13A/B) und werden somit exprimiert. Bei BHRF1 konnte durch die Auswahl der Oligonukleotide über ein Intron hinweg zusätzlich auch die ungespleißte von der gespleißten Form unterschieden werden.

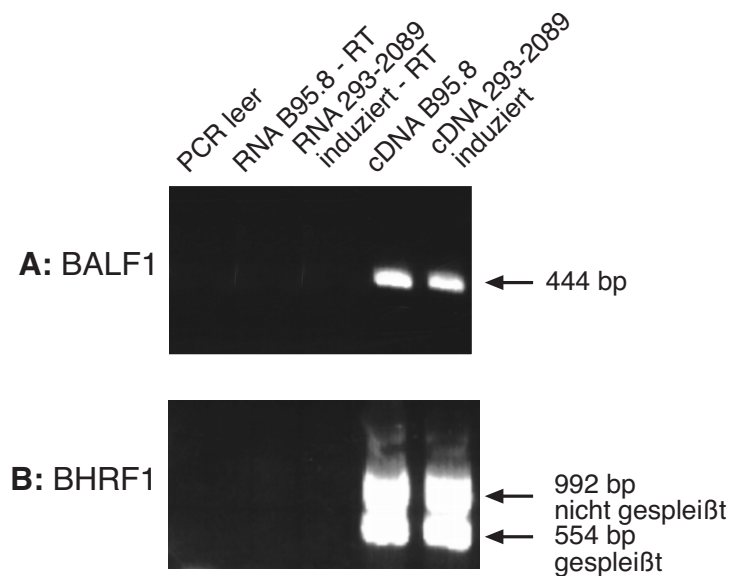


Abb.4.13: Expression von BALF1 und BHRF1 während der lytischen Replikation

Aus B95.8 und lytisch induzierten HEK293/2089 Zellen wurde mit dem „RNA-Isolation Kit“ (Roche) RNA isoliert. Je 0,5 µg RNA aus jeder Zelllinie wurde mit dem „high prime Superscript™ II - reverse Transkriptase Kit“ (Life Technologies) revers transkribiert. BALF1 (**A**) und BHRF1 (**B**) wurden mit sequenzspezifischen Primern in einer PCR Reaktion amplifiziert. Die mRNAs beider Proteine waren sowohl in B95.8, als auch in lytisch induzierten 293/2089 Zellen nachweisbar. Die Auswahl der Oligonukleotide ließ für BHRF1 auch die Unterscheidung zwischen der ungespleißten (992bp) und der gespleißten (554bp) Form zu. In nicht lytisch induzierten HEK293/2089 Zellen und nicht spontan lytisch replizierenden Akata Zellen konnte keine der beiden mRNAs nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

4.2.7.3 Nachweis von BALF und BHRF1 mittels „real-time“ PCR in frisch infizierten primären B-Lymphozyten

Das Vorhandensein der mRNAs von BALF1 und BHRF1 kurz nach der Infektion von primären B-Lymphozyten mit B95.8 Kulturüberstand sollte mittels „real-time PCR“ nachgewiesen werden. Diese quantitativ auswertbare PCR Reaktion lässt eine verlässlichere Quantifizierung an ursprünglich vorhandener Ausgangsmatrize zu. Wie in Material und Methoden unter 4.2.7.3 genauer beschrieben, wurde zuerst mit Standardverdünnungen aus genomischer HEK293/2089 DNA die Effizienz der eingesetzten Oligonukleotidpaare zur Amplifikation von BALF1 und BHRF1 überprüft. Beide Oligonukleotidpaare entsprechen den bei Schepers et al. beschriebenen Anforderungen (Schepers et al., 2001).

Pro Zeitwert wurden 10^7 primäre B-Lymphozyten mit 4ml B95.8 Kulturüberstand infiziert. Acht Stunden nach Infektion wurden die Zellen sedimentiert und in frischem Zellkulturmedium aufgenommen, um noch vorhandene infektiöse Partikel im Kulturmedium zu entfernen und die Infektion abzuschließen. Aus uninfizierten primären B-Lymphozyten als Negativkontrolle, sowie aus den infizierten Zellen wurde

1, 2, 3, 4 und 5 Tage nach der Infektion gesamtzelluläre RNA isoliert, wie unter 3.4.1 beschrieben. Als Positivkontrolle zum Nachweis der mRNAs für BALF1 und BHRF1 habe ich gesamtzelluläre RNA aus 10^7 Zellen der Zelllinie B95.8 verwendet. Ein μg von jeder RNA wurde mit dem cDNA-Synthese-System der Firma Roche diagnostics nach Angaben des Herstellers revers transkribiert. 200ng RNA oder die entsprechende Menge an cDNA wurden in eine quantitative PCR Reaktion eingesetzt. Die Amplifikation erfolgte wie bereits bei Schepers et al. beschrieben (Schepers et al., 2001).

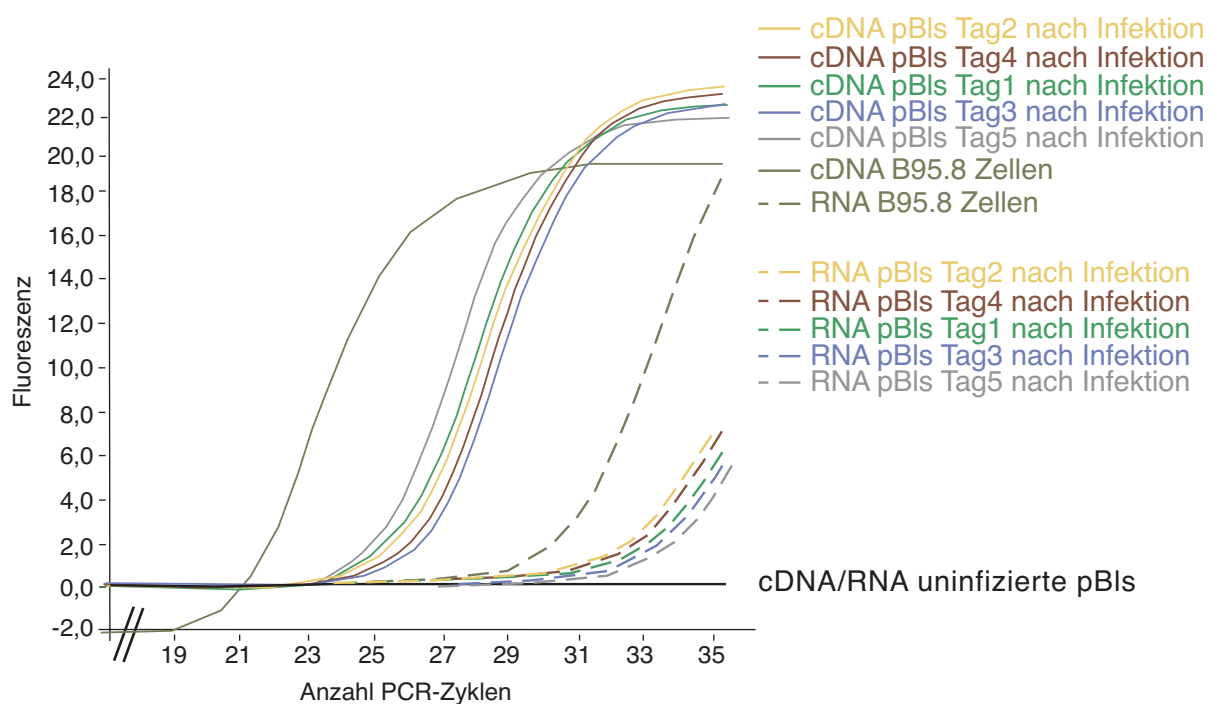


Abb.4.14: Nachweis der BHRF1-mRNA in frisch infizierten primären B-Lymphozyten

Zum Nachweis der BHRF1-mRNA wurden 5×10^7 primäre B-Lymphozyten mit 20ml B95.8 Kulturüberstand infiziert. Acht Stunden nach Infektion wurden die Zellen sedimentiert und in neuem Zellkulturmedium aufgenommen, um noch im Überstand vorhandene infektiöse Partikel zu entfernen und die Infektion abzuschließen. Bis fünf Tage nach Infektion wurde jeden Tag ein Teil der Zellen geerntet und gesamtzelluläre RNA präpariert. Als Negativkontrolle für die nachfolgende PCR Reaktion diente RNA aus 10^7 nicht infizierten primären B-Lymphozyten, als Positivkontrolle RNA aus 10^7 B95.8 Zellen. 200ng RNA oder das Äquivalent an cDNA wurden in eine „Light Cycler“ PCR Reaktion eingesetzt (Ansatz siehe 3.3.8). Schon nach einer geringen Anzahl von PCR Zyklen war bei der Positivkontrolle ein Produkt nachweisbar. B95.8 induziert spontan den lytischen Zyklus. Dabei ist BHRF1-mRNA nachweisbar. Diese zusätzliche Menge an mRNA, die man noch zu der in frisch infizierten Zellen nachweisbaren mRNA hinzurechnen muss, erklärt den früheren Nachweis von BHRF1-mRNA in B95.8. In frisch infizierten B-Lymphozyten ist BHRF1-mRNA schon 24 Stunden nach Infektion nachweisbar. Das Niveau der detektierten Menge ändert sich bis zum Tag fünf nicht signifikant. Dies lässt sich entweder durch eine starke Transkription des BHRF1 Gens kurz nach der Infektion der Zelle erklären, oder aber die mRNA wurde durch das Virion selbst mitgebracht und in die Zelle eingeschleust. Bei den Negativkontrollen mit nicht revers transkribierter RNA ist erst signifikant später ein PCR Produkt zu erhalten. Eine genomische DNA Kontamination kann damit ausgeschlossen werden.

In der cDNA aus B95.8 Zellen war bereits bei einer deutlich niedrigeren Zykluszahl ein Produkt für BHRF1 zu erhalten, als dies für die infizierten primären B-Lymphozyten der Fall war (siehe Abb.4.14). Die dadurch bedingte größere Menge an Matrize zu Beginn der PCR Reaktion lässt sich durch die spontane lytische EBV Replikation in der Zelllinie B95.8 erklären. Wie unter 4.2.7.2 beschrieben, ist BHRF1-mRNA während der lytischen Replikation nachweisbar. Diese Menge an mRNA ist zu der in den frisch infizierten primären B-Lymphozyten nachweisbaren mRNA hinzuzurechnen. Die in den frisch infizierten primären B-Lymphozyten vorhandene Menge an BHRF1-mRNA Matrize verändert sich von Tag 1 bis Tag 5 kaum (siehe Abb.4.14). Bereits zum ersten Messwert, 24 Stunden nach Infektion der Zellen, ist die mRNA für BHRF1 gut nachweisbar. Dieses Niveau verändert sich bis zum Tag 5 weder signifikant nach oben oder nach unten. Dies ist entweder auf eine sehr kurz nach der Infektion beginnende Transkription des Gens zurückzuführen, oder die mRNA wurde schon durch das infektiöse Partikel bei der Infektion der Zelle mitgebracht. Im Gegensatz zu BHRF1 war keine BALF1-mRNA in frisch infizierten B-Lymphozyten nachweisbar (Daten nicht gezeigt).

4.2.8 Transkomplementation der Δ BALF1/ Δ BHRF1 Doppeldeletionsmutante

BALF1 und BHRF1 werden in Wildtyp-EBV während der lytischen Replikation exprimiert. Mit einer transienten Überexpression jedes der beiden Gene in lytisch induzierten HEK293 Zellen wollte ich untersuchen, ob BALF1 und/oder BHRF1 während der lytischen Replikation des Epstein-Barr Virus ihre Funktion ausüben und die Lebensspanne der produzierenden 293 Zellen verlängern. Dies sollte durch die Erhöhung der Menge neu gebildeter infektiöser Partikel bestimmbar sein. Wie schon unter 4.1.6 beschrieben, habe ich in HEK293/2089 (Wildtyp EBV), sowie in HEK293/2512 (Δ BALF1), HEK293/2637 (Δ BHRF1), HEK293/2636 (Δ BALF1/ Δ BHRF1) den lytischen Zyklus durch transiente Expression von BZLF1 und BALF4 induziert. Zusätzlich wurden auch Expressionsplasmide für BALF1 und/oder BHRF1 in steigenden Mengen kotransfiziert. Zum Mengenausgleich der transfizierten DNA und zusätzlich in einer eigenen Versuchsreihe als Negativkontrolle diente der Leervektor pRK5. In diesem Vektor sind auch die offenen Leserahmen zur

Expression von BALF1 oder BHRF1 einkloniert. Vier Tage nach Induktion des lytischen Zyklus wurden die Kulturüberstände geerntet und durch einen Filter mit 0,8µm Porendurchmesser filtriert. Mit einem Milliliter davon wurden 3×10^5 Raji Zellen infiziert und die grünen Zellen vier Tage später in einem invertierten Fluoreszenzmikroskop ausgezählt. Die Anzahl der grünen Raji-Zellen, die nach Infektion mit einem Kulturüberstand ohne kotransfizierte Expressionsplasmide gezählt wurden, wurde dabei auf 100% gesetzt.

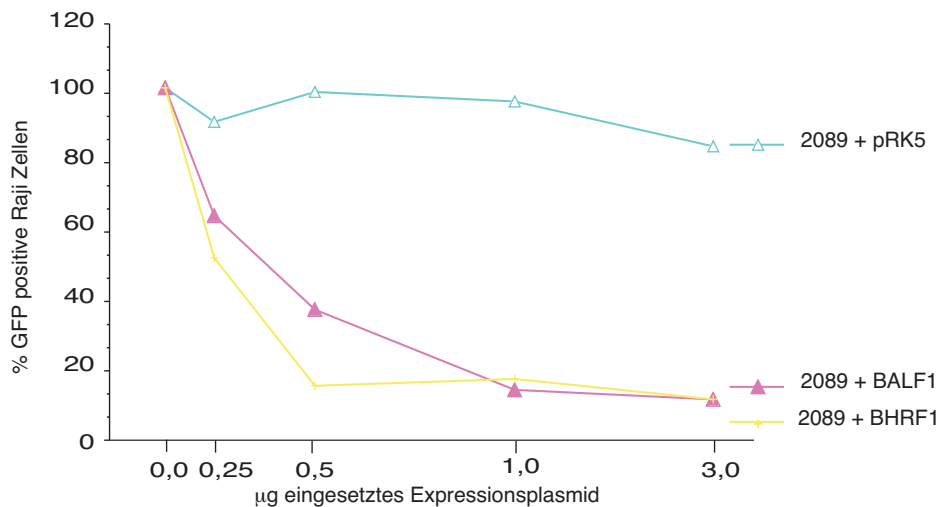


Abb.4.15: Überexpression von BALF1 und BHRF1 während des lytischen Zyklus

Ein anti-apoptotischer Effekt von BALF1 und BHRF1 sollte die Lebensdauer der lytisch replizierenden HEK293/2089 Zelllinie verlängern und somit den erhaltenen Virustiter erhöhen. Durch transiente Expression von BALF1- und BHRF1-Expressionsplasmiden wurde der lytische Zyklus induziert. Zusätzlich dazu wurden steigende Mengen eines Expressionsplasmides für BALF1 oder BHRF1 kotransfiziert. Die transfizierte DNA wurde mit dem Leervektor pRK5 auf gleiche Mengen gebracht. Die infektiösen Partikel in den geernteten Kulturüberständen wurden durch Infektion von Raji-Zellen quantifiziert, der Wert ohne Kotransfektion der BALF1- und BHRF1-Expressionsplasmide auf 100% gesetzt. Im Vergleich zum Leervektor ist bei steigender Menge der Expressionsvektoren ein deutlicher Rückgang des Virustiters zu beobachten. Die Expression von BALF1 oder BHRF1 verbessert nicht die Produktion von infektiösen EBV Partikeln, sondern führt zum gegenteiligen Effekt.

Die Überexpression von BALF1 oder von BHRF1 senkte die Menge an produzierten Viren durch die Zelllinie HEK293/2089 erheblich (siehe Abb.4.15). Vergleichbare Ergebnisse wurden auch bei der Komplementation der Zelllinie HEK293/2512 (Δ BALF1 Deletionsmutante) mit einem Expressionsplasmid für BALF1 erhalten. Die Komplementation der Zelllinien HEK293/2637 (Δ BHRF1) mit einem Expressionsplasmid für BHRF1 und HEK293/2636 (Δ BALF1/ Δ BHRF1) mit Expressionsplasmiden für BALF1 und BHRF1 führte auf Grund der an sich schon

deutlich geringeren Virustiter, die diese Zelllinien nach Induktion des lytischen Zyklus produzieren, auch in mehreren Experimenten nicht zu einem eindeutigen Ergebnis.

Trotz des Rückgangs der produzierten infektiösen Partikel ist die Kotransfektion eines Expressionsplasmides während des lytischen Zyklus das klassische Komplementationsexperiment für eine Deletionsmutante, die ein Protein betrifft, das im infektiösen Partikel selbst vorhanden ist. Auf diese Weise wurde z.B. von Janz et al. ein gp350/220 defizientes Maxi-EBV komplementiert und der Wildtyp Phänotyp wieder hergestellt (Janz et al., 2000). Wird BALF1 und/oder BHRF1 im Viruspartikel direkt mitgebracht, sollten während des lytischen Zyklus in HEK293/2636 (Δ BALF1/ Δ BHRF1) komplementierte rekombinante Viren eine verbesserte Effizienz in der B-Zell-Immortalisierung besitzen. Wie bereits mehrfach beschrieben, wurde in Zellen der Linie HEK293/2636 (Δ BALF1/ Δ BHRF1) der lytische Zyklus induziert. Kotransfiziert wurden 0,25 μ g pRK5, 0,25 μ g BALF1, 0,25 μ g BHRF1 oder je 0,25 μ g BALF1 und BHRF1 Plasmid DNA. Die erhaltenen rekombinanten Viren wurden quantifiziert und wie unter 4.2.5 in ein Immortalisierungsexperiment eingesetzt. Sechs Wochen nach Infektion der primären B-Lymphozyten konnte keine Verbesserung der Immortalisierungseffizienz der komplementierten Δ BALF1/ Δ BHRF1 Doppeldelentionsmutante (2636) festgestellt werden.

Trotz einer nachgewiesenen Expression von BALF1 und BHRF1 konnte keine Funktion dieser beiden Gene während des lytischen Zyklus von EBV bestimmt werden. Da der drastische Einbruch der Immortalisierungseffizienz der Δ BALF1/ Δ BHRF1 Doppeldelentionsmutante (2636) aber eindeutig auf das Fehlen dieser beiden Gene zurückzuführen ist, muss deren Funktion zu einem späteren Zeitpunkt nach der lytischen Replikation, wahrscheinlich während der Initiation der Latenz, vermutet werden.

4.3 LMP2 und die Aufrechterhaltung der Latenz

Wie bereits unter 4.1.4 ausgeführt und in Abbildung 4.6.A dargestellt, bestehen die Gene für LMP2A und LMP2B aus neun Exons. Die beiden Gene unterscheiden sich dabei nur im ersten Exon und dem dazugehörigen Promotor. Exon zwei bis neun sind für beide Proteine identisch. Im ersten Exon von LMP2A ist der gesamte cytoplasmatische, N-terminale Anteil des Proteins kodiert. Exon eins von LMP2B ist nicht kodierend. Exon 2-8 kodieren für die gemeinsamen 12 Transmembranregionen. Exon neun ist nicht kodierend. Jede der beiden mRNAs wird über die „terminal repeats“ hinweg gespleißt. Nur wenn das Genom als extrachromosomales Plasmid zirkularisiert innerhalb einer Zelle vorliegt, können die LMP2 Gene transkribiert werden. Aufgrund dieser Besonderheit bei der Transkription wird den LMP2 Genen eine Rolle bei der Aufrechterhaltung der Latenz, bzw. bei der Unterdrückung des lytischen Zyklus zugeschrieben (Longnecker and Miller, 1996). Zur Untersuchung des Effekts einer LMP2A Deletion wurde wie unter 4.1.4 beschrieben ein Maxi-EBV Plasmid konstruiert, in dem der Promotor und das erste Exon von LMP2A mit loxP-Sequenzen flankiert sind (Abb.4.6.B). Dieses p2190new genannte Maxi-EBV Plasmid kommt dem Wildtyp p2089 sehr nahe und sollte sich von diesem in seiner Funktionalität nicht unterscheiden. Nach transienter Cre-Expression in p2190new erhielt ich das rekombinante Maxi-EBV Plasmid p2525 mit dem Genotyp Δ LMP2A (Abb.4.6.C).

4.3.1 LMP2A induziert BZLF1, aber nicht die vollständige lytische Replikation von EBV

Nach der Theorie von Longnecker und Miller (Longnecker and Miller, 1996) sollte ein LMP2A defizientes EBV spontan lytisch replizieren. Um dieser Theorie nachzugehen, habe ich pro gemessenem Zeitwert 5×10^6 primäre B-Lymphozyten mit einer MOI von 0,1 an infektiösen Partikeln des LMP2A defizienten Virus 2525, sowie mit 2190new-EBV oder WT-EBV (2089) infiziert. Nach 0, 1, 4, 8, 15 und 21 Tagen wurden Kulturüberstände geerntet und damit Raji-Zellen zum Nachweis von infektiösen Partikeln inkubiert (vergleiche 4.2.8). In keinem der getesteten Kulturüberstände waren grün fluoreszierenden Raji-Zellen nachweisbar. In den frisch infizierten pBIs kam es weder durch Infektion mit Wildtyp EBV (2089 und 2190new) noch durch

Infektion mit dem LMP2A defizienten Virus 2525 zu einem vollständigen Durchlaufen des lytischen Zyklus. Auch eine spontane Induktion des lytischen Zyklus in etablierten lymphoblastoiden Zelllinien von B2089, B2190new und B2525 konnte nicht nachgewiesen werden.

Die mit Wildtyp EBV (2089 und 2190new) und dem LMP2A defizienten Virus 2525 infizierten primären B-Lymphozyten selbst wurden, wie unter 4.2.3 beschrieben, mittels FACS-Analyse auf ihre BZLF1 Expression hin untersucht. Die nach Infektion primärer B-Lymphozyten mit Wildtyp EBV ansteigende Expression von BZLF1 habe ich bereits gezeigt (siehe Abb.4.10.B und Abb.4.16.A/B). Wie in Abbildung 4.16.C/D eindeutig zu erkennen ist, führt eine Infektion von primären B-Lymphozyten mit LMP2A defizienten Maxi-EBVs (2525) nicht zu einer Expression von BZLF1 in den infizierten Zellen.

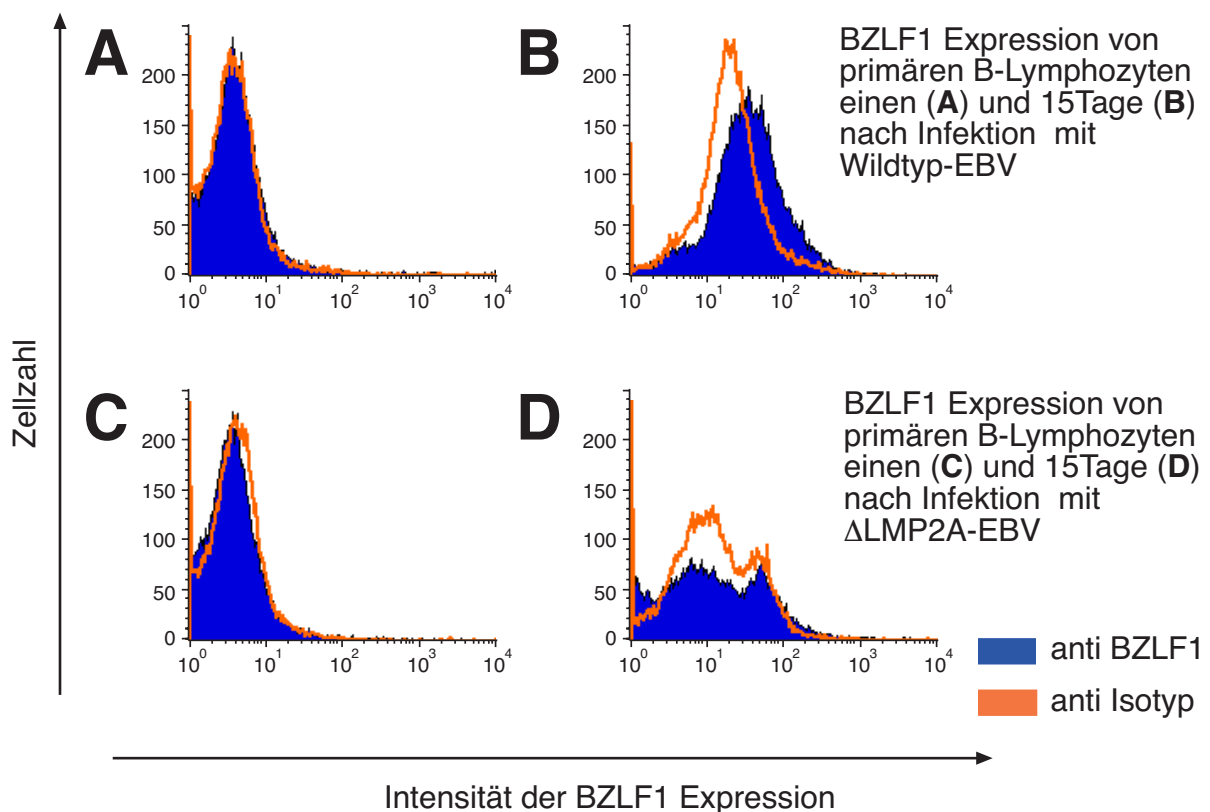


Abb.4.16: BZLF1 Expression nach Infektion von primären B-Lymphozyten mit WT-EBV (2089) und Δ LMP2A-EBV (2525)

Infizierte primärer B-Lymphozyten wurden mittels FACS-Analyse auf BZLF1 Expression untersucht. 24 Stunden nach der Infektion der Zellen ist weder mit WT-EBV (2089) (A) noch mit Δ LMP2A-EBV (2525) (C) eine signifikante BZLF1 Expression im Vergleich zur Isotypkontrolle nachweisbar. 15 Tage nach der Infektion ist bei den mit WT-EBV infizierten Zellen eine deutliche BZLF1 Expression nachweisbar (B). Dagegen exprimieren mit Δ LMP2A-EBV infizierte Zellen kein BZLF1 (D). Nach diesem Befund ist LMP2A für die Expression lytischer Gene nach Infektion primärer B-Lymphozyten notwendig.

Diesen Ergebnissen zufolge ist die Expression von LMP2A für die Induktion lytischer Gene von EBV notwendig. Eine vollständige lytische Replikation findet jedoch nicht statt. Eine Unterdrückung des lytischen Zyklus und die damit verbundene Aufrechterhaltung der Latenz in infizierten Zellen konnte als Funktion von LMP2A nicht gezeigt werden. Der Übergang des Epstein-Barr Virus von der Latenz in den lytischen Zyklus ist damit nicht oder zumindest nicht alleine von LMP2A abhängig.

4.3.2 Bestimmung der Immortalisierungseffizienz von Δ LMP2A-EBV

Der Einfluss von LMP2A auf die Immortalisierungseffizienz wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Während Brielmeier et al. mit einem auf einem mini-EBV basierendem Testsystem einen Einfluss von LMP2A auf die B-Zell Immortalisierung sah (Brielmeier et al., 1996), war dieser Effekt von anderen Gruppen mit anderen Testsystemen nicht nachweisbar (Konishi et al., 2001; Longan and Longnecker, 2000; Speck et al., 1999). Diesen Widerspruch wollte ich mit dem unter 4.2.5 beschriebenen Versuchsansatz zur Bestimmung der Immortalisierungseffizienz klären. Dazu habe ich primäre B-Lymphozyten mit den rekombinanten Maxi-EBVs 2089 (Wildtyp), 2190new (Wildtyp) und 2525 (Δ LMP2A) infiziert, und deren Immortalisierungseffizienz bestimmt.

Maxi EBV Konstrukt	Grüne Raji Einheiten (GRE)/Einzelzellklon
WT EBV (2089)	2,8
WT EBV (2190new)	3,2
Δ LMP2A (2525)	36,4

Tabelle 4.4 Immortalisierungseffizienz verschiedener, den Genlokus von LMP2A betreffenden Maxi-EBV Mutanten

Die Immortalisierungseffizienz wurde für jedes einzelne in der Tabelle aufgeführte Maxi-EBV Konstrukte aus mindestens drei unabhängigen Experimenten ermittelt. Zur Auswertung wurden nur Verdünnungsstufen verwendet, die die statistische Voraussetzung einer „one hit“ Kinetik erfüllen (Frisan et al., 2001). Dies ist der Fall, wenn bei einer Verdünnungsstufe höchstens 63% also 60 von 96 Löchern einer 96-Loch Platte proliferierende Zellen enthalten. Die Bestimmung erfolgte graphisch, wie dies in Abbildung 4.11 für das Wildtyp-Virus 2089 dargestellt ist. Die rekombinante Δ LMP2A (2525) Maxi-EBV Mutante zeigt eine signifikante Verschlechterung ihrer Immortalisierungsfähigkeit.

Wie erwartet war das Vorläuferkonstrukt 2190new-EBV für die LMP2A Deletion in der Immortalisierungseffizienz nicht von Wildtyp EBV unterscheidbar. Die eingefügte Kanamycinresistenz und die loxP Sequenzen verändern die Fähigkeit, primäre B-Lymphozyten zum Proliferieren zu bringen also nicht. Die Deletion von LMP2A führt zu einer zehnfach reduzierten Immortalisierungseffizienz. Die Deletion von LMP2A hat also einen gewissen, aber nicht essentiellen Effekt auf die Immortalisierungseffizienz von EBV. Dieser Effekt konnte nur durch die Titration infektiöser Partikel und die Frequenz der Immortalisierungsereignisse der Einzelzellklone nachgewiesen werden. Zu diesen Beobachtungen passen die Ergebnissen von Brielmeier et al. (Brielmeier et al., 1996). Sie widersprechen dagegen anderen Veröffentlichungen wie der von Speck et al. (Speck et al., 1999).

4.3.3 LMP2A reguliert zelluläre Zielgene in der Zelle

LMP2A liegt in der Zellmembran nicht gleichmäßig verteilt, sondern fleckenartig mit offensichtlich hoher lokaler Dichte vor. Durch dieses „patching“ wirkt LMP2A wahrscheinlich als konstitutiv aktiver Pseudorezeptor, der starke Homologien zum B-Zell-Rezeptor aufweist (Caldwell et al., 1998) und diesen teilweise auch funktionell ersetzen kann. Bisher ist in der Literatur nur ein Signaltransduktionsweg beschrieben, der durch die Expression von LMP2A positiv reguliert wird. Durch die Expression von LMP2A in einer humanen Keratinocytenzelllinie (HaCaT) entstanden Zelllinien, die nach Transfektion in immunsupprimierten Mäusen stark tumorigen waren, und eine konstitutive Aktivierung des PI3-Kinase-Akt-Signaltransduktionsweges zeigten (Scholle et al., 2000). Einem aktivierten PI3-Kinase-Akt-Signaltransduktionsweg wird auch eine anti-apoptotische Funktion zugesagt (Kennedy et al., 1999; Swart et al., 2000). Darüber hinaus sind in in vitro transformierten B-Lymphozyten für LMP2A nur regulierende Effekte, wie die Blockade von Signaltransduktionswegen, die vom B-Zell-Rezeptor ausgehen, beschrieben (Miller et al., 1994). Im Rahmen dieser Arbeit sollte deswegen ein induzierbares LMP2A-Expressionssystem etabliert werden. Durch die Untersuchung der Zielgene von LMP2A in B-Lymphozyten und die von LMP2A aktivierten Signaltransduktionswege sollte ein experimenteller Zugang zur Funktion dieses Proteins geschaffen werden. Dieses induzierbare LMP2A-Expressionssystem sollte

in einem für EBV möglichst authentischen Zellsystem funktionieren, um auf die bisherige transiente Expression in nicht-lymphoiden Zelllinien verzichten zu können.

4.3.3.1 Konstruktion eines induzierbaren LMP2A Expressionssystems

LMP2A ist ein Typ-II-Transmembranprotein mit seinem N-terminalen Anteil im Cytoplasma (siehe Abb.1.4.A). In diesem sind alle bisher bekannten Motive zur Interaktion mit zellulären Kinasen und Nedd4-ähnlichen Protein-Ubiquitin-Ligasen lokalisiert (Abb.1.4.B/C). Der größere, C-terminale Anteil des Proteins besteht aus 12 Transmembranregionen. Bisher wird dieser nur für die Auto-Aggregation der Proteine in der Zellmembran verantwortlich gemacht und ist vergleichbar mit den sechs Transmembrandurchgängen von LMP1, die ebenfalls die Aggregation der Proteine in der Zellmembran bewirken. Eine Voraussetzung, um die Funktion von LMP2A in einem konditionalen System untersuchen zu können, ist die Aufhebung der spontanen Aggregation der Transmembrandomänen. Deswegen wurde der cytoplasmatische Anteil von LMP2A, der für die Signaltransduktion des Proteins verantwortlich ist, bis zum Übergang in die Plasmamembran (AS 1-122) anstelle des sehr kurzen cytoplasmatischen Anteils von proTNF α gesetzt. ProTNF α ist ebenfalls ein Typ-II-Transmembranprotein, allerdings mit nur einem Transmembrandurchgang. Es entstand das chimäre Protein LMP2A:ProTNF α , das durch den die Membran durchspannenden Anteil von proTNF α (AS 28-76) in der Plasmamembran verankert ist und nicht mit sich selbst aggregieren kann. Kurz nach dem Transmembrandurchgang auf der extrazellulären Seite, noch vor der proteolytischen Schnittstelle zur Abspaltung von TNF α , wurde das Protein trunziert und ein His₆-tag angefügt. Über dieses Epitop ist das chimäre Protein LMP2A:ProTNF α :His₆-tag in der Membran mit einem geeigneten Antikörper detektierbar. Der Aufbau dieses chimären Proteins und seine Verankerung in der Plasmamembran ist schematisch in Abbildung 4.17 dargestellt.

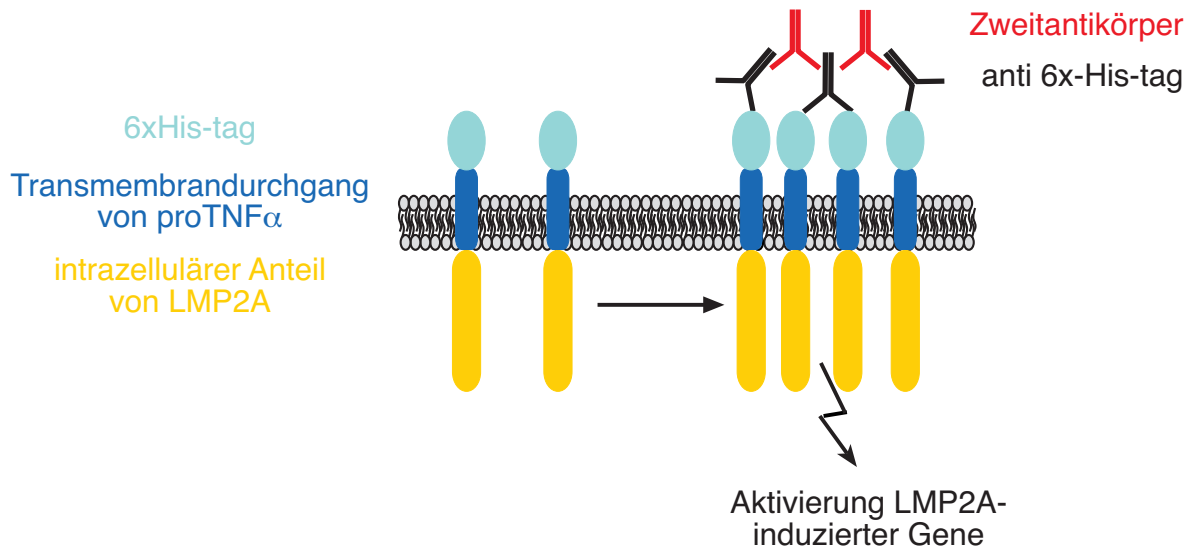


Abb.4.17: Schematische Darstellung des konditionalen LMP2A:proTNF α :His₆-tag Chimärs

Für die Funktion von Wildtyp-LMP2A als konstitutiv aktiver Pseudorezeptor ist eine Aggregation der Proteine in der Plasmamembran verantwortlich, die durch die 12 Transmembrandomänen vermittelt wird. Die Signalaktivität des LMP2A:proTNF α :His₆-tag-Fusionsprotein kann durch Inkubation mit einem anti-His₆-Antikörper und einem geeigneten Zweitantikörper induziert werden. Dabei kommt es ebenso wie bei Wildtyp-LMP2A zu einer Aggregation der Proteine in der Plasmamembran.

Das LMP2A:proTNF α :His₆-tag-Chimär besteht aus der intrazellulären Signaldomäne von LMP2A, dem Transmembrandomgang und extrazellulären Anteilen des humanen Vorläuferproteins proTNF α und einem extrazellulären His₆-tag (Arg-Ser-6xHis).

Um möglichst nahe am WT-EBV Kontext zu bleiben, wurde das chimäre Protein LMP2A:ProTNF α :His₆-tag an Stelle von Exon zwei bis acht von LMP2A/B in das rekombinante Δ LMP2A Maxi-EBV Plasmid p2525 eingefügt (siehe Abb.4.7.B). Die Spleißakzeptorstelle am Beginn des Exons zwei von LMP2A/B wurde in dem chimären Protein wieder hergestellt und das Protein damit unter die Kontrolle des LMP2B Promotors gebracht. Es entstand p2792, ein Δ LMP2A/B Maxi-EBV, das das chimäre Protein LMP2A:ProTNF α :His₆-tag exprimieren sollte. Wie schon mehrfach beschrieben, wurden stabile HEK293/2792 Zelllinien generiert, infektiöse Partikel produziert und primäre B-Lymphozyten damit infiziert. Auswachsende immortalisierte Zellklone wurden auf die Integrität des Genoms in einer Southern-Blot-Hybridisierung überprüft. Nach der Expansion dieser lymphoblastoiden Einzelzelllinien wurde wie unter 3.5.1 beschrieben die Expression und das Migrationsverhalten des chimären Proteins mittels Western-Blot-Immunodetektion bestimmt. Die drei in Abbildung 4.18 dargestellten lymphoblastoiden Zellklone B2792.G/1-3 zeigen alle die Expression des chimären Proteins LMP2A:ProTNF α :His₆-tag in Abwesenheit von Wildtyp-LMP2A, das als Kontrolle in B95.8 und einer mit 2089-EBV immortalisierten

lymphoblastoiden Zelllinie nachgewiesen wurde. Als Negativkontrolle diente eine Zelllinie, die mit 2525-EBV (Δ LMP2A) immortalisiert wurde. Wie zu erwarten, war in dieser Zelllinie kein LMP2A nachweisbar.

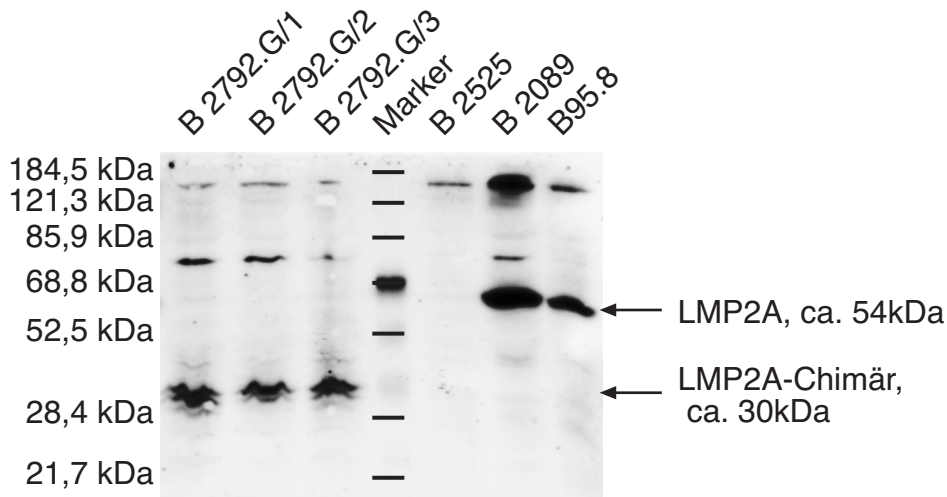


Abb.4.18: Nachweis des chimären Proteins LMP2A:ProTNF α :His $_6$ -tag in lymphoblastoiden Zelllinien

Die Zelllinie B 2089 resultiert aus einer B-Zell-Immortalisation mit dem unmodifizierten Maxi-EBV 2089. Die Zelllinie B95.8 (Wildtyp-EBV) trägt das EBV Genom in sich, aus dem das rekombinante Maxi-EBV p2089 kloniert wurde. Beide Zelllinien exprimieren WT-LMP2A. Die Zelllinie B 2525 resultiert aus einer B-Zell-Immortalisation mit dem Δ LMP2A Maxi-EBV 2525. Nachdem in dem Ausgangskonstrukt p2525 der gesamte N-Terminus von LMP2A deletiert ist, dient diese Zelllinie als Negativkontrolle für die Immuno-Blot-Hybridisierung. Die Zelllinien B2792.G/1-3 resultieren aus einer B-Zell-Immortalisierung mit dem Maxi-EBV 2792. Das chimäre Protein LMP2A:ProTNF α :His $_6$ -tag wurde in diesen drei Zellklonen mit einem monoklonalen Antikörper gegen LMP2A (14B6) und einem geeigneten Zweitantikörper über ihren N-Terminus detektiert. In keinem der drei dargestellten Einzelzellklone ist Wildtyp-LMP2A, wie es in B95.8 und B2089 nachgewiesen wurde, zu detektieren.

Um das induzierbare LMP2A System zu aktivieren, können die chimären Proteine, die zunächst einzeln in der Membran vorliegen sollten, über einen anti-His $_6$ -Antikörper quervernetzt werden. Ein höherer Grad der Quervernetzung wird durch eine zusätzliche Inkubation mit einem geeigneten Zweitantikörper gegen den anti-His $_6$ -Antikörper erreicht (Schematische Darstellung in Abb.4.17, Fotos der Aggregation in Abb.4.19.A/B). Dies sollte dann auch eher die bei WT-LMP2A beobachteten, großen Aggregate der Proteine in der Membran widerspiegeln.

4.3.3.2 Nachweis der Induzierbarkeit von LMP2A:ProTNF α :His₆-tag

Wie ich schon unter 4.3.1 gezeigt habe, erfolgt die Expression von BZLF1 nur bei mit Wildtyp-EBV infizierten primären B-Lymphozyten, nicht aber durch LMP2A Deletionsmutanten. Es lag deswegen nahe zu vermuten, dass die Induktion der BZLF1 Genexpression durch die spontane Aggregation von LMP2A bewirkt wird und BZLF1 als Zielgen von LMP2A aufgefasst werden kann. Deswegen sollte das induzierbare LMP2A System auf seine Fähigkeit BZLF1 zu induzieren getestet werden. Wie unter 3.2.1 genauer beschrieben, wurden 10^7 B2792 Zellen 30min lang mit einem anti-His₆ Antikörper aus Kaninchen und anschließend mit einem Anti-Kaninchen Antikörper aus Ziege inkubiert. 48h nach Induktion des Systems habe ich die induzierten Zellen auf eine erfolgreiche Aggregation der chimären Proteine mittels Immunfluoreszenz (Abb.4.19.A/B) und die Expression von BZLF1 mittels FACS Analyse (Abb.4.19.C/D) untersucht. Unfixierte Zellen zeigten nach Inkubation mit Erst- und Zweitantikörper Bereiche der Zellmembran, in denen die chimären Proteine aggregiert waren. Im Gegensatz dazu war bei Zellen, die vor der Inkubation mit Antikörpern mit Paraformaldehyd fixiert worden waren, eine gleichmäßige Verteilung des chimären Proteins über die Zellmembran hinweg zu beobachten. Der Wildtyp-LMP2A Phänotyp konnte durch die Antikörper vermittelte Quervernetzung wieder hergestellt werden. Die Expression von BZLF1 war 48 Stunden nach der Aggregation der chimären Proteine im Histogramm noch nicht deutlich zu erkennen (Abb.4.19.C, vergleiche dazu Abb.4.16.B), aber im Auftrag „sidward-scatter“ gegen die BZLF1 Expression zeichnete sich schon eine diskrete, BZLF1 positive Zellpopulation ab (Abb.4.19.D).

Das System kann nach Quervernetzung den WT-LMP2A Phänotyp wieder herstellen und ist in der Lage, BZLF1 Expression zu induzieren. Es ist also funktional und kann nun zur Aufklärung weiterer Funktionen von LMP2A in der Wirtszelle von EBV benützt werden.

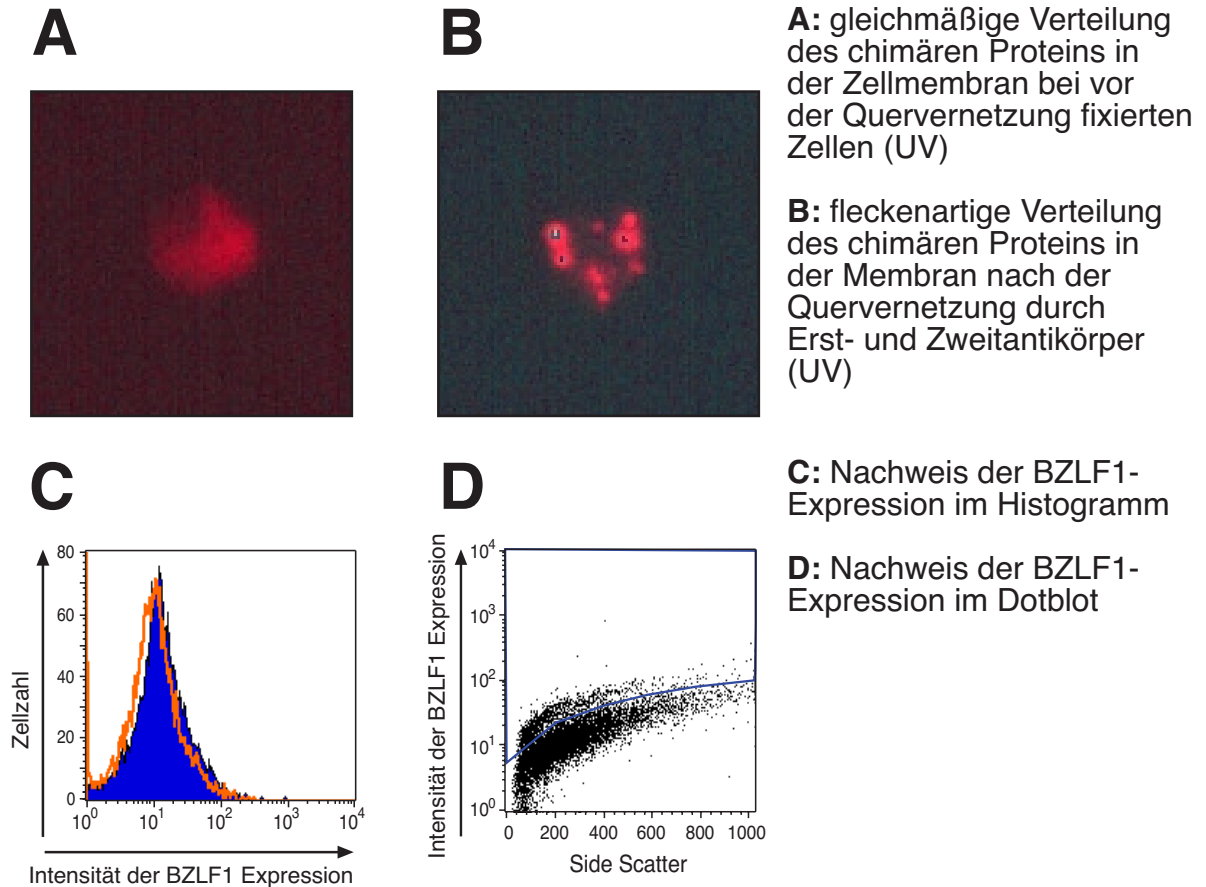


Abb.19: Nachweis der Funktionalität des induzierbaren LMP2A Systems

(A) Fixierte, mit 2792-EBV immortalisierte lymphoblastoide Zellen zeigen nach Inkubation mit anti-His₆-Antikörper und einem geeigneten Zweitantikörper eine gleichmäßige Verteilung des chimären Proteins über die gesamte Oberfläche der Zelle. Durch die Fixierung der Zellen mit 4% Paraformaldehyd vor der Inkubation mit Antikörpern kann es zu keiner Aggregation der Moleküle kommen. (B) Bei unfixierten Zellen ziehen sich die chimären Proteine durch die mit Antikörpern induzierten Quervernetzung zu Aggregaten zusammen. Damit ist der Phänotyp von Wildtyp-LMP2A wieder hergestellt.

Nachdem die Expression von BZLF1 nur bei mit Wildtyp-EBV infizierten primären B-Lymphozyten erfolgt, nicht aber durch LMP2A Deletionsmutanten, kann BZLF1 als Zielgen von LMP2A aufgefasst werden. Die Induktion der BZLF1 Expression kann auch 48h nach der Quervernetzung des induzierbaren LMP2A-Systems mittels FACS Analyse nachgewiesen werden. Im Histogramm (C) ist nur eine sehr geringe Intensitätsveränderung zu sehen, im dot-plot (D) sind die BZLF1-positiven Zellen innerhalb der blauen Umrandung als diskrete, abgegrenzte Population zu erkennen.

5. Diskussion

5.1 Charakterisierung der Δ BALF1- und Δ BHRF1-Maxi-EBV Deletionsmutanten

5.1.1 Funktion von BALF1 und BHRF1 bei der Immortalisierung primärer humaner B-Lymphozyten

Im Genom des Epstein-Barr Virus sind BALF1 und BHRF1 als Homologe des zellulären, anti-apoptotisch wirkenden Proteins BCL-2 beschrieben (Henderson et al., 1993; Marshall et al., 1999). Falls über die Aminosäurehomologie hinausgehend auch eine Homologie zu BCL-2 in der Wirkungsweise der Proteine festgemacht werden kann, könnte die Funktion dieser beiden Proteine darin liegen, eine Immunantwort der Zelle nach erfolgter Infektion zu unterdrücken und eine lebenslange Persistenz zu ermöglichen. Für BHRF1 ist in transienten Systemen eine anti-apoptotische Wirkung, abhängig von Zelltyp und Stimulus, belegt (Fanidi et al., 1998; Foghsgaard and Jaattela, 1997), doch gilt dieses Protein für die B-Zell-Immortalisierung als entbehrlich (Lee and Yates, 1992; Marchini et al., 1991). Kontrovers diskutiert wird, ob BALF1 trotz starker Homologie zu BCL-2 eine anti-apoptotische Funktion besitzt, oder als Antagonist von BHRF1 zu betrachten ist (Bellows et al., 2002; Marshall et al., 1999). Um diese besondere Rolle von BALF1 und BHRF1 im Lebenszyklus von EBV zu untersuchen, habe ich vier Deletionsmutanten auf der Basis des Maxi-EBV Systems etabliert. Mit Hilfe dieses Systems war es möglich, genau quantifizierte Virusstocks mit Konzentrationen von 5×10^3 - 1×10^5 infektiösen Partikeln/ml zu generieren. Der Beitrag verschiedener Gene zur Immortalisierung von B-Zellen kann dadurch quantitativ bestimmt werden. Mit den von mir etablierten Maxi-EBV Deletionsmutanten konnte ich nicht nur die Möglichkeit bestätigen, lymphoblastoide Zelllinien mit einem BHRF1 defizienten Maxi-EBV zu generieren, sondern auch zeigen, dass das Fehlen dieses Gens quantitativ keine messbare Verschlechterung der Immortalisierungseffizienz hervorruft. Die Infektion von primären B-Lymphozyten mit einem BALF1 defizienten Maxi-EBV hatte, wie auch schon die Deletion seines Homologs BHRF1, quantitativ keine Verschlechterung der B-Zell-Immortalisierung zur Folge. Mit Wildtyp Virus

(2089, MOI 0,05) infizierte B-Zellen begannen bereits wenige Tage nach der Infektion, erkennbar zu proliferieren. Es ging nur eine sehr kurze Phase des Absterbens voraus. Dieser Beginn der Proliferation setzte bei den mit den beiden Einzeldelentionsmutanten infizierten B-Lymphozyten deutlich verzögert ein. Über einen längeren Zeitraum hinweg gingen viele mit Δ BALF1-Maxi-EBV oder Δ BHRF1-Maxi-EBV infizierte Zellen in Apoptose. Ein sichtbarer Beginn der Proliferation in mit Δ BALF1-Maxi-EBV infizierten B-Zellen setzte im Vergleich zu Wildtyp EBV erst eine Woche später ein. Diese Verzögerung war bei mit Δ BHRF1-Maxi-EBV infizierten Zellen noch länger, obwohl immer mit einer gleichen Menge an infektiösen Partikeln infiziert wurde (siehe Abb.4.9.B). Überraschenderweise führte die Kombination der beiden für die Immortalisierungseffizienz unauffälligen Deletionen zu einem sehr ausgeprägten Phänotyp. Das zweifach deletierte, Δ BALF1- und Δ BHRF1-Maxi-EBV war bis auf wenige Einzelereignisse nicht mehr in der Lage, infizierte B-Lymphozyten zum Proliferieren anzuregen und lymphoblastoide Zelllinien zu generieren.

Die Fähigkeit des Epstein-Barr Virus in vitro primäre B-Lymphozyten zu immortalisieren wurde vor über 30 Jahren beschrieben (Henle et al., 1979; Pope et al., 1968). Seitdem wurden nur wenige Proteine im Genom von EBV als essentiell für die B-Zell Immortalisierung charakterisiert. Dazu zählen die nukleären Antigene EBNA1 und EBNA2 (Miller et al., 1974), sowie EBNA3A und EBNA3C, die sich trotz großer Homologien nicht gegenseitig ersetzen können (Tomkinson and Kieff, 1992; Tomkinson et al., 1993). Obwohl Daten aus unserem Labor dagegen sprechen (Dirmeier et al., Manuskript eingereicht), gilt auch LMP1 als absolut essentiell für die B-Zell Immortalisierung (Kaye et al., 1993). Nach der Deletion eines einzigen dieser Gene kann EBV keine lymphoblastoiden Zelllinien in vitro generieren. BALF1 und BHRF1 sind für sich alleine gesehen nicht essentiell für die B-Zell-Immortalisierung. Es kommt zu keinem detektierbaren Phänotyp in der Immortalisierungseffizienz, solange mindestens eines der beiden Proteine vorhanden ist. Eine Homologie in der Funktion zweier Proteine von EBV bei der B-Zell-Immortalisierung und der erst durch eine Doppeldelation hervorgerufene, immortalisierungsinkompetente Phänotyp ist bisher in der Literatur noch nicht bekannt.

BALF1 und BHRF1 scheinen trotz ihrer Austauschbarkeit für die Immortalisierung primärer B-Lymphozyten nicht beliebig benützt zu werden. In mit B95.8 Kulturüberstand infizierten B-Zellen konnte ich nur die mRNA von BHRF1 nachweisen (siehe Abb.4.14), obwohl während der lytischen Replikation von EBV beide mRNAs gebildet werden (siehe Abb. 4.13). Die bevorzugte, selektive Verwendung von BHRF1 kann eventuell durch das Fehlen eines zweiten, normalerweise im Genom von EBV vorhandenen lytischen Replikationsursprung erklärt werden. Der Promotor von BHRF1 im Genom des EBV Stammes B95.8 grenzt an den in diesem EBV Stamm einzigen vorhandenen Replikationsursprung für die lytische DNA Synthese, oriLyt (Hammerschmidt and Sugden, 1988). Der genomische Locus von BALF1 liegt sehr nahe an dem in B95.8 nicht mehr vorhandenen, zweiten lytischen Replikationsursprung, der in nahezu allen anderen EBV Stämmen vorhanden ist. Während der lytischen Replikation gehören die Gene um oriLyt zu den am stärksten transkribierten Genen (Laux et al., 1985; Liebermann and Hoffman-Liebermann, 1989). Falls der lytische Replikationsursprung kurz nach Infektion primärer B-Lymphozyten aktiv ist, worauf die Expression zweier für die lytische DNA Replikation wichtiger Gene hinweist (siehe Abb.4.10.B/C), kann es zu dieser nachgewiesenen Bildung sehr großer Mengen an mRNA für BHRF1 kommen. Die Expression von BALF1 ist nach diesem Modell als gering einzustufen, da sich der Genort dieses Proteins im B95.8 Genom nicht mehr in der Nähe eines lytischen Replikationsursprungs befindet. Der selektive Nachweis von nur einer mRNA in frisch infizierten Zellen kann auch durch einen mRNA Transport innerhalb des Viruspartikels selbst hervorgerufen werden, wie er für einige mRNAs mit unbekannter Funktion bei Cytomegalovirus nachgewiesen wurde (Bresnahan and Shenk, 2000). Bei EBV wäre dazu jedoch ein noch nicht entdeckter, spezifischer Transportmechanismus nötig, der eine Unterscheidung zwischen BALF1- und BHRF1-mRNA während der lytischen Replikation und eine selektive Verpackung in das infektiöse Partikel ermöglicht. Der bisherige Wissensstand lässt aber zumindest für das Immortalisierungsprogramm von B95.8 eher auf eine Hierarchie bei der Verwendung der beiden Genprodukte schließen.

5.1.1.1 Komplementation des immortalisierungsdefizienten Δ BALF1/ Δ BHRF1-Maxi-EBV

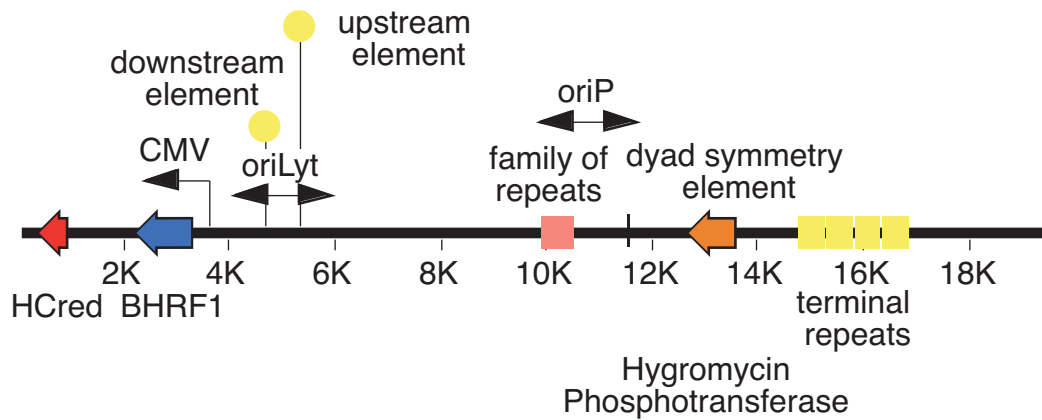
Die Δ BALF1 und Δ BHRF1 Einzeldelentionsmutanten haben keinen Einfluss auf die B-Zell-Immortalisierung. Daher sollte die Komplementation der Doppeldelentionsmutante mit einem der beiden Proteine ausreichend sein. Deletionen im Genom von EBV, die Proteine innerhalb des Virions selbst betreffen, können durch die Expression einer cDNA des deletierten Gens während der lytischen Replikation komplementiert werden. Dies wurde z.B. von Janz et al. für eine Deletionsmutante des viralen Glykoproteins gp350/220 beschrieben (Janz et al., 2000). Eine Lokalisation von BALF1 oder BHRF1 innerhalb des Virions ist nicht bekannt, jedoch werden beide Proteine während der lytischen Replikation transkribiert. Daher habe ich durch die Expression von BALF1 oder BHRF1 während der lytischen Replikation in HEK293 Zellen versucht, den Phänotyp der Δ BALF1/ Δ BHRF1-Doppeldelentionsmutante zu komplementieren. Es war keine Revertierung des immortalisierungsincompetenten Phänotyps der Doppeldelentionsmutante zu beobachten. Eine Funktion von BALF1 oder BHRF1 für die B-Zell Immortalisierung schon während der lytischen Replikation oder ein nötiger Transport von mindestens einem der beiden Proteine innerhalb des infektiösen Partikels kann damit ausgeschlossen werden.

Aufgrund dieses Ergebnisses und dem Nachweis von BHRF1 mRNA in mit Wildtyp EBV infizierten B-Lymphozyten liegt es nahe, die Δ BALF1/ Δ BHRF1-Doppeldelentionsmutante während der Infektion primärer B-Lymphozyten zu komplementieren. Diese Zellen können in vitro mit sehr guter Effizienz viral infiziert, jedoch nicht direkt transfiziert werden. Dies machte die Konstruktion von Plasmiden nötig, die in virale Hüllen verpackbar sind und eine Koinfektion der primären B-Zellen möglich machen. Es stehen zwei verschiedene virale Systeme zur Verfügung. Das auf ein Mini-EBV basierende System ist in Abbildung 5.1.A dargestellt. Es enthält den lytischen Replikationsursprung oriLyt, der zur Induktion des lytischen Zyklus notwendig ist, die „terminal repeats“ innerhalb derer die nach dem Prinzip des „rolling circle“ gebildete DNA geschnitten wird, sowie den latenten Replikationsursprung oriP, der für die Replikation des Plasmids in der infizierten Zelle notwendig ist. Neben diesen Anteilen von EBV ist auf dem Plasmid noch das Resistenzgen Hygromycinphosphotransferase zur Selektion mit Hygromycin in eukaryotischen Zellen und das

fluoreszierende HCred Gen zum Nachweis der Infektion primärer B-Lymphozyten vorhanden. Zwischen den Promotor für HCred und oriLyt kann jeder beliebige offene Leserahmen einkloniert werden und in einer infizierten Zelle zur Expression gelangen. Die Induktion des lytischen Zyklus durch BZLF1 und BALF4 in einer Helferzelllinie (HEK293/TR⁻) und die Kotransfektion des zu verpackenden Mini-EBV Plasmids führt zur Produktion von infektiösen Partikeln, die nur das Mini-EBV beinhalten. Eine Kontamination der verpackten Mini-EBV Plasmide mit infektiösen Helferviren kann mit diesem System ausgeschlossen werden, da die für die Verpackung der viralen DNA nötigen „terminal repeats“ im Genom des Helfervirus deletiert wurden. Innerhalb der „terminal repeats“ wird die während der lytischen Replikation gebildete, multigenomische DNA in singuläre Genome getrennt. Nur dann kann die virale DNA als lineares Fragment in die Virushülle verpackt werden.

Ein zweites, retrovirales System zur Komplementation der Doppeldeletionsmutante beruht auf den von Hildinger et al. publizierten Vektoren (Hildinger et al., 1999) (Abb.5.1.B). Dabei wird der offene Leserahmen eines Proteins ohne Promotor und Poly-A-Sequenz vor eine interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES) mit nachfolgendem eGFP in ein retrovirales Vektorgrundkonstrukt gesetzt. Dieses Konstrukt wird in infizierten Zellen als bicistronische mRNA vom retroviralen Promotor innerhalb der UTRs (untranslated region) transkribiert. Durch diese Anordnung kann davon ausgegangen werden, dass fluoreszierende Zellen auch das gewünschte Protein exprimieren. Die mit einer retrovirale Helferzelllinie verpackten infektiösen Partikel können primäre B-Lymphozyten infizieren, brauchen aber ein Durchlaufen der Mitose in den infizierten Zellen, um nach dem Zusammenbruch der Kernmembran in den Zellkern zu gelangen.

A: Komplementationsvektor auf der Basis von EBV



B: Komplementationsvektor auf retroviraler Basis

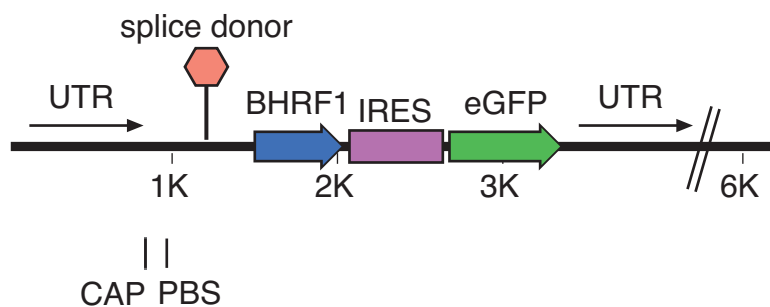


Abb.5.1: Komplementationsvektoren auf der Basis eines Retrovirus und von EBV

Beide Systeme sind exemplarisch anhand der Komplementationsvektoren für BHRF1 dargestellt. Beide Konstrukte können selbst keine infektiösen Viruspartikel bilden, sondern müssen mit einer Helferzelllinie verpackt werden, welche die benötigten Gene für Hüllproteine und ähnliches zur Verfügung stellt, aber selbst keine infektiösen Partikel bildet.

(A): Verpackungsplasmid auf der Basis von EBV: das Plasmid trägt sowohl den Replikationsursprung für die lytische Replikation (oriLyt, „upstream und downstream element“), als auch oriP („family of repeats, dyad symmetry element“), der zur Replikation während des normalen Zellzyklus und für die Aufrechterhaltung des Plasmids in der Zelle benötigt wird. Als weiterer EBV Bestandteil sind die „terminal repeats“ vorhanden, innerhalb derer die lytisch replizierte, virale DNA in lineare Fragmente geschnitten wird, um in die Virushülle verpackt zu werden. Zusätzlich dazu ist das Hygromycin-phosphotransferase Gen zur Selektion in eukaryotischen Zellen und das „HCred“ Fluoreszenzprotein zur Detektion infizierter Zellen in einem invertierten Fluoreszenzmikroskop vorhanden. Zwischen diesem und der Sequenz von oriLyt ist der offene Leserahmen für BHRF1 unter der Kontrolle des CMV Promotors eingefügt. Dieses Plasmid kann mit Hilfe einer Helferzelllinie, die das gesamte EBV Genom ohne die „terminal repeats“ enthält, verpackt werden.

(B): Verpackungsplasmid auf der Basis eines Retrovirus: der Aufbau dieses Verpackungsplasmids und die dazugehörige Helferzelllinie ist von Hildinger et al publiziert (Hildinger et al., 1999). Nach dem Spleißdonor ist der offene Leserahmen für BHRF1 ohne Promotor und Polyadenylierungssignal in eine MCS (multiple cloning site) eingesetzt. Es wird eine bicistronische mRNA transkribiert, die an ihrem 3' Ende nach einer IRES Sequenz (internal ribosomal entry site) für eGFP kodiert. Dadurch können mit rekombinanten Retroviren infizierte Zellen durch die grüne Fluoreszenz sichtbar gemacht werden.

In beide Komplementationssysteme wurden die offenen Leserahmen für die BCL-2 Homologen BALF1 und BHRF1 inkloniert. Nachdem BCL-2 die Funktion von Ced9, dem BCL-2 Homolog in *C.elegans*, zu großen Teilen übernehmen kann, ist es nahe liegend zu klären, ob dies auch für EBV möglich ist. Deswegen habe ich auch Komplementationsvektoren für beide Systeme kloniert, die die Expression von BCL-2 in infizierten B-Lymphozyten ermöglichen. Komplementationsversuche mit dem auf EBV basierendem System habe ich bereits durchgeführt. Dabei wurden primäre B-Lymphozyten sowohl mit dem Δ BALF1/ Δ BHRF1-Maxi-EBV, als auch mit einem Mini-EBV infiziert, das den offenen Leserahmen für BHRF1 unter der Kontrolle des CMV-Promotors trug. Keiner der dabei entstandenen lymphoblastoiden Einzelzellklone konnte für weitergehende Analysen breit genug expandiert werden, ein wirklich immortaler Phänotyp wurde nicht etabliert. Es sind verschiedene Ursachen denkbar, warum es nicht dazu gekommen ist. Es ist nicht klar, ob genügend primäre B-Lymphozyten mit beiden EBV Plasmiden infiziert wurden. Für die Etablierung eines wirklich immortalen Phänotyps sind weitere, nicht näher bekannte, zelluläre Voraussetzungen entscheidend, die aber nur von wenigen Zellen einer B-Zell-Population erfüllt werden (Tahara et al., 1997). Das bedeutet, dass auch bei lymphoblastoiden Zelllinien, die mit Wildtyp-EBV etabliert wurden, durchschnittlich nur jede vierte die kritische Schwelle von 90-150 Zellteilungen übersteht, wobei eine hohe Telomeraseaktivität als wichtiger Faktor angesehen wird (Counter et al., 1994; Tahara et al., 1997). Vor allem aber spiegelt die Expression von BHRF1 unter der Kontrolle des CMV-Promotors nicht das natürliche System wieder. Es ist anzunehmen, dass die exprimierte Gendosis von BHRF1 durch die hohe Aktivität des CMV-Promotors höher ist, als es bei Wildtyp-EBV zu erwarten ist. Auch ein bestimmter Zeitpunkt und die Dauer der Expression ist mit dem Komplementationssystem im Gegensatz zum natürlichen Promotor nicht zu regeln. Falls auch mit dem retroviralen System keine Komplementation des immortalisierungsinkompetenten Phänotyps der Doppeldeletionsmutante erreicht werden kann, ist die Klonierung neuer Komplementationsvektoren mit BALF1 und BHRF1 unter ihren natürlichen Promotoren angedacht. Auch die Konstruktion neuer Maxi-EBVs, die die Gene für BALF1 und BHRF1 unter ihrem natürlichen Promotor, aber an anderer Stelle im Genom von EBV tragen, ist eine mögliche Alternative. Als Position bietet sich der bakterielle Anteil des Maxi-EBV an. Hier ist sichergestellt, mit

keinen anderen, EBV spezifischen Genen oder Strukturen zu interferieren. Gleichzeitig kann mit diesem Versuchsansatz das Problem der Koinfektion mit zwei Viren umgangen werden.

5.1.2 Expression von BZLF1 nach Infektion primärer B-Lymphozyten

Während der lytischen DNA Replikation repliziert EBV mit einem viral kodierten Polymerasekomplex und benützt dafür einen eigenen Replikationsursprung, oriLyt (Gruffat et al., 1995; Hammerschmidt et al., 1988; Schepers et al., 1993a; Schepers et al., 1993b). Der lytische Zyklus wird dabei durch die Expression von BZLF1 induziert (Chevallier-Greco et al., 1986; Countryman and Miller, 1985; Kenney et al., 1989; Zalani et al., 1996). Durch die Expression von BZLF1 kommt es in mit EBV infizierten Zellen zu einem Umschalten aus dem latenten Status in die lytische Replikation, zur Expression lytischer Gene und zur Bildung neuer infektiöser Partikel. Dies führt letztendlich zum Tod der infizierten Zelle. Von Inman et al. wurde kürzlich eine weitere Funktion lytischer Genexpression vorgeschlagen (Inman et al., 2001). Die Gruppe zeigte eine Resistenz gegen unterschiedliche, die Apoptose auslösende Reagenzien, so in einer stabil mit EBV infizierten Zelle gleichzeitig lytische Gene exprimiert werden. Dieser anti-apoptotische Effekt war durch die Gabe von viralen Inhibitoren wie Phosphonoessigsäure oder Acyclovir vor dem die Apoptose induzierenden Stimulus revertierbar. Dies bekräftigt die These einer viralen Beteiligung.

Die von mir gezeigte Expression von BZLF1 kurz nach der Infektion primärer B-Lymphozyten (siehe Abb.4.10.B) ist in der Literatur bisher nicht beschrieben. Sie war bereits wenige Tage nach der Infektion mit Wildtyp EBV nachweisbar und verstärkte sich mit zunehmender Proliferation der infizierten Zellen. Die Expression von BZLF1 verläuft im Verhältnis zur Expression von EBNA2 schwächer aber mit fortdauernder Zeit nach der Infektion parallel ansteigend. Die Expression von BZLF1 wurde zeitgleich mit der Expression von EBNA2 verfolgt, da dieses Protein nach bisherigem Wissensstand das erste, in einer EBV infizierten Zelle nachweisbare virale Protein ist (Alfieri et al., 1991; Allday et al., 1989) (siehe Abb.4.10.A/B). Bei der Infektion von primären B-Lymphozyten mit Δ BALF1-Maxi-EBV war die Expression von BZLF1, wie

auch schon die beginnende Proliferation der B-Lymphozyten, zeitlich verzögert. Sie war zum Ende des Versuchszeitraumes (18 Tage nach Infektion der Zellen) mittels Immunfluoreszenzanalysen, aber noch nicht signifikant in der FACS-Analyse nachweisbar. Mit Δ BHRF1-Maxi-EBV infizierte Zellen zeigten eine noch schwächere, wahrscheinlich mit der noch größeren zeitlichen Verzögerung bis zum Beginn der Proliferation einhergehende BZLF1 Expression. Ob in den mit den Deletionsmutanten infizierten Zellen die Expressionshöhe von BZLF1 nach Infektion mit Wildtyp EBV erreicht wird, kann durch einen längeren Versuchszeitraum geklärt werden. Die Expression von BZLF1 in frisch infizierten B-Lymphozyten führt aber entgegen bisheriger Erkenntnisse (Liao et al., 2001) bei keinem der getesteten Maxi-EBVs zu einer vollständigen Induktion des lytischen Zyklus und der Bildung neuer infektiöser Partikel (siehe 4.2.4). BZLF1 ist nach Infektion mit Wildtyp EBV nur für kurze Zeit nach der Infektion nachzuweisen und wird in etablierten lymphoblastoiden Zelllinien nicht mehr exprimiert. In mit Δ BALF1/ Δ BHRF1-Maxi-EBV infizierten B-Lymphozyten war bis zum Absterben der in den Versuch eingesetzten Zellen keine BZLF1 Expression nachweisbar.

Eine Expression von BZLF1 ist aber nicht zwingend für die Etablierung eines immortalen Phänotyps transformierter B-Lymphozyten erforderlich. Auch mit einem Δ BZLF1-Maxi-EBV konnten lymphoblastoide Zelllinien generiert werden. Allerdings wurden für einen lymphoblastoiden Einzelzellklon fünf mal mehr infektiöse Partikel benötigt, als dies für Wildtyp-EBV der Fall war. Bei der Infektion von primären B-Lymphozyten mit einem dreifach deletierten Δ BZLF1/ Δ BALF1/ Δ BHRF1-Maxi-EBV konnte kein einziger lymphoblastoider Einzelzellklon mehr generiert werden, wohingegen dies mit der Doppeldeletionsmutante in wenigen Fällen noch möglich war. Die Verschlechterung der Immortalisierungseffizienz durch die Deletion von BZLF1 scheint additiv zu wirken. Der Expression von BZLF1 kurz nach der Infektion primärer B-Lymphozyten kann damit eindeutig eine die Immortalisierungseffizienz verbessernde Funktion zugeschrieben werden. Eine mögliche Erklärung, warum die BZLF1 Expression die Immortalisierungseffizienz verbessert, kann durch die Ergebnisse von Zhang et al. gegeben werden. Diese haben in transienten Expressionsversuchen eine physikalische und funktionale Interaktion von BZLF1 mit dem zellulären Protein p53 nachgewiesen (Zhang et al., 1994). Eine Überexpression

von BZLF1 konnte p53 induzierte Apoptose unterdrücken. Zusammen mit den Ergebnissen von Inman et al. (Inman et al., 2001) und den hier beschriebenen Daten, ist BZLF1 eine neue Funktion, unabhängig von der Induktion des lytischen Zyklus zur Virusreplikation, zuzuschreiben.

5.1.3 Expression von EA-D nach Infektion primärer B-Lymphozyten

Neben BZLF1 wird bisher auch EA-D (early antigene-diffuse) eine exklusive Funktion während der lytischen Replikation nachgesagt. EA-D wurde 1993 von Freemer et al. zum ersten Mal beschrieben (Freemer et al., 1993). Bereits damals wurde eine Funktion bei der viralen DNA Replikation vermutet. Heute ist EA-D, das nun nach seiner Position im Genom von B95.8 auch BMRF1 genannt wird, als Teil des viralen DNA-Polymerase-Komplexes zur lytischen Replikation bekannt (Chen et al., 1995). Zu diesem Komplex gehören neben EA-D (DNA bindendes Protein), BALF5 (die katalytische Komponente der viralen DNA Polymerase), BALF2 (DNA-Einzelstrang bindendes Protein), BSLF1 (Primase), BBLF4 (Helicase) und BBLF2/3 (Helicase/Primase assoziiertes Protein) (Fixman et al., 1992; Fixman et al., 1995). Zusammen mit BZLF1 sind diese sechs Proteine während der von oriLyt ausgehenden lytischen DNA Replikation von EBV absolut essentiell (Baer et al., 1984; Hammerschmidt and Sugden, 1988). Von Zhang et al. wurde eine direkte Bindung von EA-D an den „downstream“ Bereich von oriLyt gezeigt (Zhang et al., 1997). Dieser Bereich wurde zusammen mit dem „upstream“ Bereich von oriLyt, an den BZLF1 bindet, als wesentlich für die lytische DNA Replikation kartiert (Gruffat et al., 1995; Schepers et al., 1993b). EA-D bindet aber auch an für die lytische DNA Replikation nichtessentielle Proteine (Fixman et al., 1992). So formiert EA-D einen Komplex mit DNase, einem weiteren DNA bindenden Protein von EBV (Zeng et al., 1997; Zhang et al., 1987). Dieser Komplex ist im EBV Stamm P3HR-1 bereits vor dem Einsetzen der lytischen DNA Replikation im Zytoplasma formiert und wird nicht durch Bindung eines Proteins an den Replikationsursprung und anschließende Rekrutierung weiterer Proteine aufgebaut. In lymphoiden Zellen soll die Expression von EA-D durch ein Zusammenwirken von BZLF1 und BRLF1, den beiden Aktivatoren des lytischen Zyklus von EBV, reguliert werden (Holley-Guthrie et al., 1990). Die Expression von EA-D, wie auch die Expression von BZLF1 und BRLF1, wird während der latenten Phase von EBV unterdrückt (Holley-Guthrie et al., 1990).

Wie schon für BZLF1 konnte ich auch für EA-D eine Expression zeigen, die nicht mit dem lytischen Zyklus von EBV in Verbindung steht (siehe Abb.4.10.C). Entgegen den Annahmen der Literatur scheint die Expression von EA-D kurz nach der Infektion primärer B-Lymphozyten nicht von BZLF1 reguliert zu werden, da EA-D bereits vor BZLF1 nachweisbar ist. Nach Infektion primärer B-Lymphozyten mit Wildtyp EBV (B95.8 Kulturüberstand, 2089) war im Abstand zum ersten Messwert, 24 Stunden nach Infektion, keine signifikante Expression von EA-D zu bestimmen. Dies änderte sich bis zum Ende des Versuchszeitraumes nicht mehr. In den mit den Einzeldelentionsmutanten infizierten Zellen war 24 Stunden nach Infektion eine sehr starke Expression von EA-D nachzuweisen. Diese ging mit fortlaufendem Versuchsverlauf innerhalb weniger Tage auf ein nicht mehr detektierbares Niveau wie bei mit Wildtyp EBV infizierten Zellen zurück (siehe Abb.4.10.C). Auch bei primären B-Zellen, die mit der Δ BALF1/ Δ BHRF1 Doppeldeletionsmutante infiziert wurden, war am ersten Messwert eine sehr starke EA-D Expression nachzuweisen. Diese reduzierte sich aber ebenso während des Versuchsverlaufes und war mit dem Zugrundegehen der Zellen nicht mehr nachzuweisen. Bei allen Infektionsversuchen geht ein Verschwinden der EA-D Expression dem Einsetzen der Proliferation lymphoblastoider Zellen voraus. Mit Wildtyp-EBV infizierte Zellen beginnen sehr schnell mit der Proliferation. Deswegen kann ein Zeitraum von 24 Stunden nach Infektion bereits zu groß sein, um eine EA-D Expression nachzuweisen. Durch die zeitliche Verzögerung bis zum Einsetzen der Proliferation der mit den Einzeldelentionsmutanten infizierten Zellen mag die EA-D Expression länger angehalten haben und messbar gewesen sein.

Bisher wurde die Expression von EA-D immer als durch BZLF1 reguliert und im Zusammenhang mit der lytischen DNA-Replikation gesehen. Ich konnte jedoch zeigen, dass EA-D Expression nach der Infektion primärer B-Lymphozyten der BZLF1 Expression vorausgeht. EA-D kann also in diesem Fall nicht durch BZLF1 reguliert werden. Auch werden entgegen den Annahmen der Literatur beide Proteine exprimiert, ohne dass der lytische Zyklus komplett durchlaufen wird. Es kommt weder zur Expression später Proteine des lytischen Zyklus wie VCA oder gp350/220, noch zur Bildung neuer infektiöser Partikel. Dies alles weist darauf hin, dass EA-D, wie

auch schon zuvor für BZLF1 vermutet, noch eine weitere Funktion neben der lytischen DNA Replikation im Lebenszyklus von EBV hat.

5.2 Initiation der Latenz als dritter Abschnitt im Lebenszyklus von EBV

Das Genom von EBV enthält 85 bisher bekannte Gene, die den Großteil der viralen DNA überspannen. Nahezu alle dieser Gene werden während der lytischen Replikation in einer geordneten Kaskade exprimiert (Wensing and Farrell, 2000). Dabei kommt es zur Bildung neuer infektiöser Partikel. Die Replikation des Genoms beginnt am lytischen Replikationsursprung oriLyt und erfolgt nach dem Mechanismus des „rolling circle“. Das Genom wird dabei als lineares „multi copy“ Plasmid repliziert und anschließend innerhalb der „terminal repeats“ in einzelne Genome getrennt. Nur lineare Fragmente, die der durchschnittlichen Genomlänge von ca. 170kb entsprechen, werden in virale Hüllen verpackt. Während der latenten Phase sind drei Expressionsmuster viraler Gene beschrieben. Diese werden als Latenz I, II und III bezeichnet (Kerr et al., 1992). Etablierte lymphoblastoide Zelllinien exprimieren virale Gene nach dem Muster der Latenz III. Dabei sind sechs nukleäre Antigene (EBNA 1, 2, 3A, 3B, 3C, LP), drei Plasmamembranproteine (LMP1, 2A und 2B), sowie zwei EBV kodierte, kleine RNAs (EBERs) nachweisbar. Im Stadium der Latenz III wird das Genom über den latenten Replikationsursprung oriP repliziert. Es kommt zu keiner lytischen Replikation und nicht zur Bildung neuer infektiöser Partikel. Alle Zellen einer mit EBV infizierten lymphoblastoiden Zelllinie enthalten und replizieren zwischen zehn und mehreren hundert Kopien des 170kb großen EBV Genoms als extrachromosomale Episome (Sugden and Mark, 1977; Sugden et al., 1979). Die Replikation der Episome findet während der S-Phase im Zellzyklus der Wirtszelle statt. Sie beginnt am latenten Replikationsursprung oriP und wird in jedem Zellzyklus genau einmal durchgeführt (Yates and Guan, 1991). Lymphoblastoide Einzelzellklone, die bei einem Immortalisierungsexperiment aus dem Bereich der „one hit“ Kinetik stammen, also rechnerisch mit höchstens einem infektiösen Partikel pro primäre B-Zelle infiziert wurden, haben die hohe Kopienzahl der Episome bereits wenige Tage nach der Infektion erreicht (Hurley and Thorley-Lawson, 1988). Wie diese schnelle Expansion des Genoms kurz nach der Infektion primärer B-

Lymphozyten bewerkstelligt wird, ist nicht bekannt. Ebenso wenig kennt man die Regulationsmechanismen, die nach der Vervielfältigung des Episoms diesen Mechanismus stoppen und auf genau eine Replikation jedes Episoms pro Zellzyklus der Wirtszelle reduzieren (Yates and Guan, 1991).

Während der Latenz kommt es zu genau einer Verdopplung jedes Episoms pro Zellzyklus der Wirtszelle, beginnend an oriP. Die Replikation wird dabei von Proteinen der Wirtszelle und damit streng synchron mit dem zellulären Genom durchgeführt. Die Steigerung der Kopienzahl des EBV Genoms binnen weniger Tage nach Infektion einer Zelle ist deswegen nicht durch die Replikation über oriP erklärbar.

Während der lytischen Replikation kommt es zu einer schnellen Vervielfältigung des viralen Genoms. Nach bisherigem Stand der Forschung ist eine Aktivierung des lytischen Replikationsursprungs durch BZLF1 immer mit dem vollständigen Durchlaufen des lytischen Zyklus und der Bildung neuer infektiöser Partikel verbunden. Durch meine Versuche konnte ich jedoch die Bildung neuer infektiöser Partikel nach der Infektion primärer B-Lymphozyten ausschließen. Trotzdem werden für die lytische Replikation wichtige Proteine kurz nach der Infektion primärer B-Lymphozyten exprimiert, die für eine Initiation der lytischen Replikation nach der Infektion primärer B-Lymphozyten sprechen. Ich konnte die Expression von BZLF1 (Abb.4.10.B) und auch BRLF1 (Daten nicht gezeigt) kurz nach der Infektion primärer B-Lymphozyten mit Wildtyp EBV nachweisen. Eine Expression von EA-D ist bei mit Δ BALF1- und Δ BHRF1-Maxi-EBVs infizierten B-Lymphozyten detektierbar. Es ist anzunehmen, dass diese bei einer Wildtyp EBV Infektion aufgrund eines zu langen Zeitraums bis zum ersten Messwert schon wieder verschwunden, zu einem früheren Zeitpunkt jedoch vorhanden war. In keinem der Infektionsexperimente war jedoch eine gleichzeitige Expression von BZLF1 und EA-D nachzuweisen. Wie von Zhang et al. in D98/HE-R-1 Zellen gezeigt (Zhang et al., 1997), ist aber die direkte Interaktion von BZLF1 und EA-D notwendig, damit der lytische Zyklus komplett durchlaufen werden kann. Die Expression von BZLF1, BRLF1 und wahrscheinlich auch EA-D in mit Wildtyp EBV infizierten Zellen ohne die Expression später lytischer Gene wie VCA (virus capsid antigene) oder gp350/220, weisen deutlich auf einen neuen, bisher nicht definierten Abschnitt im Lebenszyklus von EBV hin. Dieser liegt

zwischen der Infektion der Zelle und der etablierten Latenz. Während dieser Zeit müssen die Abwehrmechanismen der Zelle gegen eine virale Infektion überwunden werden, das einzelne Episom vielfach repliziert und die Wirtszelle zum Eintritt in den Zellzyklus umprogrammiert werden, um das Auswachsen lymphoblastoider Zelllinien zu ermöglichen. Die Expression von BHRF1 kurz nach Infektion der Zelle und das Verschwinden der Expression in etablierten Zelllinien bietet einen anti-apoptischen Schutz in der infizierten Zelle, der nur so lange nötig ist, bis der latente Status etabliert ist. Danach können anti-apoptische Funktionen durch andere Proteine von EBV, wie z.B. LMP1, das die Expression der zellulären anti-apoptischen Proteine BCL-2 und A20 (Henderson et al., 1993; Laherty et al., 1992) steigert, übernommen werden. Als weiterer möglicher Mechanismus zur Verhinderung der Apoptose in infizierten Zellen sollte eine mögliche Interaktion von BZLF1 oder BRLF1 mit den zellulären Proteinen p53 oder Rb untersucht werden. In etablierten lymphoblastoiden Zelllinien scheint die Funktionen dieser den Zellzyklus regulierenden, pro-apoptischen Proteine nicht beeinträchtigt zu sein. Kurz nach Infektion einer Zelle kann eine Inaktivierung dieser Proteine aber nötig sein, um den latenten Status etablieren zu können, ohne dass die Zelle im Zellzyklus blockiert wird oder in die Apoptose geht. Bei anderen Viren wie Adenovirus und Papillomavirus sind Mechanismen zur Inaktivierung von p53 und Rb beschrieben (Wensing and Farrell, 2000), die auch für EBV untersucht werden sollten. Mit einer der lytischen Replikation ähnlichen Vervielfältigung des viralen Genoms ohne die Expression später lytischer Proteine lässt sich der sprunghafte Anstieg der Kopienzahl des viralen Genoms erklären. Dies kann von BZLF1 und EA-D, die bisher nur eine klar definierte Funktion während der lytischen Replikation innehatten, durch die Übernahme einer neuen, bisher unbekanntes Funktion während der Initiation der Latenz erreicht werden. Um diese These zu belegen ist es notwendig, die Expression weiterer Proteine des viralen Polymerasekomplexes und eine Aktivierung des lytischen Replikationskomplexes kurz nach Infektion primärer B-Zellen zu untersuchen.

5.3 LMP2A

Wie in Abbildung 4.6.A dargestellt, besteht der Genlokus von LMP2A aus neun Exons. Dabei kodiert das erste Exon für die 119 Aminosäuren lange cytoplasmatische Domäne, der aufgrund gemeinsamer Aminosäuremotive eine Homologie zum B-Zell-Rezeptor zugeschrieben wird (Portis et al., 2002). Exon zwei bis acht kodieren für 12 Transmembrandurchgänge, Exon neun ist nicht kodierend. Diese letzten acht Exons werden ebenso zur Transkription von LMP2B benützt, das dominant negativ zu LMP2A wirken soll (Portis et al., 2002). Die Transkription einer mRNA für LMP2A erfolgt über die „terminal repeats“ hinweg und ist nur in der episomal geschlossenen Form des EBV Genoms möglich (Laux et al., 1988). LMP2A wird als einziges Protein des Genoms in allen EBV positiven Zellen exprimiert. Es liegt in der Plasmamembran in sogenannten „lipid rafts“ akkumuliert vor, und stellt wahrscheinlich einen konstitutiv aktiven Pseudorezeptor dar (Dykstra et al., 2001).

5.3.1 Funktionen bei der Aufrechterhaltung der Latenz

Die Hauptaufgabe von LMP2A wird in der Literatur in der Unterdrückung des lytischen Zyklus und der Aufrechterhaltung der Latenz in EBV infizierten Zellen gesehen. Durch die von LMP2A induzierte Blockade der Signaltransduktion des B-Zell-Rezeptors nach Aktivierung durch sein Antigen soll der postulierte Eintritt in die lytische Replikationsphase von EBV verhindert werden (Longnecker, 2000). Dazu kann LMP2A einen aktivierten B-Zell-Rezeptor oder ein B-Zell-Rezeptor-Signalsom nachahmen, die für die Signaltransduktion des B-Zell-Rezeptors wichtigen Proteine rekrutieren und diese gemeinsam mit sich selbst zur Degradierung kennzeichnen (Fruehling and Longnecker, 1997; Fruehling et al., 1998; Ikeda et al., 2000b; Ikeda et al., 2001a). Durch diese Aufrechterhaltung der Latenz und der Expression nur weniger viraler Proteine entgehen infizierte Zellen der Immunüberwachung durch zytotoxische T-Zellen (Portis et al., 2002). In unreifen B-Lymphozyten, denen ein ausdifferenzierter B-Zell-Rezeptor fehlt, können gleichwertige Signale zur Differenzierung der Zelle von LMP2A induziert werden. Die Gruppe um R. Longnecker etablierte in transgenen Mäusen ein konstitutiv exprimiertes LMP2A Gen. In diesen Mäusen konnten sie LMP2A positive B-Lymphozyten nachweisen, die ohne funktionalen B-Zell-Rezeptor das Knochenmark verlassen hatten und im Blut

zirkulierten (Caldwell et al., 2000; Caldwell et al., 1998). Normalerweise werden B-Lymphozyten ohne korrekt arrangierten B-Zell-Rezeptor noch im Knochenmark eliminiert. Darüber hinaus soll LMP2A in einer infizierten Zelle für die Etablierung der Latenz benötigt werden (Portis et al., 2002). Von der selben Gruppe, die eine Funktion von LMP2A bei der Etablierung der Latenz postuliert, wurde aber ebenso veröffentlicht, dass LMP2A keinen Einfluss auf die B-Zell-Immortalisierung besitzt (Speck et al., 1999). Dies wird durch Brielmeier et al. kontrovers diskutiert (Brielmeier et al., 1996).

Um eine Funktion von LMP2A bei der Aufrechterhaltung der Latenz zu untersuchen, wurden zwei Maxi-EBV Mutanten etabliert. Als Vorkonstrukt zur Herstellung eines Δ LMP2A Maxi-EBVs wurde der Promotor und das erste Exon von LMP2A mit loxP Sequenzen flankiert. Das dabei entstandene Maxi-EBV verhält sich wie Wildtyp EBV (siehe Tabelle 4.4). Nach transienter Cre Expression entstand durch entsprechende Rekombination ein LMP2A defizientes Maxi-EBV. Die Immortalisierungseffizienz dieser Deletionsmutante war gegenüber Wildtyp EBV auf ein Zehntel reduziert. Um diese Reduktion in der Immortalisierungseffizienz nachweisen zu können, war die genaue Quantifizierung der zur Immortalisierung primärer B-Lymphozyten eingesetzten infektiösen Partikel nötig. Eine Quantifizierung der infektiösen Partikel, z.B. durch die eGFP Expression des Maxi-EBV Systems, ist mit dem von Speck et al. verwendeten System nicht möglich. Deswegen konnten sie eine Reduktion der Immortalisierungseffizienz in dieser Größenordnung auch nicht bestimmen. LMP2A kann eindeutig eine Funktion bei der B-Zell Immortalisierung zugeschrieben werden. Die Expression dieses Proteins ist jedoch nicht zwingend erforderlich, um lymphoblastoide Zelllinien zu generieren (siehe Tabelle 4.4). Eine spontane Induktion des lytischen Zyklus in infizierten Zellen, wie sie für ein LMP2A defizientes EBV postuliert wurde, konnte über den gesamten Versuchszeitraum der Immortalisierung nicht beobachtet werden. Um eine Induktion des lytischen Zyklus nach Aktivierung des B-Zell-Rezeptors zu untersuchen, wurden EBV negative Akata27 Zellen mit den beiden oben beschriebenen Maxi-EBVs infiziert und stabile Zelllinien in der Anwesenheit von Hygromycin etabliert. Nach Aktivierung des B-Zell-Rezeptors durch die Quervernetzung von IgG auf der Oberfläche der Zelle kann in der EBV positiven Ausgangszelllinie Akata (Daibata et al., 1990), sowie in mit Δ BALF1/ Δ BHRF1 Maxi-

EBV infizierten Akata27 der lytische Zyklus induziert werden. Weder in der mit Wildtyp-EBV, noch in der mit Δ LMP2A Maxi-EBV infizierten Zelllinie konnte eine Induktion des lytischen Zyklus nach Aktivierung des B-Zell-Rezeptors beobachtet werden. Es ist davon auszugehen, dass LMP2A zumindest nicht alleine für die Aufrechterhaltung der Latenz und die Unterdrückung des lytischen Zyklus verantwortlich ist.

5.3.2 Funktionen bei der Etablierung der Latenz

Eine weitere Funktion, wenn auch nicht klar formuliert, wird LMP2A bei der Etablierung der Latenz in frisch infizierten B-Lymphozyten zugeschrieben (Longnecker, 2000). Deswegen habe ich, wie schon früher bei anderen Maxi-EBV Mutanten geschildert, die Expression von BZLF1 in mit Wildtyp EBV und Δ LMP2A Maxi-EBV infizierten primären B-Zellen untersucht. Wie in Abbildung 4.16 zu sehen ist, kann eine Expression von BZLF1 nur in B-Lymphozyten nachgewiesen werden, die mit Wildtyp EBV infiziert wurden. Die Expression von BZLF1 scheint von der Expression von LMP2A abhängig zu sein. Auch eine Expression von BRLF1, dem zweiten Aktivator des lytischen Zyklus, konnte ich in mit Wildtyp-EBV infizierten Zellen nachweisen (Daten nicht gezeigt). Da sich BZLF1 und BRLF1 gegenseitig aktivieren können (Feederle et al., 2000), kann von einer unabhängigen Induktion beider Proteine durch LMP2A ohne weitere Versuche nicht ausgegangen werden. Dies ist jedoch leicht durch Infektionsversuche mit der in Tabelle 4.1 beschriebenen Δ BZLF1 Deletionsmutante 2809 und einer von R. Feederle etablierten Δ BRLF1 Deletionsmutante zu überprüfen. Von Feederle et al. wurde mittels Deletionsmutanten gezeigt, dass sowohl BZLF1, als auch BRLF1 absolut essentiell für die lytische DNA Replikation von EBV sind (Feederle et al., 2000). Im Gegensatz zu der Expression von BZLF1 reicht die Expression von BRLF1 alleine nicht aus, um den lytischen Zyklus in EBV zu induzieren. Von Darr et al. wurde jedoch vor kurzem eine Induktion der lytischen Form der viralen Replikation durch BRLF1 über den Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Signaltransduktionsweg gezeigt (Darr et al., 2001). Die Aktivierung dieses Signaltransduktionsweges ist auch direkt durch LMP2A gezeigt worden (Scholle et al., 2000). Diese Versuche wurde jedoch in EBV negativen Zelllinien, die transient mit LMP2A transfiziert wurden, durchgeführt. Die

Aktivierung des Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Signaltransduktionsweges durch LMP2A führte dabei zu einem Schutz vor Apoptose in der transfizierten Zelle. Zusammengefasst scheint LMP2A mehrere Funktionen in einer mit EBV infizierten Zelle auszuüben. Nach Infektion induziert es die Expression von BZLF1 und eventuell auch BRLF1 und ist somit nach der unter 5.2 aufgestellten These an der Vervielfältigung des viralen Genoms in der infizierten Zelle beteiligt. Ebenso kann es einen Signaltransduktionsweg induzieren, der die Zelle vor Apoptose schützt. Eine Funktion zur Unterdrückung des lytischen Zyklus konnte allerdings nicht nachgewiesen werden.

5.3.3 Das konditionale LMP2A Zellsystem

Die Funktion von LMP2A in einer mit EBV infizierten Zelle ist noch nicht vollständig verstanden und wird oft kontrovers diskutiert. Um die Zielgene von LMP2A in der Zelle umfassend katalogisieren zu können und dadurch einen besseren Einblick in die Funktion dieses Proteins zu erhalten, habe ich ein konditionales System zur Expression von LMP2A entwickelt. Da humane B-Zellen die wichtigsten Zielzellen von EBV sind, war es für die Relevanz späterer Versuche wichtig, das konditionale LMP2A System in primären B-Zellen zu etablieren. Basierend auf dem Maxi-EBV System, das den Kontext des gesamten EBV-Genoms in die Untersuchungen einbringt, konnte ich eine lymphoblastoide Zelllinie (B2792.G) generieren, die anstelle von Wildtyp-LMP2A/B ein konditionales LMP2A Gen exprimiert. Das dabei gebildete Protein besteht aus der intrazellulären, N-terminalen Signaltransduktionsdomäne von LMP2A, dem Transmembrandurchgang des humanen Vorläuferproteins $\text{proTNF}\alpha$, das wie LMP2A ein Typ II Transmembranprotein ist, und einem extrazellulären His_6 -tag (Abb.4.17). Die Transmembrandomäne aus dem $\text{proTNF}\alpha$ Anteil ersetzt die zwölf Transmembrandomänen von LMP2A/B. Ziel dieses Vorgehens war es, die LMP2A/B typische Aggregation und damit die konstitutive Aktivität von LMP2A aufzuheben. Erst eine artifizielle Aggregation mit Hilfe von Antikörpern, die gegen den extrazellulären His_6 -tag des chimären Proteins gerichtet sind, sollte LMP2A-spezifische Signale in der Zelle aktivieren (Abb.4.17).

Im nicht induzierten Zustand liegt das chimäre Protein gleichmäßig in der Zellmembran verteilt vor. Durch Quervernetzung über den His₆-tag konnte die Wildtyp LMP2A typische Verteilung auf wenige Stellen in der Membran wiederhergestellt werden (siehe Abb.4.19.A/B). Die BZLF1 Expression nach der Quervernetzung des chimären Proteins zeigte die Funktionalität des Chimärs (siehe Abb.4.19.C/D). Das System soll nun in naher Zukunft eingesetzt werden, um mittels „run on“- oder DNA-Chip-Technologie die Zielgene von LMP2A in der Zelle identifizieren zu können.

6. Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, mit Hilfe von Mutanten den Einfluss der Proteine BALF1, BHRF1 und LMP2A von Epstein-Barr Virus (EBV) auf die B-Zell-Immortalisierung zu bestimmen. Diese EBV Mutanten bilden die Grundlage zur Funktionsanalyse der Genprodukte in infizierten humanen B-Zellen, die durch die Infektion mit EBV als stabile B-Zelllinien in vitro proliferieren und latent, d.h. ohne Virus zu produzieren, mit EBV infiziert sind.

Die Einzeldelationen von BALF1 oder BHRF1 im Genom von EBV zeigen keinen Einfluss auf die Effizienz, mit der solche B-Zelllinien entstehen. Die in beiden Genen deletierte Mutante ist dagegen nicht mehr in der Lage, die Proliferation von B-Lymphozyten zu induzieren. Eine LMP2A Deletionsmutante ist gegenüber Wildtyp EBV in dieser Eigenschaft deutlich beeinträchtigt.

LMP2A induziert in frisch infizierten B-Lymphozyten die Expression von EBV Genen, die nicht zur Gruppe der latenten Genprodukte gehören, sondern nur während der Virusproduktion transkribiert werden. Allerdings werden keine Viren gebildet, da der lytische Zyklus nicht vollständig durchlaufen wird. Ebenso unerwartet ist die Expression des anti-apoptotischen Proteins BHRF1, das auch zu den lytischen Genen gehört und dessen Expression kurz nach der Infektion primärer B-Zellen nachzuweisen war. Diese Ergebnisse führten im Rahmen dieser Arbeit zu der Hypothese eines dritten Infektionsmodus von EBV: die Initiation der Latenz. Dabei wird die Apoptose in der infizierten Zelle durch BHRF1 verhindert, bis die Latenz etabliert ist. Später können anderen Proteinen von EBV wie z.B. LMP1, dessen anti-apoptotische Eigenschaften bereits beschrieben ist, diese Aufgaben übernehmen. Der bisher ungeklärte Mechanismus der Replikation des viralen Genoms von einem auf bis zu mehreren Hundert Kopien ist während der Initiation der Latenz durch einen der lytischen Replikation ähnlichen Vorgang zu erklären.

LMP2A wurde bisher immer mit der Unterdrückung des lytischen Zyklus und der Aufrechterhaltung der Latenz in der infizierten Zelle in Verbindung gebracht. Um die Funktion dieses Proteins besser untersuchen zu können, wurde ein konditionales LMP2A Zellsystem entwickelt. Dieses Systems ermöglicht eine kontrollierte LMP2A

Aktivierung, um die induzierten Signalwege und Zielgene von LMP2A in der Zelle zu identifizieren.

7. Abkürzungen

Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin („ <u>b</u> ovine <u>s</u> erum <u>a</u> lbumin“)
ca.	zirka
Ci	Curie
CMV	Cytomegalovirus
d	Tag
DD	<u>d</u> eath <u>d</u> omain
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dpm	radioaktive Zerfälle (disintegrations) pro Minute
DTT	Dithiothreitol
EA-D	early antigen D
EBNA	Epstein-Barr Virus nukleäres Antigen
EBV	Epstein-Barr Virus
bzw.	beziehungsweise
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FADD	<u>F</u> AS <u>a</u> ssociated <u>d</u> eath <u>d</u> omain
FKS	Fötales Kälberserum
GRE	grüne <u>R</u> aji <u>E</u> inheiten
h	Stunde
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethan-sulfonsäure
HRP	gekoppelte Merrettich-Peroxidase
kb	Kilobasenpaar(e)
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	Luria-Bertani

LCL	lymphoblastoide Zelllinie („lymphoblastoid cell line“)
LMP2	Latentes Membranprotein 2
mA	Milliampere
min.	Minute
mRNA	Boten-RNA („messenger RNA“)
pBLs	primäre B-Lymphozyten
PBS	primer binding site
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion („polymerase chain reaction“)
PI	Propidium Iodid
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
SDS	Natriumdodecylsulfat
SV40	Simian Virus 40
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan
rpm	Umdrehungen (rounds) pro Minute
UV	Ultraviolett
UZ	Ultrazentrifuge
V	Volt
Vol.	Volumen
z.B.	zum Beispiel

8. Literatur

Adams, J.M. and Cory, S. (1998) The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science*, 281, 1322-1326.

Ahmad, M., Srinivasula, S.M., Wang, L., Talanian, R.V., Litwack, G., Fernandes-Alnemri, T. and Alnemri, E.S. (1997) CRADD, a novel human apoptotic adaptor molecule for caspase-2, and FasL/tumor necrosis factor receptor-interacting protein RIP. *Cancer Res*, 57, 615-619.

Albert, H., Dale, E.C., Lee, E. and Ow, D.W. (1995) Site-specific integration of DNA into wild-type and mutant lox sites placed in the plant genome. *Plant J*, 7, 649-659.

Alfieri, C., Birkenbach, M. and Kieff, E. (1991) Early events in Epstein-Barr virus infection of human B lymphocytes. *Virology*, 181, 595-608.

Allday, M.J., Crawford, D.H. and Griffin, B.E. (1989) Epstein-Barr virus latent gene expression during the initiation of B cell immortalization. *J Gen Virol*, 70, 1755-1764.

Alnemri, E.S., Livingston, D.J., Nicholson, D.W., Salvesen, G., Thornberry, N.A., Wong, W.W. and Yuan, J. (1996) Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell*, 87, 171.

Araki, K., Araki, M. and Yamamura, K. (1997) Targeted integration of DNA using mutant lox sites in embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res*, 25, 868-872.

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., Tufnell, P.S. and Borel, B.G. (1984) DNA sequence and expression of the B95-8 Epstein-Barr virus genome. *Nature*, 310, 207-211.

Banerji, L., Glassford, J., Lea, N.C., Thomas, N.S., Klaus, G.G. and Lam, E.W. (2001) BCR signals target p27(Kip1) and cyclin D2 via the PI3-K signalling pathway to mediate cell cycle arrest and apoptosis of WEHI 231 B cells. *Oncogene*, 20, 7352-7367.

- Bargonetti, J., Reynisdottir, I., Friedman, P.N. and Prives, C. (1992) Site-specific binding of wild-type p53 to cellular DNA is inhibited by SV40 T antigen and mutant p53. *Genes Dev*, 6, 1886-1898.
- Bates, S. and Vousden, K.H. (1999) Mechanisms of p53-mediated apoptosis. *Cell Mol Life Sci*, 55, 28-37.
- Bellows, D.S., Chau, B.N., Lee, P., Lazebnik, Y., Burns, W.H. and Hardwick, J.M. (2000) Antiapoptotic herpesvirus Bcl-2 homologs escape caspase-mediated conversion to proapoptotic proteins. *J Virol*, 74, 5024-5031.
- Bellows, D.S., Howell, M., Pearson, C., Hazlewood, S.A. and Hardwick, J.M. (2002) Epstein-Barr virus BALF1 is a BCL-2-like antagonist of the herpesvirus antiapoptotic BCL-2 proteins. *J Virol*, 76, 2469-2479.
- Boersma, A.W., Nooter, K., Oostrum, R.G. and Stoter, G. (1996) Quantification of apoptotic cells with fluorescein isothiocyanate- labeled annexin V in chinese hamster ovary cell cultures treated with cisplatin. *Cytometry*, 24, 123-130.
- Boise, L.H., Gottschalk, A.R., Quintans, J. and Thompson, C.B. (1995) Bcl-2 and Bcl-2-related proteins in apoptosis regulation. *Curr Top Microbiol Immunol*, 200, 107-121.
- Bresnahan, W.A. and Shenk, T. (2000) A subset of viral transcripts packaged within human cytomegalovirus particles. *Science*, 288, 2373-2376.
- Brielmeier, M., Mautner, J., Laux, G. and Hammerschmidt, W. (1996) The latent membrane protein 2 gene of Epstein-Barr virus is important for efficient B cell immortalization. *J Gen Virol*, 77, 2807-2818.
- Brown, D.A. and Rose, J.K. (1992) Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell*, 68, 533-544.
- Brune, W., Messerle, M. and Koszinowski, U.H. (2000) Forward with BACs: new tools for herpesvirus genomics. *Trends Genet*, 16, 254-259.

Caldwell, R.G., Brown, R.C. and Longnecker, R. (2000) Epstein-Barr virus LMP2A-induced B-cell survival in two unique classes of EmuLMP2A transgenic mice. *J Virol*, 74, 1101-1113.

Caldwell, R.G., Wilson, J.B., Anderson, S.J. and Longnecker, R. (1998) Epstein-Barr virus LMP2A drives B cell development and survival in the absence of normal B cell receptor signals. *Immunity*, 9, 405-411.

Campbell, K.S. (1999) Signal transduction from the B cell antigen-receptor. *Curr Opin Immunol*, 11, 256-264.

Chen, L.W., Lin, L.S., Chang, Y.S. and Liu, S.T. (1995) Functional analysis of EA-D of Epstein-Barr virus. *Virology*, 211, 593-597.

Cheng, E.H., Kirsch, D.G., Clem, R.J., Ravi, R., Kastan, M.B., Bedi, A., Ueno, K. and Hardwick, J.M. (1997a) Conversion of Bcl-2 to a Bax-like death effector by caspases. *Science*, 278, 1966-1968.

Cheng, E.H., Nicholas, J., Bellows, D.S., Hayward, G.S., Guo, H.G., Reitz, M.S. and Hardwick, J.M. (1997b) A Bcl-2 homolog encoded by Kaposi sarcoma-associated virus, human herpesvirus 8, inhibits apoptosis but does not heterodimerize with Bax or Bak. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 690-694.

Cherepanov, P.P. and Wackernagel, W. (1995) Gene disruption in *Escherichia coli*: TcR and KmR cassettes with the option of Flp-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant. *Gene*, 158, 9-14.

Chevallier-Greco, A., Manet, E., Chavrier, P., Mosnier, C., Daillie, J. and Sergeant, A. (1986) Both Epstein-Barr virus (EBV)-encoded trans-acting factors, EB1 and EB2, are required to activate transcription from an EBV early promoter. *Embo J*, 5, 3243-3249.

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.

Clem, R.J., Cheng, E.H., Karp, C.L., Kirsch, D.G., Ueno, K., Takahashi, A., Kastan, M.B., Griffin, D.E., Earnshaw, W.C., Veluona, M.A. and Hardwick, J.M. (1998) Modulation of cell death by Bcl-XL through caspase interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 554-559.

Counter, C.M., Botelho, F.M., Wang, P., Harley, C.B. and Bacchetti, S. (1994) Stabilization of short telomeres and telomerase activity accompany immortalization of Epstein-Barr virus-transformed human B lymphocytes. *J Virol*, 68, 3410-3414.

Countryman, J. and Miller, G. (1985) Activation of expression of latent Epstein-Barr herpesvirus after gene transfer with a small cloned subfragment of heterogeneous viral DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 82, 4085-4089.

Crook, N.E., Clem, R.J. and Miller, L.K. (1993) An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif. *J Virol*, 67, 2168-2174.

Cryns, V. and Yuan, J. (1998) Proteases to die for. *Genes Dev*, 12, 1551-1570.

Daibata, M., Humphreys, R.E., Takada, K. and Sairenji, T. (1990) Activation of latent EBV via anti-IgG-triggered, second messenger pathways in the Burkitt's lymphoma cell line Akata. *J Immunol*, 144, 4788-4793.

Darr, C.D., Mauser, A. and Kenney, S. (2001) Epstein-Barr virus immediate-early protein BRLF1 induces the lytic form of viral replication through a mechanism involving phosphatidylinositol-3 kinase activation. *J Virol*, 75, 135-142.

Datta, S.R., Brunet, A. and Greenberg, M.E. (1999) Cellular survival: a play in three Acts. *Genes Dev*, 13, 2905-2927.

Dawson, C.W., George, J.H., Blake, S.M., Longnecker, R. and Young, L.S. (2001) The Epstein-Barr virus encoded latent membrane protein 2A augments signaling from latent membrane protein 1. *Virology*, 289, 192-207.

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, 8245-8250.

Denzler, K.L. and Jacobs, B.L. (1994) Site-directed mutagenic analysis of reovirus sigma 3 protein binding to dsRNA. *Virology*, 204, 190-199.

Dobbelstein, M. and Shenk, T. (1996) Protection against apoptosis by the vaccinia virus SPI-2 (B13R) gene product. *J Virol*, 70, 6479-6485.

Duan, H. and Dixit, V.M. (1997) RAIDD is a new 'death' adaptor molecule. *Nature*, 385, 86-89.

Dykstra, M.L., Longnecker, R. and Pierce, S.K. (2001) Epstein-Barr virus coopts lipid rafts to block the signaling and antigen transport functions of the BCR. *Immunity*, 14, 57-67.

Dymecki, S.M. (2000) Site-specific recombination in cells and mice. In Joyner, A.L. (ed.), *Gene targeting - a practical approach*. Oxford University Press, Oxford, pp. 37-99.

Eick, D. and Hermeking, H. (1996) Viruses as pacemakers in the evolution of defence mechanisms against cancer. *Trends Genet*, 12, 4-6.

Fanidi, A., Hancock, D.C. and Littlewood, T.D. (1998) Suppression of c-Myc-induced apoptosis by the Epstein-Barr virus gene product BHRF1. *J Virol*, 72, 8392-8395.

Feederle, R., Kost, M., Baumann, M., Janz, A., Drouet, E., Hammerschmidt, W. and Delecluse, H.J. (2000) The Epstein-Barr virus lytic program is controlled by the co-operativ functions of two transactivators. *Embo J*, 19, 3080-3089.

Feinberg, A.P. and Vogelstein, B. (1983) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem*, 132, 6-13.

Fixman, E.D., Hayward, G.S. and Hayward, S.D. (1992) trans-acting requirements for replication of Epstein-Barr virus ori-Lyt. *J Virol*, 66, 5030-5039.

Fixman, E.D., Hayward, G.S. and Hayward, S.D. (1995) Replication of Epstein-Barr virus oriLyt: lack of a dedicated virally encoded origin-binding protein and dependence on Zta in cotransfection assays. *J Virol*, 69, 2998-3006.

Foghsgaard, L. and Jaattela, M. (1997) The ability of BHRF1 to inhibit apoptosis is dependent on stimulus and cell type. *J Virol*, 71, 7509-7517.

Franke, T.F., Kaplan, D.R. and Cantley, L.C. (1997) PI3K: downstream AKTion blocks apoptosis. *Cell*, 88, 435-437.

Freemer, C.S., Bertoni, G., Takagi, S. and Sairenji, T. (1993) A novel early antigen associated with Epstein-Barr virus productive cycle. *Virology*, 194, 387-392.

Frisan, T., Levitsky, V. and Masucci, M. (2001) Limiting dilution assay. *Methods Mol Biol*, 174, 213-216.

Fruehling, S. and Longnecker, R. (1997) The immunoreceptor tyrosine-based activation motif of Epstein-Barr virus LMP2A is essential for blocking BCR-mediated signal transduction. *Virology*, 235, 241-251.

Fruehling, S., Swart, R., Dolwick, K.M., Kremmer, E. and Longnecker, R. (1998) Tyrosine 112 of latent membrane protein 2A is essential for protein tyrosine kinase loading and regulation of Epstein-Barr virus latency. *J Virol*, 72, 7796-7806.

Graham, F.L., Smiley, J., Russell, W.C. and Nairn, R. (1977) Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol*, 36, 59-74.

Green, D.R. and Reed, J.C. (1998) Mitochondria and apoptosis. *Science*, 281, 1309-1312.

Gross, A., McDonnell, J.M. and Korsmeyer, S.J. (1999) BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev*, 13, 1899-1911.

Gruffat, H., Renner, O., Pich, D. and Hammerschmidt, W. (1995) Cellular proteins bind to the downstream component of the lytic origin of DNA replication of Epstein-Barr virus. *J Virol*, 69, 1878-1886.

- Guillerm, C., Robert-Hebmann, V., Hibner, U., Hirn, M. and Devaux, C. (1998) An anti-CD4 (CDR3-loop) monoclonal antibody inhibits human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein-induced apoptosis. *Virology*, 248, 254-263.
- Guo, F., Gopaul, D.N. and van Duyn, G.D. (1997) Structure of Cre recombinase complexed with DNA in a site-specific recombination synapse. *Nature*, 389, 40-46.
- Hammerschmidt, W. and Sugden, B. (1988) Identification and characterization of oriLyt, a lytic origin of DNA replication of Epstein-Barr virus. *Cell*, 55, 427-433.
- Han, J., Sabbatini, P., Perez, D., Rao, L., Modha, D. and White, E. (1996) The E1B 19K protein blocks apoptosis by interacting with and inhibiting the p53-inducible and death-promoting Bax protein. *Genes Dev*, 10, 461-477.
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol*, 166, 557-580.
- Hanahan, D. (1985) Techniques for transformation of *E. coli*. In Glover, D. (ed.), *DNA cloning. A practical approach*. IRL Press, Oxford, Vol. 1, pp. 109-135.
- Hardwick, J.M. (1997) Virus-induced apoptosis. *Adv Pharmacol*, 41, 295-336.
- Hardwick, J.M. (1998) Viral interference with apoptosis. *Semin Cell Dev Biol*, 9, 339-349.
- Harrington, E.A., Bennett, M.R., Fanidi, A. and Evan, G.I. (1994) c-Myc-induced apoptosis in fibroblasts is inhibited by specific cytokines. *Embo J*, 13, 3286-3295.
- Hartung, M. and Kisters-Woike, B. (1998) Cre mutants with altered DNA binding properties. *J Biol Chem*, 273, 22884-22891.
- He, B., Gross, M. and Roizman, B. (1997) The gamma(1)34.5 protein of herpes simplex virus 1 complexes with protein phosphatase 1alpha to dephosphorylate the alpha subunit of the eukaryotic translation initiation factor 2 and preclude the shutoff of protein synthesis by double-stranded RNA-activated protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 843-848.

Henderson, S., Huen, D., Rowe, M., Dawson, C., Johnson, G. and Rickinson, A. (1993) Epstein-Barr virus-coded BHRF1 protein, a viral homologue of Bcl-2, protects human B cells from programmed cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90, 8479-8483.

Hengartner, M.O. and Horvitz, H.R. (1994) *C. elegans* cell survival gene *ced-9* encodes a functional homolog of the mammalian proto-oncogene *bcl-2*. *Cell*, 76, 665-676.

Henle, W., Henle, G. and Lennette, E.T. (1979) The Epstein-Barr virus. *Sci Am*, 241, 48-59.

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.

Hildinger, M., Abel, K.L., Ostertag, W. and Baum, C. (1999) Design of 5' untranslated sequences in retroviral vectors developed for medical use. *J Virol*, 73, 4083-4089.

Ho, S.N., Hunt, H.D., Horton, R.M., Pullen, J.K. and Pease, L.R. (1989) Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene*, 77, 51-59.

Hoess, R., Abremski, K., Irwin, S., Kendall, M. and Mack, A. (1990) DNA specificity of the Cre recombinase resides in the 25 kDa carboxyl domain of the protein. *J Mol Biol*, 216, 873-882.

Holley-Guthrie, E.A., Quinlivan, E.B., Mar, E.C. and Kenney, S. (1990) The Epstein-Barr virus (EBV) BMRF1 promoter for early antigen (EA-D) is regulated by the EBV transactivators, BRLF1 and BZLF1, in a cell-specific manner. *J Virol*, 64, 3753-3759.

Holmes, D.S. and Quigley, M. (1981) A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal Biochem*, 114, 193-197.

Hunter, J.J., Bond, B.L. and Parslow, T.G. (1996) Functional dissection of the human Bcl-2 protein: sequence requirements for inhibition of apoptosis. *Mol Cell Biol*, 16, 877-883.

Hurley, E.A. and Thorley-Lawson, D.A. (1988) B cell activation and the establishment of Epstein-Barr virus latency. *J Exp Med*, 168, 2059-2075.

Ikeda, M., Ikeda, A., Longan, L.C. and Longnecker, R. (2000a) The Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A PY motif recruits WW domain-containing ubiquitin-protein ligases. *Virology*, 268, 178-191.

Ikeda, M., Ikeda, A. and Longnecker, R. (2001a) PY motifs of Epstein-Barr virus LMP2A regulate protein stability and phosphorylation of LMP2A-associated proteins. *J Virol*, 75, 5711-5718.

Inman, G.J., Binne, U.K., Parker, G.A., Farrell, P.J. and Allday, M.J. (2001) Activators of the Epstein-Barr virus lytic program concomitantly induce apoptosis, but lytic gene expression protects from cell death. *J Virol*, 75, 2400-2410.

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.

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.

Kennedy, S.G., Kandel, E.S., Cross, T.K. and Hay, N. (1999) Akt/Protein kinase B inhibits cell death by preventing the release of cytochrome c from mitochondria. *Mol Cell Biol*, 19, 5800-5810.

Kenney, S., Kamine, J., Holley-Guthrie, E., Mar, E.C., Lin, J.C., Markovitz, D. and Pagano, J. (1989) The Epstein-Barr virus immediate-early gene product, BMLF1, acts in trans by a posttranscriptional mechanism which is reporter gene dependent. *J Virol*, 63, 3870-3877.

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.

Kerr, J.F., Wyllie, A.H. and Currie, A.R. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 26, 239-257.

Khwaja, A. (1999) Akt is more than just a Bad kinase. *Nature*, 401, 33-34.

Kieff, E. and Rickinson, A.B. (2001) Epstein-Barr virus and its replication. In Knipe, D.M., Howley, P.M., Griffin, D.E., Martin, M.A., Lamb, R.A., Roizman, B. and Straus, S.E. (eds.), *Field's Virology*. Lippincott - Williams & Wilkins, Philadelphia, Vol. 2, pp. 2511-2573.

Konishi, K., Maruo, S., Kato, H. and Takada, K. (2001) Role of Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 2A on virus-induced immortalization and virus activation. *J Gen Virol*, 82, 1451-1456.

Kurosaki, T. (1999) Genetic analysis of B cell antigen receptor signaling. *Annu Rev Immunol*, 17, 555-592.

Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.

Laherty, C.D., Hu, H.M., Opipari, A.W., Wang, F. and Dixit, V.M. (1992) The Epstein-Barr virus LMP1 gene product induces A20 zinc finger protein expression by activating nuclear factor kappa B. *J Biol Chem*, 267, 24157-24160.

Lamkanfi, M., Declercq, W., Kalai, M., Saelens, X. and Vandenabeele, P. (2002) Alice in caspase land. A phylogenetic analysis of caspases from worm to man. *Cell Death and Differentiation*, 9, 358-361.

Laux, G., Freese, U.K. and Bornkamm, G.W. (1985) Structure and evolution of two related transcription units of Epstein-Barr virus carrying small tandem repeats. *J Virol*, 56, 987-995.

Laux, G., Perricaudet, M. and Farrell, P.J. (1988) A spliced Epstein-Barr virus gene expressed in immortalized lymphocytes is created by circularization of the linear viral genome. *Embo J*, 7, 769-774.

Lee, G. and Saito, I. (1998) Role of nucleotide sequences of loxP spacer region in Cre-mediated recombination. *Gene*, 216, 55-65.

Lee, M.A. and Yates, J.L. (1992) BHRF1 of Epstein-Barr virus, which is homologous to human proto-oncogene bcl2, is not essential for transformation of B cells or for virus replication in vitro. *J Virol*, 66, 1899-1906.

Li, H. and Yuan, J. (1999) Deciphering the pathways of life and death. *Curr Opin Cell Biol*, 11, 261-266.

Liao, G., Wu, F.Y. and Hayward, S.D. (2001) Interaction with the Epstein-Barr virus helicase targets Zta to DNA replication compartments. *J Virol*, 75, 8792-8802.

Liebermann, D.A. and Hoffman-Liebermann, B. (1989) Proto-oncogene expression and dissection of the myeloid growth to differentiation developmental cascade. *Oncogene*, 4, 583-592.

Longan, L. and Longnecker, R. (2000) Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A has no growth-altering effects when expressed in differentiating epithelia. *J Gen Virol*, 81, 2245-2252.

Longnecker, R. (2000) Epstein-Barr virus latency: LMP2A, a regulator or means for Epstein-Barr virus persistence? *Advance in cancer research*, 79, 175-200.

Longnecker, R. and Miller, C.L. (1996) Regulation of Epstein-Barr virus latency by latent membrane protein 2. *Trends Microbiol*, 4, 38-42.

Mack, A., Sauer, B., Abremski, K. and Hoess, R. (1992) Stoichiometry of the Cre recombinase bound to the lox recombining site. *Nucleic Acids Res*, 20, 4451-4455.

Marchini, A., Tomkinson, B., Cohen, J.I. and Kieff, E. (1991) BHRF1, the Epstein-Barr virus gene with homology to Bcl2, is dispensable for B-lymphocyte transformation and virus replication. *J Virol*, 65, 5991-6000.

Marshall, W.L., Yim, C., Gustafson, E., Graf, T., Sage, D.R., Hanify, K., Williams, L., Fingerroth, J. and Finberg, R.W. (1999) Epstein-Barr virus encodes a novel homolog of the bcl-2 oncogene that inhibits apoptosis and associates with Bax and Bak. *J Virol*, 73, 5181-5185.

Matskova, L., Ernberg, I., Pawson, T. and Winberg, G. (2001) C-terminal domain of the Epstein-Barr virus LMP2A membrane protein contains a clustering signal. *J Virol*, 75, 10941-10949.

McDonnell, J.M., Fushman, D., Milliman, C.L., Korsmeyer, S.J. and Cowburn, D. (1999) Solution structure of the proapoptotic molecule BID: a structural basis for apoptotic agonists and antagonists. *Cell*, 96, 625-634.

Miller, C.L., Burkhardt, A.L., Lee, J.H., Stealey, B., Longnecker, R., Bolen, J.B. and Kieff, E. (1995) Integral membrane protein 2 of Epstein-Barr virus regulates reactivation from latency through dominant negative effects on protein- tyrosine kinases. *Immunity*, 2, 155-166.

Miller, C.L., Lee, J.H., Kieff, E. and Longnecker, R. (1994) An integral membrane protein (LMP2) blocks reactivation of Epstein-Barr virus from latency following surface immunoglobulin crosslinking. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91, 772-776.

Miller, G., Robinson, J., Heston, L. and Lipman, M. (1974) Differences between laboratory strains of Epstein-Barr virus based on immortalization, abortive infection, and interference. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 71, 4006-4010.

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.

Miyashita, T., Kitada, S., Krajewski, S., Horne, W.A., Delia, D. and Reed, J.C. (1995) Overexpression of the Bcl-2 protein increases the half-life of p21Bax. *J Biol Chem*, 270, 26049-26052.

Mullis, K.B. and Faloona, F.A. (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol*, 155, 335-350.

Muyrers, J.P., Zhang, Y., Benes, V., Testa, G., Ansorge, W. and Stewart, A.F. (2000) Point mutation of bacterial artificial chromosomes by ET recombination. *EMBO Rep*, 1, 239-243.

Nava, V.E., Cheng, E.H., Veluona, M., Zou, S., Clem, R.J., Mayer, M.L. and Hardwick, J.M. (1997) Herpesvirus saimiri encodes a functional homolog of the human bcl-2 oncogene. *J Virol*, 71, 4118-4122.

Nguyen, M., Millar, D.G., Yong, V.W., Korsmeyer, S.J. and Shore, G.C. (1993) Targeting of Bcl-2 to the mitochondrial outer membrane by a COOH- terminal signal anchor sequence. *J Biol Chem*, 268, 25265-25268.

Nicholls, J., Kremmer, E., Meseda, C.A., Mackett, M., Hahn, P., Gulley, M.L., Brink, A., Swinnen, L.J., Greenspan, J., De Souza, Y., Grasser, F., Sham, J., Ng, M.H. and Arrand, J.R. (2001) Comparative analysis of the expression of the Epstein-Barr virus (EBV) anti-apoptotic gene BHRF1 in nasopharyngeal carcinoma and EBV-related lymphoid diseases. *J Med Virol*, 65, 105-113.

O'Connor, M., Peifer, M. and Bender, W. (1989) Construction of large DNA segments in *Escherichia coli*. *Science*, 244, 1307-1312.

Ohnimus, H., Heinkelein, M. and Jassoy, C. (1997) Apoptotic cell death upon contact of CD4+ T lymphocytes with HIV glycoprotein-expressing cells is mediated by caspases but bypasses CD95 (Fas/Apo-1) and TNF receptor 1. *J Immunol*, 159, 5246-5252.

Oldstone, M.B. (1997) How viruses escape from cytotoxic T lymphocytes: molecular parameters and players. *Virology*, 234, 179-185.

Pope, J.H., Horne, M.K. and Scott, W. (1968) Transformation of foetal human leukocytes in vitro by filtrates of a human leukaemic cell line containing herpes-like virus. *Int J Cancer*, 3, 857-866.

Portis, T., Cooper, L., Dennis, P. and Longnecker, R. (2002) The LMP2A signalosome -a therapeutic target for Epstein-Barr virus latency and associated disease. *Front Biosci*, 7, d414-426.

- Pulvertaft. (1964) Cytology of Burkitt's tumour (African lymphoma). *Lancet*, i, 238-240.
- Ray, R.B., Meyer, K., Steele, R., Shrivastava, A., Aggarwal, B.B. and Ray, R. (1998) Inhibition of tumor necrosis factor (TNF- α)-mediated apoptosis by hepatitis C virus core protein. *J Biol Chem*, 273, 2256-2259.
- Reed, J.C. (1994) Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *J Cell Biol*, 124, 1-6.
- Reed, J.C. (1997) Cytochrome c: can't live with it--can't live without it. *Cell*, 91, 559-562.
- Reed, J.C. (1998) Bcl-2 family proteins. *Oncogene*, 17, 3225-3236.
- Reed, J.C. (2000) Mechanisms of apoptosis. *Am J Pathol*, 157, 1415-1430.
- Rowe, M., Peng-Pilon, M., Huen, D.S., Hardy, R., Croom-Carter, D., Lundgren, E. and Rickinson, A.B. (1994) Upregulation of bcl-2 by the Epstein-Barr virus latent membrane protein LMP1: a B-cell-specific response that is delayed relative to NF- κ B activation and to induction of cell surface markers. *J Virol*, 68, 5602-5612.
- Salvesen, G.S. and Dixit, V.M. (1997) Caspases: intracellular signaling by proteolysis. *Cell*, 91, 443-446.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Sandberg, M., Hammerschmidt, W. and Sugden, B. (1997) Characterization of LMP-1's association with TRAF1, TRAF2, and TRAF3. *J Virol*, 71, 4649-4656.
- Sauer, B. (1996) Multiplex Cre/lox recombination permits selective site-specific DNA targeting to both a natural and an engineered site in the yeast genome. *Nucleic Acids Res*, 24, 4608-4613.
- Scheffner, M., Werness, B.A., Huibregtse, J.M., Levine, A.J. and Howley, P.M. (1990) The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell*, 63, 1129-1136.

Schendel, S.L., Xie, Z., Montal, M.O., Matsuyama, S., Montal, M. and Reed, J.C. (1997) Channel formation by antiapoptotic protein Bcl-2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 5113-5118.

Schepers, A., Pich, D. and Hammerschmidt, W. (1993a) A transcription factor with homology to the AP-1 family links RNA transcription and DNA replication in the lytic cycle of Epstein-Barr virus. *Embo J*, 12, 3921-3929.

Schepers, A., Pich, D., Mankertz, J. and Hammerschmidt, W. (1993b) cis-acting elements in the lytic origin of DNA replication of Epstein-Barr virus. *J Virol*, 67, 4237-4245.

Schepers, A., Ritz, 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, 4588-4602.

Scholle, F., Bendt, K.M. and Raab-Traub, N. (2000) Epstein-Barr virus LMP2A transforms epithelial cells, inhibits cell differentiation, and activates Akt. *J Virol*, 74, 10681-10689.

Sheng, Y., Mancino, V. and Birren, B. (1995) Transformation of *Escherichia coli* with large DNA molecules by electroporation. *Nucleic Acids Res*, 23, 1990-1996.

Simons, K. and Ikonen, E. (1997) Functional rafts in cell membranes. *Nature*, 387, 569-572.

Speck, P., Kline, K.A., Cheresch, P. and Longnecker, R. (1999) Epstein-Barr virus lacking latent membrane protein 2 immortalizes B cells with efficiency indistinguishable from that of wild-type virus. *J Gen Virol*, 80, 2193-2203.

Sternberg, N., Austin, S., Hamilton, D. and Yarmolinsky, M. (1978) Analysis of bacteriophage P1 immunity by using lambda-P1 recombinants constructed in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 75, 5594-5598.

Sugden, B. and Mark, W. (1977) Clonal transformation of adult human leukocytes by Epstein-Barr virus. *J Virol*, 23, 503-508.

Sugden, B., Phelps, M. and Domoradzki, J. (1979) Epstein-Barr virus DNA is amplified in transformed lymphocytes. *J Virol*, 31, 590-595.

Swart, R., Ruf, I.K., Sample, J. and Longnecker, R. (2000) Latent membrane protein 2A-mediated effects on the phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt pathway. *J Virol*, 74, 10838-10845.

Tahara, H., Tokutake, Y., Maeda, S., Kataoka, H., Watanabe, T., Satoh, M., Matsumoto, T., Sugawara, M., Ide, T., Goto, M., Furuichi, Y. and Sugimoto, M. (1997) Abnormal telomere dynamics of B-lymphoblastoid cell strains from Werner's syndrome patients transformed by Epstein-Barr virus. *Oncogene*, 15, 1911-1920.

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.

Thornberry, N.A. and Lazebnik, Y. (1998) Caspases: enemies within. *Science*, 281, 1312-1316.

Thornberry, N.A., Rano, T.A., Peterson, E.P., Rasper, D.M., Timkey, T., Garcia-Calvo, M., Houtzager, V.M., Nordstrom, P.A., Roy, S., Vaillancourt, J.P., Chapman, K.T. and Nicholson, D.W. (1997) A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis. *J Biol Chem*, 272, 17907-17911.

Tollefson, A.E., Ryerse, J.S., Scaria, A., Hermiston, T.W. and Wold, W.S. (1996a) The E3-11.6-kDa adenovirus death protein (ADP) is required for efficient cell death: characterization of cells infected with adp mutants. *Virology*, 220, 152-162.

Tollefson, A.E., Scaria, A., Hermiston, T.W., Ryerse, J.S., Wold, L.J. and Wold, W.S. (1996b) The adenovirus death protein (E3-11.6K) is required at very late stages of infection for efficient cell lysis and release of adenovirus from infected cells. *J Virol*, 70, 2296-2306.

Tomkinson, B. and Kieff, E. (1992) Use of second-site homologous recombination to demonstrate that Epstein-Barr virus nuclear protein 3B is not important for lymphocyte infection or growth transformation in vitro. *J Virol*, 66, 2893-2903.

- Tomkinson, B., Robertson, E. and Kieff, E. (1993) Epstein-Barr virus nuclear proteins EBNA-3A and EBNA-3C are essential for B-lymphocyte growth transformation. *J Virol*, 67, 2014-2025.
- Torres, R.M. and Kühn, R. (1997) *Laboratory protocols for conditional gene targeting*. Oxford University Press, Oxford.
- Vaux, D.L. and Strasser, A. (1996) The molecular biology of apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 2239-2244.
- Vaux, D.L., Weissman, I.L. and Kim, S.K. (1992) Prevention of programmed cell death in *Caenorhabditis elegans* by human bcl-2. *Science*, 258, 1955-1957.
- Vousden, K.H. (2000) p53: death star. *Cell*, 103, 691-694.
- Wallach, D., Varfolomeev, E.E., Malinin, N.L., Goltsev, Y.V., Kovalenko, A.V. and Boldin, M.P. (1999) Tumor necrosis factor receptor and Fas signaling mechanisms. *Annu Rev Immunol*, 17, 331-367.
- Wang, G.H., Bertin, J., Wang, Y., Martin, D.A., Wang, J., Tomaselli, K.J., Armstrong, R.C. and Cohen, J.I. (1997) Bovine herpesvirus 4 BORFE2 protein inhibits Fas- and tumor necrosis factor receptor 1-induced apoptosis and contains death effector domains shared with other gamma-2 herpesviruses. *J Virol*, 71, 8928-8932.
- Wang, S., Rowe, M. and Lundgren, E. (1996) Expression of the Epstein Barr virus transforming protein LMP1 causes a rapid and transient stimulation of the Bcl-2 homologue Mcl-1 levels in B-cell lines. *Cancer Res*, 56, 4610-4613.
- Watts, C. (1997) Capture and processing of exogenous antigens for presentation on MHC molecules. *Annu Rev Immunol*, 15, 821-850.
- Wensing, B. and Farrell, P.J. (2000) Regulation of cell growth and death by Epstein-Barr virus. *Microbes and infection*, 2, 77-84.
- White, E. (1996) Life, death, and the pursuit of apoptosis. *Genes Dev*, 10, 1-15.
- White, E., Sabbatini, P., Debbas, M., Wold, W.S., Kusher, D.I. and Gooding, L.R. (1992) The 19-kilodalton adenovirus E1B transforming protein inhibits programmed

cell death and prevents cytolysis by tumor necrosis factor alpha. *Mol Cell Biol*, 12, 2570-2580.

Wienands, J. (2000) The B-cell antigen receptor: formation of signaling complexes and the function of adaptor proteins. *Curr Top Microbiol Immunol*, 245, 53-76.

Yamaguchi, H. and Wang, H.G. (2001) The protein kinase PKB/Akt regulates cell survival and apoptosis by inhibiting Bax conformational change. *Oncogene*, 20, 7779-7786.

Yates, J.L. and Guan, N. (1991) Epstein-Barr virus-derived plasmids replicate only once per cell cycle and are not amplified after entry into cells. *J Virol*, 65, 483-488.

Yew, P.R., Liu, X. and Berk, A.J. (1994) Adenovirus E1B oncoprotein tethers a transcriptional repression domain to p53. *Genes Dev*, 8, 190-202.

Yin, X.M., Oltvai, Z.N. and Korsmeyer, S.J. (1994) BH1 and BH2 domains of Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with Bax. *Nature*, 369, 321-323.

Young, L.S., Dawson, C.W. and Eliopoulos, A.G. (2000) The expression and function of Epstein-Barr virus encoded latent genes. *Mol Pathol*, 53, 238-247.

Yuan, J. (1997) Transducing signals of life and death. *Curr Opin Cell Biol*, 9, 247-251.

Zalani, S., Holley-Guthrie, E. and Kenney, S. (1996) Epstein-Barr viral latency is disrupted by the immediate-early BRLF1 protein through a cell-specific mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 9194-9199.

Zamzami, N., Brenner, C., Marzo, I., Susin, S.A. and Kroemer, G. (1998) Subcellular and submitochondrial mode of action of Bcl-2-like oncoproteins. *Oncogene*, 16, 2265-2282.

Zeng, Y., Middeldorp, J., Madjar, J.J. and Ooka, T. (1997) A major DNA binding protein encoded by BALF2 open reading frame of Epstein-Barr virus (EBV) forms a

complex with other EBV DNA-binding proteins: DNAase, EA-D, and DNA polymerase. *Virology*, 239, 285-295.

Zhang, C.X., Decaussin, G., de Turenne Tessier, M., Daillie, J. and Ooka, T. (1987) Identification of an Epstein-Barr virus-specific desoxyribonuclease gene using complementary DNA. *Nucleic Acids Res*, 15, 2707-2717.

Zhang, Q., Gutsch, D. and Kenney, S. (1994) Functional and physical interaction between p53 and BZLF1: implications for Epstein-Barr virus latency. *Mol Cell Biol*, 14, 1929-1938.

Zhang, Q., Holley-Guthrie, E., Ge, J.Q., Dorsky, D. and Kenney, S. (1997) The Epstein-Barr virus (EBV) DNA polymerase accessory protein, BMRF1, activates the essential downstream component of the EBV oriLyt. *Virology*, 230, 22-34.

**Funktion früher Gene des Epstein-Barr Virus
bei der Immortalisierung
humaner primärer B-Lymphozyten**

Anhang

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von

Markus Altmann

2003

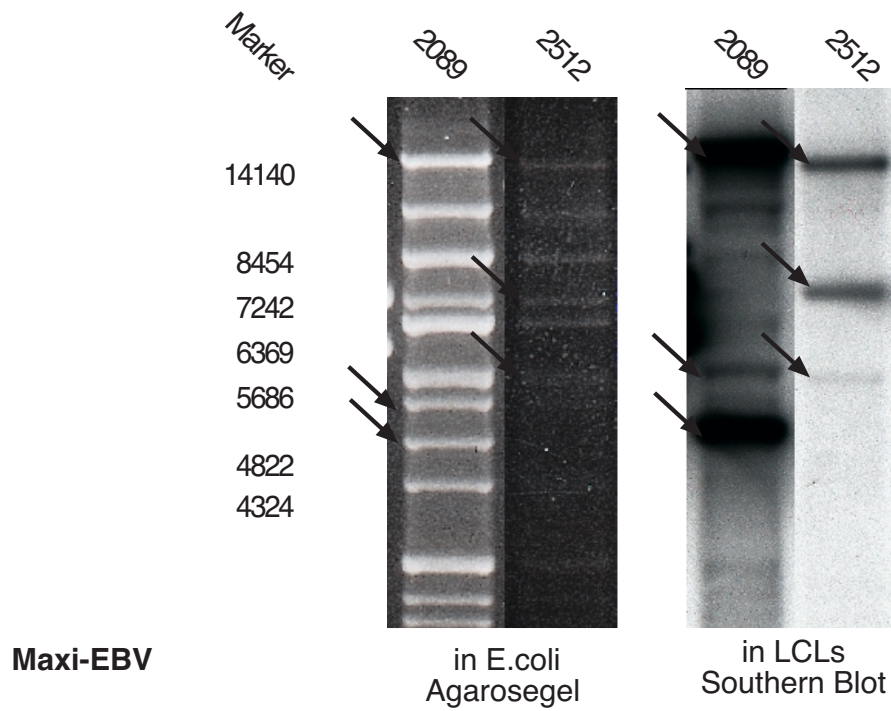
Anhang

Abbildung A-F: Identitätskontrolle von sieben Deletionsmutanten im Maxi-EBV Kontext.

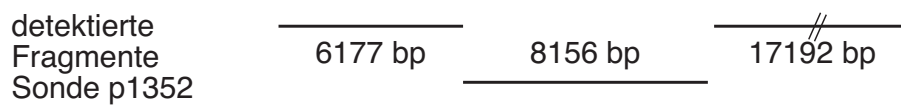
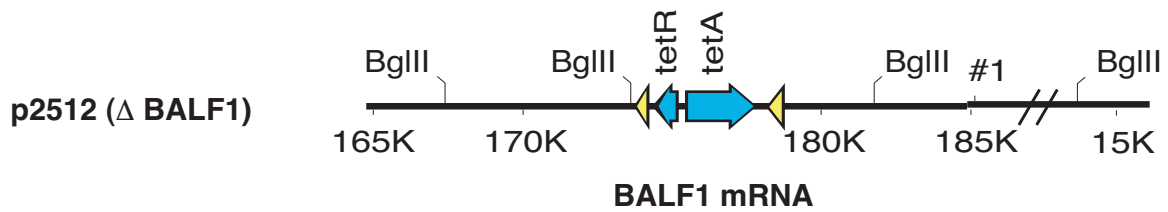
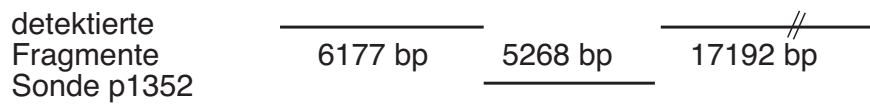
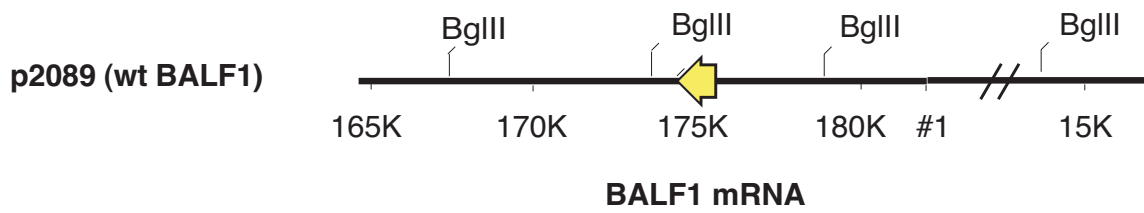
Dargestellt sind die einzelnen Prozessschritte zur Herstellung eines mutanten Maxi-EBV Plasmids auf der Grundlage des Maxi-EBV Plasmids p2089. Diese umfassen die homologe Rekombination in *E.coli*, die stabile Selektion der Maxi-EBV Mutanten in HEK 293-Zellen und die Immortalisierung von B-Zelllinien mit infektiösen Maxi-EBV Partikeln zur Generierung von lymphoblastoiden Zelllinien (LCLs). Alle Prozessschritte wurden bei der Herstellung von jeder der insgesamt sieben Mutanten zur Qualitäts- und Identitätskontrolle verfolgt. Die Überprüfung erfolgte anhand von Restriktionsfragment-Mustern des Maxi-EBV Plasmids (jeweils im oberen Teil der Abbildung links außen gezeigt) und Southern-Blot-Hybridisierung des entsprechenden Genorts mit geeigneten Sonden. Dies wurde mit Plasmidpräparationen aus *E.coli* und gesamtzellulärer DNA aus HEK293-Zellen bzw. LCLs durchgeführt, wobei die Southern-Blot-Hybridisierung der stabilen HEK293 Einzelzellklone aus Übersichtlichkeitsgründen nicht dargestellt ist. Der Genotyp der HEK293 Einzelzellklone nach der Transfektion mit Maxi-EBV Plasmiden sowie der lymphoblastoiden Zelllinien, die durch Infektion mit rekombinanten EBV Partikeln generiert wurden, wurde stichprobenartig bei jeweils 20 Klonen überprüft (hier ist je ein Beispiel gezeigt). Zur besseren Übersichtlichkeit werden jeweils nur die relevanten Ausschnitte der Southern-Blot-Hybridisierung gezeigt. Die jeweilige Ausgangszelllinie mit der Maxi-EBV DNA vor der homologen Rekombination wurde direkt neben die jeweilige Mutante gestellt, um die Unterschiede im Restriktionsbandenmuster eingänglicher darstellen zu können.

Für die Restriktionskartierung wurden 1 µg CsCl-gereinigter Plasmid-DNA aus *E.coli* bzw. 15 µg gesamtzelluläre DNA aus HEK293 oder LCLs eingesetzt. Der Restriktionsverdau erfolgte mit dem jeweils in der Plasmidkarte angegebenen Restriktionsenzym. Die auftretenden Restriktions-Banden wurden mit dem Bandenmuster, das nach dem Verdau der Ausgangs-DNA entsteht, verglichen. Banden, die die Mutante vom Ausgangs-EBV-Genom differenzieren, sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Zusätzlich wurde die DNA auf eine Nylonmembran transferiert und mit radioaktiv markierten Sonden hybridisiert. Die zu erwartenden Fragmente im mit Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegel bzw. Autoradiogramm der Southern-Blot-Hybridisierung sind jeweils in einer Schemazeichnung im unteren Teil der Abbildungen dargestellt. In allen untersuchten Prozessstadien und allen überprüften Einzelzellklonen konnten die klonalen Identitäten bestätigt werden. Für zuverlässige Aussagen hinsichtlich der Immortalisierungsfrequenz und des Phänotyp der verschiedenen lymphoblastoiden Zelllinien war es besonders wichtig, eine Kontamination mit Wildtyp-EBV ausschließen zu können. Dies war in allen untersuchten Fällen möglich.

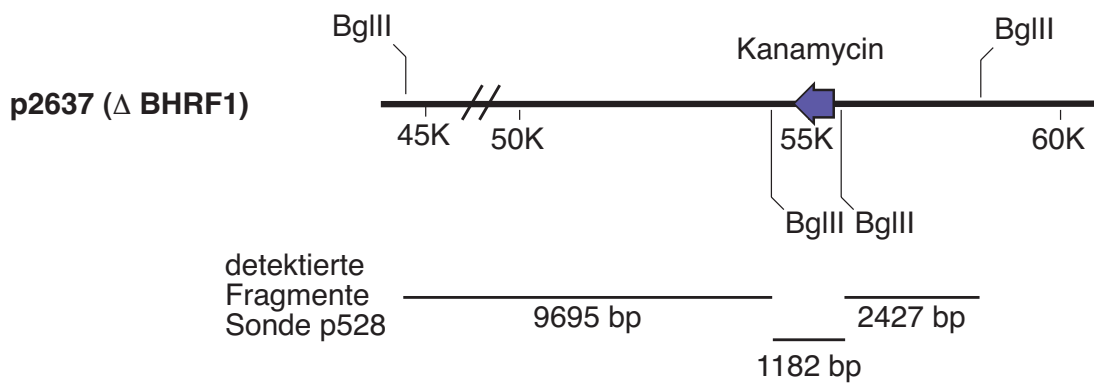
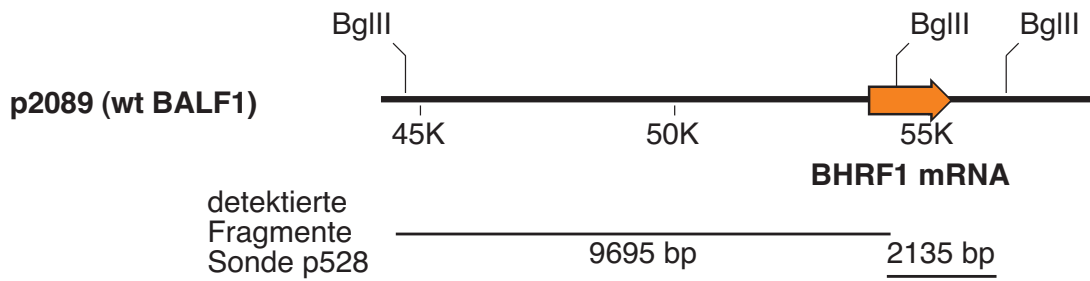
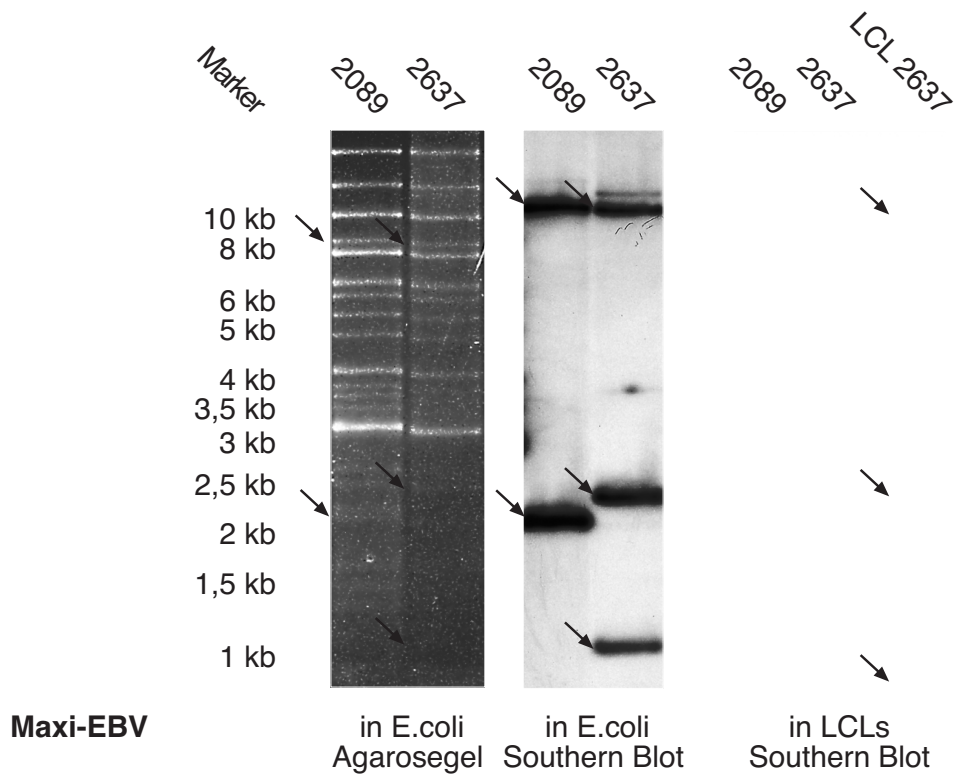
A: Δ BALF1 Maxi-EBV (2512)



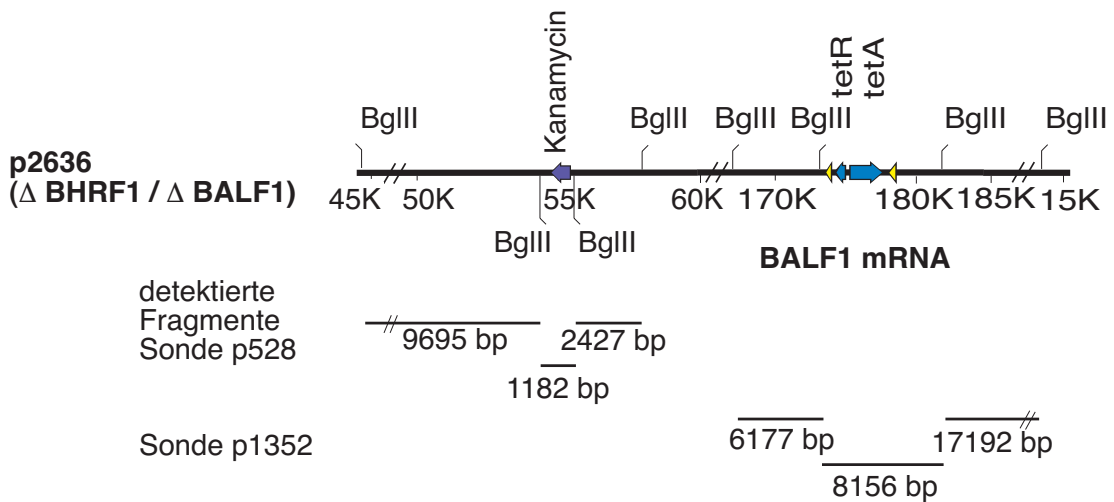
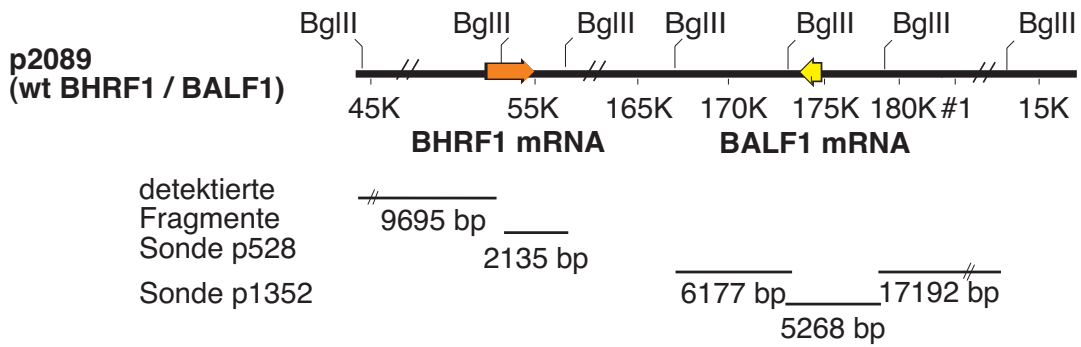
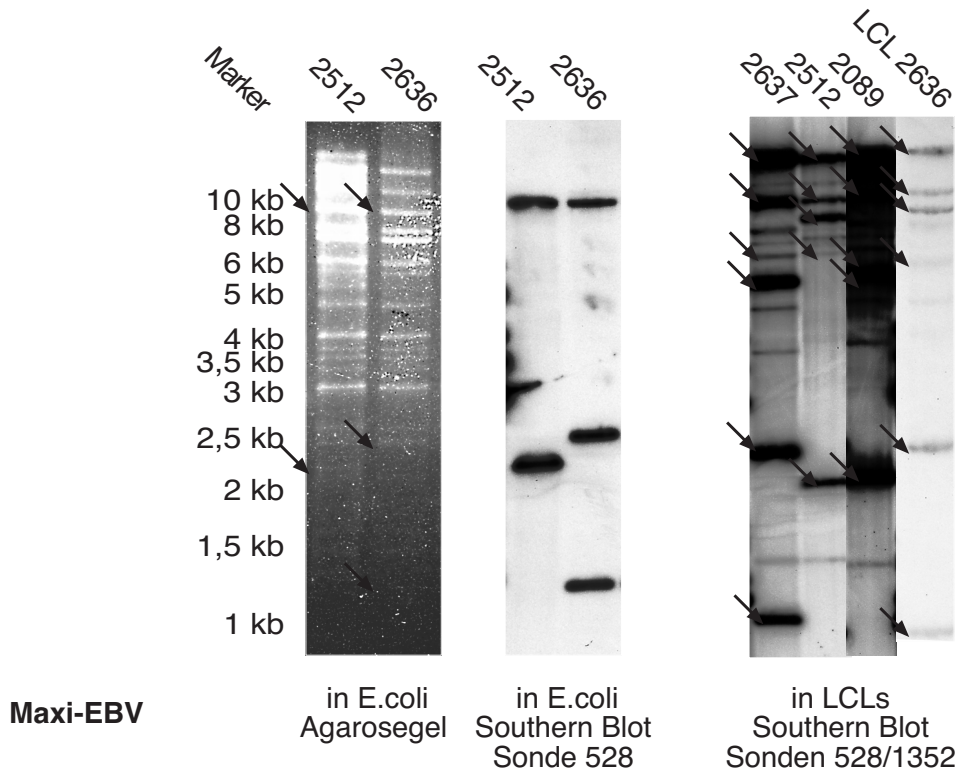
Maxi-EBV



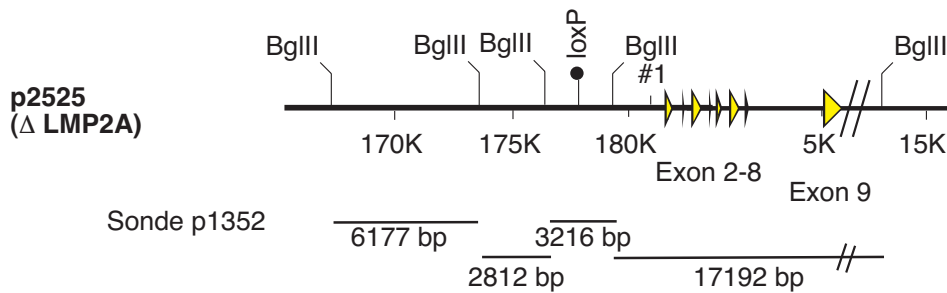
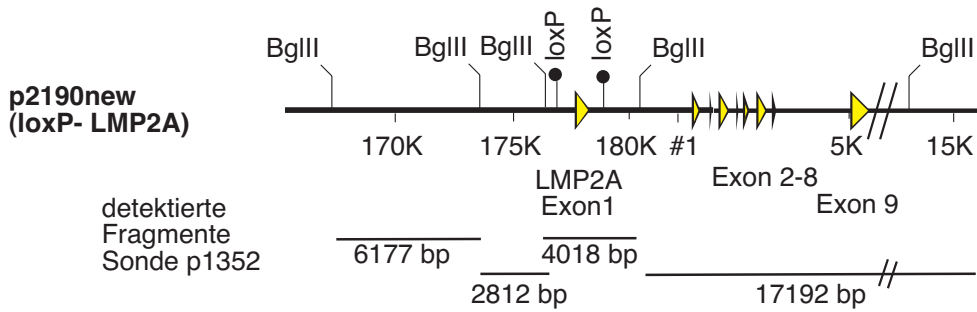
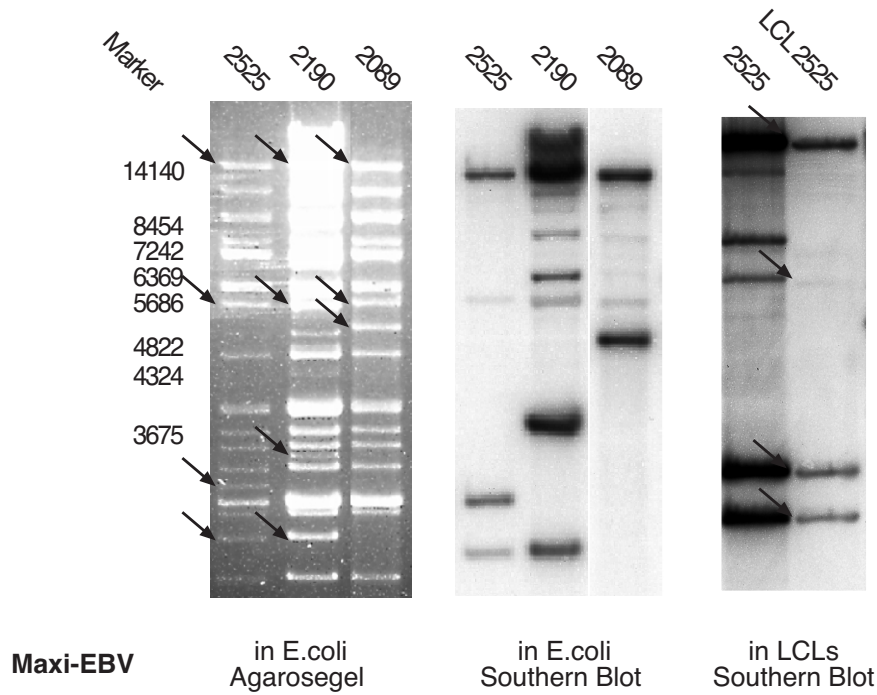
B: Δ BHRF1 Maxi-EBV (2637)



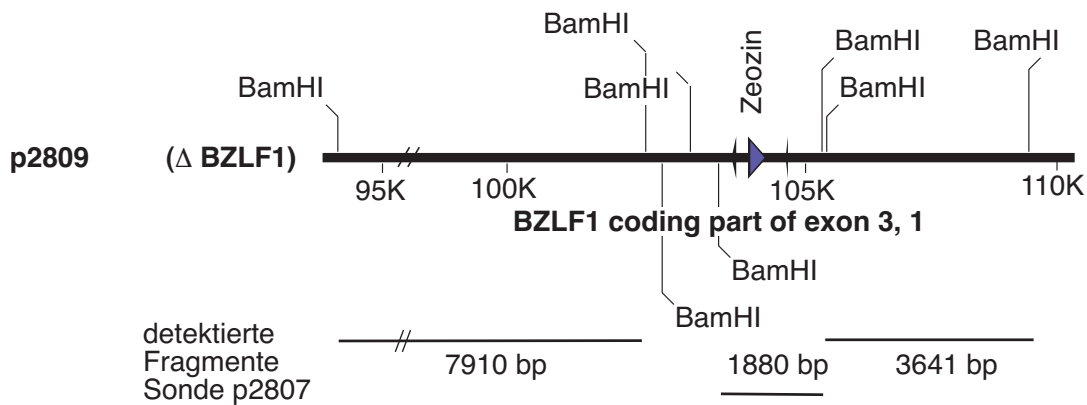
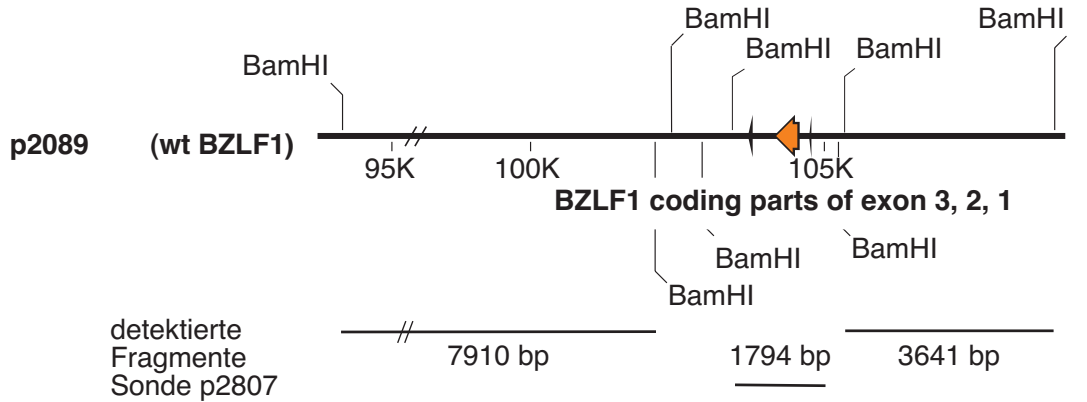
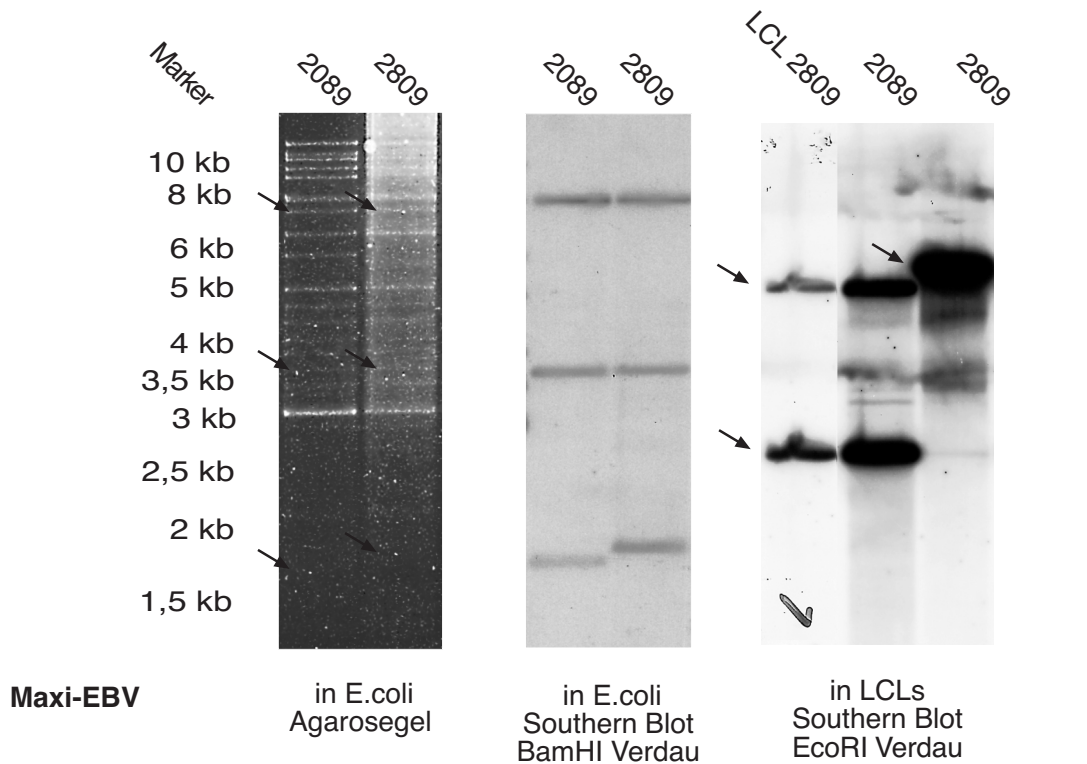
C: Δ BALF1/ Δ BHRF1 Maxi-EBV (2636)



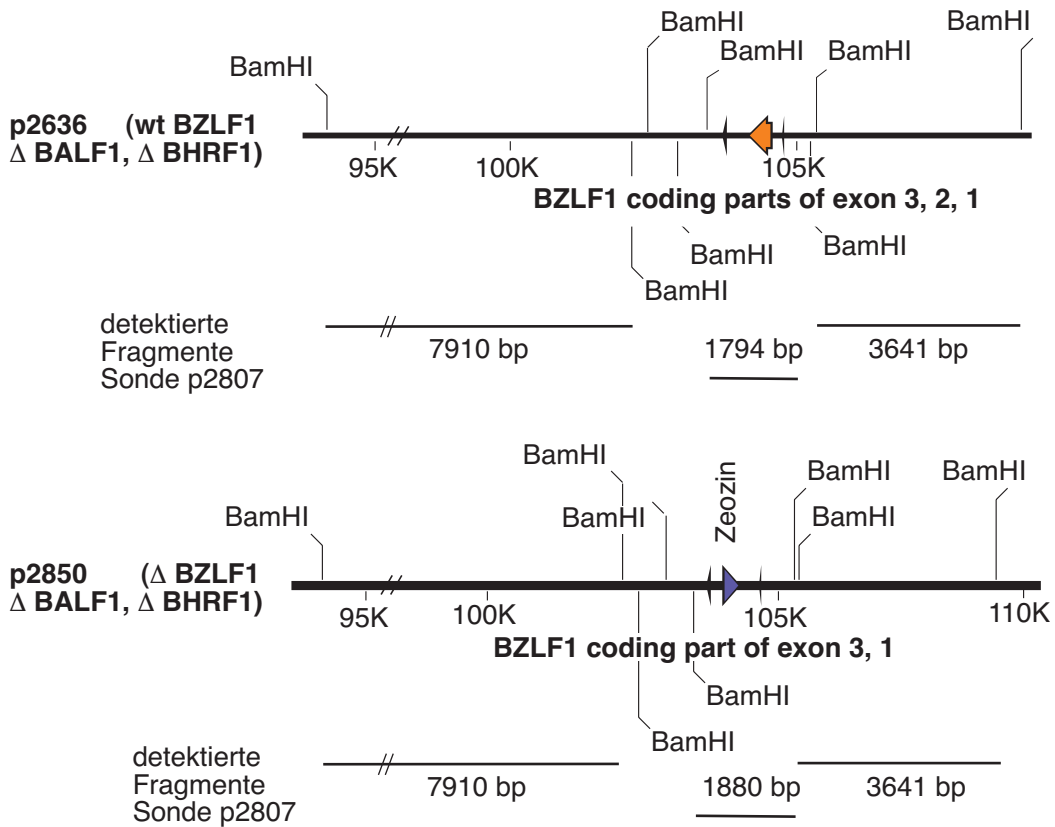
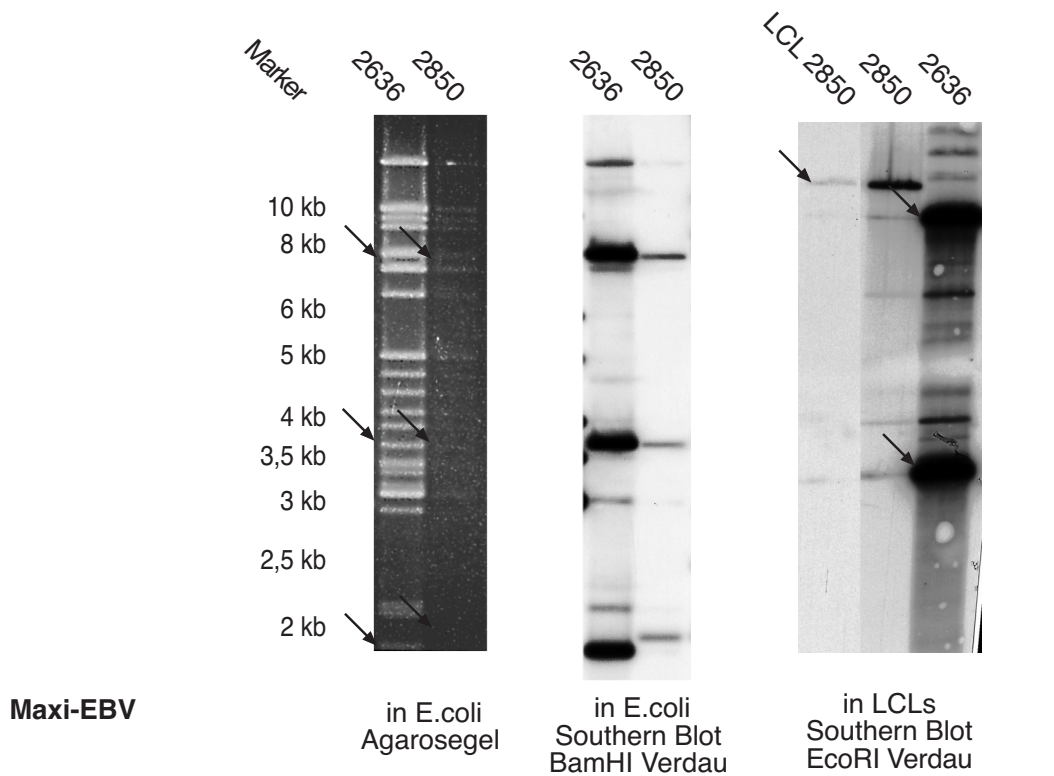
D: WT Maxi-EBV - loxP/ Δ LMP2A Maxi-EBV (2190new/2525)



E: Δ BZLF1 Maxi-EBV (2809)



F: ΔBALF1/ΔBHRF1/ΔBZLF1 Maxi-EBV



Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Mein besonderer Dank gilt:

Prof. Dr. Wolfgang Hammerschmidt für die hervorragende Betreuung, den wissenschaftlichen Rat und seine ständige Diskussionsbereitschaft, wobei er (wie war das noch mal...) als „advocatus diaboli“ immer nur das Beste aus mir herausholen wollte,

Prof. Dr. Horst Domdey dafür, dass er die Pflichten des offiziellen Betreuers übernommen hat,

Dr. Gilbert Reisbach, dem gefühlvollsten Blutabnehmer im ganzen Haus, der mich in langen Sitzungen in die Geheimnisse der FACS-Einstellungen eingewiesen hat,

Dr. Martin Rowe für den BZLF1 Antikörper ohne ein „material transfer agreement“, Dr. Elisabeth Kremmer für ihre Antikörper, Jürgen Mühlberg für die proTNF α cDNA und Dr. Ulla Zimmer-Strobl für das Protokoll, mit dem endlich der LMP2A Westernblot funktionierte,

Dr. Bernhard Neuhierl, der auf fast alle Probleme des Laboralltags eine Antwort wusste, und so etwas wie unser „Königtiger“ war, obwohl er das nie sein wollte,

den Mitgliedern der Arbeitsgruppe Genvektoren für die gute Zusammenarbeit, praktische Unterstützung und wissenschaftliche Diskussion und allen Kolleginnen und Kollegen des Instituts, die zum guten Arbeitsklima beigetragen haben,

meinen (Ex-)Doktorandenkollegen Ute, Annette, Eva, Eva, Madelaine, Sibille, Matthias und Frank, ohne die die Arbeit im Labor bei weitem nicht so lustig gewesen wäre, und natürlich meiner Schreibtischnachbarin Uli, deren Schwangerschaft ich fünf Monate lange nicht bemerkte und mit der das Jammern immer so viel Spaß gemacht hat,

und Ted fürs Korrekturlesen, seine „unendliche“ Geduld und Unterstützung

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Markus Altmann

Geburtsdatum 14.12.1971

Geburtsort Gräfelfing

Familienstand ledig

Staatsangehörigkeit deutsch

Schulischer Werdegang

1978 – 1982 Grundschule Gräfelfing

1982 – 1991 Feodor-Lynen-Gymnasium Planegg

Juni 1991 Abitur

Zivildienst

1991 – 1992 Rudolf und Maria Gunst Haus, Lochham

Pflegeheim des Bayerischen roten Kreuzes

Studium

1992 – 1998 Studium der Biologie, Ludwig-Maximilians-Universität, München

März 1997 – Januar 1998 Diplomarbeit am Lehrstuhl von Prof. Dr. Svante Pääbo, Institut für Zoologie, LMU München

Januar 1998 Abschluss des Studiums der Biologie (Diplom)

Februar 1998 – August 1998 wissenschaftliche Hilfskraft Prof. Svante Pääbo

September 1998 – April 1999 wissenschaftliche Hilfskraft SWITCH Biotech GmbH, Martinsried

Juni 1999 – Oktober 2002

Promotion in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Wolfgang Hammerschmidt, Abteilung Genvektoren an der GSF, München