

---

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

**Herstellung von Epstein-Barr Virus Glykoproteinmutanten  
zur Veränderung des Wirtsspektrums**

**von  
Annette Janz**

aus

Langenhagen

2001

---

## Erklärung

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

## Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, am 11.04.2001

(Annette Janz)

Dissertation eingereicht am 11.04.2001

1. Gutachter                      apl. Prof. Dr. Wolfgang Hammerschmidt

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

Mündliche Prüfung am      25.06.2001

---

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

**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.

**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 cooperative functions of two transactivators. *EMBO J.*, **19**, 3080-3089.

---

**für meine Eltern**

---

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. Einleitung</b>  | <b>1</b>  |
| 1.1 Gentransfersysteme  | 2         |
| 1.2 Pseudotypisierung umhüllter Viren   | 4         |
| 1.3 c-kit Rezeptor als Marker für die spezifische Retargetierung<br>von pseudotypisierten Viren | 6         |
| 1.4 Das Epstein-Barr Virus  | 8         |
| 1.4.1 EBV und Infektion – die Glykoproteine gp350/220 (BLLF1)<br>und gp85 (BXL2)                | 10        |
| 1.4.2 Maxi-EBV  | 13        |
| 1.5 Aufgabenstellung  | 16        |
| <b>2. Material</b>  | <b>17</b> |
| 2.1 Zelllinien und Bakterien  | 17        |
| 2.2 Plasmide  | 19        |
| 2.3 Oligonukleotide   | 20        |
| 2.4 Antikörper  | 22        |
| 2.5 Enzyme, Chemikalien, Geräte, Sonstiges  | 23        |
| <b>3. Methoden</b>  | <b>25</b> |
| 3.1 Bakterienkultur   | 25        |
| 3.1.1 Vermehrung und Aufbewahrung von Bakterien   | 25        |
| 3.1.2 Transformation und Elektroporation von E. coli  | 25        |
| 3.1.3 Fermentation von E. coli  | 26        |
| 3.2 Zellkultur und Analyse von Zellen   | 27        |
| 3.2.1 Zellkulturbedingungen   | 27        |
| 3.2.2 Aufbewahrung von Zellen   | 27        |
| 3.2.3 Isolierung von CD34-positiven Zellen  | 28        |
| 3.2.4 Transfektion von Zellen und Selektion stabiler<br>Zellklone mit Hygromycin                | 29        |
| 3.2.5 Produktion von infektiösen Viruspartikeln   | 29        |
| 3.2.6 Infektionen von Zellen mit Virusüberständen   | 30        |

---

|           |   |           |
|-----------|---|-----------|
| 3.2.7     | Inhibierung der EBV Infektion.....  | 30        |
| 3.2.8     | Virusaufreinigung und -fraktionierung .....   | 30        |
| 3.2.9     | Immunfluoreszenz-Analysen .....   | 31        |
| 3.2.10    | Bindungsassay.....  | 32        |
| 3.2.11    | FACS-Analyse.....   | 32        |
| 3.2.12    | Elektronenmikroskopie .....   | 33        |
| 3.2.13    | Extraktion zellulärer DNA .....   | 34        |
| 3.3       | DNA-Arbeitstechniken.....   | 34        |
| 3.3.1     | Homologe Rekombination in E. coli zur Konstruktion<br>von Maxi-EBV Mutanten .....                       | 34        |
| 3.3.2     | Präparation von EBV Plasmid-DNA aus E. coli.....  | 36        |
| 3.3.3     | Southern-Blot-Analyse .....   | 37        |
| 3.3.4     | Radioaktive Markierung von DNA .....  | 37        |
| 3.3.5     | PCR-Analysen.....   | 38        |
| 3.3.6     | Plasmidisolierung aus eukaryotischen Zelllinien.....  | 38        |
| 3.4       | RNA-Arbeitstechniken.....   | 38        |
| 3.4.1     | Isolierung von RNA .....  | 38        |
| 3.5       | Protein-Arbeitstechniken .....  | 39        |
| 3.5.1     | Westernblot-Analysen .....  | 39        |
| <b>4.</b> | <b>Ergebnisse.....</b>  | <b>41</b> |
| 4.1       | Konstruktion von EBV Glykoprotein-Nullmutanten in E. coli .....   | 41        |
| 4.1.1     | gp350/220 (BLLF1)-Nullmutante .....   | 42        |
| 4.1.2     | gp85 (BXLF2)-Nullmutante .....  | 43        |
| 4.1.3     | gp350/gp85-Nullmutante.....   | 43        |
| 4.2       | Produktion der gp350- und gp85-negativen EBV Mutanten.....  | 45        |
| 4.2.1     | Etablierung stabiler und permissiver EBV-positiver 293 Zelllinien .....                                 | 45        |
| 4.2.2     | Infektiosität und Komplementierung der EBV<br>Glykoprotein-Nullmutanten.....                            | 48        |
| 4.3       | Charakterisierung der gp350-negativen EBV Mutante .....   | 53        |
| 4.3.1     | gp350 ist für die Infektion und Immortalisierung primärer<br>B-Lymphozyten nicht absolut notwendig..... | 54        |

---

|           |  |           |
|-----------|--|-----------|
| 4.3.2     | gp350-KO-EBV infiziert HLA-Klasse-II-negative Raji Zellen .....  | 56        |
| 4.3.3     | gp350-negatives EBV infiziert verschiedene Epithelzellen.....  | 56        |
| 4.3.4     | CD21 spielt eine Rolle bei der Infektion<br>von 293 Zellen mit Wildtyp-EBV .....   | 57        |
| 4.4       | Pseudotypisierung der gp350-Nullmutante .....  | 62        |
| 4.4.1     | Konstruktion von GFP-gp350 Chimären .....  | 62        |
| 4.2.      | Konstruktion des hSCF-gp350 Fusionsproteins .....  | 64        |
| 4.4.3     | Generierung transient pseudotypisierter Viruspartikel.....   | 66        |
| 4.4.4     | hSCF-vermittelte Infektion von TF-1 Zellen.....  | 68        |
| 4.4.5     | Infektion von CD34 <sup>+</sup> /c-kit <sup>+</sup> -hämatopoetischen Stammzellen .....  | 73        |
| 4.5       | Retargetierung der gp350/gp85-negativen EBV Glykoprotein-<br>mutante mit dem Glykoprotein des "Lymphocytic Choriomeningitis<br>Virus" (LCMV) ..... | 76        |
| <b>5.</b> | <b>Diskussion.....</b>   | <b>80</b> |
| 5.1       | EBV Infektion von B-Zellen und Epithelzellen: ein alternativer<br>Infektionsmechanismus in Abwesenheit von gp350/220 .....                         | 80        |
| 5.2       | Die Rolle von CD21 bei der EBV Infektion von Epithelzellen .....   | 83        |
| 5.3       | Pseudotypisierung von EBV durch einen zellulären Liganden,<br>den humanen Stammzellofaktor (hSCF) .....  | 85        |
| 5.4       | EBV Retargetierung mittels des LCMV Glykoproteins .....  | 90        |
| 5.5       | Ausblick.....  | 91        |
| <b>6.</b> | <b>Zusammenfassung .....</b>   | <b>94</b> |
| <b>7.</b> | <b>Abkürzungen .....</b>   | <b>96</b> |
| <b>8.</b> | <b>Literatur .....</b>   | <b>97</b> |

## 1. Einleitung

Gentherapeutische Ansätze haben zum Ziel, therapeutisch relevante Gene in bestimmte Zielzellen einzuführen. Hauptanwendungsgebiete der Gentherapie sind, neben der Komplementierung genetischer Defekte, die Eliminierung neoplastischer oder durch Mikroorganismen infizierter Zellen. Da Viren eukaryotische Zellen in vivo infizieren und prinzipiell in der Lage sind, einen erfolgreichen Gentransfer durchzuführen, basiert ein Großteil der zur Zeit verwendeten Gentransfermethoden auf viralen Genvektoren. Jedes Virus besitzt sein eigenes Wirtsspektrum, welches durch die spezifische Interaktion zwischen viralen und zellulären Oberflächenrezeptoren bestimmt wird. Dabei variiert das Wirtsspektrum von Viren in seiner Breite. Ein zu breites Wirtsspektrum stellt insofern ein Problem dar, weil es eine selektive Infektion bestimmter Zielzellen unmöglich macht. Andererseits sind für die natürliche Infektion mancher Zelltypen nur wenige oder keine bekannten Viren geeignet. Darunter fallen z. B. hämatopoetische Stammzellen, die für die Gentherapie von großem Interesse sind (siehe auch Kap. 1.3). Um diese Limitationen zu beseitigen, wird versucht, das Wirtsspektrum eines Virus dahingehend zu verändern, daß die Infektion geeigneter Zielzellen spezifisch und effizient erfolgt. Dies kann bei umhüllten Viren durch die Manipulation der die Infektion vermittelnden viralen Glykoproteine erreicht werden. Dieser Prozeß wird Pseudotypisierung genannt (siehe Kap. 1.2).

Das Epstein-Barr Virus besitzt ein relativ enges Wirtsspektrum. Als eines von wenigen Viren infiziert es humane B-Lymphozyten (siehe Kap. 1.4). Für die Konstruktion von B-zellspezifischen Genvektoren ist das ein entscheidender Vorteil, schließt aber zunächst eine Anwendung und Erweiterung auf andere Zielzellen aus. Die vorliegende Arbeit befasst sich deshalb mit der Frage, ob eine Pseudotypisierung des Epstein-Barr Virus (EBV) zur Konstruktion von zellspezifischen Gentransfervektoren möglich ist.



## 1.1 Gentransfersysteme

Die rekombinanten, viralen Vektoren, die heutzutage zur Übertragung von therapeutischen Genen erprobt werden, leiten sich von einigen wenigen Viren ab. Das am häufigsten in klinischen Studien verwendete Gentransfersystem basiert auf retroviralen Vektoren.

Retroviren sind umhüllte Viruspartikel, die zwei Kopien einer linearen, einzelsträngigen RNA von 7 bis 11 kb Größe enthalten. Die einfache Genomstruktur und die überschaubare Anzahl von Genen ermöglicht die Konstruktion von Verpackungszelllinien, welche die Helfer-DNA mit den essentiellen Genen für das Kapsid- und Hüllprotein und die für die Replikation benötigte Polymerase enthalten. Zusätzlich liegt in den Zellen ein Plasmid mit der therapeutischen Expressionskassette und den regulatorischen, viralen cis-Elementen vor. Diese Elemente enthalten unter anderem das Verpackungssignal, welches der Helfer-DNA fehlt, so daß letztere oder die entsprechende RNA nicht in Viruspartikel aufgenommen werden kann. Auf der anderen Seite stellt die Größe des Genoms einen Nachteil dar, da nur bis zu 8 kb Fremd-DNA in die rekombinanten Viruspartikel eingebaut werden kann. Eine weitere Limitation dieses Systems besteht darin, daß die meisten Retroviren nur proliferierende Zellen infizieren, da der Eintritt in den Zellkern die Abwesenheit der Kernmembran erfordert. Dies schließt z. B. die Transduktion von ruhenden Lymphozyten und hämatopoetischen Stammzellen aus. Durch den Einsatz von Lentiviren, einer retroviralen Subgruppe, zu der HIV-1 gezählt wird und welche die Fähigkeit besitzen, ruhende Zellen zu infizieren, kann dieses Hindernis umgangen werden. Beiden retroviralen Systemen ist jedoch gemein, daß die Vektoren, nach reverser Transkription ihres RNA-Genoms in doppelsträngige DNA, ungerichtet ins Genom der Zielzellen integrieren. Das kann z. B. die unerwünschte Aktivierung von zellulären Genen, darunter Onkogenen, zur Folge haben. Ein weiterer Nachteil durch die Integration ins Wirtsgenom besteht in einer eventuellen Inaktivierung des Transgens durch Methylierung.

Zu den weit verbreiteten Gentransfersystemen zählen auch Vektoren, die von Adenoviren und Adeno-assoziierten Viren (AAV) abgeleitet werden, die sich durch ein breites Wirtsspektrum auszeichnen. Die adenoviralen Vektoren sind fast

ausschließlich auf die in der Bevölkerung am weitesten verbreiteten Adenovirus Serotypen 2 und 5 zurückzuführen. Ein Vorteil dieser Vektorsysteme besteht in der hohen Viruskonzentration von bis zu  $10^{13}$  Vektorpartikel/ml, die von den Helferzellen erreicht werden kann. Unter Verwendung eines solchen helferabhängigen Vektorsystems, in dem ein Virus, dem die Verpackungssignale fehlen, alle Gene für die Virusproduktion zur Verfügung stellt, ist es mittlerweile möglich, therapeutische Gensequenzen von bis zu 30 kb in einen adenoviralen Vektor einzubauen. Da die adenoviralen Vektoren nicht ins Genom integrieren, ist es allerdings schwierig, die Dauer der Persistenz und damit der Expression des Transgens in verschiedenen Zelltypen abzuschätzen. Ein Problem beim Einsatz von adenoviralen Vektoren stellt auch immer noch die massive Immunantwort des Wirtes sowie die zelluläre Toxizität dar.

Das Adeno-assoziierte Virus ist ein einzelsträngiges DNA Parvovirus und benötigt für eine produktive Infektion natürlicherweise ein Helfervirus wie z. B. das Adenovirus. Gegenüber anderen viralen Systemen hat AAV den Vorteil der Apathogenität. Allerdings besitzen die AAV-Vektoren nur eine Verpackungskapazität von 5 kb, was die größte Limitation dieses Vektorsystems darstellt. Das Wildtyp-Virus integriert normalerweise bei Vorhandensein des viralen Gens *rep* in einer spezifischen Region auf dem Chromosom 19. Den AAV-Vektoren ist diese Eigenschaft durch Deletion des *rep* Gens verlorengegangen. Es wurde beobachtet, daß die rekombinanten Vektoren entweder eine episomale Expression des Transgens oder eine zufällige chromosomale Integration aufweisen (Übersicht in Glorioso et al., 2001).

Aufgrund ihrer genomischen Größe von 150 bis 200 kb bieten Herpesviren als Gentransfervektoren Vorteile gegenüber anderen viralen Systemen (Hammerschmidt and Sugden, 1988b). Herpesvirale Vektoren besitzen z. B. die Möglichkeit, mehr als 100 kb große DNA-Abschnitte in eine Zelle zu übertragen, was ganze Genloci einschließlich ihrer regulatorischen Elemente beinhalten kann. Herpesviren wie z. B. das Epstein-Barr Virus eignen sich auch für die Übertragung von Genen *in vivo*, da sie die Eigenschaft besitzen, nach der Primärinfektion in einem latenten Zustand in der Zelle zu persistieren. Dabei liegt das virale Genom als extrachromosomales, replizierendes Plasmid in der infizierten Zelle vor, wodurch das Risiko der chromosomalen Integration gering ist. Zusätzlich können die übertragenen Gene

stabil an die Tochterzellen weitergegeben werden. Der episomale Zustand des Plasmids wird im Fall von EBV durch das virale Protein EBNA1 aufrechterhalten, welches an den "origin of replication" (oriP) bindet und die gleichmäßige Verteilung des viralen Episoms gewährleistet (siehe Kap. 1.4 und Übersicht in Scimanti and Calos, 1998; Hammerschmidt, 2000; Glorioso et al., 2001). Die Klonierung des Epstein-Barr Virus Genoms in *E. coli* (siehe Kap. 1.4.2) ermöglichte auch die Etablierung einer Verpackungszelllinie mit einem EBV Helfervirus-Plasmid für EBV abgeleitete Vektoren (Delecluse et al., 1998; Delecluse et al., 1999).

## 1.2 Pseudotypisierung umhüllter Viren

Alle umhüllten Viren erhalten ihre Virushülle einschließlich der darin verankerten Glykoproteine durch Knospung an einer Zellmembran. Der Prozeß, bei dem umhüllte Viren heterologe virale Glykoproteine oder zelluläre Oberflächenmoleküle während der Knospung in ihre Hülle einbauen, wird Pseudotypisierung genannt. Diese "pseudotypisierten Viren" können dadurch entweder das Wirtsspektrum des Virus erwerben, von dem dieses fremdartige Glykoprotein stammt oder durch den Einbau eines zellulären Liganden an die entsprechenden Rezeptoren auf spezifischen Zellen binden.

Die Manipulation des Wirtsspektrums ist für verschiedene Viren beschrieben worden, insbesondere für Retroviren wie das murine Leukämie-Virus (MLV) und Rhabdo- und Adenoviren (Landau et al., 1991; Suomalainen and Garoff, 1994; Douglas et al., 1996). Die Pseudotypisierung kann neben der Inkorporation von heterologen Glykoproteinen auch auf andere Arten erreicht werden, z. B. durch Koinfektion, wie es für das "Moloney Murine Leukemia Virus" (MoMuLV) und einen Vertreter der Rhabdoviren, dem "Vesicular Stomatitis Virus" (VSV), schon früh beschrieben worden ist (Witte and Baltimore, 1977). Eine weitere Möglichkeit zur Veränderung der Selektivität der Infektion besteht darin, die Konstellation von zellulärem Rezeptor und viralem Oberflächenmolekül umzudrehen. Dies ist von zwei Arbeitsgruppen für das Tollwut-Virus (RV) und VSV demonstriert worden. Es wurden Rhabdoviren generiert, bei denen das virale Glykoprotein der Hülle (G Protein) durch den Rezeptor und Korezeptor des HI-Virus ersetzt wurde. Diese rekombinanten Viren konnten somit nur

Zellen infizieren, die mit HIV infiziert waren und HIV-spezifische Oberflächenmoleküle exprimierten (Mebatsion et al., 1997; Schnell et al., 1997). Desweiteren ist die Retargetierung von Viren mit Chimären, die neben Teilen des natürlichen Hüllproteins sogenannte "single-chain Antikörper" (scA) und zelluläre Liganden tragen, beschrieben worden. Durch den Einbau von single-chain Antikörpern gegen den LDL-Rezeptor in die Hüllproteine des MoMuLV konnte z. B. eine spezifische Infektion von Zielzellen, die diesen Rezeptor tragen, erreicht werden (Somia et al., 1995). Für das "Spleen Necrosis Virus" (SNV) ist diese Vorgehensweise z. B. mit scA-Fragmenten gegen den Transferrin-Rezeptor, T-Zell spezifische Oberflächenmoleküle oder den Oberflächenmarker CD34 demonstriert worden (Jiang et al., 1998; Engelstadter et al., 2000). Andererseits scheint dieses System von mehreren, bisher unbekanntem Faktoren abhängig zu sein, da z. B. auf MLV-basierende Vektoren, in die ebenfalls ein scA-Fragment gegen CD34 eingebaut wurde, nur Bindung, aber keine Infektion von CD34-positiven Zellen vermitteln konnten (Benedict et al., 1999). Die Pseudotypisierung durch spezifische Liganden-Rezeptor-Interaktionen ist ebenfalls unter Verwendung von MLV Vektorsystemen untersucht worden. Dabei wurde z. B. ein Fusionsprotein zwischen dem Hormon Erythropoetin (EPO) und Teilen des Hüllproteins (env Protein) des MoMuLV in das Virus inkorporiert, woraufhin dieses rekombinante Retrovirus Zellen, die den EPO-Rezeptor exprimieren, infizieren konnte (Kasahara et al., 1994).

Im Vergleich zu Retroviren ist über eine erfolgreiche Strategie zur Retargetierung von Herpesviren relativ wenig bekannt. Dies hängt unter anderem mit der Größe des Genoms, der Komplexität der Virusstruktur und der Vielzahl an Glykoproteinen zusammen, die Herpesviren exprimieren. Im Fall von Herpes Simplex Virus-1 (HSV-1) ist z. B. die Konstruktion von rekombinanten Viruspartikeln beschrieben worden, die ein Fusionsprotein zwischen dem viralen Glykoprotein gC, das normalerweise die Bindung an Heparansulfat vermittelt, und dem Hormon EPO enthielten. Allerdings wurde, obwohl die Viren an Zellen mit dem entsprechenden Rezeptor für EPO binden konnten, keine produktive Infektion beobachtet (Laquerre et al., 1998a). Die Pseudotypisierung von gD-defizienten HSV-1 Partikeln mit dem G Protein des VSV dagegen zeigte, daß dieses heterologe Glykoprotein sowohl die Adsorption als auch den Eintritt von HSV-1 in bestimmte Zielzellen vermitteln kann. Allerdings war die

Infektionseffizienz im Vergleich zu der Infektion mit Wildtyp stark reduziert (Anderson et al., 2000).

Die Manipulation des Wirtsspektrums von EBV ist bis dato in der Literatur nicht beschrieben worden. Eine Möglichkeit dieses Ziel zu erreichen, liegt im Austausch der EBV spezifischen Glykoproteine, die eine entscheidende Rolle bei der Bindung und dem Eintritt des Virus in die Zelle spielen. Dieser Austausch kann durch andere virale Glykoproteine oder zelluläre, membranständige Liganden erfolgen. Bei den infektionsrelevanten Glykoproteinen von EBV handelt es sich um gp350, das die Adsorption vermittelt und gp85, das für die Fusion der viralen Hülle mit der Wirtszellmembran verantwortlich ist (siehe Kap. 1.4.1).

### **1.3 c-kit Rezeptor als Marker für die spezifische Retargetierung von pseudotypisierten Viren**

Das hämatolymphoide Kompartiment besteht aus Zellen, welche die Blutzelltypen repräsentieren. Die unterschiedlichen Zelltypen lassen sich alle auf die sogenannten pluripotenten, hämatopoetischen Stammzellen (HSC) zurückführen. Diese Stammzellen besitzen die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und sind in der Lage, in alle verschiedenen Blutzellen zu differenzieren. Außerdem wurde gezeigt, daß die HSC diese Eigenschaften auch nach erfolgter ex vivo Manipulation beibehalten. Deshalb stellen die HSC ein attraktives Ziel für gentherapeutische Anwendungen dar, durch die angeborene oder erworbene Krankheiten des Immunsystems und des hämatopoetischen Systems korrigiert werden sollen. Theoretisch könnten einzelne Krankheiten, die die Funktion von reifen Blutzellen der unterschiedlichen Zelllinien betreffen, durch die Einführung eines defekten oder fehlenden Gens in hämatopoetische Stammzellen beeinflußt oder korrigiert werden. Dies wurde mittlerweile unter anderem an Krankheiten wie dem Adenosindeaminase-Mangel (ADA), der Gaucher-Krankheit und Krebs erprobt. Im Fall von Brustkrebspatientinnen wurden z. B. hämatopoetische Stammzellen, die mit einem retroviralen Vektor für das "multidrug resistance" Gen (mdr-1) transduziert worden waren, eingesetzt. Ziel war es, die Überlebensfähigkeit der transduzierten, blutzellbildenden Stammzellen bei einer Chemotherapie zu erhöhen (Cowan et al., 1999).

Der genaue Phänotyp der humanen HSC ist bis heute nicht vollständig charakterisiert. Allerdings enthält humanes Nabelschnurblut sowie Knochenmark CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup>-Zellen, eine Subpopulation von pluripotenten Vorläuferzellen, die in vivo die Fähigkeit zur Rekonstitution des hämatopoetischen Gewebes nach einer Knochenmarktransplantation besitzen (Asahara et al., 2000). Es wurde gezeigt, daß ca. 60-76% dieser CD34-positiven Zellen c-kit (CD117) koexprimieren (Reisbach et al., 1993; Simmons et al., 1994). Das c-kit Molekül ist ein 145 kDa Transmembranprotein und gehört zur Familie der Tyrosinkinase-Rezeptoren, zu der z. B. auch der "Platelet-derived growth factor" (PDGF) Rezeptor und der "colony-stimulating factor 1" (CSF-1) gezählt wird (Yarden et al., 1987). Der c-kit Rezeptor ist sehr stark auf unreifen, CD34-positiven Zellen, die auch Stammzellen einschließen, exprimiert und kann deshalb als Zielmolekül für eine spezifische Infektion von HSC dienen. Im Laufe der myeloischen und B-lymphoiden Differenzierung verringert sich das Expressionsniveau des c-kit Rezeptors, während es in frühen Stadien der Erythropoese maximale Werte annimmt (Wognum et al., 1996). Die Expression von CD117 ist auch mit Leukämien wie z. B. AML (acute myeloid leukemia) assoziiert worden (Escribano et al., 1998).

Der Ligand des c-kit Rezeptors ist der sogenannte Stammzellfaktor (SCF), auch als kit-Ligand (KL) bezeichnet (Zsebo et al., 1990a; Zsebo et al., 1990b). Dieser Wachstumsfaktor spielt unter anderem eine Rolle in frühen Stadien der hämatopoetischen Entwicklung sowie bei der Proliferation und Reifung von Mastzellen. SCF existiert sowohl in membrangebundener Form von 248 und 220 Aminosäuren Länge als auch in löslicher Form mit einem Rest von 165 Aminosäuren. Dies ist das Resultat von alternativen Spleißvorgängen und proteolytischen Spaltungen (siehe Übersicht in Galli et al., 1994; Broudy, 1997). Die lösliche Form liegt als nicht kovalent gebundenes Homodimer vor. Ob dies auch der Fall für die membranassoziierte Form des SCF ist, ist nicht bekannt. Die N-terminalen 141 Aminosäuren des Liganden wurden als der funktionale Bereich des Proteins identifiziert, der die Dimerbildung und die Bindung sowie die Aktivierung des c-kit Rezeptors vermittelt (Langley, 1994). Die Bindung von SCF führt, wie es auch für andere Tyrosinkinase-Rezeptoren bekannt ist, zur Dimerisierung von c-kit, was wiederum die Autophosphorylierung des Rezeptors und eine Aktivierung von

intrazellulären Signaltransduktionswegen zur Folge hat. Zusätzlich vermittelt die Bindung des Stammzellokals auch die rasche Internalisierung des Ligand-Rezeptor-Komplexes durch Endozytose.

#### 1.4 Das Epstein-Barr Virus

Das Epstein-Barr Virus (EBV) gehört zur Familie der Herpesviridae, die aufgrund ihrer Pathogenität, der Zelltypen, die sie infizieren und ihrer Vermehrungseigenschaften in drei Unterfamilien ( $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Herpesviren) eingeteilt werden. Das Epstein-Barr Virus wird in die Unterfamilie der  $\gamma_1$ -Herpesviren eingeordnet, die sich durch ein sehr enges Wirtsspektrum auszeichnen. Ein charakteristisches Merkmal aller Herpesviren ist ihre Fähigkeit, nach der Primärinfektion im infizierten Wirt lebenslang in einem latenten Zustand ohne Bildung infektiöser Partikel zu persistieren. In diesem Zustand liegt das Genom als episomales Plasmid in der Zelle vor. Das EBV Genom besteht aus linearer, doppelsträngiger DNA mit einer Größe von 172 kb und kodiert für etwa 90 verschiedene Proteine.

Der Lebenszyklus des EBV weist wie der anderer Herpesviren zwei verschiedene Phasen, eine lytische und eine latente Phase, auf. Die Primärinfektion mit EBV erfolgt über Epithelzellen des Nasen-Rachenraumes und ist gekennzeichnet durch lytische DNA-Replikation, Expression nahezu aller viraler Gene, Virusproduktion und Lyse der befallenen Zellen. Meist erfolgt die Infektion bereits im frühen Kindesalter und verläuft ohne klinische Symptome. Findet der Kontakt mit EBV jedoch im frühen Erwachsenenalter oder später statt, kann sich dieser in einer infektiösen Mononukleose (IM) manifestieren. Diese akute Phase der Infektion geht mit einer massiven Proliferation der B-Lymphozyten einher, die zu einer starken T-Zellaktivierung und damit zu den klinischen Symptomen der IM führt.

Im weiteren Verlauf der Infektion werden B-Zellen infiziert, in denen das Virus in die latente Phase seines Lebenszyklus wechselt. Es werden nur noch wenige latente virale Gene exprimiert, das EBV Genom liegt als extrachromosomales Plasmid vor und wird zusammen mit dem zellulären Genom repliziert und an die Tochterzellen weitergegeben. Das viral kodierte Protein EBNA1 (EBV-nukleäres Antigen 1) bindet

an den Ursprung der latenten Replikation oriP und ist dafür verantwortlich, daß das virale Genom in latent infizierten Zellen als Episom erhalten bleibt. Die gleichmäßige Verteilung des viralen Episoms während der Mitose wird höchstwahrscheinlich durch die Interaktion von EBNA1 mit Chromatin gewährleistet (Yates et al., 1985; Wu et al., 2000). In diesem latenten Zustand kann das Virus lebenslang in B-Zellen des Wirts persistieren, ohne Krankheitssymptome auszulösen. Eine charakteristische Eigenschaft des Virus besteht auch in seiner Fähigkeit, ruhende B-Zellen zu unbegrenztem Wachstum anzuregen. In vitro bewirkt eine EBV Infektion die Umwandlung primärer B-Zellen zu permanent proliferierenden lymphoblastoiden Zelllinien (LCL). In vivo werden solche EBV-infizierten B-Zellen normalerweise sehr effizient durch das Immunsystem eliminiert, ohne daß es zu einer lymphoproliferativen Erkrankung kommt. In Fällen einer geschwächten Immunabwehr wie z. B. durch eine HIV-Infektion oder nach einer Organ- oder Knochenmarkstransplantation kann EBV jedoch an der Entstehung von Tumoren beteiligt sein. So findet man das EBV Genom bei mindestens drei Krebsarten beim Menschen, dem Burkitt-Lymphom, dem Morbus Hodgkin und dem Nasopharynxkarzinom (zur Übersicht siehe Rickinson and Kieff, 1996).

In seltenen Fällen kann es zu einer Reaktivierung von EBV kommen. Die Mechanismen, die in vivo in latent infizierten Zellen zu einer Induktion des lytischen Zyklus führen, sind nicht bekannt. Während in der latenten Phase nur wenige Gene zur Erhaltung des Genoms exprimiert sind, kommt es in der produktiven Phase zu einer sequentiellen Aktivierung lytischer Gene, die nach der Reihenfolge des Auftretens ihrer Genprodukte als sehr frühe (immediate-early), frühe (early) und späte (late) Gene bezeichnet werden. Immediate-early Gene sind im allgemeinen Transkriptionsfaktoren, die alle nachfolgenden lytischen Gene direkt oder indirekt induzieren. Von zentraler Bedeutung für die Umschaltung in den lytischen Zyklus ist das virale Genprodukt BZLF1. Dieser Transaktivator bindet an oriLyt, den Replikationsursprung, von dem aus die Replikation des EBV Genoms in der lytischen Phase erfolgt (Countryman and Miller, 1985; Hammerschmidt and Sugden, 1988a). Ein weiterer Transaktivator des lytischen Zyklus ist BRLF1 (Ragoczy et al., 1998). Beide Proteine sind essentiell für die lytische DNA-Replikation, die aber, wie bisher angenommen, keine Voraussetzung für die Expression der lytischen Gene zu sein



scheint. So konnte z. B. gezeigt werden, daß BRLF1 die Expression des Glykoproteins gp350 ohne stattfindende DNA-Replikation induziert (Feederle et al., 2000).

#### **1.4.1 EBV und Infektion – die Glykoproteine gp350/220 (BLLF1) und gp85 (BXLF2)**

Wie schon im vorherigen Kapitel erwähnt, kann EBV reife B-Lymphozyten infizieren und immortalisieren. Weiterhin ist beobachtet worden, daß EBV auch pre-B-Zellen infiziert, die zu lymphoblastoiden Zelllinien auswachsen können (Gregory et al., 1987). Ebenso lassen sich fötale, lymphoide Knochenmarkzellen, die den frühen B-Zellmarker CD19 tragen, mit EBV infizieren. Eine der daraus resultierenden CD19-positiven Zelllinien wies zusätzlich eine Expression des Stammzellmarkers CD34 auf (Panzer-Grumayer et al., 1993). Das Wirtsspektrum von EBV ist jedoch nicht allein auf B-Zellen beschränkt, da z. B. die Primärinfektion von EBV in vivo in Epithelzellen stattfindet. Das virale Genom ist auch in einer Reihe von humanen Karzinomen, wie dem Nasopharynxkarzinom und dem Magenkarzinom identifiziert worden (Miller, 1990). Da die Infektion von Epithelzellen in vitro allerdings nicht sehr effizient erfolgt, gab es bisher nur wenige Studien über diesen Infektionsweg. In neuerer Zeit ist jedoch vermehrt von einer erfolgreichen Infektion sowohl von etablierten Epithelzelllinien als auch von primären gastrischen Zellen berichtet worden. Dabei erwies sich die Kokultivierung von EBV-positiven Zellen mit den zu infizierenden Epithelzellen als hilfreich (Yoshiyama et al., 1997; Imai et al., 1998).

Die Hülle des Epstein-Barr Virus enthält wie auch die Hüllen anderer Herpesviren mehrere Glykoproteine, denen verschiedene Aufgaben bei der Bindung und beim Eintritt in die Wirtszelle sowie bei der Reifung des Virus zugeschrieben werden. Ein Großteil der Glykoproteine findet sich als Homologe bei verschiedenen Vertretern der Herpesvirus-Familie wieder, während andere Glykoproteine nur bei bestimmten Mitgliedern vorkommen, wo sie vermutlich eine spezifische Rolle für die Infektion und den Tropismus spielen. Die Tabelle 1.1 zeigt eine Übersicht der neun bekannten EBV Glykoproteine mit ihren verschiedenen Funktionen. Eine Ausnahme stellt gp125/110 dar, da es sehr wahrscheinlich nicht in der Hülle von reifen Viruspartikeln

vorkommt. Alle EBV Glykoproteine werden von lytischen Genen kodiert, die nach dem Eintritt des Virus in den lytischen Lebenszyklus induziert werden.

| Glykoproteine (Gene) | Funktion  |
|----------------------|---|
| gp350/220 (BLLF1)    | Bindung an CD21   |
| gp85 (BXLF2)         | essentiell für Membranfusion; Bindungsaktivität (?)           |
| gp25 (BKRF2)         | Chaperon für gp85; Membranfusion                              |
| gp42 (BZLF2)         | Interaktion mit HLA-Klasse-II-Molekülen                       |
| gp125/110/gB (BALF4) | essentiell für lytische Replikation                           |
| gp78 (BILF2)         | nicht bekannt   |
| gN (BLRF1)           | Freisetzung der Kapside aus dem Kern;<br>Prozessierung von gM |
| gM (BBRF3)           | Interaktion mit gN; genaue Funktion nicht bekannt             |
| gp150 (BDLF3)        | Deletion verstärkt Infektion von Epithelzellen                |

**Tab. 1.1** : Glykoproteine des Epstein-Barr Virus

Ein für EBV charakteristisches Glykoprotein ist gp350/220, das Genprodukt des BamHI L DNA-Fragmentes des B95.8 Stammes (Biggin et al., 1984; Hummel et al., 1984). Das Protein gp220 stellt ein Splicingprodukt des gp350 Proteins innerhalb desselben Leserasters dar (Beisel et al., 1985). Gp350 ist ein 907 Aminosäuren großes Typ I Transmembranprotein, das im Endoplasmatischen Retikulum (ER) synthetisiert wird. Anschließend wird das Protein zum Golgi-Apparat transportiert, wo die vollständige Prozessierung und Glykosylierung erfolgt. Gp350 fungiert als Ligand für CD21, den Rezeptor für EBV auf B-Zellen. Parallel dazu dient CD21 als Rezeptor für das Cd3 Molekül, ein Mitglied der Komplementkaskade (Fingerroth et al., 1984; Nemerow et al., 1985). Die Infektion von B-Lymphozyten wird durch die Bindung der

N-terminalen Region (Aminosäuren 21-29) von gp350 an CD21 initiiert (Nemerow et al., 1987; Nemerow et al., 1989). Das gp350 Glykoprotein vermittelt dabei nicht nur die Adsorption an CD21, sondern scheint auch die Endozytose des Virus in B-Lymphozyten zu induzieren (Tanner et al., 1987). Wie schon erwähnt, ist EBV auch in der Lage, Epithelzellen zu infizieren. Da EBV Epithelzellen in vitro jedoch nur unzureichend infizieren kann, ist relativ wenig über den Mechanismus der Infektion dieser Zellen bekannt. Die Rolle von CD21 als EBV Rezeptor auf Epithelzellen ist dabei unterschiedlich bewertet worden. Es gibt z. B. sowohl Berichte über einen CD21-abhängigen als auch einen CD21-unabhängigen Infektionsweg in 293 Zellen, einer Nierenkarzinomzelllinie (Imai et al., 1998; Fingerroth et al., 1999). Letzteres deutet auf die Existenz eines zweiten EBV Rezeptors auf Epithelzellen hin, der entweder von gp350 oder von einem anderen EBV Protein erkannt werden könnte.

Gp350 ist das am häufigsten in der Hülle von EBV vorkommende Glykoprotein und stellt das Hauptantigen dar, welches für die Produktion von neutralisierenden Antikörpern in vivo verantwortlich ist (Thorley-Lawson and Poodry, 1982). Den Hauptanteil von gp350 findet man in der Plasmamembran von infizierten, virusproduzierenden Zellen (Mueller-Lantzsch et al., 1980; Edson and Thorley-Lawson, 1981; Gong and Kieff, 1990). Im Gegensatz zu anderen Glykoproteinen wie z. B. gp125/110 (siehe Tabelle 1.1), konnte für das reife gp350 Protein keine Kernmembranlokalisation nachgewiesen werden. Diese Analysen deuten darauf hin, daß umhülltes EBV nach erster Knospung durch die Kernmembran mit Vesikelmembranen fusioniert. Dadurch gelangen Nukleokapside ins Zytoplasma, die anschließend durch Knospung an der Plasmamembran ihre endgültige Virushülle erhalten (Gong and Kieff, 1990).

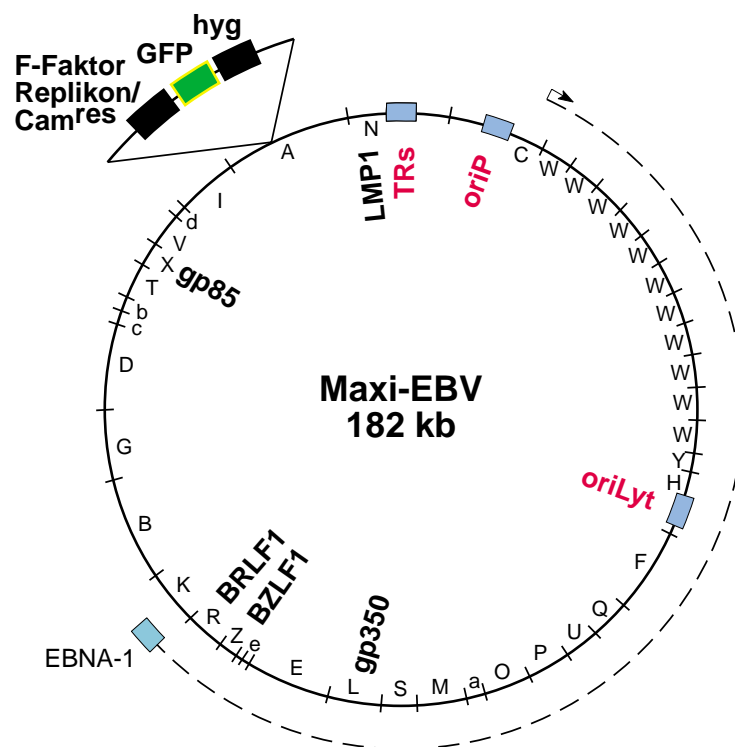
Zu den konservierten Glykoproteinen der Familie der Herpesviren zählen unter anderem die Glykoproteine gH und gL. Sie gehören zu einem Multiproteinkomplex, der bei allen Herpesviren zu finden ist und eine Rolle bei der Penetration des Virus in die Zelle spielt. Das Glykoprotein gH scheint dabei für die Fusion der Virushülle mit der Zellmembran essentiell zu sein (Keller et al., 1987; Cranage et al., 1988; Miller and Hutt-Fletcher, 1988; Fuller et al., 1989; Liu et al., 1993). Zusätzlich wird gL für die Faltung und den Transport von gH aus dem Endoplasmatischen Retikulum heraus benötigt (Hutchinson et al., 1992; Kaye et al., 1992). Die gH und gL

Homologe des Epstein-Barr Virus sind gp85, das Produkt des BXLF2 Leserahmens (Heineman et al., 1988; Miller and Hutt-Fletcher, 1988; Oba and Hutt-Fletcher, 1988; Haddad and Hutt-Fletcher, 1989) und gp25, das Produkt des BKRF2 Leserahmens (Yaswen et al., 1993). Der gp85/gp25-Komplex von EBV beinhaltet daneben noch ein weiteres Protein, gp42, das vom BZLF2 Leserahmen kodiert wird (Li et al., 1995). Dieses Molekül kann mit HLA-Klasse-II-Molekülen interagieren, die als Korezeptoren für den Eintritt von EBV in B-Zellen beschrieben worden sind (Spriggs et al., 1996; Li et al., 1997). Nachdem für den gp85/gp25/gp42-Komplex gezeigt wurde, daß er eine entscheidende Rolle bei der Penetration in B-Zellen spielt (Haddad and Hutt-Fletcher, 1989; Li et al., 1995), weisen neuere Arbeiten auch auf eine Bindungsaktivität des gp85 Glykoproteins bei Epithelzellen hin (Molesworth et al., 2000; Oda et al., 2000).

#### **1.4.2 Maxi-EBV**

Die Voraussetzung für die genetische Manipulation beliebiger EBV Proteine wurde durch die Klonierung des gesamten EBV Genoms geschaffen (Delecluse et al., 1998). Durch den Einbau eines prokaryotischen F-Plasmids und dem Chloramphenicol-Resistenzgen in das EBV Genom war es möglich, das Genom in *E. coli* zu klonieren. Zusätzlich wurden auch das Gen für das grün fluoreszierende Protein (GFP) unter der Kontrolle des CMV-Promotors und das Hygromycin-Resistenzgen in das EBV Genom eingeführt (Abb. 1.1). Diese Gene erlauben eine Selektion von Zellen, die das rekombinante, sogenannte "Maxi-EBV" tragen und deren einfache Identifizierung über die GFP-vermittelte Fluoreszenz. Da die Expression von GFP den Transport des viralen Genoms in den Kern erfordert, kann die GFP Fluoreszenz als Indikator für eine erfolgreiche Infektion mit EBV angesehen werden. Eine unzureichende GFP Expression in den Zielzellen kann jedoch zu einer Unterschätzung der Anzahl infizierter Zellen führen. Es ist z. B. bekannt, daß der CMV-Promotor keine optimale Lösung für die Genexpression in primären Vorläuferzellen darstellt. Anhand der GFP Expression in infizierten Zellen kann keine Aussage über virale Funktionen und die Expression viraler Proteine gemacht werden.

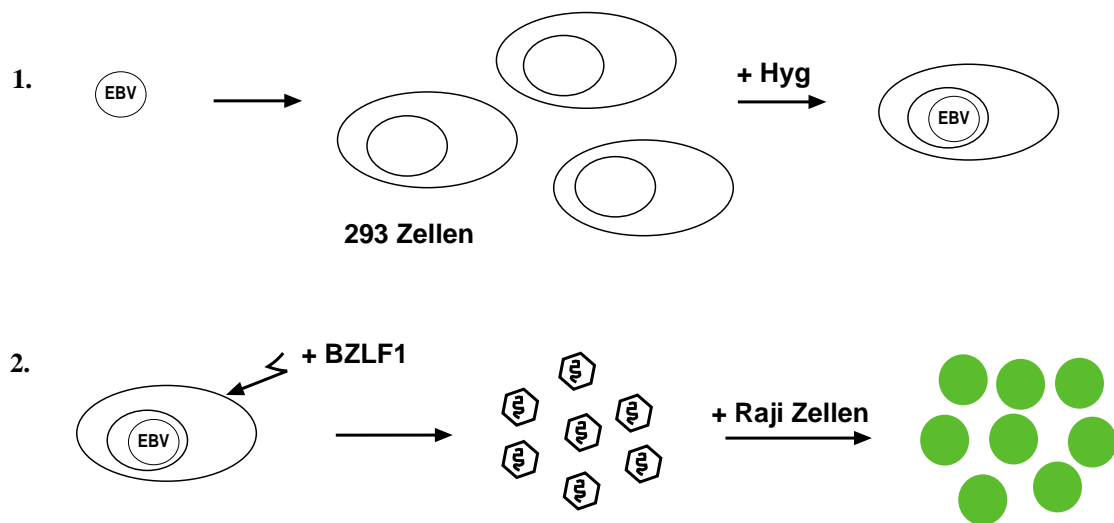
Das EBV Plasmid besitzt die Fähigkeit, sowohl in *E. coli* als auch in eukaryotischen Zellen zu replizieren. Nach Infektion von primären, menschlichen B-Zellen mit dem Maxi-EBV konnte gezeigt werden, daß das rekombinante Virus alle Eigenschaften des Wildtyp-EBVs besitzt und effizient B-Zellen immortalisieren kann (Delecluse et al., 1998).



**Abb. 1.1 : Karte des Maxi-EBV Plasmids.** Das Plasmid pMBO131, welches den Replikationsursprung des F-Faktors, die Gene für die Chloramphenicol- und Hygromycin-Resistenz (hier als Cam<sup>res</sup> und hyg bezeichnet) sowie die verstärkte Version des "green fluorescent protein" (GFP) trägt, wurde in das EBV Genom in B95.8 Zellen eingeführt (Delecluse et al., 1998). Die Plasmid-DNA aus hygromycinresistenten B95.8 Zellklonen wurde anschließend in *E. coli* transformiert. Unter anderem zeigt die Plasmidkarte die Position der Gene gp350/220 (BLLF1) und gp85 (BXLF2).

Dieses System erlaubt die Konstruktion von Virusmutanten via homologer Rekombination in *E. coli*. Nach Transfektion der aus Bakterien gewonnenen, mutierten EBV Plasmid-DNA in 293 Zellen können Zellklone selektioniert werden, die das rekombinante EBV Plasmid als extrachromosomale Kopie tragen. Durch transiente Expression des Transaktivators BZLF1, der die lytische Phase von EBV

einleitet, ist es möglich, Viruspartikel zu produzieren, die das mutierte virale EBV Genom tragen. Damit sind die viralen Glykoproteine wie auch alle anderen Gene von EBV einer genetischen Analyse erstmals zugänglich geworden. Die Infektiosität der generierten, rekombinanten Viruspartikel kann durch Infektion von z. B. Raji Zellen, einer Burkitt-Lymphom Zelllinie, getestet werden (siehe Abb. 1.2).



**Abb. 1.2 : EBV Verpackungssystem.** Für die Etablierung von latent EBV-infizierten Zelllinien wird die Maxi-EBV DNA (Wildtyp oder Mutante) in 293 Zellen transfiziert und diese auf Hygromycin-Resistenz selektioniert (1.). Die EBV-positiven Zellklone werden durch Transfektion eines Expressionsplasmids für BZLF1 auf ihre Fähigkeit getestet, den lytischen Zyklus von EBV zu unterstützen. Die Analyse der Infektiosität der generierten Virusüberstände kann über die GFP Expression in Zielzellen, z. B. Raji Zellen, erfolgen (2.).

## 1.5 Aufgabenstellung

Im Rahmen meiner Arbeit sollte untersucht werden, ob eine Manipulation bzw. die selektive Erweiterung des EBV Wirtsspektrums zur Infektion gentherapeutisch relevanter Zellen möglich ist. Dazu sollten die für die natürliche Infektion entscheidenden Glykoproteine von EBV funktionell ausgeschaltet werden und durch heterologe Glykoproteine oder zelluläre Liganden, die den Eintritt in spezifische Zielzellen vermitteln, ersetzt werden.

Der experimentelle Ansatz beinhaltete die Konstruktion von Maxi-EBV Mutanten, die Nullmutationen in den Glykoproteinen gp350 und gp85 tragen. Zusätzlich sollte eine Variante mit einem doppelten "knockout" (KO) beider Gene generiert werden. Anschließend sollten diese rekombinanten Virusmutanten hinsichtlich ihrer Infektiosität charakterisiert werden. Um eine Retargetierung des Epstein-Barr Virus zu erreichen, sollten zwei Strategien verfolgt werden. Zum einen kam in Betracht, Fusionsproteine mit infektionsrelevanten Liganden, wie z. B. dem humanen Stammzellfaktor zur Infektion von hämatopoetischen Stammzellen, auf der Basis des gp350 Glykoproteins in die Virushülle der EBV gp350-Mutante einzubauen. Dadurch sollte das rekombinante Virus die Fähigkeit erhalten, an den entsprechenden spezifischen Rezeptor zu binden, über den der Eintritt in die Zelle erfolgen kann. Da über die Funktion bestimmter Proteinabschnitte des gp350 Glykoproteins relativ wenig bekannt ist, sollten zunächst GFP Fusionsproteine zur Identifizierung von Domänen, die für eine korrekte Prozessierung und den Transport des Proteins zur Plasmamembran notwendig sind, getestet werden.

Ein zweiter Ansatz zur Pseudotypisierung von EBV sah vor, heterologe Glykoproteine von z. B. Retroviren einzusetzen. Im Zusammenhang mit der Doppelknockout-Mutante von EBV sollte geklärt werden, inwieweit alternative Glykoproteine in die Hülle von EBV eingebaut werden und somit die zwei Funktionen der Bindung und der Membranfusion übernehmen können.

## 2. Material

### 2.1 Zelllinien und Bakterien

Sämtliche verwendete prokaryotische bzw. eukaryotische Zellkulturen stammen, wenn nicht anders vermerkt, aus der Sammlung der Abteilung für Genvektoren (W. Hammerschmidt) der GSF, München.

#### Zelllinien

|                          |  |
|--------------------------|--|
| 293                      | humane embryonale Nierenepithelzelllinie, die durch Einführung der E1a und E1b Gene von Adenovirus Typ 5 transformiert wurde (Graham et al., 1977)   |
| Raji                     | humane EBV-positive Burkitt-Lymphom Zelllinie (Pulvertaft, 1964)   |
| Raji 2.2.5               | immunselektierte Mutante der Raji Zelllinie, die aufgrund einer Deletion im CIITA-Gen keine HLA-Klasse-II-Antigenexpression zeigt (Accolla, 1983; Koch et al., 1988)   |
| pBLs                     | primäre B-Lymphozyten wurden aus Leukozytenkonzentrat vom Bayerischen Roten Kreuz über einen Ficoll-Gradienten aufgereingt; die T-Zellen wurden dabei durch Zugabe von Schafererythrozyten abgetrennt (Zeidler et al., 1996) |
| HaCat                    | immortalisierte humane Keratinozytenzelllinie, die Mutationen in den Allelen des p53 Gens trägt (Boukamp et al., 1988; Lehman et al., 1993)  |
| HEp-2                    | humane Larynxkarzinomzelllinie (ATCC)  |
| HeLa                     | humane Zervixkarzinomzelllinie (ATCC)  |
| Vero                     | Nierenzellen der afrikanischen Meerkatze (Rhim et al., 1969)   |
| BHK                      | Hamsternierenzelllinie (Jarrett and Macpherson, 1968)  |
| TF-1                     | humane erythroleukämische Zelllinie (Kitamura et al., 1989)  |
| 293-B95.8/F<br>(2089-31) | durch Transfektion von 293 Zellen mit dem rekombinanten EBV Genom auf der Basis eines bakteriellen F-Faktor-Plasmids (Maxi-EBV) generierte Zelllinie; das Maxi-EBV kodiert zusätzlich  |



|                                   |   |
|-----------------------------------|---|
|                                   | für die Markergene Hygromycin und GFP unter der Kontrolle eines konstitutiven Promotors (CMV) (Delecluse et al., 1998)  |
| 293-gp350-KO<br>(2367.8)          | von 293 Zellen abgeleitete Zelllinie, die episomal das Maxi-EBV mit einem funktionellen knockout im gp350/220 (BLLF1) Gen trägt   |
| 293-gp85-KO<br>(2233.H)           | EBV-positive 293 Zelllinie, die durch Transfektion mit dem Maxi-EBV, das eine Deletion im gp85 (BXL2) Gen enthält, generiert wurde  |
| 293-gp350/<br>gp85-KO<br>(2243.F) | EBV-positive 293 Zelllinie, die das Maxi-EBV mit einem doppelten knockout in den Genen gp350 und gp85 trägt<br>(für die Konstruktion der einzelnen EBV Mutanten siehe Kap. 3.3.1) |

#### Bakterien

|                     |   |
|---------------------|---|
| E.coli DH5 $\alpha$ | F-, lacI-, recA1, endA1, hsdR17, $\Delta$ (lacZYA-argF), U169, F80dlacZ $\Delta$ M15, supE44, thi-1, gyrA96, relA1 (Hanahan, 1985)  |
| E. coli DH10B       | F-, mcrA, $\Delta$ (mrr-hsdRMS-mcrBC), $\Phi$ 80dlacZ $\Delta$ M15, $\Delta$ lacX74, deoR, recA1, endA1, araD139, $\Delta$ (ara, leu)7697, galU, galK, $\lambda$ -, rpsL, nupG (GibcoBRL) |
| E. coli BJ5183      | F-, endA, sbcB-, recBC-, galK, met-, str <sup>R</sup> , thi-1, bioT, hsdR (r <sub>K</sub> -, m <sub>K</sub> +), $\lambda$ - (Hanahan, 1983)   |

## 2.2 Plasmide

Die im Rahmen meiner Arbeit verwendeten Plasmide wurden meist durch mehrere Klonierungsschritte unter Verwendung üblicher Klonierungstechniken (Sambrook et al., 1989) konstruiert. Einige dieser Plasmide waren 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 der Plasmid-Datenbank der Arbeitsgruppe W. Hammerschmidt (GSF-Forschungszentrum, Abteilung Genvektoren, München) wieder.

|        |  |
|--------|--|
| p509   | pCMV:BZLF1 (Hammerschmidt and Sugden, 1988a)   |
| p58.20 | Clal-H Fragment (B95.8 Nukleotidkoordinaten #88247 to #93260)  |
| p1902  | Clal-D Fragment (B95.8 Nukleotidkoordinaten #133,435-#148547)  |
| p2089  | Maxi-EBV: F-Plasmid (pMBO131) mit eGFP Gen und Hygromycin-Resistenzgen in B95.8 DNA (Delecluse et al., 1998) |
| p2192  | p58.20 mit Tetracyclin-Resistenzgen (Deletion der EBV Koordinaten #90263-#91916)                             |
| p2209* | Subklon von p1902 in pcDNA3.1+ (#139017-#144722)   |
| p2210* | 2209 mit Kanamycin-Resistenzgen (Deletion der Koordinaten #141759-143227)                                    |
| p2367* | p2089 (Maxi-EBV) mit knockout im gp350 Gen, Insertion des Tetracyclin-Resistenzgens                          |
| p2233* | p2089 (Maxi-EBV) mit knockout im gp85 Gen, Insertion des Kanamycin-Resistenzgens                             |
| p2243* | p2089 (Maxi-EBV) mit knockout im gp350 und gp85 Gen  |
| p2303* | gp350-Gen mit natürlichem Promotor (in pBluescript)  |
| p2341* | As 1-20 (Signalpeptid) von gp350 in peGFP-C1 (N-terminal des GFP Gens)                                       |
| p2344* | As 630-907 von gp350 in peGFP-C1 (C-terminal des GFP Gens)   |
| p2362* | As 1-20 von gp350 in p2344   |
| p2385* | CMV:gp350; Expressionsplasmid für gp350 in pcDNA3.1(+) mit Kozak-Sequenz                                     |
| p2386* | As 466-907 (letzten 441 Aminosäuren) von gp350 in p2341  |

|           |   |
|-----------|---|
| p2387*    | As 751-907 (letzten 156 Aminosäuren) von gp350 in p2341   |
| p2399*    | gp350 Gen ohne Signalpeptid ( $\Delta$ As 1-20) in p2341  |
| p2411*    | As 466-907 von gp350 in pcDNA3.1(+) (1. Teil des hSCF Fusionsproteins)  |
| p2416*    | As 1-187 (25 As Signalpeptid + 162 As) des humanen SCF (mit Kozak-Sequenz) in p2411 (Fusionsprotein mit gp350 Anteil) |
| p2439*    | CMV:gp85, Expressionsplasmid für gp85 in pcDNA3.1(+) mit Kozak-Sequenz  |
| p2479*    | Subklon von p2416 in pRK5; CMV:hSCF-gp350   |
| p2670     | CMV:BALF4; Expressionsplasmid für BALF4 (gp125/110)   |
| pM108     | CMV:LCMV-GP; Expressionsplasmid für LCMV-GP (Winfried Beyer, Heinrich-Pette-Institut, Hamburg)                        |
| peGFP-C1  | Clontech, Palo Alto, USA  |
| pcDNA3.1+ | Invitrogen Corp., San Diego, USA  |
| pRK5      | CMV:Expressionsplasmid (Schall et al., 1990)  |

### 2.3 Oligonukleotide

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

- Verwendete Primer für die Amplifikation des 3'-Endes von gp350 (As 751-907):

5'BLLF1chimer(last156aa): GATATCACGCCCCCCCCAAAATGCAACGTCG

3'BLLF1chimer: GTTTAAACTTATACATAGGTCTCGGCGTCATC

- Primer für die Amplifikation des 3'-Endes von gp350 (As 630-907):

5-C-termgp350: GCGATATCGTTTAAACTCTTAGGAGGAACAAGTCCCACC

3-C-termgp350: CTGATATCTACATAGGTCTCGGCGTCATCATATGGTGGG

- Primer für die Amplifikation des 3'-Endes von gp350 (As 446-907):

5'BLLF1chimer: GATATCGTTAACCCCACTGTATCCACCGCGGATGTC

3'BLLF1chimer: AAATTATACATAGGTCTCGGCGTCATCATA

- Primer für das 5'-Ende (As 1-20) von gp350:

5'signalgp350:

GGAGCTAGCGCCACCATGGAGGCAGCCTTGCTTGTGTGTCAGTACACCATCCA

GAGCCTGATCCATCTCACGGGTGGGCTAGCGGA

3'signalgp350:

TCCGCTAGCCCACCCGTGAGATGGATCAGGCTCTGGATGGTGTACTGACACAC

AAGCAAGGCTGCCTCCATGGTGGCGCTAGCTCC

- Primer für die Amplifikation von gp350 ohne Signalpeptid (5'-Ende):

5'BLLF1w/osignal: GGAAGATCCTGGTTTTTTCAATGTT

3'gp350new: TACATAGGTCTCGGCGTCATC

- Primer für die Klonierung des gp350 Gens in pcDNA3.1(+):

5'gp350Kozak: GCCACCATGGAGGCAGCCTTGCTTGTG

3'gp350new+stop: TTATACATAGGTCTCGGCGTCATC

- Primer für die Klonierung des gp85 Gens in pcDNA3.1(+):

5'gp85express: GCCACCATGCAGTTGCTCTGTGTTTTT

3'gp85express: CTAAAGGAAAAACATAACAAT

- Verwendete Primer für die Amplifikation der N-terminalen 187 Aminosäuren (162 As und 25 As Signalpeptid) des humanen Stammzellfaktors (hSCF) aus der Melanomzelllinie MelJuso (cDNA von Dr. Mailhammer, Institut für experimentelle Hämatologie, GSF):

5'hSCF1-162aa: ATCGCCACCATGAAGAAGACACAAACTTGGATT

3'hSCF1-162aa: ATCAGGGGGTAACATAAATGGTTTTGT

- Primer für die RT-PCR zum Nachweis CD21-spezifischer Transkripte; Amplifikation von Sequenzen innerhalb der "short consensus repeats" 1 und 2:

5'CD21: GTTGTTTCAGGTACCTTCCGC

3'CD21: TAGGAAGTGCTGGACACTCG

## 2.4 Antikörper

| Antikörper               | Herkunft/Isotyp | Bezugsquelle                                  |
|--------------------------|-----------------|---|
| gp350/220 (72A1)         | Maus/IgG2a      | ATCC (Hybridom)                               |
| gp85 (E1D1)              | Maus/IgG        | L. Hutt-Fletcher, University of Missouri, USA |
| VCA (gp125)              | Maus/IgG        | Chemicon, USA                                 |
| CD21 (FE8)               | Maus/IgG        | M. Prodinger, Univ. Innsbruck, Österreich     |
| CD21 (HB5)               | Maus/IgG2a      | ATCC/M.Prodinger                              |
| GFP                      | Kaninchen/IgG   | Clontech, Heidelberg                          |
| hSCF                     | Maus/IgG1       | Bachem, Heidelberg                            |
| c-kit (3D6)              | Maus/IgG2b      | Boehringer Mannheim, Penzberg                 |
| PE-CD117                 | Maus/IgG        | BD Pharmingen, Heidelberg                     |
| FITC-CD34                | Maus/IgG        | Dako, Hamburg                                 |
| LCMV-GP-1                | Maus/IgG        | W. Beyer, Heinrich-Pette-Institut, Hamburg    |
| Cy3- $\alpha$ -Maus      | Ziege/IgG       | Dianova, Hamburg                              |
| Cy3- $\alpha$ -Kaninchen | Ziege/IgG       | Dianova, Hamburg                              |
| Cy3-Streptavidin         | Ziege/IgG       | Dianova, Hamburg                              |
| Biotin- $\alpha$ -Maus   | Ziege/IgG       | Dianova, Hamburg                              |
| HRP- $\alpha$ -Maus      | Maus/IgG        | Promega, Madison, USA                         |

PE: Phycoerythrin; FITC: Fluorescein-Isothiocyanat; Cy3: Indocarbocyanin;  $\alpha$ : anti;  
HRP: Meerrettich-Peroxidase

## 2.5 Enzyme, Chemikalien, Geräte, Sonstiges

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

### Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg

[ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-dCTP (3000 Ci/mmol), Hybond™-N+-Nylonmembran, Hybond™-ECL-Zellulosemembran, ECL™-"Western blotting analysis"-System, G50-Sepharose-Säulen ("Nick columns")

### Becton Dickinson GmbH, Heidelberg

Plastik-Reagenzgefäße 15 und 50 ml, 96-Loch-Platten, 24-Loch-Platten, 6-Loch-Platten

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

Gene Pulser™, Elektroporationsküvetten (0,1 cm Plattenabstand)

### Calbiochem GmbH, Frankfurt/Main

Dithiothreitol (DTT), Hygromycin B

### Coulter Electronics GmbH, Krefeld

"Particle Counter", Z Serie

### Deutsche Dynal GmbH, Hamburg

"Dynal® CD34 Progenitor Cell Selection System Kit", Dynabeads® M-450 CD19 (pan B)

### Eastman Kodak Company, Rochester, USA

Röntgenfilme XAR5, Polaroidfilme

### Hofer Scientific Instruments, San Francisco, USA

Mighty Small II-Gelelektrophoreseeinheit

### ICN Biomedicals GmbH, Eschwege

Dimethylsulfoxid

### Infors GmbH, Einsbach

Labfors®, Klein Fermenter System

### Life Technologies, Eggenstein

Zellkulturmedium RPMI 1640 und DMEM, fötales Kälberserum (FKS), Streptomycin, Penicillin, Lipofectamin™-Reagenz, Opti-MEM®, Superscript™II-Reverse Transkriptase

MBI Fermentas, St. Leon-Rot

Restriktionsenzyme

Nunc GmbH, Wiesbaden

Cryotube™, Plastikpetrischalen, Zellkulturflaschen, Zellkulturschalen

New England Biolabs, Schwalbach

T4 DNA-Ligase

Pall Gelman Sciences, Dreieich

Acrodisc Syringe Filter, 0,8 µm

Peptotech, London, U.K.

Interleukin-3, TPO

Promega, Madison, USA

Pfu DNA-Polymerase

Roche Diagnostics, Mannheim

Alkalische Phosphatase, DNaseI, DNA-PolymeraseI bzw. Klenow-Fragment (beide aus E. coli ), Restriktionsenzyme, dNTPs, Random primed DNA labeling kit, "High Pure RNA Isolation kit", Interleukin-3 (rekombinant)

Schleicher & Schuell, Dassel

Filtereinheit 1,2 µm

Sigma Chemie, München

Ampicillin, 2-Mercaptoethanol, Bromphenolblau, Proteinase K

Zeiss, Oberkochen

Axiovert 10 inverses Fluoreszenzmikroskop

### **3. Methoden**

#### **3.1 Bakterienkultur**

##### **3.1.1 Vermehrung und Aufbewahrung von Bakterien**

Bakterien wurden als Suspensionskultur in LB-Medium (1% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 0,5% NaCl) oder zur Vereinzelnung von Kolonien auf LB-Agarplatten (15 g Bacto-Agar ad 1 l LB-Medium) kultiviert. Bei Selektion auf Resistenzen gegen Antibiotika wurden dem LB-Medium Ampicillin (100 µg/ml), Chloramphenicol (15 µg/ml), Tetracyclin (10 µg/ml) oder Kanamycin (50 µg/ml) zugegeben. Zur Lagerung von Bakterien über längere Zeiträume wurde eine stationär gewachsene Bakterienkultur mit 20% Glycerin versetzt und in einem 2 ml NUNC-Cryotube™ bei -80°C tiefgefroren.

##### **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 100 µl dieser Bakterien zusammen mit ca. 50 ng eines Ligierungsansatzes 20 – 30 min auf Eis inkubiert und anschließend für 1 min 30 sec auf 42°C im Wasserbad erwärmt. Nach Zugabe von SOC-Medium (2% Trypton; 0,5% Hefeextrakt; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 10 mM MgSO<sub>4</sub>; 0,2% Glukose) 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.



### Elektroporation:

EBV Plasmid-DNA wurde durch Elektroporation mit einem Gene-Pulser (Bio-Rad) in DH10B E. coli transfiziert. Die Herstellung elektrokompeter DH10B Bakterien erfolgte nach einem Protokoll von Sheng et al. (Sheng et al., 1995). 50 µl kompetente Bakterien wurden mit 1 µg Plasmid-DNA 5 min lang auf Eis inkubiert und anschließend in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (0.1 cm Elektrodenabstand) überführt. Die Elektroporation erfolgte bei 1,8 kV, 100 Ω und 25 µF mit einer Zeitkonstante von 2 sec. Die Bakterien wurden sofort in SOC-Medium überführt und nach einer 60-minütigen phänotypischen Expression bei 37°C auf Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37°C.

### **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 Umdrehungen/min. 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 Antischaum-Zugabe wurde ebenfalls durch eine entsprechende Antischaum-Elektrode geregelt. Die Belüftung des Fermenters erfolgte durch ein Begasungsrohr mit einer konstanten Begasungsrate von 1 Vol. Sauerstoff/Vol. Kultur x min. Die Kultivierung der DH10B E. coli Bakterien erfolgte bis zu einer  $OD_{600}$  von 4 bis 5. Nach Erreichen dieser Zelldichte wurden die Bakterien für eine anschließende EBV DNA-Präparation geerntet (siehe 3.3.2).

## **3.2 Zellkultur und Analyse von Zellen**

Zellpelletierungen und Waschschrirte wurden durch Zentrifugation für 10 min bei 1200 rpm und 20°C in einer Heraeus-Varifuge 3.0RS durchgeführt. Alle Zellzählungen wurden mittels eines Partikelzählers der Firma Coulter nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

### **3.2.1 Zellkulturbedingungen**

Alle Zellen wurden in einem Inkubator bei 37°C unter einer Atmosphäre von 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Die meisten der verwendeten Zelllinien wurden in RPMI 1640 Medium kultiviert, mit Ausnahme von HeLa Zellen, die in DMEM-Medium vermehrt worden. Beiden Medien wurde 10% fötales Kälberserum (FKS), 50 IE/ml Penicillin und 50 µg/ml Streptomycin zugesetzt. Das Medium für die Kultivierung der Zelllinie TF-1 enthielt zusätzlich 1 ng/ml IL-3. Dem RPMI Medium für die Zelllinien 2367.8, 2233.H und 2243.F wurde 100 µg/ml Hygromycin zur Aufrechterhaltung des episomalen Maxi-EBV Plasmids zugesetzt.

### **3.2.2 Aufbewahrung von Zellen**

In Gegenwart von Dimethylsulfoxid (DMSO) können Zellen in flüssigem Stickstoff eingefroren und über längere Zeit gelagert werden. Zum Einfrieren wurden etwa 10<sup>7</sup> Zellen abzentrifugiert (10 min, 1200 rpm, 20°C) und in 1 ml des entsprechenden Mediums, das 10% FKS und 10% DMSO enthielt, resuspendiert und in ein 2 ml Gefäß (NUNC-Cryotube™) pipettiert. Um die Zellen schonend abzukühlen, wurde das Röhrchen in Watte eingewickelt und über Nacht bei -80°C aufbewahrt. Am nächsten Tag wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff tiefgefroren.

Zur Wiederverwendung wurden die Zellen in einem 37°C warmen Wasserbad schnell aufgetaut. Suspensionszellen wurden in ein Falcon-Röhrchen, das 50 ml vorgewärmtes Medium (mit 10% FKS) enthielt, überführt und 10 min bei 1200 rpm und 20°C abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in Kulturmedium aufgenommen und die Zellen im Brutschrank kultiviert.

### 3.2.3 Isolierung von CD34-positiven Zellen

CD34<sup>+</sup>-Stammzellen wurden aus Nabelschnurblutproben gewonnen, die freundlicherweise von der Entbindungsstation des Universitätsklinikums Großhadern bereitgestellt wurden. Die Proben wurden 1:1 mit PBS vermischt und über einen 30%-igen Ficoll-Gradienten (Ficoll-Dichte 1.077) aufgereinigt. Dafür wurden die Proben bei 375xg 30 min lang durch ein Ficoll-Kissen zentrifugiert, um die Erythrozyten und Granulozyten abzutrennen. Nach der Zentrifugation wurde die Interphase abgenommen und mit PBS gewaschen. Die aufgereinigten Zellen wurden in RPMI 1640 Kulturmedium aufgenommen und über Nacht in Gegenwart von DNase (5 µg/ml Endkonzentration) inkubiert. Die Isolierung von CD34<sup>+</sup>-Zellen aus dieser Zellpopulation erfolgte am darauffolgenden Tag mit Hilfe des "DynaL CD34 Progenitor Cell Selection System Kit" der Firma Dynal. Das Prinzip beruht auf der Bindung der CD34<sup>+</sup>-Zellen an paramagnetische Polystyrenpartikel, die mit einem monoklonalen Antikörper gegen das Zellmembranantigen CD34 beschichtet sind (mAB 561; Dynabeads M-450 CD34). Die Isolierung der gebundenen Zellen von der Gesamtzellpopulation erfolgte anschließend mit einem magnetischen Partikelkonzentrator (DynaL MPC®). Um die magnetischen Partikel von den CD34<sup>+</sup>-Zellen abzulösen, werden polyklonale Antikörper verwendet, die spezifisch mit der Fab-Region des monoklonalen Antikörpers 561 interagieren (DETACHaBEAD CD34). Die abgelösten Dynabeads können mittels des magnetischen Partikelkonzentrators von den gereinigten CD34<sup>+</sup>-Zellen getrennt werden. Die einzelnen Versuchsschritte wurden nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Da beobachtet werden konnte, daß CD19-positive Zellen unspezifisch an die Dynabeads M-450 CD34 banden, wurde nach erfolgter CD34 Zellselektion ein weiterer Schritt zur Depletierung der CD19-positiven Zellen durchgeführt. Zur Abtrennung dieser Subpopulation wurden die Dynabeads M-450 CD19 (Pan B) benutzt (laut Protokoll des Herstellers).

Die isolierten CD34-positiven Zellen wurden vor der Infektion mit Virusüberstand über Nacht inkubiert. Dem RPMI1640 Medium wurde IL-3 (1 ng/ml), TPO (1 ng/ml) und 2-Mercaptoethanol (1 µM Endkonzentration) zugesetzt.

### 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, GibcoBRL) wurde nach Angaben des Herstellers (Life Technologies, GibcoBRL) durchgeführt (6 µl Lipofectamin™-Reagenz pro 1 µg transfizierter DNA).

Für die Etablierung EBV-positiver stabiler Zelllinien wurden 293 Zellen in 6-Loch-Platten mit 1 µg DNA des entsprechenden Maxi-EBV Plamids transfiziert. Am nächsten Tag wurden die Zellen in Zellkulturschalen (Durchmesser 140 mm) überführt und Hygromycin (100 µg/ml Endkonzentration) dem Kulturmedium hinzugegeben. Drei bis vier Wochen später wurden auswachsende Zellklone, die sich mittels Fluoreszenzmikroskopie als positiv für die GFP Expression erwiesen, geerntet und einzeln expandiert.

### 3.2.5 Produktion von infektiösen Viruspartikeln

293-B95.8/F, 293-gp350-KO, 293-gp85-KO und 293-gp350/gp85-KO Zellen wurden in 6-Loch-Platten mit je 0.5 µg/Loch des Expressionsplasmids pCMV-BZLF1 (p509) und pCMV-BALF4 (p2670) transfiziert. Die transiente Komplementierung des Genotyps der verschiedenen EBV Mutanten erfolgte durch Kotransfektion von 1 µg/Loch des entsprechenden Glykoprotein-Expressionsplasmids (pCMV-gp350/p2385; pCMV-gp85/p2439). Für die Expression der gp350 Fusionsproteine (p2479, p2672) in 293-gp350-KO Zellen wurden ebenfalls je 1 µg DNA kotransfiziert. Nach drei Tagen Kultivierung bei 37°C wurden die Überstände geerntet und filtriert, um Zelltrümmer abzutrennen (Porengröße 0.8 µm). Die Virusüberstände wurden anschließend durch eine 2- bis 3-stündige Ultrazentrifugation bei 20000xg in einem Festwinkelrotor aufkonzentriert. Die Viruspellets wurden in RPMI 1640 Medium über Nacht bei 4°C resuspendiert. Nach erneuter Filtration wurden die konzentrierten Überstände für Infektionsversuche eingesetzt.

### 3.2.6 Infektionen von Zellen mit Virusüberständen

$10^5$  Zellen der zu infizierenden Zelllinien wurden mit je 1 ml konzentriertem Virusüberstand in 24-Loch-Platten inkubiert. Zwei Tage nach der Infektion wurde dem Kulturmedium TPA (20 ng/ml Endkonzentration) und Butyrat (3 mM Endkonzentration) zugesetzt, um die GFP Genexpression zu verstärken. Zum Nachweis der GFP Expression in situ wurden die Zellen mit Licht der Wellenlänge 450-490 nm bestrahlt und mit Hilfe eines inversen Fluoreszenzmikroskops (Zeiss Axiovert 10) mikroskopiert.

Primäre B-Lymphozyten ( $4 \times 10^6$ ) wurden mit 1 ml Virusüberstand über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die B-Zellen zusammen mit WI38 Fibroblasten, die als sogenannte Feeder-Zellen dienten, in 96-Loch-Platten überführt ( $1,5 \times 10^5$  Zellen/Loch) und einmal pro Woche mit frischem Medium versorgt. Auswachsene Zellklone wurden mit Medium, dem 20% FKS zugesetzt wurde, expandiert.

### 3.2.7 Inhibierung der EBV Infektion

$10^5$  Zellen der Zelllinien Raji, 293 und 293-TB wurden mit steigenden Konzentrationen des monoklonalen Antikörpers FE8 (0; 0,56; 2,8 und 5,6  $\mu\text{g/ml}$ ) 20 min lang bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Anschließend wurde 0,5 ml Virusüberstand mit gp350-negativem EBV oder transient komplementiertem gp350-negativem EBV hinzugegeben und die Zellen über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde der Überstand mit dem Antikörper entfernt und die Zellen mit frischem Medium versorgt. Nach weiteren 24 Std wurden die GFP-positiven Zellen mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie und der FACS-Analyse (BectonDickinson) ermittelt und quantifiziert.

### 3.2.8 Virusaufreinigung und -fraktionierung

293-gp350-KO Zellen wurden in 4x6-Loch-Platten mit je 0,5  $\mu\text{g/Loch}$  des Expressionsplasmids pCMV-BZLF1 (p509) und pCMV-BALF4 (p2670) transfiziert. Zusätzlich wurden die Zellen transient mit 1  $\mu\text{g}$  des Expressionsplasmids für das

hSCF-gp350 Fusionsprotein (p2479) transfiziert. Nach drei Tagen wurden die Virusüberstände geerntet (ca. 120 ml) und durch einen Filter mit der Porengröße 0,8 µm filtriert. Anschließend wurden die Virusüberstände durch eine 2- bis 3-stündige Ultrazentrifugation bei 20000xg und 20°C in einem Festwinkelrotor aufkonzentriert. Die Viruspellets wurden in insgesamt 0,5 ml PBS/1%FKS aufgenommen und über Nacht bei 4°C zur vollständigen Resuspendierung inkubiert.

Um restliche Zelltrümmer und Membranfragmente abzutrennen, wurden die konzentrierten Viren über einen 20-70%-igen Sucrosegradienten weiter aufgereinigt. Zur Herstellung des Gradienten wurden 4,8 ml einer 20%-igen Sucroselösung und 5,2 ml einer 70%-igen Sucroselösung in einem Gradientenmischer gemischt und in einem 13,2 ml Polyallomer-Röhrchen, in dem 0,5 ml einer 80%-igen Sucroselösung vorgelegt wurden, aufgefangen. Die konzentrierte Viruslösung wurde anschließend vorsichtig auf den Gradienten geschichtet. 50 µl dieser Viruslösung wurden für die Infektion von Raji Zellen aufbewahrt.

Der Gradient mit der Virusprobe wurde in einem SW41-Rotor für ca. 20 Std bei 35000 rpm und 4°C zentrifugiert. Danach wurden 0,6 ml Fraktionen des Gradienten aufgefangen und jeweils 1/10 der Aliquots zur Infektion von Raji Zellen verwendet. Nach zwei Tagen wurde die Infektiosität der einzelnen Fraktionen mittels GFP Fluoreszenz der infizierten Zellen bestimmt.

Zur weiteren Analyse im Westernblot wurden jeweils drei Fraktionen, die entweder kein Virus enthielten, die Hauptmenge an Virus oder eine leichte Kontamination mit EBV aufwiesen, vereinigt, mit PBS verdünnt und in einem weiteren Zentrifugationsschritt (SW50, 20000 rpm, 3 Std, 4°C) aufkonzentriert. Die unterschiedlich sichtbaren "Pellets" wurden in je 75 µl TE aufgenommen und für die Westernblot-Analyse weiter behandelt (siehe 3.5.1).

### **3.2.9 Immunfluoreszenz-Analysen**

Die Expression lytisch induzierbarer EBV Proteine sowie die transiente Expression von Proteinen nach Transfektion wurde durch Immunfärbungen nachgewiesen. Induzierte 293-gp350-KO, 293-gp85-KO und 293-gp350/gp85-KO Zellen wurden mit

PBS gewaschen und auf einem 8-Loch-Objektträger für 20 min mit Aceton fixiert. Die fixierten Zellen wurden mit spezifischen monoklonalen Antikörpern für 30 min bei 37°C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen der Objektträger mit PBS in einer Glaskammer wurden die Zellen mit einem zweiten, Cy3-konjugierten anti-Maus oder anti-Kaninchen Antikörper für weitere 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und in einer 10%-igen PBS/Glyzerin-Lösung eingebettet. Zur Analyse wurden die gefärbten Zellen mit Licht der Wellenlänge 546 nm bestrahlt und mit einem Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Axiovert 10) mikroskopiert.

### **3.2.10 Bindungsassay**

Die Bindung von Viruspartikeln an Zellen wurde ebenfalls mittels Immunfärbungen nachgewiesen. Die Zellen wurden mit 1 ml Virusüberstand 1 Std lang bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen geerntet, einmal mit PBS gewaschen und auf einem Objektträger für 20 min mit Aceton fixiert. Die Detektion der Viren erfolgte mit monoklonalen Antikörpern, die bestimmte Virushüllproteine erkennen. Für die Färbung wurde ein zweiter, Cy3-gekoppelter Ziege anti-Maus IgG Antikörper verwendet. Alternativ dazu wurden die Proben zur Verstärkung des Signals mit einem Biotin-gekoppelten Ziege anti-Maus Antikörper und anschließend mit Cy3-konjugiertem Streptavidin (Dianova) für jeweils 30 min bei 37°C inkubiert. Die Proben wurden mit einem Fluoreszenzmikroskop bei der Wellenlänge 546 nm analysiert.

### **3.2.11 FACS-Analyse**

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, wieviele Zellen einer Population ein bestimmtes Protein exprimieren und welches relative Expressionsniveau auf der Oberfläche erreicht wird. Exprimieren die Zellen Fluoreszenzfarbstoffe wie z. B. GFP, ist keine zusätzliche Färbung mit einem Antikörper nötig.

### GFP Fluoreszenz

Raji, 293, 293-TB und TF-1 Zellen wurden drei Tage nach erfolgter Inkubation mit Virusüberständen geerntet, zweimal mit PBS/2%FKS-Lösung gewaschen und mittels Durchflußzytometrie in einem FACS-Gerät der Firma Coulter auf GFP Fluoreszenz analysiert. Als Negativkontrolle dienten Zellen, die mit nicht infektiösem Kulturüberstand inkubiert wurden.

### Nachweis von Oberflächenmolekülen

Für die Detektion der CD21 Expression wurden  $10^5$  Zellen mit PBS/2%FKS-Lösung gewaschen und für 30 min mit verschiedenen monoklonalen Antikörpern, die gegen humanes CD21 gerichtet sind (HB5, FE8), auf Eis inkubiert.

Nach zweimaligem Waschen mit PBS/2%FKS-Lösung wurden die Zellen mit einem Ziege anti-Maus IgG Antikörper, der mit dem Cy3-Fluoreszenzfarbstoff konjugiert ist, für weitere 30 min auf Eis inkubiert. Zellen, die nur mit dem zweiten Antikörper inkubiert wurden, wurden als Negativkontrolle eingesetzt. Nach dreimaligem Waschen wurde die CD21 Expression mit Hilfe eines FACS-Gerätes der Firma BectonDickinson analysiert. Die Expression der Oberflächenmoleküle CD117 (c-kit) und CD34 wurde mit spezifischen monoklonalen Antikörpern nachgewiesen, die direkt mit den Fluoreszenzfarbstoffen PE oder FITC gekoppelt sind (siehe 2.4).

### **3.2.12 Elektronenmikroskopie**

293-gp350-KO Zellen wurden in 6-Loch-Platten mit pCMV-BZLF1 (0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) transfiziert, um die lytische Phase von EBV zu induzieren. Für die Komplementierung des gp350-KOs wurde 1  $\mu\text{g}$  pCMV-gp350, zur Pseudotypisierung 1  $\mu\text{g}$  pCMV-hSCF-gp350 (p2479) kotransfiziert. Nach drei Tagen Inkubation wurde der Kulturüberstand abgenommen, die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend mit 2,5%-iger Glutaraldehyd-Lösung 10 min lang bei Raumtemperatur fixiert. Danach wurden die Zellen von der Kulturschale abgelöst und in ein Eppendorfgefäß überführt. Die fixierten Zellen konnten bei 4°C aufbewahrt werden. Die Analyse der Zellen mit Hilfe der Elektronenmikroskopie wurde in Kooperation mit Dr. Muhsin Özel am Robert



Koch-Institut in Berlin durchgeführt. Die Präparation der Ultradünnschnitte der 293-gp350-KO Zellen wurde nach Özel et al. durchgeführt (Özel et al., 1988). Die Auswertung der Schnitte erfolgte mit einem Zeiss 902 Elektronenmikroskop.

### **3.2.13 Extraktion zellulärer DNA**

Die zu analysierenden Zellen wurden in 1% SDS lysiert. Nach Zugabe von Proteinase K (50 µg/ml Endkonzentration) wurden die lysierten Zellen bei 37°C über Nacht verdaut. Anschließend wurde die zelluläre DNA nach einem modifizierten Protokoll von Hirt extrahiert (Hirt, 1967). Dem Extraktionsmedium wurde NaCl (0.3 M Endkonzentration) zugesetzt, danach wurde die Suspension kräftig gemischt und bei 7000 rpm in einem HS4-Ausschwingrotor 30 min lang zentrifugiert. Der Überstand wurde mit zweifachem Volumen Ethanol präzipitiert, das Pellet mit 70%-igem Ethanol gewaschen und in einem geeigneten Volumen TE resuspendiert.

## **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, Ligierung freier DNA-Enden, Präparation von Plasmid-DNA über alkalische Lyse, Affinitätsmatrices oder durch Ultrazentrifugation in einem Cäsiumchlorid-Gradienten, etc. erfolgte in Anlehnung an Standardprotokolle (Sambrook et al., 1989).

### **3.3.1 Homologe Rekombination in *E. coli* zur Konstruktion von Maxi-EBV Mutanten**

Die Deletionen der Gene BLLF1 und BXLF2 wurden durch homologe Rekombination in dem *E. coli* Bakterienstamm BJ5183 generiert. BJ5183 Bakterien wurden mit dem

Maxi-EBV Plasmid transformiert. Zur Konstruktion dieses EBV Plasmids (p2089) wurde das B95.8 Genom auf ein F-Faktor-Plasmid kloniert. Das Maxi-EBV enthält den F-Faktor-Replikationsursprung, das Chloramphenicol- Resistenzgen sowie die Gene für GFP und Hygromycinresistenz unter der Kontrolle des CMV-Promotors (Delecluse et al., 1998).

#### Konstruktion der EBV gp350-Nullmutante (p2367)

Als Ausgangsplasmid diente p58.20, welches das ClaI-H Fragment mit den Koordinaten #88247–93260 des EBV/B95.8 Genoms enthält. Ein Teil des gp350 Gens (XhoI-Bsu36I Fragment) wurde durch das Tetracyclin-Resistenzgen (pCP16) ersetzt. Dieser Klonierungsschritt resultierte in einer Deletion der Aminosäuren 79-630 des gp350 Proteins und führte zu einer Leserasterverschiebung der noch vorhandenen kodierenden Sequenzen durch die Insertion des Tetracyclingens. Das entstandene Plasmid p2192 wurde durch einen Restriktionsverdau mit AvrII linearisiert, woraus sich ein 6059 bp Fragment ergab, welches das mutierte gp350 Gen sowie flankierende EBV Sequenzen von ungefähr 1 kb Größe enthält. Dieses linearisierte Fragment wurde in Maxi-EBV-positive BJ5183 Bakterien transformiert, um eine homologe Rekombination im EBV Genom über die flankierenden EBV Sequenzen zu induzieren. Die transformierten Bakterien wurden auf Chloramphenicol- (15 µg/ml) und Tetracyclin-Resistenz (10 µg/ml) selektioniert.

#### Konstruktion der EBV gp85-Nullmutante (p2233)

Das Plasmid p2209, welches die EBV/B95.8 Koordinaten #139016-144718 (Teil des Cla-D Fragments) umfasst, wurde mit EcoRV und PmlI geschnitten. Dieser Abschnitt des gp85 Gens wurde mit dem Kanamycin-Resistenzgen aus pCP15 ersetzt, was auch in diesem Fall zu einer Leserasterverschiebung innerhalb des gp85 Gens und der Deletion der Aminosäuren 92-426 führte (p2210). Für die homologe Rekombination mit dem Maxi-EBV in BJ5183 Bakterien wurde das Plasmid p2210 mit BsaI und AvrII verdaut und ein 5555 bp großes Fragment, welches das modifizierte gp85 Gen mit flankierenden EBV Sequenzen (5': 1800 bp; 3': 1175 bp) enthält, isoliert. Die Bakterien wurden mit diesem linearisierten Konstrukt transformiert und auf Chloramphenicol- (15 µg/ml) und Kanamycin-Resistenz (50 µg/ml) selektioniert.

### Konstruktion der gp350/gp85-Doppelnulmutante (p2243)

BJ5183 Bakterien wurden mit EBV Plasmid-DNA, die den gp350 knockout trägt, transformiert. Anschließend wurden von einem 2367-positiven E. coli BJ5183 Stamm transformationskompetente Bakterien nach dem Protokoll von Hanahan hergestellt (Hanahan, 1985). Zur Einführung der gp85 Deletion in p2367 wurden diese Bakterien mit dem linearisierten Fragment, welches das mutierte gp85 Gen trägt (siehe Konstruktion der EBV gp85-Nullmutante), transformiert und anschließend auf alle drei Antibiotika (Chloramphenicol, Tetracyclin und Kanamycin) selektioniert.

Bei allen beschriebenen EBV Mutanten wurde die Plasmid-DNA, die aus positiven BJ5183 Klonen gewonnen wurde, mittels eines CsCl-Gradienten aufgereinigt. Danach wurden die mutierten Maxi-EBVs durch Elektroporation in DH10B Bakterien überführt und diese zur weiteren Produktion kultiviert.

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

Die 5 l Fermenterkultur wurde für 15 min bei 5000 rpm und Raumtemperatur in einer Heraeus Sepatech Zentrifuge abzentrifugiert. Die Bakterienlyse und DNA-Präparation erfolgte nach dem Prinzip der alkalischen Lyse. Anschließend wurde die gewonnene DNA in insgesamt 100 ml TE aufgenommen. 110 g CsCl wurden hinzugegeben und aufgelöst. Diese Mischung wurde auf 4 Ultrazentrifugenröhrchen (Sorvall, 35 ml), in denen je 800 µl Ethidiumbromid (1%, Merck) vorgelegt wurde, verteilt. Die UZ-Röhrchen wurden mit 1,55 g/ml CsCl-Lösung aufgefüllt. Die Zentrifugation erfolgte für 72 Std bei 35000 rpm und 20°C in einer Beckmann L-60 Ultrazentrifuge. Nach dieser Zeit wurden die DNA-Banden unter UV-Licht (365 nm) sichtbar gemacht und die jeweils unteren Banden, die der 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 für 48 Std bei 35000 rpm wurden die Plasmid-DNA Banden abgezogen und das restliche Ethidiumbromid durch Zugabe von CsCl-gesättigtem Isopropanol extrahiert. Nach erfolgter DNA-Präzipitation mit Isopropanol wurde die EBV Plasmid-DNA in TE aufgenommen.

### 3.3.3 Southern-Blot-Analyse

10 µg zellulärer DNA wurden mit entsprechenden Restriktionsenzymen gespalten und in einem 0,8%-igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Die DNA wurde nach der Gelelektrophorese durch Färbung mit Ethidiumbromid (40 ng/ml in 1xTAE-Puffer) sichtbar gemacht. Anschließend wurde das Gel 10 min lang mit 0,25 M HCl behandelt, um Strangbrüche in den DNA-Fragmenten zu induzieren. 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 1 Std beendet (nach Southern, 1975). Die Membran wurde 30 min in 2xSSC (300 mM NaCl, 30 mM Natriumcitrat) gewaschen und anschließend für die Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten Probe verwendet. Die Prähybridisierung erfolgte in 10 ml Hybridisierungspuffer nach Church (400 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 7% SDS, 1 mM EDTA pH 7,2) für 60 min bei 65°C (Church and W., 1984). Nach dieser Zeit wurde der Puffer erneuert, die radioaktiv markierte Probe (4x10<sup>7</sup> dpm/ml) zugegeben und die Hybridisierung an homologe DNA-Bereiche über Nacht bei 65°C durchgeführt. Die hybridisierten Nylonfilter wurden 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 radioaktiven Strahlung.

### 3.3.4 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 Startpunkte für die Polymerase-Aktivität des Klenow-Fragmentes dienen (Feinberg and Vogelstein, 1983). Die Markierung von 50 ng DNA wurde mit dem "random primed DNA labelling 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.

### 3.3.5 PCR-Analysen

Pfu DNA-Polymerase und der dazugehörige Puffer wurden von der Firma Promega bezogen und die PCR-Analysen nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Das Temperaturprofil der PCR richtete sich nach den Schmelztemperaturen der Oligonukleotide und der Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragmentes. In der Regel wurden 35 Zyklen durchlaufen.

#### Reverse Transkriptase (RT)-PCR

Jeweils 1 µg gesamtzelluläre RNA der Zelllinien Raji, 293, 293-TB und HeLa wurde mit 100 pmol Oligo-(dT<sub>15</sub>)-Primern 10 min lang bei 70°C denaturiert und sofort auf Eis gestellt. Die Auffüllreaktion mit Superscript™II-Reverse Transkriptase (Life Technologies) erfolgte nach Angaben des Herstellers. In die anschließende PCR-Reaktion wurden 2 µl aus 20 µl RT-Reaktionsansatz eingesetzt. Um Kontaminationen der RNA-Präparation mit genomischer DNA zu kontrollieren, wurden zusätzlich 0,1 µg RNA der Zelllinien in der PCR-Reaktion getestet.

### 3.3.6 Plasmidisolierung aus eukaryotischen Zelllinien

Die Extraktion von zirkulärer EBV Plasmid-DNA aus 293 Zellen wurde nach einem Protokoll von Griffin (Griffin et al., 1981) durchgeführt. Die isolierte DNA wurde anschließend durch Elektroporation in den E. coli Stamm DH10B überführt (siehe 3.1.2).

## 3.4 RNA-Arbeitstechniken

### 3.4.1 Isolierung von RNA

Als Ausgangsmaterial für die Isolierung von gesamtzellulärer RNA dienten  $1 \times 10^6$  Zellen einer Zellkultur. Nach Zentrifugation der Zellen und zweimaligem Waschen in PBS erfolgte die Aufarbeitung mit RNA-Adsorptionssäulen entsprechend den Angaben des Herstellers (Roche Diagnostics). Die Qualität und Menge der isolierten

RNA wurden anschließend auf einem denaturierenden 1%-igen Formaldehyd-Agarosegel überprüft.

### 3.5 Protein-Arbeitstechniken

#### 3.5.1 Westernblot-Analysen

Etwa  $10^5$ - $10^6$  293 Zellen wurden zentrifugiert, in PBS gewaschen und in 1 ml Kernextraktionspuffer (10 mM Tris/Cl pH 7,5, 10 mM KCl, 1,5 mM  $MgCl_2$ , 0,1 mM EDTA) 30 min lang auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Kerne bei etwa 1500 rpm in einer Eppendorfszentrifuge abgetrennt und der Überstand für 30 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Die pelletierten Membranfragmente wurden in 0,9 ml Kernextraktionspuffer aufgenommen. 100  $\mu$ l dieser Suspension wurden mit 25  $\mu$ l 5xRIPA-Puffer (750 mM NaCl, 100 mM Tris/Cl pH 7,5, 5% Triton, 2,5% Desoxycholat, 0,5% SDS, 10 mM DTT) versetzt. Zu den aufgereinigten Virusfraktionen (siehe 3.2.8) wurden jeweils 25  $\mu$ l 4xLämmli-Puffer (4% SDS, 20% Glycerin, 100 mM Tris/Cl, 10 mM DTT, 0,2% Bromphenolblau) gegeben und diese für 1 Std bei 40 °C inkubiert. Anschließend wurden sowohl die Zell- als auch die Virusproben für 3 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Da Glykoproteine nachgewiesen werden sollten und diese leicht präzipitieren können, wurden die Proben vor der Auftragung nicht wie sonst üblich auf 95°C erhitzt.

Die Proteine wurden durch eine 7,5%-ige SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) in "mighty small II"-Gelkammern (Hofer Scientific) bei einer Stromstärke von 20-30 mA aufgetrennt. Als Molekulargewichts-Standard diente der "BenchMark™"-Marker von GibcoBRL, Life Technologies. Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die aufgetrennten Proteine mit Hilfe eines Elektrottransfer-Verfahrens auf eine HybondECL-Zellulosemembran übertragen. Der Transfer erfolgte für 1 Std bei 100 V und 500 mA in Blottingpuffer (1% Glycin, 0,3% Tris/OH pH 8,6). Nach Übertragung der Proteine auf die Membran wurde diese 30 min lang in TBS/5% Milch (fettarmes Milchpulver) geschwenkt, um unspezifische Proteinbindstellen abzusättigen. Anschließend wurde die Membran über Nacht mit dem

---

primären Antikörper (anti-hSCF Antikörper, 2 µg/ml Endkonzentration) in 10 ml TBS/5% Milch bei 4°C inkubiert. Vor Zugabe des zweiten Antikörpers wurde die Membran dreimal für 20 min mit TBS/1% Tween gewaschen. Die Inkubation mit dem sekundären Antikörper erfolgte 2 Std lang bei Raumtemperatur in 10 ml TBS/5% Milch. Anschließend wurde erneut dreimal mit TBS/1% Tween gewaschen. Die Immunfärbung erfolgte mit dem ECL-Detektionssystem (Amersham Pharmacia) nach den Angaben des Herstellers.

## 4. Ergebnisse

Die Bindung von Herpesviren an bestimmte Zelltypen wird durch Glykoproteine in der Virushülle vermittelt. Diese Glykoproteine sind damit für den Zelltropismus verantwortlich. Meine Aufgabe war es, den B-Zell-Tropismus von EBV zu verändern. Zur Erweiterung oder zur Einschränkung des bestehenden Wirtsspektrums müssen zunächst die Glykoproteine, die für die Infektion von B-Zellen von Bedeutung sind, ausgeschaltet werden. Dabei handelt es sich um das gp350 Protein, das die Bindung an den EBV Rezeptor, CD21, vermittelt und um gp85, ein weiteres Hüllprotein, das für die Membranfusion mit der Wirtsmembran wichtig ist (siehe Kap. 1.4.1). Zusätzlich zu diesen Glykoprotein-Nullmutanten sollte auch eine EBV Mutante mit einem gleichzeitigen "knockout" in den Genen für gp350 und für gp85 generiert werden.

Im ersten Teil der Ergebnisse werden die Konstruktion und Charakterisierung der einzelnen EBV Mutanten beschrieben, wobei auf die Charakterisierung der gp350-Nullmutante detailliert eingegangen wird. Im zweiten Teil wird die Vorgehensweise zur Herstellung pseudotypisierter EBV Mutanten dargestellt und an geeigneten Infektionsmodellen demonstriert.

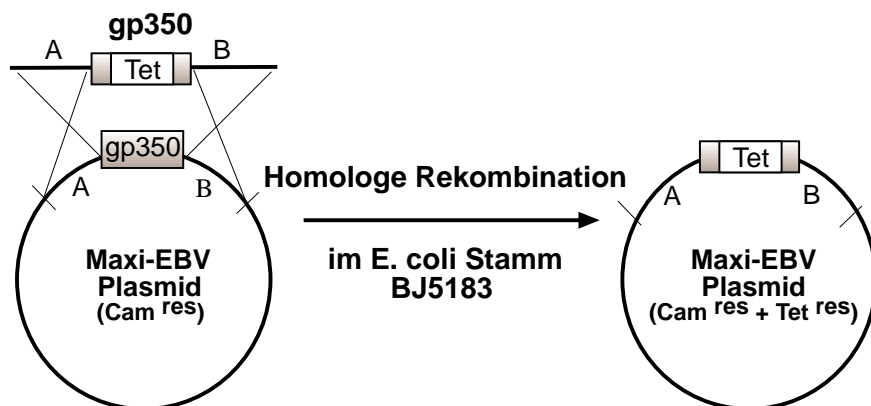
### 4.1 Konstruktion von EBV Glykoprotein-Nullmutanten in *E. coli*

Die hier vorgestellten EBV Plasmide wurden alle auf der Basis des in Kap. 1.4.2 beschriebenen Maxi-EBV Plasmids p2089 (Delecluse et al., 1998) konstruiert. Die gezielte Deletion der verschiedenen EBV Glykoproteine erfolgte durch den Austausch der jeweiligen Gene gegen Antibiotika-Resistenzgene mittels homologer Rekombination in *E. coli*. Eine ausführlichere Beschreibung der einzelnen Klonierungsschritte findet sich in Kap. 3.3.1.



#### 4.1.1 gp350/220 (BLLF1)-Nullmutante

Die Vorgehensweise zur Einführung einer gp350-Nullmutante in das Maxi-EBV Plasmid ist in Abb. 4.1 schematisch dargestellt. Als Ausgangskonstrukt diente das Plasmid p2192, welches Teile des gp350 Gens mit einer Insertion des Gens für Tetracyclinresistenz enthält. Diese Insertion führte zur Deletion der Aminosäuren 79 bis 630 und zu einer Leserasterverschiebung der verbleibenden kodierenden Sequenzen des gp350 Gens. p2192 wurde linearisiert und ein DNA-Fragment, welches das mutierte gp350 Gen sowie flankierende EBV Sequenzen von jeweils ca. 1 kb Größe enthielt, in Maxi-EBV tragende, recA-positive, recBC-negative BJ5183 Bakterien transformiert. Die Rekombination erfolgte über die homologen EBV Sequenzen auf beiden Seiten des gp350 Gens. Nach Koselektion auf Chloramphenicol- und Tetracyclinresistenz wurde die Plasmid-DNA aus resistenten BJ5183 Klonen isoliert und mittels Restriktionsenzymanalyse überprüft (nicht gezeigt).



**Abb. 4.1 : Konstruktion des gp350-negativen EBV Genoms durch homologe Rekombination in E. coli BJ5183.** Die Proteine recB, recC und recD bilden das Enzym Exonuklease V, das lineare, doppelsträngige DNA von den Enden her abbaut. Der recBC-negative Genotyp des E. coli Stammes BJ5183 ermöglicht dagegen die Rekombination mit linearisierten DNA-Fragmenten. Die Illustration zeigt schematisch das Maxi-EBV Plasmid und das linearisierte Fragment mit den nach Insertion des Gens für Tetracyclin (Tet) verbliebenen gp350 Gensequenzen. Da das Fragment zusätzliche flankierende EBV Sequenzen (A und B) trägt, können zwei homologe Rekombinationsereignisse mit dem Wildtyp-EBV Genom stattfinden, so daß das Wildtypallel durch den gezeigten Sequenzabschnitt ersetzt wird. Nach Transformation dieses DNA-Fragmentes in BJ5183 Bakterien wurden chloramphenicol- und tetracyclinresistente Klone selektioniert, die das rekombinante EBV Plasmid trugen.

Anschließend wurde die EBV Plasmid-DNA aus einem Klon mit korrekt erfolgter Rekombination in den E. coli Stamm DH10B überführt. Dieser Stamm ist recA-negativ, wodurch weitere, unerwünschte Rekombinationsereignisse vermieden werden. Aufgrund dieses Genotyps eignet sich der E. coli Stamm zur Gewinnung größerer Mengen der EBV Plasmid-DNA. Nach erneuter Antibiotikaselektion wurde das mutierte Maxi-EBV Plasmid p2367 aus resistenten DH10B Klonen isoliert. Die gewünschte Rekombination, die zur Deletion von Teilen des gp350 Gens führte, wurde durch eine Restriktionsenzymanalyse bestätigt (Abb. 4.2).

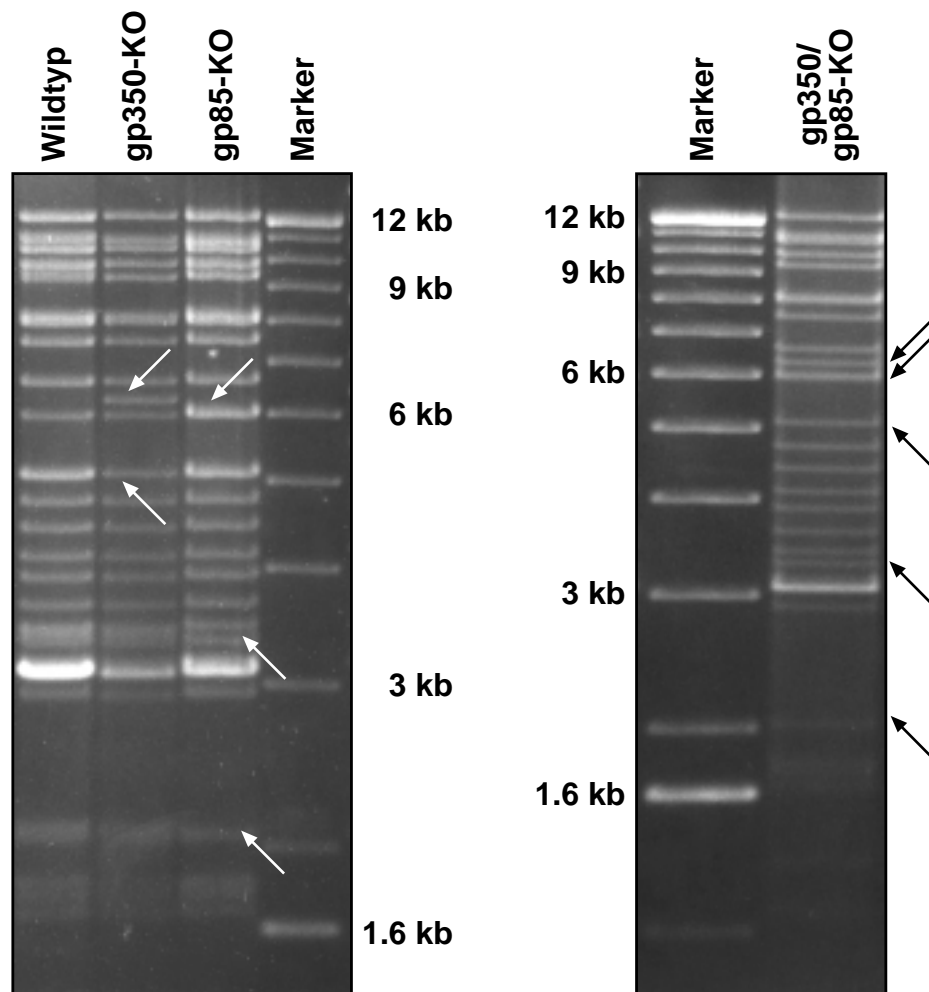
#### **4.1.2 gp85 (BXLf2)-Nullmutante**

Die Einführung der gp85 Deletion in das EBV Genom wurde nach dem gleichen Prinzip, wie es schon für die gp350-Nullmutante beschrieben und illustriert wurde, durchgeführt. Die Inaktivierung des gp85 Gens erfolgte durch Insertion des Gens für Kanamycinresistenz, was zu einer Deletion der Aminosäuren 92 bis 426 des gp85 Proteins mit anschließender Leserasterverschiebung führte. Für die Rekombination mit dem Wildtyp-EBV Genom wurde ein linearisiertes DNA-Fragment, welches das modifizierte gp85 Konstrukt mit angrenzenden EBV-homologen Sequenzen enthält, in Maxi-EBV Plasmid tragende BJ5183 E. coli Bakterien transformiert. Nach Koselektion auf Chloramphenicol- und Kanamycinresistenz wurde erneut Plasmid-DNA isoliert und auf eine erfolgreiche Rekombination untersucht. Anschließend wurde die virale DNA mit dem gp85 "knockout" (Plasmid p2233) durch Elektroporation in DH10B Bakterien überführt. Nach erneuter Selektion von resistenten Klonen wurde die daraus isolierte EBV DNA mittels Restriktionsenzymanalyse überprüft (Abb. 4.2).

#### **4.1.3 gp350/gp85-Nullmutante**

Als Ausgangsplasmid für die Konstruktion einer gp350- und gp85-negativen EBV Mutante diente p2367, welches die gp350-Nullmutante trägt. BJ5183 Bakterien, die dieses Plasmid enthalten, wurden mit dem DNA-Fragment transformiert, das das mutierte gp85 Gen umfasst und das auch zur Konstruktion der gp85-Nullmutante verwendet wurde. Nach entsprechender Selektion mit den drei Antibiotika

Chloramphenicol, Tetracyclin und Kanamycin wurde die virale DNA in DH10B Bakterien übertragen. Der korrekte Genotyp des Doppel-KO-Maxi-EBV Plasmids (p2243) wurde ebenfalls mittels Restriktionsenzymanalyse, wie in Abb. 4.2 dargestellt, bestätigt.



**Abb. 4.2 : Restriktionsenzymanalyse der Plasmid-DNA der einzelnen EBV Mutanten im Vergleich zu Wildtyp-Maxi-EBV DNA.** Die DNAs wurden aus entsprechend resistenten DH10B Klonen isoliert und mittels CsCl-Gradienten aufgereinigt. Anschließend wurden 1  $\mu$ g dieser DNA mit BamHI verdaut. Die auftretenden Restriktionsbanden wurden mit dem Bandenmuster, das nach Verdau der Wildtyp-DNA entsteht, verglichen. Die Unterschiede sind durch Pfeile gekennzeichnet. Wie vom vorhergesagten Bandenmuster erwartet, führte das Einfügen des Gens für Tetracyclin-resistenz in das gp350 Gen zum Entstehen einer zusätzlichen 6.2 kb Bande und damit zum Verschwinden einer der beiden 5 kb Doppelbanden (siehe gp350-KO (p2367) sowie gp350/gp85-KO (p2243)). Die Insertion des Kanamycin-Resistenzgens in das Gen für gp85 dagegen hatte das Auftreten einer weiteren 6 kb Bande zur Folge, während BamHI-Fragmente der Größen 3.3 kb und 2.1 kb wegfielen (siehe gp85-KO (p2233) und gp350/gp85-KO (p2243)). Die hochmolekulare Bande bei 3.1 kb repräsentiert die BamW Wiederholungssequenzen. Dieses Fragment kann in unterschiedlicher Kopienzahl auftreten, was jedoch keinen Einfluß auf die Funktionalität des EBV Genoms hat.

## 4.2 Produktion der gp350- und gp85-negativen EBV Mutanten

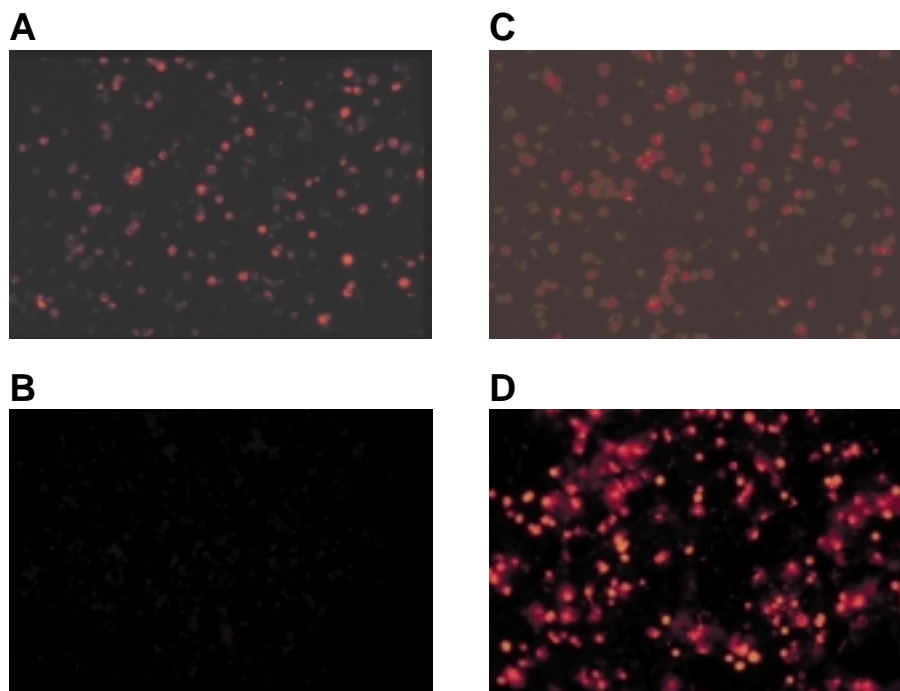
### 4.2.1 Etablierung stabiler und permissiver EBV-positiver 293 Zelllinien

Zur Generierung von Virusüberständen, die die verschiedenen EBV Mutanten enthalten, müssen zunächst stabile Zelllinien etabliert werden, die die Maxi-EBV Plasmide p2367, p2233 und p2243 als extrachromosomale Kopien in latenter Form enthalten und an die Tochterzellen weitergeben. Darüber hinaus müssen solche Zelllinien den lytischen Zyklus von EBV nach Induktion des lytischen Programms unterstützen.

Zu diesem Zweck wurden 293 Zellen mit dem jeweiligen Maxi-EBV Plasmid transfiziert und anschließend auf Hygromycinresistenz, die auf dem Maxi-EBV Plasmid kodiert ist, selektioniert (100 µg/ml Endkonzentration). Nach drei Wochen wurden die auswachsenden Einzelzellklone, die zusätzlich eine GFP Expression aufwiesen, expandiert. Anschließend mußten die Klone auf ihre Fähigkeit getestet werden, den lytischen Zyklus von EBV und somit die Virusproduktion zu unterstützen. Der Übergang von der Latenz in den lytischen Zyklus von EBV kann durch die Expression des Transaktivators BZLF1, ein Genprodukt der frühen lytischen Phase, eingeleitet werden (Countryman and Miller, 1985; Hammerschmidt and Sugden, 1988a). Dadurch wird die Transkription weiterer lytischer Gene, die für strukturelle Proteine wie z.B. Kapsidproteine oder Glykoproteine kodieren, induziert. Durch den Expressionsnachweis von z. B. gp125/gp110, einem lytischen, viralen Protein des VCA Komplexes, kann auf eine erfolgreiche Induktion des lytischen Zyklus geschlossen werden. Die selektionierten Zellklone wurden deshalb mit einem Expressionsplasmid für BZLF1 transfiziert. Drei Tage später wurden die Zellen mit Hilfe einer Immunfärbung bezüglich der Expression des gp125/gp110 Proteins analysiert. Die am stärksten induzierbaren Klone wurden für weitere Experimente verwendet. Auf diese Weise konnten drei permissive 293 Zellklone identifiziert werden, die entweder p2367 (293-gp350-KO Zellen), p2233 (293-gp85-KO Zellen) oder p2243 (293-gp350/gp85-KO Zellen) episomal tragen. Abb. 4.3 zeigt exemplarisch eine positive Immunfluoreszenzfärbung von induzierten 293-gp350-KO Zellen mit einem Antikörper gegen gp125 (A). Es zeigte sich, daß ca. 16 % aller transfizierten Zellen gp125/110 exprimieren. Eine zusätzliche Färbung mit einem Antikörper gegen das gp85 Protein führte ebenfalls zu einem positiven Signal (nicht

gezeigt). Die Färbung mit dem Antikörper 72A1, der ein Epitop nahe der CD21 Bindungsstelle des gp350 Proteins erkennt (Hoffman et al., 1980; Khyatti et al., 1998), war negativ. Die 293-gp350-KO Zellen zeigten also, wie erwartet, keine Expression des gp350 Proteins (Abb. 4.3, B). Als Positivkontrolle wurden 293-B95.8/F Zellen, die das Wildtyp-Maxi-EBV tragen, induziert und mit den gleichen Antikörpern angefärbt (Abb. 4.3, C und D).

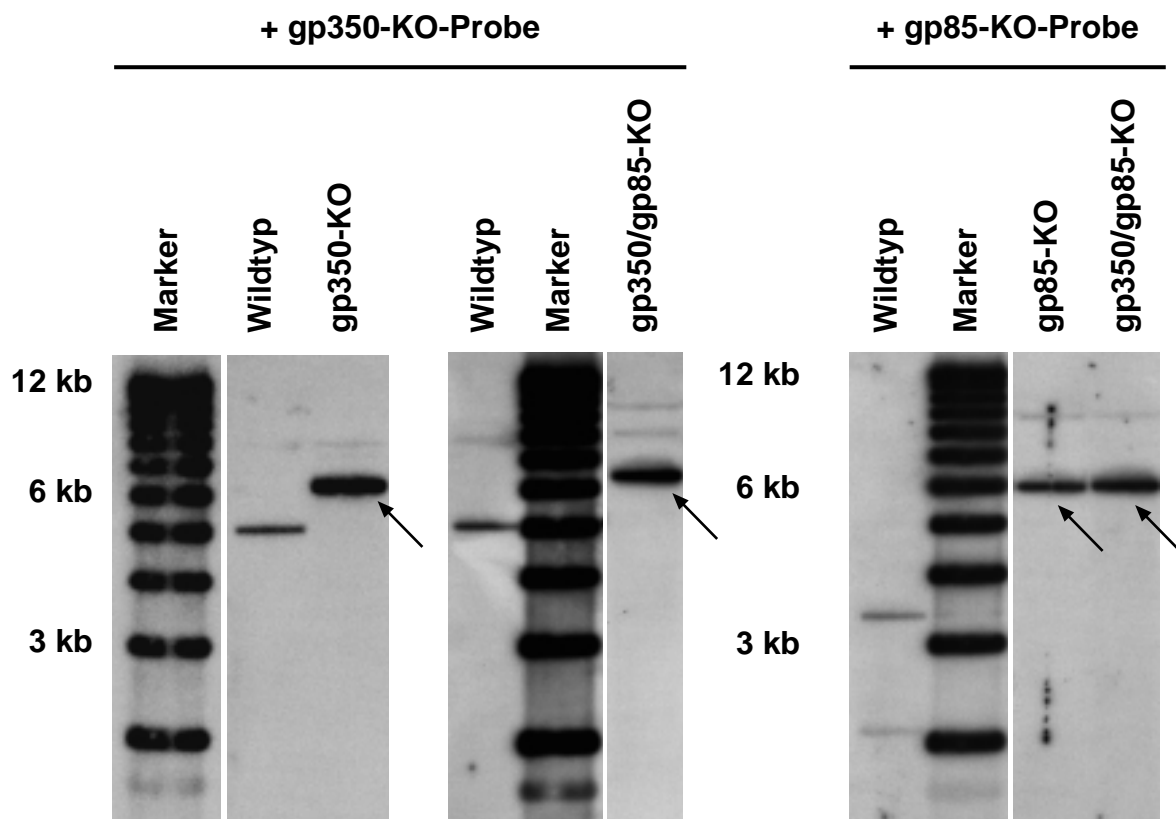
Nach dem gleichen Prinzip wurde auch für die beiden anderen Mutanten verfahren. In 293-gp85-KO Zellen als auch in 293-gp350/gp85-KO Zellen ließ sich nach erfolgter Induktion der Übergang in die lytische Phase durch Expression des gp125 Proteins nachweisen. Die gp85-negative EBV Mutante zeigte dabei korrekterweise keine Expression des gp85 Proteins und die EBV Variante mit Nullmutationen in den Genen für gp350 und gp85 wies ein Negativergebnis in der Immunfärbung beider Proteine auf (nicht gezeigt).



**Abb. 4.3: Lytisch induzierte 293-gp350-KO Zellen zeigen keine Expression des gp350 Proteins.** 293-B95.8/F Zellen und 293-gp350-KO Zellen wurden mit BZLF1 induziert, nach drei Tagen geerntet und mit Aceton fixiert. Die Expression des gp125 Proteins sowie des gp350 Proteins wurde durch Immunfärbungen mit spezifischen monoklonalen Antikörpern und einem zweiten, Cy3-konjugierten Ziege anti-Maus IgG Antikörper detektiert. 293-B95.8/F Zellen wiesen positive Signale für beide Proteine auf (C und D), während die 293-gp350-KO Zellen nur eine Expression des gp125 Proteins zeigten (A). Dagegen war bei diesen Zellen nach Färbung mit dem Antikörper gegen gp350 kein Signal zu beobachten (B).

Um zu überprüfen, ob die selektionierten, GFP-positiven Zelllinien tatsächlich das jeweilige mutierte EBV Genom trugen und keine Rekombination in den 293 Zellen stattgefunden hatte, wurde der Genotyp der EBV Mutanten in diesen Zellen mit Hilfe der Southern-Blot-Analyse überprüft. Als Sonden zur Hybridisierung der zellulären DNA aus den einzelnen EBV Zelllinien wurden die jeweiligen DNA-Fragmente verwendet, die auch zur Mutation der Glykoproteine und Insertion der Antibiotikaresistenzen in das Maxi-EBV Plasmid benutzt wurden (siehe auch Kap. 3.3.1). In Abb. 4.4 ist das Ergebnis der Southern-Blot-Analyse mit BamHI-verdauter DNA aus 293-gp350-KO Zellen, 293-gp85-KO sowie 293-gp350/gp85-KO Zellen zu sehen. Als Kontrolle diente DNA aus 293-B95.8/F Zellen, die das Wildtyp-Maxi-EBV tragen. Es zeigte sich, daß die DNA aller drei Zelllinien die für die eingeführten Mutationen charakteristischen Banden im Vergleich zur Wildtyp-EBV DNA aufwiesen. Ein zusätzlicher Nachweis, daß die Zellen die korrekten EBV Genome enthielten, konnte durch die Präparation von EBV Plasmid-DNA aus diesen Zellklonen erbracht werden. Die isolierten Maxi-EBV Genome wurden wieder zurück in *E. coli* transformiert und die Plasmid-DNA aus entsprechend resistenten Bakterienklonen erneut durch eine Restriktionsenzymanalyse überprüft (nicht gezeigt).

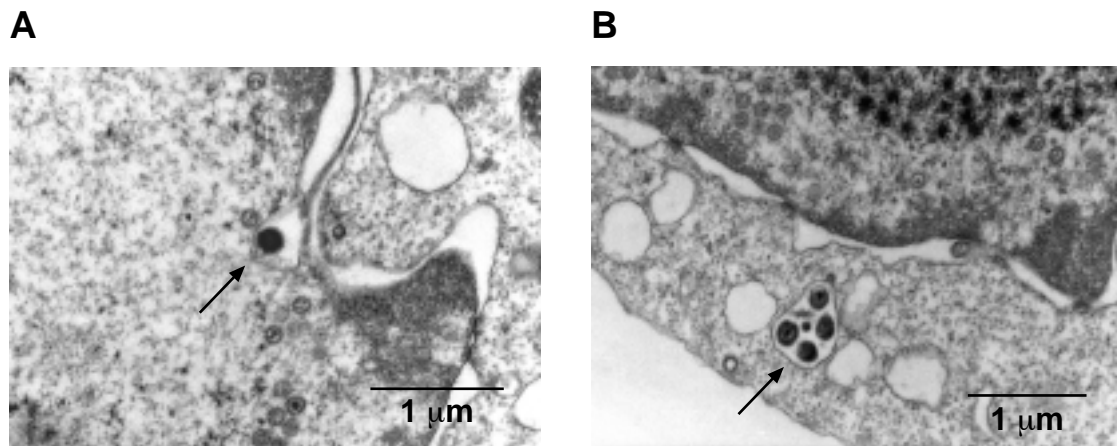
**Abb. 4.4: Southern-Blot-Analyse der selektionierten 293-EBV-KO Zellen im Vergleich zu 293-B95.8/F Zellen, die Wildtyp-Maxi-EBV tragen.** 10 µg zellulärer DNA aus 293-gp350-KO, 293-gp85-KO und 293-gp350/gp85-KO Zellen, sowie genomische DNA aus 293-B95.8/F Zellen als Kontrolle, wurden mit BamHI verdaut, im Agarosegel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran übertragen. Die für die Hybridisierung eingesetzten <sup>32</sup>P-markierten Proben wurden von den DNA-Fragmenten, die zur Einführung der funktionellen Mutationen der einzelnen Glykoproteine verwendet wurden, abgeleitet (hier als gp350-KO- und gp85-KO-Probe bezeichnet). Es wurden spezifisch die BamHI-Fragmente detektiert, die durch die Insertionen der Antibiotikaresistenzen zusätzlich im Vergleich zum Wildtyp-Bandenmuster entstanden (markiert durch Pfeile; siehe auch Abb. 4.2). Schwache Signale, die auch mit zellulärer DNA aus 293-B95.8/F Zellen beobachtet wurden, repräsentieren flankierende Wildtyp-Sequenzen, die partiell mit der Probe hybridisieren (z. B. eine 7.9 kb Bande mit DNA aus 293-gp350-KO Zellen). Andere sichtbare Banden sind unspezifisch und durch Kreuzhybridisierung der jeweiligen Probe entstanden.



#### 4.2.2 Infektiosität und Komplementierung der EBV Glykoprotein-Nullmutanten

In der Literatur ist beschrieben worden, daß gp85 bei der Fusion der Virushülle mit der Wirtszellmembran und damit für die Penetration des Virus in die Zelle eine essentielle Rolle spielt (Miller and Hutt-Fletcher, 1988; Haddad and Hutt-Fletcher, 1989). Neuere Arbeiten konnten dies auch durch Verwendung einer EBV Variante, der gp85 fehlt, belegen (Molesworth et al., 2000; Oda et al., 2000). In Bezug auf gp350 wurde aufgrund der Arbeiten mehrerer Gruppen angenommen, daß es als Ligand für den zellulären EBV Rezeptor CD21 für die Infektion von B-Zellen essentiell ist (Fingeroth et al., 1984; Nemerow et al., 1985; Nemerow et al., 1987; Nemerow et al., 1989). Allerdings umfassen diese Arbeiten keine direkten Experimente mit einer gp350-negativen EBV Variante. Zunächst wurde deshalb mit Hilfe der Elektronenmikroskopie überprüft, ob die Deletion des gp350 Glykoproteins einen Einfluß auf die Virusreifung hat. Im Folgenden sollte dann die Infektiosität der entstehenden EBV Mutanten untersucht werden.

Die Analyse lytisch induzierter 293-gp350-KO Zellen im Elektronenmikroskop legte die Vermutung nahe, daß gp350 bei der Reifung und dem Transport der Viruskapside keine aktive Rolle spielt, da Virusstrukturen in verschiedenen Stadien der EBV Reifung nachgewiesen werden konnten (Abb. 4.5).



**Abb. 4.5: Reifung der EBV Partikel ist unabhängig von gp350.** 293-gp350-KO Zellen wurden mit BZLF1 induziert und drei Tage später für die Präparation von Ultradünnschnitten geerntet. Mittels Elektronenmikroskopie-Analyse konnten virale Kapside, die durch die Kernmembran knospen (A) oder zur Plasmamembran transportiert werden (B), beobachtet werden.

Um die virale DNA zu verpacken, wurde der lytische Zyklus von EBV in den stabilen 293-EBV-KO Zelllinien durch die transiente Expression des Transaktivatorproteins BZLF1 induziert. Kürzlich wurde in unserem Labor beobachtet, daß die gleichzeitige Expression von gp125/110 (BALF4) in EBV-positiven 293 Zellen zu einer signifikanten Erhöhung (ca. 100-fach) des Virustiters führt (persönliche Mitteilung von Dr. Bernhard Neuhierl/GSF). Das Glykoprotein gp125/110, welches das Homolog des Glykoproteins B von HSV-1 darstellt, scheint im Gegensatz zu den anderen EBV Glykoproteinen nicht in die Virushülle eingebaut zu werden, sondern lokalisiert vorwiegend in der Kernmembran und im Endoplasmatischen Retikulum (Gong and Kieff, 1990). Es wurde gezeigt, daß das Glykoprotein gp125/110 für die Replikation des Virus und den Zusammenbau der Virusstruktur essentiell ist (Herrold et al., 1996). Aufgrund dieser Beobachtungen wurden in allen folgenden Experimenten die Verpackungszelllinien bei Induktion der lytischen Phase zusätzlich mit einem Expressionsplasmid für BALF4 transfiziert. Dadurch konnten im Fall der in trans

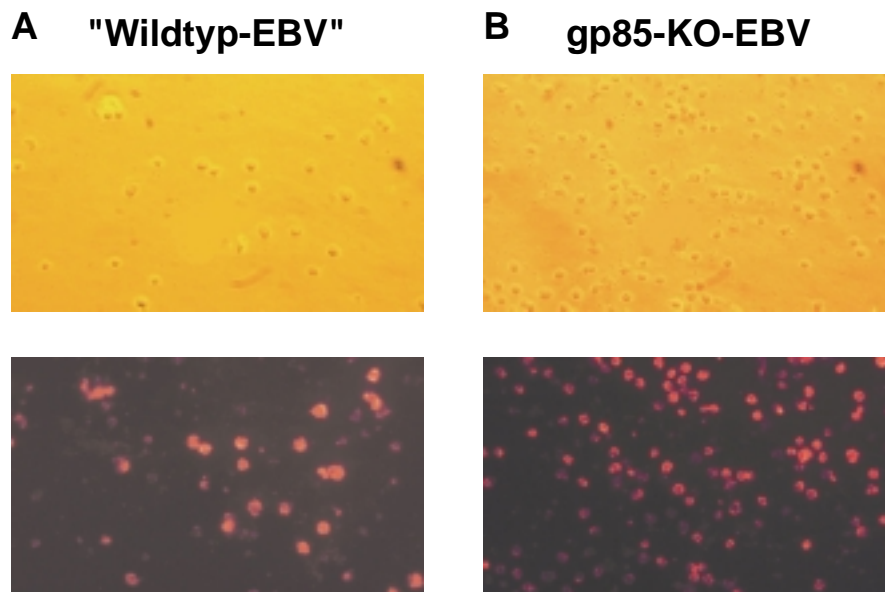


komplementierten EBV Mutanten ("Wildtyp-EBV") Virustiter von etwa  $10^6$  bis  $10^7$  infektiöse Partikel/ml erzielt werden.

Drei Tage nach der Induktion des lytischen Zyklus in den EBV-positiven Zelllinien wurden die Überstände geerntet und durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert, um höhere Virustiter zu erhalten. Als Zielzellen für die Infektion wurden Raji Zellen verwendet, eine EBV-positive Burkitt-Lymphom Zelllinie. Diese Zellen können mit EBV superinfiziert werden. Da das endogene EBV Genom kein GFP Gen trägt, kann durch das Auftreten von GFP-positiven Zellen zwei bis drei Tage nach Inkubation mit Virusüberständen auf eine erfolgreiche Neuinfektion geschlossen werden. Parallel zur Infektion von Raji Zellen mit den drei verschiedenen EBV Mutanten, wurden die Zellen mit Virusüberständen inkubiert, die komplementierte EBV Partikel enthielten. Die Komplementierung der einzelnen Mutanten-Phänotypen wurde durch transiente Expression des jeweils fehlenden Glykoproteins während der Phase der Virusproduktion erreicht (nicht gezeigt). Die Expression des gp350 bzw. gp85 Gens auf den entsprechenden Expressionsplasmiden stand unter der Kontrolle des CMV-Promotors. Als Positivkontrolle wurden Raji Zellen zusätzlich mit Virusüberständen von induzierten 293-B95.8/F Zellen, die das Wildtyp-Maxi-EBV tragen, inkubiert.

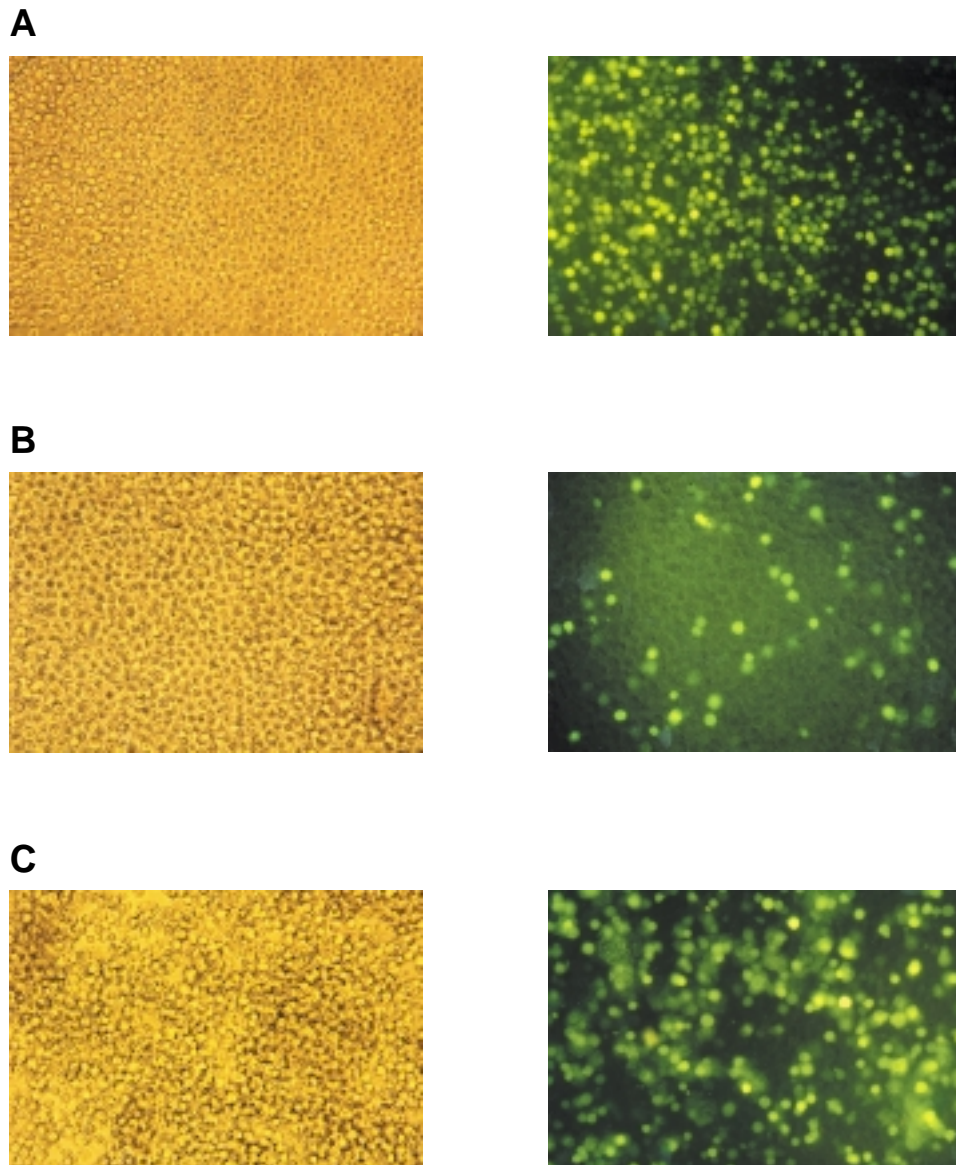
Wie erwartet, liessen sich Raji Zellen mit Virusüberständen, die gp85-negatives EBV oder EBV enthielten, das zusätzlich die gp350 Deletion trug, nicht infizieren. Nach Komplementation der Mutanten in trans konnte jedoch eine erfolgreiche Infektion beobachtet werden (nicht gezeigt). Diese Beobachtungen decken sich mit Ergebnissen früherer Arbeiten, die berichteten, daß gp85 eine essentielle Rolle bei der EBV Infektion von B-Zellen spielt. Wie schon erwähnt, ist gp85-negatives EBV in der Lage, an B-Zellen zu binden. Allerdings können die Viren sehr wahrscheinlich nicht mehr mit der Zellmembran fusionieren, so daß eine Infektion ausbleibt. Zur Bestätigung dieser Annahme und um die Bildung von prinzipiell intakten Viruspartikeln nachzuweisen, wurden Bindungsexperimente durchgeführt. Mit Hilfe dieser Methode können an Zellen gebundene Viren in situ detektiert werden. Der Nachweis der Viren erfolgt indirekt durch eine Immunfärbung von abundanten Virushüllproteinen nach der Bindung an die Zelle. Raji Zellen wurden mit gp85-negativem EBV oder der komplementierten Mutante inkubiert, anschließend fixiert und die Bindung von EBV Partikeln mit dem 72A1 Antikörper gegen gp350

nachgewiesen (siehe Abb. 4.6). Anhand dieses Experiments konnte demonstriert werden, daß tatsächlich reife Viruspartikel in Abwesenheit von gp85 generiert werden, die an lymphoblastoide Zellen binden, diese aber nicht mehr infizieren können. Zur Kontrolle wurden die Zellen nur mit dem zweiten Antikörper gefärbt. Wie erwartet, ließ sich in diesem Fall kein Signal erkennen (nicht gezeigt).



**Abb. 4.6: gp85-negatives EBV bindet an Raji Zellen, ohne diese zu infizieren.** gp85-KO-EBV und die mit gp85 in trans komplementierte EBV Mutante als Positivkontrolle ("Wildtyp-EBV") wurden 1 Std lang bei 4°C mit Raji Zellen inkubiert. Diese wurden anschließend geerntet, gewaschen und mit Aceton fixiert. Immunfärbungen wurden mit einem monoklonalen Antikörper gegen gp350 (72A1) durchgeführt. Die Detektion der Signale wurde durch Inkubation mit einem zweiten, Cy3-gekoppelten Ziege anti-Maus Antikörper erreicht. Sowohl mit gp85 komplementiertes EBV (A) als auch EBV, welches den gp85-KO trägt (B), binden effizient an Raji Zellen.

Im Gegensatz zu den beiden anderen Mutanten, konnten nach Inkubation mit Überstand von 293-gp350-KO Zellen GFP-positive Raji Zellen beobachtet werden (siehe Abb. 4.7). Eine FACS-Analyse zeigte, daß die Infektionsrate nach Inkubation mit gp350-negativem EBV um den Faktor 10-12 niedriger lag als nach Infektion mit Wildtyp-EBV oder der komplementierten gp350-Mutante (siehe Tab. 4.1). Dieses Ergebnis demonstriert, daß die Deletion von gp350 zwar eine Reduktion der Infektionsrate von Raji Zellen zur Folge hat, den Viruseintritt in diese Burkitt-Lymphom Zelllinie aber nicht ausschließt. Dies wiederum weist auf einen alternativen, gp350-unabhängigen Infektionsweg für EBV bei B-Zellen hin.



**Abb. 4.7: gp350-negatives EBV infiziert Raji Zellen.** Raji Zellen ( $10^5$ ) wurden mit 1 ml Virusüberstand, der entweder Wildtyp-EBV (A), gp350-KO-EBV (B) oder die transient mit gp350 komplementierte EBV Mutante enthielt (C), inkubiert. Anhand der GFP Expression nach 48-72 Std konnte auf eine erfolgreiche Infektion geschlossen werden (Axiovert invertiertes Fluoreszenzmikroskop). Die Infektionsrate mit gp350-KO-EBV ist allerdings im Vergleich zu den anderen Viruspräparationen deutlich reduziert. Die linken Abbildungen zeigen die korrespondierenden Zellen im Phasenkontrast-Lichtmikroskop (Vergrößerung 200-fach).

| Zelllinie  | + Wildtyp-EBV<br>(% GFP-positive<br>Zellen) | + gp350-KO-EBV<br>(% GFP-positive<br>Zellen) | + komplementierte<br>EBV Mutante<br>(% GFP-positive<br>Zellen) | Ratio<br>(kompl. Virus/<br>gp350-KO-EBV) |
|------------|---|--|--|--|
| Raji       | 77,0  | 6,2  | 60,0   | 9,7                                      |
| Raji 2.2.5 | 11,2  | 0,7  | 12,9   | 18,4                                     |
| 293        | 6,2   | 1,8  | 4,5  | 2,5                                      |
| 293-TB     | 18,3  | 5,6  | 15,0   | 2,7                                      |
| HaCat      | 0   | 0  | 0  | -  |
| HeLa       | 0   | 0  | 0  | -  |
| HEp-2      | 10 <sup>-3</sup>                            | 0  | 10 <sup>-3</sup>   | -  |
| Vero       | 0,1   | 0,12   | 0,11   | 0,92                                     |
| BHK        | 0   | 0  | 0  | -  |

**Tab. 4.1: Infektionseffizienz der getesteten Zelllinien mit Wildtyp-EBV, gp350-negativem EBV und gp350 komplementierter EBV Mutante.** Der Prozentsatz der GFP-positiven Zellen nach Inkubation mit verschiedenen Virusüberständen ist angegeben. Die Zahlen, die hier aufgelistet sind, repräsentieren den Mittelwert von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten.

### 4.3 Charakterisierung der gp350-negativen EBV Mutante

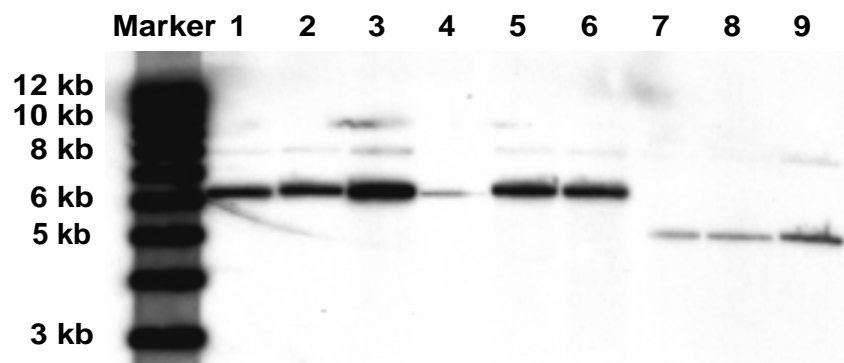
In Bezug auf die Infektion von Epithelzellen durch EBV konnte bis jetzt nicht vollständig geklärt werden, ob die Interaktion von gp350 mit CD21 für den Viruseintritt in die Zelle notwendig ist. In der Literatur finden sich Berichte sowohl über einen CD21-abhängigen als auch einen CD21-unabhängigen Infektionsweg in verschiedene Epithelzelllinien (Yoshiyama et al., 1997; Imai et al., 1998; Fingerroth et al., 1999). Die Ergebnisse der Infektionsexperimente mit Raji Zellen ließen vermuten, daß neben gp350 weitere Glykoproteine eine Rolle bei der Bindung und Adsorption von EBV an B-Zellen spielen. Um diese Fragen beantworten zu können, wurde die gp350-KO-Mutante hinsichtlich ihrer Infektiosität näher charakterisiert.

#### **4.3.1 gp350 ist für die Infektion und Immortalisierung primärer B-Lymphozyten nicht absolut notwendig**

Frühere Arbeiten haben gezeigt, daß die Präinkubation von primären B-Lymphozyten mit gp350 Peptiden, die das Bindungsmotiv für CD21 umfassen, eine EBV Infektion und damit das Auswachsen von immortalisierten B-Zellen verhindert (Nemerow et al., 1989). Deshalb war es naheliegend, primäre B-Lymphozyten als Zielzellen für Infektionsexperimente mit der gp350-negativen EBV Mutante zu verwenden. Die aus Leukozytenkonzentrat isolierten B-Zellen wurden mit Überständen inkubiert, die entweder Wildtyp-EBV, gp350-negatives EBV oder die mit gp350 komplementierte EBV Mutante enthielten. Die Expression des transfizierten gp350 Proteins wurde durch eine Immunfärbung bestätigt (nicht gezeigt, siehe auch Kap. 4.2.2). Wie aus Tabelle 4.2 zu ersehen ist, konnten EBV-positive, immortalisierte B-Zellklone nach der Inkubation mit gp350-negativem Virus etabliert werden. Im Vergleich zur Effizienz der B-Zell-Immortalisierung mit Wildtyp-EBV oder komplementierter gp350-Mutante, die mit 100 % festgelegt wurde, betrug die Effizienz mit gp350-negativem EBV nur 15%. Dieses Ergebnis resultiert höchstwahrscheinlich aus einer geringeren Infektionsrate, wie es zuvor mit Raji Zellen beobachtet worden war. Um zu überprüfen, ob die ausgewachsenen Zellklone tatsächlich das gp350-negative EBV Genom trugen, wurde eine Southern-Blot-Analyse mit zellulärer DNA aus drei unabhängigen Klonen durchgeführt (Abb. 4.8). Als Kontrolle wurde genomische DNA von Zellklonen verwendet, die mit Wildtyp-EBV oder der transient komplementierten gp350-Mutante immortalisiert worden waren. Der gp350-negative Status der immortalisierten B-Zellen konnte damit bestätigt werden. Im Gegensatz zu früheren Publikationen zeigen diese Experimente, daß gp350 auch bei der Infektion und anschließenden Immortalisierung von primären B-Lymphozyten, die in vivo von EBV infiziert werden, keine absolut notwendige Rolle spielt.

| Virusüberstand                    | Anzahl der Löcher mit ausgewachsenen Zellklonen/<br>ausplattierte Löcher | Immortalisierungseffizienz [%] |
|-----------------------------------|--|--------------------------------|
| Wildtyp-EBV                       | 27/27  | 100                            |
| gp350-KO-EBV                      | 4/27   | 15                             |
| gp350-komplementierte EBV Mutante | 27/27  | 100                            |

**Tab. 4.2.: Transformationsraten von primären B-Lymphozyten nach der Infektion mit verschiedenen EBV Überständen.** Primäre B-Zellen wurden mit den verschiedenen Virusüberständen über Nacht inkubiert und anschließend zusammen mit WI38 Fibroblasten auf 96-Loch-Platten überführt. Nach ungefähr drei Wochen wurde die Immortalisierungseffizienz anhand der ausgewachsenen B-Zellklone bestimmt.



**Abb. 4. 8: Southern-Blot-Analyse zellulärer DNA aus immortalisierten B-Zellklonen, die nach Inkubation mit gp350-KO-EBV (Spuren 1-3), gp350-komplementierter EBV Mutante (Spuren 4-6) oder Wildtyp-EBV (Spuren 7-9) etabliert wurden.** 10 µg dieser genomischen DNA wurden mit BamHI verdaut, im Agarosegel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran übertragen. Die Hybridisierung erfolgte mit einer Probe, die das gp350/Tet-Fragment, welches zur Ausschaltung des gp350 Gens benutzt wurde, umfasst (siehe auch unter 3.3.1 und Abb. 4.4). Wie erwartet, konnte nach Hybridisierung mit DNA aus B-Zellklonen, die mit gp350-negativem oder transient komplementiertem gp350-KO-EBV inkubiert wurden, eine 6.2 kb Bande detektiert werden (Spuren 1-6). Dieses BamHI-Fragment trägt das mutierte gp350 Gen. Die schwächeren Signale von 7.9 kb Größe repräsentieren flankierende Wildtyp-Sequenzen, die partiell mit der Probe hybridisieren. B-Zellklone, die nach Infektion mit Wildtyp-EBV etabliert wurden, wiesen eine charakteristische 5 kb Bande auf, die die Wildtyp gp350 Sequenzen umfasst (Spuren 7-9).

### **4.3.2 gp350-KO-EBV infiziert HLA-Klasse-II-negative Raji Zellen**

Es ist bekannt, daß gp42, ein weiteres EBV Glykoprotein, das mit gp85 und gp25 einen Komplex bildet, an HLA-Klasse-II-Moleküle binden kann (Li et al., 1995; Spriggs et al., 1996). Die Moleküle gelten somit als Korezeptoren bei der Infektion von B-Zellen durch EBV (Li et al., 1997). Um zu untersuchen, ob diese Oberflächenmoleküle den beobachteten Viruseintritt der gp350-negativen EBV Mutante in B-Zellen vermitteln können, wurde die Zelllinie Raji 2.2.5 für Infektionsexperimente verwendet. Diese Zelllinie zeigt aufgrund einer Deletion innerhalb des HLA-Klasse-II-Transaktivatorgens CIITA keine Expression dieser Oberflächenmoleküle (Accolla, 1983; Koch et al., 1988; Steimle et al., 1993). Raji 2.2.5 Zellen wurden mit Überständen inkubiert, die entweder gp350-negative EBV Partikel, die gp350-komplementierte EBV Mutante oder als Kontrolle Wildtyp-EBV enthielten. Wie aus Tabelle 4.1 zu ersehen ist, waren alle Überstände infektiös. Allerdings war die Infektionseffizienz je nach verwendetem Virusüberstand im Vergleich zur beobachteten Infektion mit normalen Raji Zellen um den Faktor 5 bis 9 niedriger. Dennoch deutet dieses Ergebnis darauf hin, daß HLA-Klasse-II-Moleküle auch in der Abwesenheit von gp350 für die Infektion von Raji Zellen nicht absolut notwendig sind.

### **4.3.3 gp350-negatives EBV infiziert verschiedene Epithelzellen**

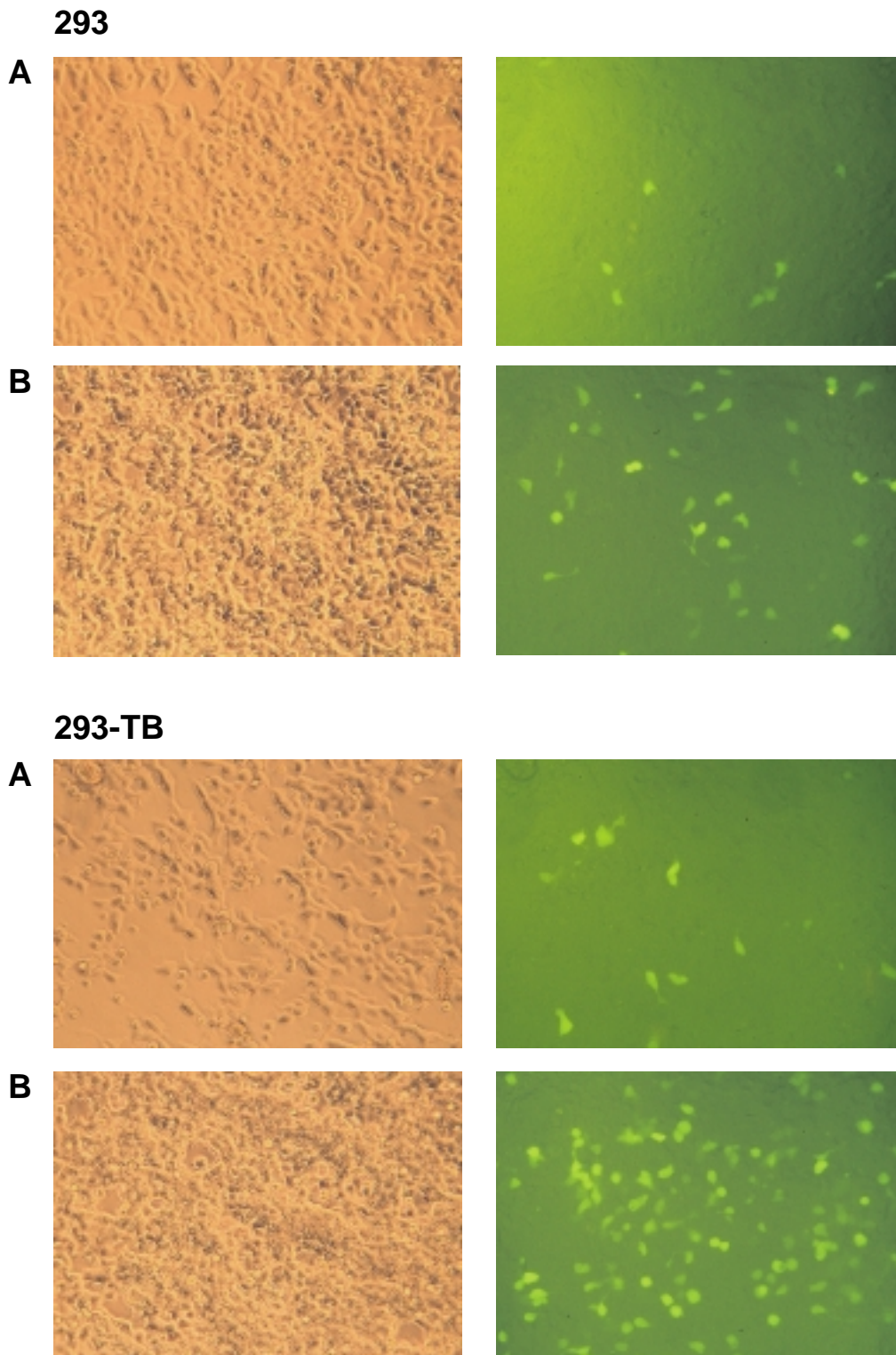
Anschließend sollte die Infizierbarkeit verschiedener Epithelzelllinien mit der gp350-negativen Virusmutante untersucht werden. Überstände von 293-gp350-KO Zellen wurden zunächst an 293 Zellen getestet, von denen *in vitro* gezeigt werden konnte, daß sie sich mit EBV infizieren lassen (Imai et al., 1998; Fingerroth et al., 1999). Parallel dazu wurde mit diesen Überständen auch die Infizierbarkeit eines Subklons der 293 Zelllinie, 293-TB, getestet. Dieser Subklon war durch Einzelzellselektion der parentalen 293 Zellen auf eine effizientere Infizierbarkeit mit Wildtyp-EBV erhalten worden. Als Kontrolle wurden die Zellen wiederum mit Überständen inkubiert, die Wildtyp-EBV oder komplementiertes gp350-KO-EBV enthielten. Es war möglich, 293 und 293-TB Zellen mit der gp350-negativen EBV Mutante zu infizieren (Abb. 4.9 und Tab. 4.1). Eine FACS-Analyse der GFP-positiven Zellen zeigte, daß sich die

Infektionsrate bei Anwesenheit von gp350 verdreifachte (Tab. 4.1, siehe auch Abb. 4.9). Die Effizienz der Wildtyp-EBV Infektion von 293-TB Zellen im Vergleich zu 293 Zellen lag dabei insgesamt um den Faktor 3 höher (Tab. 4.1). Um die Relevanz dieser Beobachtungen zu untersuchen, wurden weitere epitheliale Zelllinien getestet. Die Ergebnisse sowie die verwendeten Zellen sind ebenfalls in Tab. 4.1 aufgeführt. Es zeigte sich, daß sich die meisten dieser getesteten Zelllinien weder mit Wildtyp-EBV noch mit der gp350-negativen EBV Variante infizieren liessen. Eine Ausnahme bildeten Vero Zellen, die nach Inkubation mit den unterschiedlichen Virusüberständen GFP-positive Zellen aufwiesen. Allerdings schien die Infektionsrate in diesem Fall von der Expression des gp350 Proteins unabhängig zu sein. Die Infektion von HEP-2 war sehr ineffizient und konnte nur mit Wildtyp-EBV beobachtet werden.

#### **4.3.4 CD21 spielt eine Rolle bei der Infektion von 293 Zellen mit Wildtyp-EBV**

Aufgrund widersprüchlicher Aussagen über die Expression des EBV Rezeptors CD21 und dessen Rolle bei der Infektion von Epithelzellen durch EBV, wurde als nächstes der CD21 Status der 293 Zellen und des 293-TB Subklons mittels FACS-Analyse untersucht. Dabei wurden zwei verschiedene Antikörper gegen CD21 verwendet. Raji Zellen dienten als Positiv- und HeLa Zellen als Negativkontrolle. Wie aus Abb. 4.10, A zu ersehen ist, zeigten die 293-TB Zellen nur eine geringe, positive Verschiebung im Fluoreszenzspektrum, während die 293 Zellen keine CD21 Oberflächenexpression aufwiesen. Zur weitergehenden Analyse des CD21 Expressionsstatus wurde mit denselben Zelllinien eine RT-PCR durchgeführt. Die eingesetzten Primer erkannten Sequenzen innerhalb der "short consensus repeats" (SCR) 1 und 2 des CD21 Moleküls, für die gezeigt worden war, daß sie für die Bindung von EBV notwendig sind (Carel et al., 1990). Neben der Positivkontrolle (Raji) konnten sowohl in 293 als auch in 293-TB Zellen CD21-spezifische mRNA Transkripte nachgewiesen werden. HeLa Zellen zeigten kein Signal (Abb. 4.10, B). Anhand dieser Ergebnisse konnte allerdings noch keine eindeutige Aussage über die Proteinexpression von CD21 in 293 Zellen gemacht werden.





**Abb. 4. 9: Infektion von 293 und 293-TB Zellen mit Virusüberständen, die entweder gp350-KO-EBV (A) oder die mit gp350 komplementierte EBV Mutante enthielten (B). GFP Expression wurde durch Fluoreszenzmikroskopie der Zellen drei Tage nach erfolgter Inkubation mit Virus detektiert und analysiert (siehe rechte Abbildungen; Vergrößerung 200-fach).**

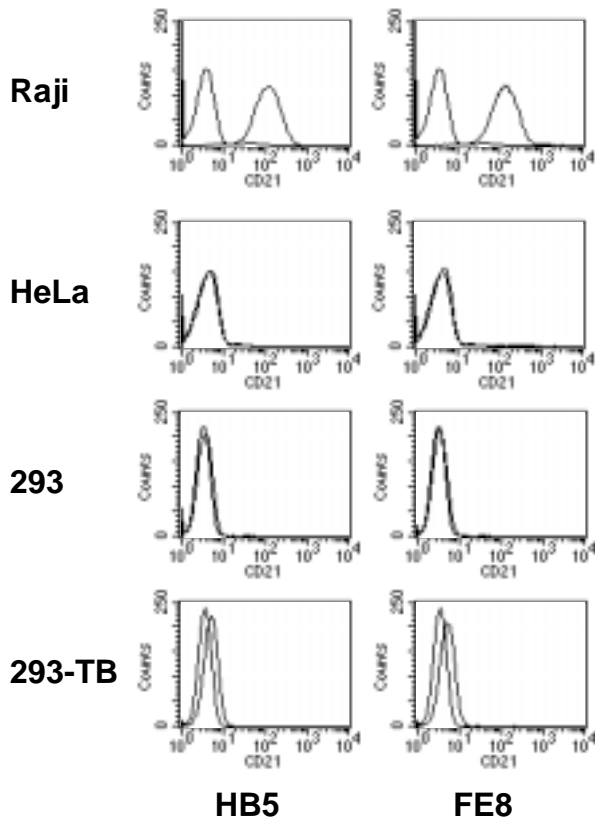
Zur Überprüfung, ob geringe, im FACS nicht nachweisbare Mengen des CD21 Moleküls auf der Zelloberfläche exprimiert werden, wurde ein Experiment zur Inhibition der EBV Infektion mit Hilfe eines CD21-spezifischen Antikörpers durchgeführt. Für den verwendeten Antikörper FE8 war gezeigt worden, daß er die EBV Infektion von B-Zellen durch Bindung an die gp350 Bindungsstelle des CD21 Moleküls blockiert (Prodinger et al., 1998). Raji, 293 und 293-TB Zellen wurden zuerst mit steigenden Konzentrationen dieses Antikörpers inkubiert und anschließend mit Virusüberständen, die gp350-negatives EBV oder die mit gp350 in trans komplementierte EBV Mutante ("Wildtyp-EBV") enthielten, infiziert. Parallel zu diesem Ansatz wurden Raji Zellen vor der Infektion mit dem HB5 Antikörper inkubiert. Dieser Antikörper erkennt CD21, hat aber keinen Einfluß auf den Viruseintritt in die Zelle (Tedder et al., 1984). Die Auswertung der GFP-positiven Zellen erfolgte mittels FACS-Analyse oder, insbesondere bei niedrigen Infektionsraten, durch Auszählung im Fluoreszenzmikroskop. Die Ergebnisse dieses Experiments sind in Abb. 4.10, C graphisch dargestellt. Die Infektion von Raji Zellen mit der gp350-komplementierten EBV Mutante konnte wie erwartet nach Inkubation mit dem Antikörper FE8 bis zu 95% inhibiert werden, während die Blockierung von CD21 keinen oder nur einen geringen Einfluß auf die Infektion mit gp350-negativem EBV hatte. Die Präinkubation der Raji Zellen mit dem nicht blockierenden Kontrollantikörper HB5 führte zu einer Reduktion der Infektionsrate mit komplementierter EBV Mutante um ca. 28%, die Infektion mit gp350-KO-EBV wurde nicht beeinträchtigt (Daten nicht gezeigt). Das Ergebnis dieser Kontrollinfektionen zeigt, daß Schwankungen in dem Umfang wie sie z. T. bei der Infektion von Raji Zellen mit gp350-negativem EBV beobachtet wurden, wahrscheinlich unspezifische Behinderungen durch den Antikörper darstellen und daher als nicht relevant betrachtet werden können. Dieser Versuch demonstrierte somit, daß die Infektion der Raji Zellen mit gp350-negativem EBV unabhängig vom bisher bekannten EBV Rezeptor CD21 ist. Dies scheint auch auf die Infektion der 293 und 293-TB Zellen zuzutreffen, da hier ebenfalls kein Unterschied in der Infektionsrate der gp350-Mutante nach Präinkubation mit dem Antikörper FE8 zu beobachten war. Im Gegensatz dazu konnte die Infektion dieser Zellen mit "Wildtyp-EBV", wie im Fall der Raji Zellen, durch den Antikörper stark inhibiert werden. Allerdings betrug die Inhibition nicht 100%. Dies war aufgrund der vorherigen Ergebnisse, die einen

alternativen Infektionsweg in Abwesenheit von gp350 vermuten liessen, zu erwarten. Die Beobachtungen weisen darauf hin, daß tatsächlich geringe Mengen von CD21 Molekülen auf der Zelloberfläche von 293 Zellen den Eintritt von EBV vermitteln. Die anderen Epithelzelllinien, die in Tab. 4.1 aufgelistet sind, zeigten in der FACS-Analyse keine Expression von CD21. Da die Infektion von Vero Zellen, wie schon erwähnt, keine Abhängigkeit von gp350 erkennen ließ, wurden an dieser Stelle keine weiteren Experimente zur näheren Charakterisierung der CD21 Expression in diesen Zellen durchgeführt.

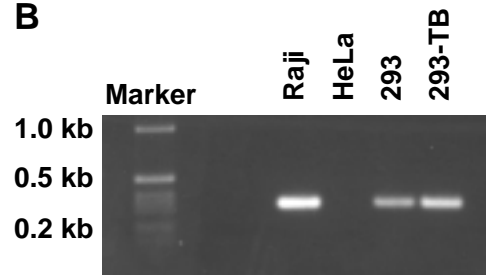
Zusammenfassend läßt sich sagen, daß gp350 für die Infektion und Immortalisierung von B-Zellen sowie für die Infektion von verschiedenen Epithelzelllinien nicht essentiell ist. Die Effizienz der EBV Infektion mittels dieses gp350-unabhängigen Modus ist allerdings deutlich reduziert. Die Ergebnisse deuten darauf hin, daß ein weiteres virales Bindungsprotein existiert, das die Bindung von EBV in Abwesenheit von gp350 vermitteln kann. Zusätzlich konnte gezeigt werden, daß dieses EBV Hüllprotein sehr wahrscheinlich mit einem anderen Rezeptor als CD21 oder HLA-Klasse-II-Molekülen interagiert.

**Abb. 4.10: Expression von CD21 in Raji Zellen und verschiedenen Epithelzelllinien. A) FACS-Analyse der CD21 Oberflächenexpression auf Raji, HeLa, 293 und 293-TB Zellen.** Die Zellen ( $3 \times 10^5$  pro Zelllinie) wurden mit je zwei unterschiedlichen monoklonalen anti-CD21 Antikörpern (HB5 und FE8) inkubiert und anschließend mit einem Cy3-konjugierten Ziege anti-Maus IgG Antikörper gefärbt. Als Negativkontrolle für die einzelnen Messungen wurde jeder Ansatz nur mit dem zweiten Antikörper inkubiert. **B) RT-PCR-Analyse zur Detektion CD21-spezifischer mRNA Transkripte in den Zelllinien Raji, HeLa, 293 und 293-TB.** Die Isolierung der RNA aus den angegebenen Zellen erfolgte mit Hilfe von RNA-Adsorptionssäulen (Roche Diagnostics). Eine Degradation der isolierten RNA konnte durch Analyse in einem denaturierenden 1%-igen Formaldehyd-Agarosegel ausgeschlossen werden (nicht gezeigt). Die komplementäre DNA (cDNA) wurde durch Zugabe von Oligo-(dT)-Primern, Desoxy-Nukleotid-Triphosphaten und Reverser Transkriptase hergestellt. Anschließend erfolgte mit je 100 ng dieser cDNAs eine PCR-Reaktion mit spezifischen Primern für das erste und dritte Exon der CD21 cDNA, mit denen ein 327 bp Fragment amplifiziert wurde. Dieses PCR-Amplifikat entspricht der erwarteten Länge (Yoshiyama et al., 1997). **C) Inhibition der EBV Infektion mit dem monoklonalen Antikörper FE8.**  $10^5$  Zellen wurden mit steigenden Konzentrationen des Antikörpers (0; 0,56; 2,8 und 5,6  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) für 20 min inkubiert. Anschließend wurde 0,5 ml Virusüberstand mit gp350-negativem EBV oder der komplementierten EBV Mutante (hier als " wt-EBV " bezeichnet ) dazugegeben. 24 Std nach Inkubation wurden der Antikörper und der Virusüberstand entfernt und die Zellen mit frischem Medium versorgt. Nach weiteren 24 Std wurde mittels FACS-Analyse und Fluoreszenzmikroskopie die GFP Expression in den Zellen untersucht. Als Kontrolle wurden Raji Zellen vor der Infektion mit Virus mit steigenden Konzentrationen des HB5 Antikörpers inkubiert (Daten nicht dargestellt).

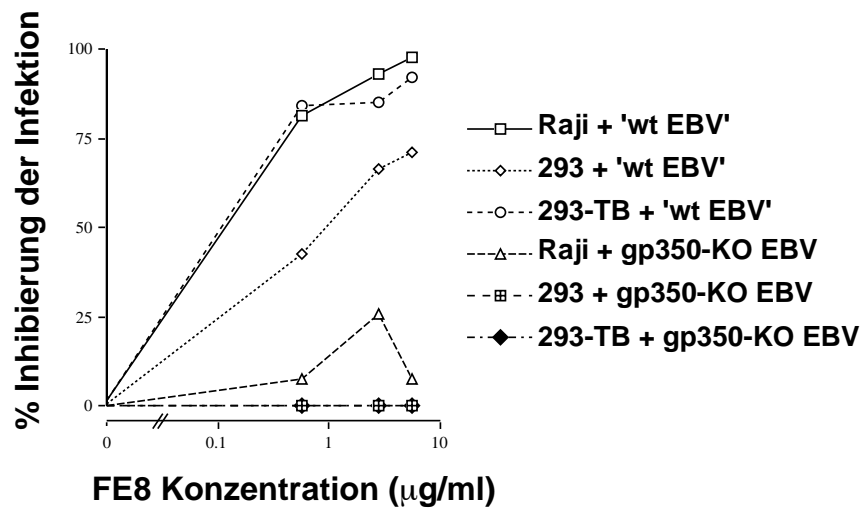
**A**



**B**



**C**



#### 4.4 Pseudotypisierung der gp350-Nullmutante

Nach erfolgter Charakterisierung der verschiedenen EBV Mutanten wird in den nächsten Kapiteln auf die Manipulation des EBV Wirtsspektrums mit Hilfe dieser Glykoprotein-Nullmutanten eingegangen. Ziel war es, den Tropismus von EBV zu verändern, so daß ein möglichst spezifischer Gentransfer mit EBV-abgeleiteten Genvektoren in bestimmte Zielzellen möglich wird. Die Pseudotypisierung der gp350-negativen Mutante sollte durch die Konstruktion von Chimären auf der Basis des gp350 Glykoproteins erreicht werden. Da über die Voraussetzungen des Einbaus von gp350 in die Virushülle fast nichts bekannt ist, wurde zunächst untersucht, welche Bereiche dieses Glykoproteins für eine korrekte Prozessierung und den Transport zur Plasmamembran hybrider Proteine benötigt werden. Anschließend wurde die Eignung eines gp350 Fusionsproteins mit dem humanen Stammzellfaktor (hSCF) als zellulärer Ligand für die spezifische Retargetierung von EBV getestet.

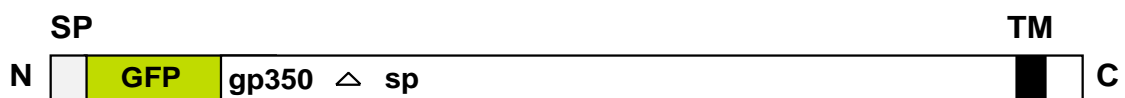
##### 4.4.1 Konstruktion von GFP-gp350 Chimären

Als Vorstufe zur Herstellung von hybriden gp350 Glykoproteinen wurden zunächst mehrere Fusionsproteine konstruiert, die unterschiedlich große Teile des gp350 Proteins in Kombination mit GFP tragen. Die einzelnen Konstrukte sind in Abb. 4.11, A schematisch dargestellt. Die korrekte Expression, Prozessierung und Lokalisierung dieser Chimären sollte durch die Expression von GFP direkt verfolgt werden können. Das Plasmid peGFP-C1 von Clontech, das für eine stärker fluoreszierende Form des GFP Proteins kodiert, diente als Ausgangsplasmid für die Konstruktion der Fusionsproteine. Der N-Terminus von gp350 umfasst eine Abfolge von 17 hydrophoben Aminosäuren, die von einer hydrophileren Domäne, die auch die CD21 Bindungsstelle beinhaltet, abgelöst werden (Beisel et al., 1985; Nemerow et al., 1989). Diese Aminosäuresequenzabfolge ähnelt dem Motiv bekannter Signalpeptide (Sabatini et al., 1982). Weiterhin verweist das Computerprogramm "Psort Prediction", mit dem gängige Signalsequenzen und Proteinmotive identifiziert werden können, auf eine eventuelle Schnittstelle zwischen den As 14 und 15 des gp350 Proteins. Für die verschiedenen Fusionsproteine zwischen GFP und gp350 wurde deshalb der offene Leserahmen von GFP unmittelbar 3' von der vermuteten Signalpeptidsequenz

(SP) des gp350 Gens eingefügt und anschließend mit unterschiedlich langen Abschnitten der gp350 cDNA fusioniert. In der Literatur konnten bisher mit Ausnahme der CD21 Bindungsstelle keine diskreten, funktionellen Domänen des gp350 Glykoproteins nachgewiesen werden. Deshalb orientierte sich die Auswahl der mittels PCR amplifizierten Bereiche an Vorhersagungen der Sekundär- und Tertiärstruktur des Proteins (Beisel et al., 1985).

## A

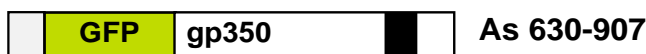
### 1. p2399:



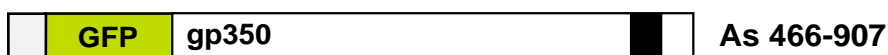
### 2. p2387:



### 3. p2362:

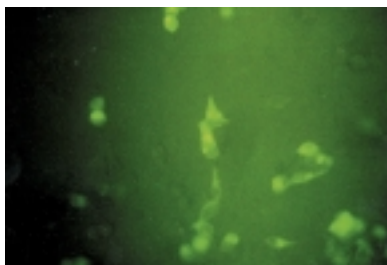


### 4. p2386:

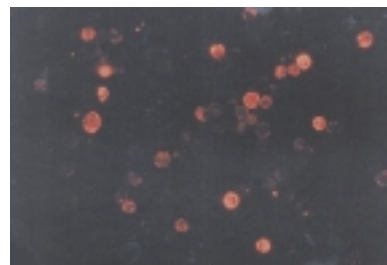


## B

### 1.



### 2.



**Abb. 4.11 : A) GFP-gp350 Fusionsproteine.** Die Abbildung zeigt den schematischen Aufbau der GFP Konstrukte, die unterschiedlich große C-terminale Bereiche des gp350 Proteins einschließlich der Transmembrandomäne (TM) umfassen. N-terminal vom GFP Gen wurde ein Oligonukleotid, das für die ersten 20 Aminosäuren des gp350 Proteins kodiert (SP), in das Plasmid pGFP-C1 eingefügt (p2341, nicht gezeigt). Die gp350 Sequenzen wurden durch PCR amplifiziert und 3' vom GFP Gen in das zuvor klonierte Plasmid p2341 eingebaut. Dabei blieb das Leseraster erhalten. **B) Expression in 293 Zellen.** 293 Zellen wurden mit p2386 transient transfiziert. Anschließend wurde im Fluoreszenzmikroskop die Expression von GFP beobachtet (1) und die Plasmamembranlokalisation des Proteins durch eine Immunfärbung mit einem polyklonalen anti-GFP Antikörper an nicht permeabilisierten Zellen bestätigt (2). In beiden Fällen handelt es sich um eine 320-fache Vergrößerung.

Die Expression der Fusionsproteine wurde in 293 Zellen getestet und konnte mit Hilfe der GFP Fluoreszenz beobachtet werden. Zusätzlich wurde die erfolgreiche Expression anhand einer Immunfärbung mit einem polyklonalen Antikörper gegen GFP und einem Cy3-konjugierten Zweitantikörper bestätigt. Die Immunfärbung wurde mit vitalen, nicht permeabilisierten Zellen durchgeführt, wodurch nur extrazelluläre Epitope für eine Antikörperbindung zugänglich sind. Die Ergebnisse der Fluoreszenzmikroskopie sind exemplarisch für das Konstrukt p2386, welches die letzten 441 Aminosäuren von gp350 umfasst, gezeigt (Abb. 4.11, B). Die positive Färbung zeigt, daß der GFP Anteil des Fusionsproteins sich außerhalb der Zelle befindet. Dadurch konnte die erwartete Positionierung dieses Proteins in der Plasmamembran nachgewiesen werden. Für die übrigen Konstrukte wurde ebenfalls eine korrekte Expression und Lokalisierung beobachtet (nicht abgebildet). Dieser Versuch zeigte, daß die Deletion sowie der Austausch großer Bereiche der extrazellulären Domäne des gp350 Glykoproteins durch fremde Proteinsequenzen die Expression und den Transport zur Plasmamembran nicht beeinflussen.

#### **4.2. Konstruktion des hSCF-gp350 Fusionsproteins**

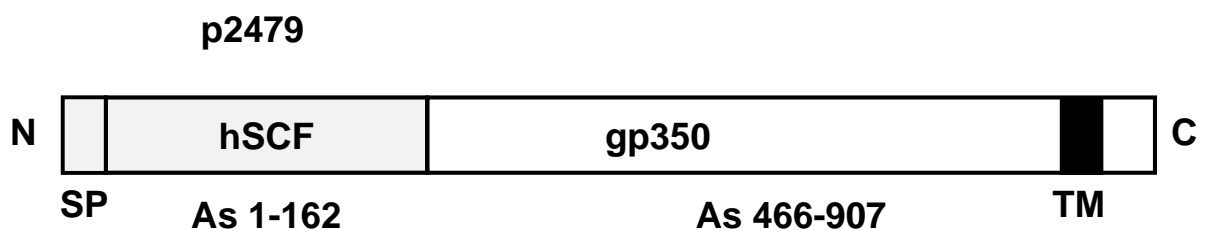
Die Ergebnisse der Expressionsstudien mit den GFP-gp350 Chimären liessen vermuten, daß andere gp350 Fusionsproteine, die z. B. Sequenzen verwandter viraler Glykoproteine oder zellulärer Liganden tragen, ein ähnliches Expressionsverhalten zeigen würden. Damit sollte es möglich sein, ein solches Fusionsprotein als Ersatz für den viralen EBV Liganden gp350 in die Virushülle einzubauen.

Als Kandidat für den zellulären Liganden wurde der humane Stammzellfaktor (hSCF) ausgewählt. Dieser Wachstumsfaktor ist als Ligand des c-kit Rezeptors (CD117) identifiziert worden (Zsebo et al., 1990b). SCF ist ein Typ I Transmembranprotein und existiert sowohl in einer membrangebundenen als auch in einer löslichen Form, die durch proteolytische Abspaltung der N-terminalen 165 As entsteht. Der c-kit Rezeptor ist ein Transmembranprotein mit intrinsischer Tyrosinkinase-Aktivität, der auf frühen Vorläuferzellen, unter anderem auf CD34-positiven, hämatopoetischen Stammzellen, stark exprimiert wird (Catlett et al., 1991). Da hämatopoetische Stammzellen aufgrund ihrer Pluripotenz ein attraktives Ziel für die Gentherapie

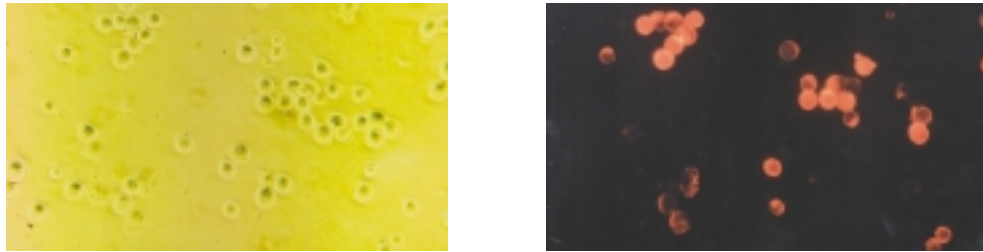
darstellen und bisher von keiner Infektion dieser Zellen mit EBV berichtet worden ist, wurde die hSCF-c-kit-Interaktion als Modellsystem für eine mögliche Pseudotypisierung von EBV analysiert (siehe auch Kap. 1.3).

Zu diesem Zweck wurde ein hSCF-gp350 Fusionsprotein konstruiert (p2479). Dieses ist in Abb. 4.12, A dargestellt. Der hSCF Anteil des Konstrukts wurde mittels PCR von einer cDNA der Melanomzelllinie MelJuso amplifiziert (Primer 5'hSCF1-162aa und 3'hSCF1-162aa, siehe Kap. 2.3). Der amplifizierte Bereich kodiert unter anderem für die ersten 162 Aminosäuren des c-kit Liganden aus dem extrazellulären Bereich des Proteins, für den gezeigt wurde, daß er mit c-kit interagiert und für die biologische Funktionalität des Proteins ausreichend ist (Martin et al., 1990). Zusätzlich umfasst das Fusionsprotein das Signalpeptid von 25 Aminosäuren Länge am N-Terminus des Stammzellfaktors, während die proteolytische Spaltstelle, die Transmembrandomäne und die intrazellulären Sequenzen des hSCFs fehlen. 3' davon wurden die C-terminalen 441 Aminosäuren des gp350 Glykoproteins eingefügt (siehe auch Abb. 4.11, p2386). Der größere Bereich des viralen Glykoproteins wurde ausgewählt, da für die Aminosäurereste 547 bis 610 des gp350 Proteins eine Funktion bei der Fusion der Virushülle mit der Zellmembran vorgeschlagen worden ist (Beisel et al., 1985). Die Expression des Konstrukts wurde, wie auch die GFP-gp350 Fusionsproteine, in 293 Zellen untersucht. Die Immunfärbung erfolgte mit einem monoklonalen Antikörper gegen ein Epitop des Stammzellfaktors an fixierten (nicht gezeigt) und an nicht permeabilisierten, vitalen Zellen (Abb. 4.12, B). Wie aufgrund der vorherigen Ergebnisse erwartet, wurde das hybride Glykoprotein in der Zelle prozessiert und in der Plasmamembran der 293 Zellen verankert.

**A**





**B**

**Abb. 4.12: A) hSCF-gp350 Fusionsprotein.** Das hybride Glykoprotein besteht aus den ersten 187 Aminosäuren des Stammzellfaktors (einschließlich des Signalpeptids von 25 Aminosäuren Länge) und den 441 C-terminalen Aminosäuren des gp350 Proteins, die sowohl extrazelluläre Bereiche als auch die Transmembrandomäne und den kurzen, intrazellulären Teil umfassen. **B)** 293 Zellen, die transient mit dem Expressionsplasmid p2479 transfiziert worden waren, wurden *in vivo* mit einem monoklonalen Antikörper gegen hSCF markiert und mit einem Cy3-konjugierten Zweitantikörper angefärbt. Das linke Bild zeigt die Zellen im Phasenkontrast (Vergrößerung 320-fach).

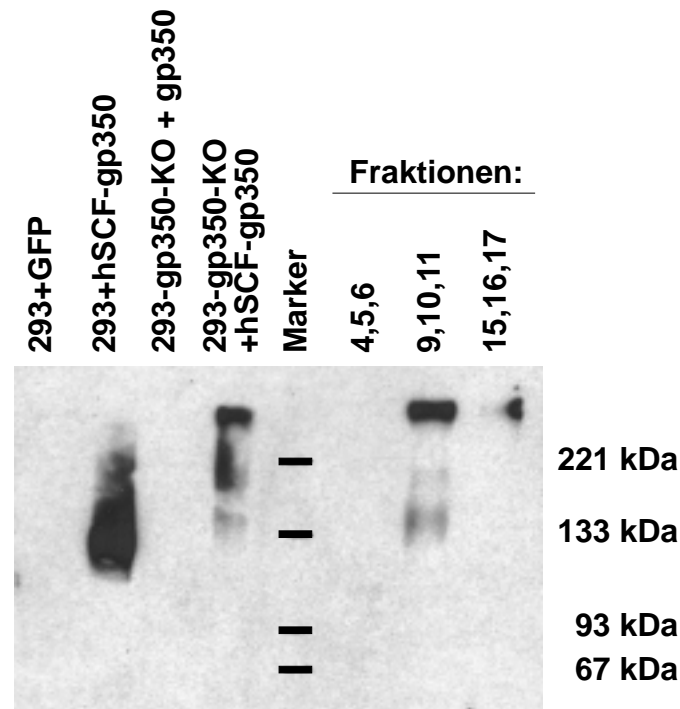
#### 4.4.3 Generierung transient pseudotypisierter Viruspartikel

Für die Produktion von EBV Partikeln, die das hSCF-gp350 Fusionsprotein in ihrer Virushülle inkorporiert haben, wurde, wie auch in Kap. 4.2 beschrieben, von einem transienten Versuchsansatz ausgegangen. 293-gp350-KO Zellen wurden mit dem Expressionsplasmid für das hSCF-gp350 Fusionsprotein (p2479) transfiziert. Die gleichzeitige Induktion des lytischen Zyklus durch Kotransfektion der Expressionsplasmide für BZLF1 und BALF4 sollte dann zur Freisetzung von transient pseudotypisierten Virionen führen. Die Infektiosität der erhaltenen und aufkonzentrierten Überstände sollte anschließend an geeigneten Zellen getestet werden (siehe 4.4.4 und 4.4.5).

Zunächst wurde jedoch überprüft, ob das hSCF-gp350 Fusionskonstrukt tatsächlich in die Hüllen reifer Viruspartikel eingebaut wird. Dazu wurden Virusüberstände von lytisch induzierten 293-gp350-KO Zellen, die transient das Fusionsprotein exprimieren, konzentriert und die Viren in einer Westernblot-Analyse mit einem monoklonalen Antikörper gegen den hSCF Anteil untersucht. Die Expression des hSCF-gp350 Fusionsproteins in den 293-gp350-KO Zellen wurde vorab mittels Immunfluoreszenz mit demselben Antikörper nachgewiesen (nicht gezeigt).

Um Kontaminationen mit pelletierten Zellmembranfragmenten, die das Fusionskonstrukt tragen und damit falsche positive Signale produzieren könnten, zu vermeiden, wurden die konzentrierten Viren durch einen zusätzlichen Zentrifugationsschritt in einem 20-70%-igen Sucrosegradienten aufgereinigt. Nach der Zentrifugation wurde der Gradient fraktioniert und die daraus resultierenden 19 Fraktionen auf ihre Infektiosität getestet. Die Inkubation mit Raji Zellen und die anschließende GFP Detektion ergab, daß die Fraktionen 9, 10 und 11 den Hauptanteil an Virus enthielten (nicht gezeigt). Während in den niedrigeren Fraktionen (höhere Sucrosedichte) kein infektiöses Virus nachzuweisen war, wiesen die Fraktionen größer als 11 im oberen Teil des Gradienten eine sehr geringe Konzentration von infektiösen Partikeln auf. Für die Westernblot-Analyse wurden die Fraktionen 4, 5, 6, und 9, 10, 11 sowie 15, 16 und 17 vereinigt und nochmals durch Sedimentation in der Ultrazentrifuge konzentriert. Diese drei gereinigten und konzentrierten "Virusproben" wurden im Westernblot eingesetzt. Für weitere Kontrollen wurden 293 Zellen, die transient GFP oder hSCF-gp350 exprimierten sowie lytisch induzierte 293-gp350-KO Zellen verwendet, die entweder mit einem Expressionsplasmid für gp350 oder für das entsprechende Fusionsprotein transfiziert worden waren. Die Ergebnisse sind in Abb. 4.13 gezeigt. Wie zu erwarten, zeigten GFP-positive 293 Zellen und mit gp350 komplementierte 293-gp350-KO Zellen kein Signal. Dagegen konnte sowohl im Fall der hSCF-gp350-exprimierenden 293 als auch der 293-gp350-KO Zellen das Fusionsprotein nachgewiesen werden. Allerdings wies die Probe aus 293 Zellen ein starkes Signal bei etwa 133 kDa auf, während die 293-gp350-KO Zellen ein Hauptsignal bei über 221 kDa lieferten. Bei 133 kDa war dagegen nur eine schwache Bande zu erkennen. Im Fall der eingesetzten Gradientenfraktionen zeigte sich, daß die EBV-positiven und vereinigten Fraktionen 9, 10 und 11 das gleiche Bandenmuster wie die virusproduzierenden 293-gp350-KO Zellen aufwiesen. Die vereinigten Fraktionen 4, 5 und 6 zeigten erwartungsgemäß keine Expression des hSCF-gp350 Fusionsproteins, während im Fall der Probe, die die Fraktionen 15, 16 und 17 enthielt, wiederum ein schwaches Signal bei über 221 kDa zu beobachten war. Der Vergleich der lytisch induzierten 293-gp350-KO Zellen, die transient das hSCF-gp350 Protein exprimieren, mit den daraus resultierenden Viren (Fraktionen 9, 10 und 11) läßt vermuten, daß das hybride Glykoprotein in die Hülle der EBV Mutante eingebaut wird. Das unterschiedliche Laufverhalten des

Proteins in den EBV-positiven 293 Zellen im Vergleich zu normalen 293 Zellen ist sehr wahrscheinlich auf die Induktion des lytischen Zyklus von EBV und der damit veränderten Genexpression viraler sowie zellulärer Gene zurückzuführen. Hierbei könnte es sich z. B. um weiterreichende posttranslationale Modifikationen wie Glykosylierung handeln. Eine eindeutige Aussage ist anhand dieses Experiments jedoch nicht möglich.



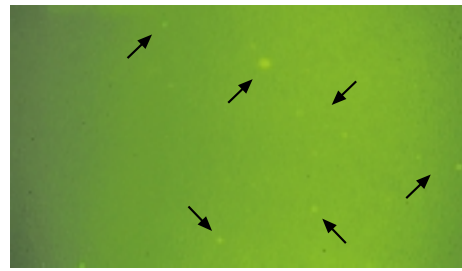
**Abb. 4.13: Westernblot-Analyse zum Nachweis des hSCF-gp350 Fusionsproteins in der Hülle von gp350-negativem EBV.** 293 Zellen wurden mit je 1 µg eines Expressionsplasmids für GFP oder hSCF-gp350 transfiziert. Zwei Tage später wurden die Zellen lysiert und die Membranproteine isoliert (siehe Kap. 3.5.1). Parallel dazu wurden 293-gp350-KO Zellen induziert und transient mit dem Expressionsplasmid für hSCF-gp350 transfiziert. Die entstandenen Viren wurden konzentriert, über einen Sucrosegradienten aufgereinigt und fraktioniert (siehe auch Kap. 3.2.8). Die Fraktionen 4, 5 und 6 des Gradienten enthalten kein Virus, während die Fraktionen 9,10 und 11 den Hauptanteil an Viruspartikeln aufweisen. Die Fraktionen 15,16 und 17 im oberen Teil des Gradienten enthalten nur geringe Mengen Virus, da sie sich als schwach infektiös erwiesen. Als weitere Kontrollen dienten lytisch induzierte 293-gp350-KO Zellen, die entweder gp350 oder hSCF-gp350 exprimierten und wie im Fall der 293 Zellen (siehe weiter oben) entsprechend behandelt wurden. Die unterschiedlichen Proben wurden im Westernblot-Verfahren analysiert, wobei das hSCF-gp350 Konstrukt mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers gegen den hSCF Anteil detektiert wurde.

#### 4.4.4 hSCF-vermittelte Infektion von TF-1 Zellen

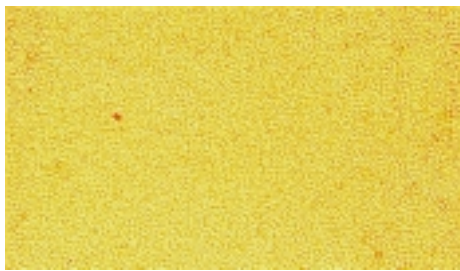
Im folgenden wurde die Infektiosität und der Tropismus der pseudotypisierten Viren getestet. Dafür wurden zunächst TF-1 Zellen, eine c-kit-positive, myeloische Vorläuferzelllinie, als Zielzellen für die Infektion verwendet. Die Expression des c-kit

Rezeptors auf der Zelloberfläche wurde vorab durch eine FACS-Analyse überprüft (nicht gezeigt). Die Zellen wurden mit konzentriertem Virusüberstand inkubiert, der entweder gp350-negatives EBV, die mit gp350 in trans komplementierte Mutante ("Wildtyp-EBV") oder die mit hSCF-gp350 pseudotypisierte gp350-Mutante enthielt ("hSCF-EBV"). Nach drei Tagen wurde mit Hilfe der GFP Expression analysiert, ob eine erfolgreiche Transduktion der Zellen stattgefunden hatte. Zur Verstärkung der GFP Genexpression wurden jeweils zwei Tage nach der Infektion TPA und Butyrat zum Medium hinzugegeben (siehe Kap. 3.2.6). Dies gilt auch für alle nachfolgenden Infektionsexperimente. Es zeigte sich, daß alle drei Überstände infektiös waren. Überraschenderweise waren sowohl Wildtyp-EBV als auch gp350-negatives EBV in der Lage, TF-1 Zellen zu infizieren. Dabei war in Abwesenheit von gp350 eine z.T. etwas niedrigere Infektionseffizienz zu beobachten (siehe Tab. 4.3). Im Vergleich zur Infektion mit gp350-negativem EBV (nicht abgebildet) und "Wildtyp-EBV" konnte nach Inkubation mit der hSCF-komplementierten EBV Mutante jedoch eine etwa 3- bis 6-fach höhere Infektionsrate erreicht werden (siehe Abb. 4.14 und Tab. 4.3). Um auszuschließen, daß eine höhere Infektiosität des "hSCF-EBV" Überstandes im Vergleich zu Wildtyp-EBV und gp350-negativem EBV für die effizientere Infektion der TF-1 Zellen verantwortlich war, mußten die Virustiter bestimmt und verglichen werden. Eine genaue Titerbestimmung durch die Infektion und anschließende Auswertung von GFP-positiven Raji Zellen ist jedoch nur für Wildtyp-EBV möglich. Eine andere Möglichkeit zur Titerbestimmung besteht in der Durchführung einer quantitativen PCR der viralen DNA im Virusüberstand. Allerdings kann es dabei durch die Detektion viraler DNA aus kontaminierenden, abgestorbenen Zellen und defekten Viruspartikeln zu fehlerhaften Ergebnissen kommen. Deshalb wurde diese Methode hier nicht angewendet. Da in diesem Fall jedoch ein Titervergleich zwischen gp350-negativem EBV und der mit hSCF-gp350 komplementierten EBV Mutante zulässig erschien, wurden Raji Zellen mit den verschiedenen Virusüberständen inkubiert (siehe Tab. 4.3). Es zeigte sich, daß die Infektionsrate von Raji Zellen mit der hSCF-pseudotypisierten Virusmutante sehr viel geringer war, als es mit gp350-negativem EBV beobachtet wurde. Diese Beobachtung ließ vermuten, daß die erhöhte Infektion der TF-1 Zellen mit "hSCF-EBV" spezifisch erfolgt und daß das hSCF-gp350 Fusionsprotein in diesem Fall eine Rolle spielt.

## + "Wildtyp-EBV"



## + "hSCF-EBV"



**Abb. 4.14: Infektion von TF-1 mit verschiedenen EBV Überständen.** TF-1 Zellen wurden mit "Wildtyp-EBV" oder "hSCF-EBV" inkubiert. Die Detektion der GFP-positiven Zellen erfolgte drei Tage später durch Fluoreszenzmikroskopie (Vergrößerung 200-fach).

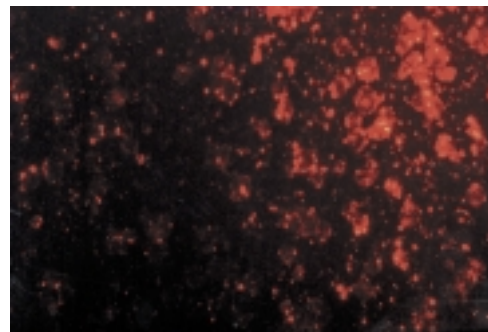
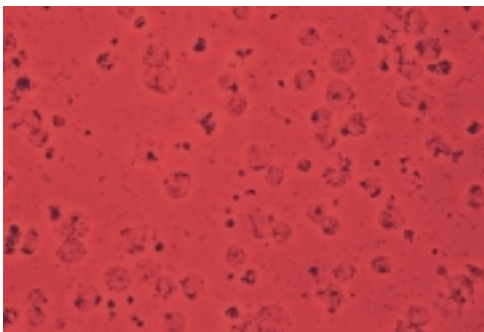
| Zellen            | % positive mit gp350-negativem EBV | % positive mit "Wildtyp-EBV" | % positive mit "hSCF-EBV" |
|-------------------|------------------------------------|------------------------------|---------------------------|
| Raji              | 6,5                                | 96                           | 0,35                      |
| TF-1              | 0,8                                | 1                            | 4,1                       |
| TF-1              | 0,5                                | 1                            | 3,5                       |
| TF-1 + anti-c-kit | -                                  | 1                            | 1,7                       |
| TF-1 + kit-Ligand | -                                  | 0,9                          | 2                         |

**Tab. 4.3: Infektionseffizienz von TF-1 Zellen mit unterschiedlichen EBV Überständen.** Der Prozentsatz der GFP-positiven Zellen nach Inkubation mit den verschiedenen Virusüberständen ist angegeben. Die Zahlen, die in den oberen beiden Reihen für Raji und TF-1 Zellen angegeben sind, repräsentieren den Mittelwert aus zwei unabhängig voneinander durchgeführten Infektionsexperimenten. Die drei unteren Zeilen der Tabelle zeigen die Ergebnisse eines unabhängigen Experimentes.

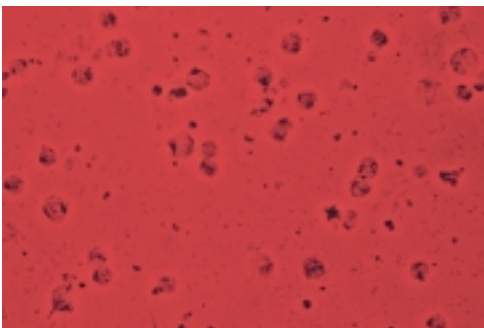
Parallel zu den Infektionsversuchen wurden Bindungsexperimente an TF-1 Zellen mit den verwendeten Virusüberständen durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abb. 4.15 dargestellt. Die Inkubation von TF-1 Zellen mit Überständen, die die pseudotypisierten Viren enthielten, und die anschließende Färbung mit einem monoklonalen Antikörper gegen hSCF führte zu positiven Ergebnissen in der Immunfluoreszenz (Abb. 4.15). Die Markierung mit dem Antikörper 72A1 zeigte, wie erwartet, keine eindeutigen Signale. Dagegen konnte nach Inkubation mit "Wildtyp-EBV" und anschließender Färbung mit dem gp350-spezifischen Antikörper 72A1 wiederum eine Bindung an TF-1 Zellen beobachtet werden (nicht gezeigt). Diese Versuche zeigen, dass sowohl "Wildtyp-EBV" als auch die mit hSCF komplementierte EBV Mutante in der Lage ist, an TF-1 Zellen zu binden. Außerdem konnte durch den Nachweis von hSCF wiederholt demonstriert werden, daß das hSCF-gp350 Fusionsprotein in die Virushülle von EBV eingebaut wird.

#### TF1 + "hSCF-EBV":

##### **+ anti-hSCF**



##### **+ anti-gp350**



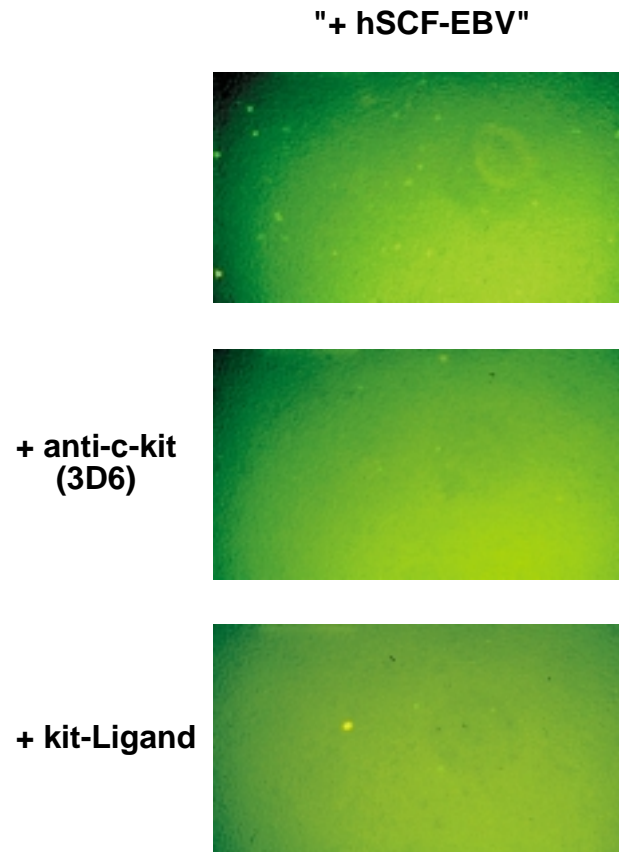
**Abb. 4.15: Bindungsexperiment mit TF-1 Zellen und anschließender Immunfluoreszenzfärbung.** TF-1 Zellen wurden mit "hSCF-EBV" 1 Std lang bei 4 °C inkubiert, gewaschen und mit Aceton fixiert. Anschließend wurde eine Immunfärbung der Zellen mit einem monoklonalen Antikörper gegen hSCF oder mit einem gp350-spezifischen Antikörper (72A1) durchgeführt. Zur Verstärkung der Signale erfolgte die Detektion durch Inkubation mit einem Biotin-gekoppelten Ziege anti-Maus Zweitantikörper und anschließender Inkubation mit Cy3-konjugiertem Streptavidin.

Um zu überprüfen, ob die erhöhte Infektionsrate mit "hSCF-EBV" tatsächlich auf die Interaktion zwischen dem Stammzellofaktor und seinem Rezeptor zurückzuführen ist, wurden Infektionsexperimente durchgeführt, bei denen der c-kit Rezeptor spezifisch blockiert wurde. TF-1 Zellen wurden erneut mit gp350-negativem EBV, "Wildtyp-EBV" und mit "hSCF-EBV" inkubiert. Parallel dazu wurde ein Versuchsansatz durchgeführt, bei dem die TF-1 Zellen vor Infektion mit "Wildtyp-EBV" und "hSCF-EBV" mit dem monoklonalen anti-c-kit Antikörper 3D6 inkubiert wurden. Für diesen Antikörper konnte gezeigt werden, daß er das Kolonienwachstum von mononukleären Zellen durch Stimulation mit dem kit-Liganden inhibiert (Reisbach et al., 1993). Dies bedeutet, daß der Antikörper 3D6 die Bindung des Liganden an den c-kit Rezeptor blockieren kann. Parallel dazu wurden TF-1 Zellen mit rekombinantem murinem SCF (mSCF), das auch an den humanen Rezeptor bindet (Martin et al., 1990), präinkubiert. Die Ergebnisse der Fluoreszenzmikroskopie sind in Abb. 4.16 zu sehen, die der FACS-Analyse sind in Tab. 4.3 aufgelistet. Während die Präinkubation der TF-1 Zellen mit dem Antikörper 3D6 und dem kit-Liganden keinen Einfluß auf die Infektionsrate mit "Wildtyp-EBV" hatte (nicht abgebildet, siehe Tab. 4.3), konnte die Infektion mit hSCF komplementiertem Virus in beiden Fällen bis zu 50% blockiert werden.

Diese Ergebnisse zeigen, daß EBV grundsätzlich TF-1 Zellen infizieren kann. Die niedrige Effizienz der Infektion kann durch die Verwendung der mit hSCF pseudotypisierten EBV Mutante gesteigert werden. Außerdem konnte demonstriert werden, daß die beobachtete Infektion durch die spezifische Bindung des hSCF-gp350 Fusionsproteins an den c-kit Rezeptor initiiert wird.

Abschließend wurde mit Hilfe der gp85-Mutante überprüft, ob es sich hierbei tatsächlich um eine Virusinfektion handelt, die nach der Bindung an den c-kit Rezeptor weitere Schritte, wie z. B. die virusvermittelte Membranfusion benötigt. Dazu wurden TF-1 Zellen mit Virusüberstand von induzierten 293-gp85-KO Zellen, die transient mit dem Expressionsplasmid für das hSCF-gp350 Fusionsprotein transfiziert wurden, inkubiert. Es war zu beobachten, daß dieser Virusüberstand keine TF-1 Zellen infizieren konnte (Ergebnisse nicht gezeigt). Dieser Versuch weist darauf hin, daß die Infektion von TF-1 Zellen, wie es auch bei B-Zellen der Fall ist,

nach erfolgter Adsorption durch EBV von der Expression des gp85 Glykoproteins abhängig ist.



**Abb. 4.16: Infektion von TF-1 Zellen mit "hSCF-EBV" wird durch die Interaktion von hSCF mit c-kit vermittelt.** TF-1 Zellen wurden mit gp350-KO-EBV, das transient mit dem hSCF-gp350 Konstrukt komplementiert worden war, inkubiert. Die infizierten Zellen wurden nach drei Tagen durch GFP Expression bestimmt (oben). In parallelen Versuchsansätzen wurden die TF-1 Zellen vor Infektion mit Virusüberstand entweder mit einem blockierenden Antikörper gegen den c-kit Rezeptor (3D6, 3 µg/ml Endkonzentration; mittlere Bildreihe) oder mit löslichem mSCF (kit-Ligand, 1 µg/ml Endkonzentration; untere Bildreihe) 30 min lang präinkubiert. Die Infektionen mit "Wildtyp-EBV" sind nicht gezeigt (Ergebnisse siehe Tab. 4.3).

#### 4.4.5 Infektion von CD34<sup>+</sup>/c-kit<sup>+</sup>-hämatopoetischen Stammzellen

Anhand der c-kit positiven Zelllinie TF-1 konnte die Funktionalität des hSCF-gp350 Fusionsproteins in Bezug auf den Einbau in die Virushülle und die Bindung an den c-kit Rezeptor mit anschließender Infektion nachgewiesen werden. Da beschrieben worden war, daß ca. 60% der CD34-positiven Zellen aus Nabelschnurblut c-kit koexprimieren (Reisbach et al., 1993), sollte im nächsten Schritt die Infektion von



CD34-positiven hämatopoetischen Stammzellen untersucht werden. Die Zellen wurden mit Hilfe paramagnetischer "Dynabeads", die mit CD34-spezifischem Antikörper gekoppelt sind, aus Nabelschnurblut isoliert. Anschließend wurde die angereicherte Stammzellfraktion mit CD19-spezifischen "Dynabeads" inkubiert, die es über einen gekoppelten monoklonalen Antikörper ermöglichen, verbliebene CD19-positiv B-Zellen zu entfernen. Dadurch sollte eine Kontamination der Stammzellpopulation mit den natürlichen Zielzellen von EBV vermieden werden. Die Expression der Oberflächenmarker CD34, c-kit und CD19 auf den isolierten, CD34-positiven Zellen wurde durch eine FACS-Analyse überprüft (nicht gezeigt). Es zeigte sich, daß von den isolierten Zellen etwa 77% CD34 auf der Zelloberfläche exprimierten. 50% dieser CD34-positiven Zellen wiesen ebenfalls eine starke Expression des c-kit Rezeptors auf. Trotz der durchgeführten CD19 Depletion fand sich unter den isolierten Zellen auch ein geringer Prozentsatz von etwa 3,9% an CD19-positiven Zellen. Von dieser Zellpopulation wiesen ca. 3% auch eine positive Oberflächenmarkierung für CD34 auf. Leider war es technisch nicht möglich, eine Kontamination mit dieser Subpopulation zu verhindern.

Die isolierten Stammzellen wurden anschließend mit Virusüberständen inkubiert, die entweder gp350-negatives EBV, "Wildtyp-EBV" oder "hSCF-EBV" enthielten. Nach zwei bis drei Tagen wurden die Zellen hinsichtlich der Expression von GFP untersucht. Während mit gp350-negativem EBV keine Infektion der Zellen stattgefunden hatte (nicht abgebildet), wurden nach Inkubation mit "Wildtyp-EBV" und der mit hSCF-gp350 pseudotypisierten Mutante GFP-positive Zellen, wenn auch in einer sehr geringen Anzahl, beobachtet (siehe Abb. 4.17, A). Die Infektionseffizienz mit "hSCF-EBV" war dabei jedoch im Vergleich zur beobachteten "Wildtyp-EBV" Infektion um das vierfache höher (siehe Tab. 4.4). Aufgrund der sehr niedrigen Infektionsrate konnte keine FACS-Analyse durchgeführt werden, die Anzahl GFP-positiver Zellen wurde direkt durch Fluoreszenzmikroskopie bestimmt.

Wie in Kap. 4.4.4 beschrieben, wurden auch in diesem Fall die Infektionsexperimente mit vorheriger Blockierung des c-kit Rezeptors durch Zugabe von löslichem kit-Ligand wiederholt. Dabei stellte sich heraus, daß sich die Infektion der primären Zellen mit "hSCF-EBV" fast vollständig inhibieren ließ (Abb. 4.17, B; links unten). Die Präinkubation der Zellen mit kit-Ligand hatte jedoch keinen Einfluß auf die Anzahl

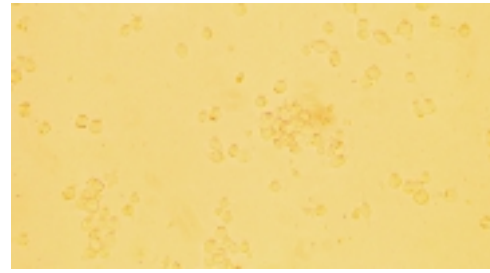
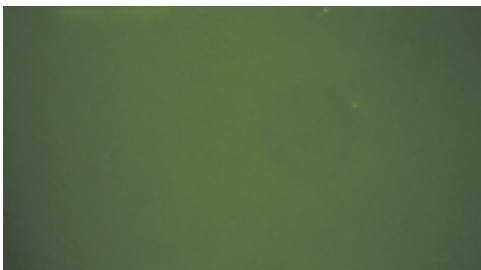
GFP-positiver Zellen, die nach Infektion mit "Wildtyp-EBV" beobachtet wurden (siehe Abb. 4.17, B und Tab. 4.4). Dieses Experiment deutet darauf hin, daß die wenigen, mit "Wildtyp-EBV" infizierten Zellen sehr wahrscheinlich der CD19-positiven Subpopulationen zuzuordnen sind, die im FACS nachgewiesen worden waren. Zur Bestätigung wurden diese Zellen nach der Infektion in Kultur gehalten. Nach drei Wochen liessen sich immortalisierte Zellklone nachweisen, die in der FACS-Analyse eine starke, B-zelltypische CD19 Expression aufwiesen (nicht gezeigt).

| Virusüberstand      | GFP-positive Zellen | <u>+ kit-Ligand:</u><br>GFP-positive Zellen |
|---------------------|---------------------|---|
| gp350-negatives EBV | -                   | -   |
| "Wildtyp-EBV"       | 12                  | 11  |
| "hSCF-EBV"          | 45                  | 1   |

**Tab. 4.4:** Anzahl GFP-positiver, CD34-exprimierender Vorläuferzellen nach Inkubation mit unterschiedlichen EBV Überständen. Die rechte Spalte zeigt das Ergebnis nach Präinkubation mit löslichem kit-Ligand. Die Angaben beziehen sich auf  $10^5$  eingesetzte Zellen.

Gleichzeitig lassen die Ergebnisse vermuten, daß die Infektion von primären CD34-/c-kit-positiven Zellen mit "hSCF-EBV", wie im Fall der TF-1 Zellen, durch die spezifische Interaktion zwischen dem hybriden Glykoprotein hSCF-gp350 und dem c-kit Rezeptor vermittelt wird.

**Abb. 4.17: "hSCF-EBV" infiziert CD34-/c-kit-positiv Zellen durch Bindung an den c-kit Rezeptor. A)** Aus Nabelschnurblut isolierte CD34-positive Zellen wurden mit je 0,8 ml Virusüberstand, der entweder gp350-negatives EBV (nicht gezeigt), "Wildtyp-EBV" oder "hSCF-EBV" enthielt, inkubiert. Nach drei Tagen wurden infizierte Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie bestimmt (GFP Expression). Die oberen Bilder zeigen die Zellen im Phasenkontrast (+ "hSCF-EBV": 200-fache Vergrößerung; +"Wildtyp-EBV": 320-fache Vergrößerung). **B)** Die Zellen wurden vor der Zugabe von "hSCF-EBV" (links) oder "Wildtyp-EBV" (rechts) mit kit-Ligand ( $1\mu\text{g/ml}$  Endkonzentration) 30 min lang inkubiert.

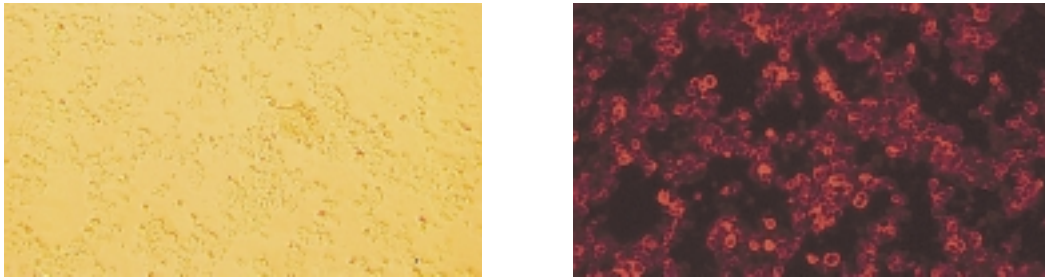
**A****+ "hSCF-EBV"****+ "Wildtyp-EBV"****B****Präinkubation mit löslichem mSCF**

#### **4.5 Retargetierung der gp350/gp85-negativen EBV Glykoproteinmutante mit dem Glykoprotein des "Lymphocytic Choriomeningitis Virus" (LCMV)**

In den vorangegangenen Kapiteln konnte gezeigt werden, daß die Retargetierung von EBV durch den Einbau eines die Bindung vermittelnden, heterologen Liganden in die Virushülle erreicht werden kann. Abschließend sollte mit Hilfe der Doppel-KO-EBV Mutante untersucht werden, ob eine erfolgreiche Pseudotypisierung auch nach Deletion des für die Infektion essentiellen Glykoproteins gp85 möglich ist. Dazu sollte das Glykoprotein eines Virus verwendet werden, das sowohl die Bindung als auch

die Fusion mit der Wirtsmembran vermitteln kann. Wie schon in Kap. 1.2 beschrieben, wird das G Protein des "Vesicular Stomatitis Virus" (VSV) als Modellmolekül zur Retargetierung verschiedener Viren eingesetzt. Allerdings ist bekannt, daß das VSV Glykoprotein zelltoxisch ist (Burns et al., 1993). Im Gegensatz dazu hat die Expression der Glykoproteine (GP) des "Lymphocytic Choriomeningitis Virus" (LCMV), ein Vertreter der Arenaviren, keinen toxischen Nebeneffekt. Diese Glykoproteine werden als 74 kDa großes Vorläuferprotein (GP-C) synthetisiert und anschließend in ein Transmembranprotein von 35 kDa Größe (GP-2) und in ein extrazelluläres, 44 kDa großes Protein (GP-1) gespalten. Nach der Prozessierung bleiben die Proteine GP-1 und GP-2 nicht kovalent miteinander assoziiert (Burns and Buchmeier, 1991). Die erfolgreiche Pseudotypisierung eines auf MLV-basierenden, retroviralen Vektors mit diesem Glykoprotein ist in der Literatur beschrieben worden (Miletic et al., 1999). Aufgrund dieser Eigenschaften sollte die Funktionalität der LCMV Glykoproteine für die Retargetierung der gp350/gp85-Nullmutante untersucht werden. Die Ergebnisse dieser Infektionsexperimente sind im folgenden Abschnitt dargestellt. Aufgrund der sehr geringen Infektionsraten wurde keine FACS Analyse der GFP-positiven Zellen durchgeführt. Die Evaluierung der infizierten Zellen erfolgte mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie.

293-gp350/gp85-KO Zellen wurden lytisch induziert und gleichzeitig transient mit einem Expressionsplasmid für das LCMV-GP-C transfiziert. Die korrekte Expression der Glykoproteine des LCMV wurde in einer Immunfluoreszenz-Analyse mit einem monoklonalen Antikörper gegen das GP-1 Protein überprüft. Dies ist in Abb. 4.18 gezeigt. Parallel dazu wurden die Zellen während der Induktion des lytischen Zyklus transient mit den Glykoproteinen gp350 und gp85 komplementiert. Die Expression der EBV Glykoproteine wurde ebenfalls durch eine Färbung mit den entsprechenden Antikörpern nachgewiesen (nicht gezeigt). Anschließend wurde die Infektiosität der Überstände an verschiedenen Zelllinien getestet. Als Negativkontrolle wurden auch Virusüberstände eingesetzt, die die nicht komplementierte Doppel-KO-Mutante enthielten.

**+ anti-GP-1:**

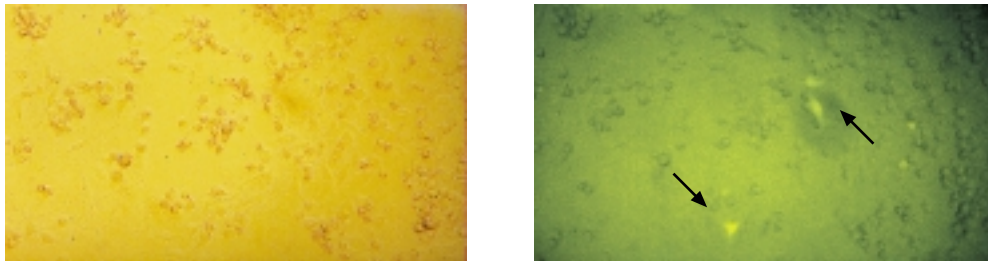
**Abb. 4.18: Expression des LCMV-GP-1 in lytisch induzierten 293-gp350/gp85-KO Zellen.** Die Zellen wurden mit BZLF1 induziert und mit einem Expressionsplasmid für das LCMV Vorläuferglykoprotein (1 µg/Loch einer 6-Loch-Platte) kotransfiziert. Drei Tage nach der Induktion wurden die Zellen geerntet und in einer Immunfluoreszenz-Analyse mit einem monoklonalen Antikörper gegen GP-1 und einem Cy3-gekoppelten Ziege anti-Maus Antikörper gefärbt. Das linke Bild zeigt die Zellen im Phasenkontrast (Vergrößerung 200-fach).

Alpha-Dystroglykan (alpha-DG) ist als Rezeptor für LCMV identifiziert worden (Cao et al., 1998). Da alpha-DG auf vielen, unterschiedlichen Zelltypen exprimiert wird, besitzt LCMV ein sehr breites Wirtsspektrum. Die generierten Virusüberstände wurden auf HeLa Zellen, Vero und TF-1 Zellen getestet, für die eine LCMV Infektion nachgewiesen werden konnte (Borrow and Oldstone, 1992; Miletic et al., 1999). Zur Überprüfung der Infektiosität der generierten Überstände wurden Raji Zellen verwendet.

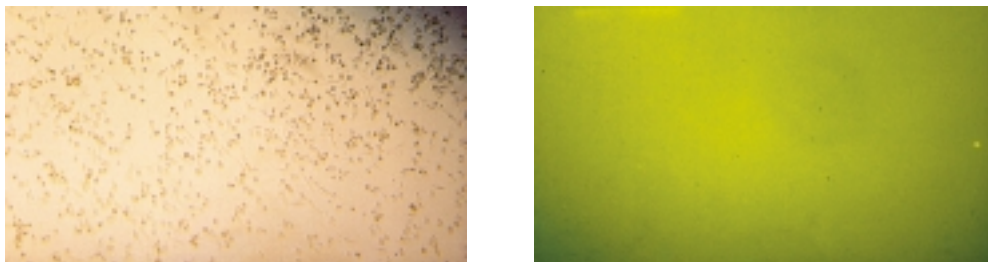
Wie es aus vorherigen Ergebnissen zu erwarten war, hatte die Inkubation der verschiedenen Zelllinien mit der Doppel-KO-Mutante keine Infektion zur Folge. Nach Komplementierung der Doppel-KO-Mutante mit gp350 und gp85 ("Wildtyp-EBV") ließ sich jedoch die Infektiosität im Fall von Raji, TF-1 und Vero Zellen wieder herstellen. Die Infektionsrate der einzelnen Zelllinien mit "Wildtyp-EBV" war mit früheren Ergebnissen vergleichbar (siehe Tab. 4.1 und 4.3). Im Gegensatz zu früheren Infektionsexperimenten (siehe Tab. 4.1) konnten diesmal nach Inkubation von HeLa Zellen mit "Wildtyp-EBV" drei GFP-positive Zellen beobachtet werden. Nach Inkubation der verschiedenen Zelllinien mit der Doppel-KO-Mutante, die transient mit LCMV-GP komplementiert worden war, konnte allerdings eine eindeutige, effizientere Infektion von HeLa Zellen beobachtet werden (siehe Abb. 4.19). Die Anzahl der GFP-positiven Zellen lag bei etwa 100 (ca. 0,1% auf  $10^5$  eingesetzte Zellen bezogen). Raji, TF-1 und Vero Zellen liessen sich dagegen nicht mit der

"pseudotypisierten" EBV Mutante infizieren. Da EBV ohne gp85 nicht mehr in der Lage ist, Zellen zu infizieren, deuten die Ergebnisse daraufhin, daß in diesem Fall die LCMV Glykoproteine sowohl die Bindung an HeLa Zellen als auch die anschließende Membranfusion vermitteln.

**A + LCMV-GP/Doppel-KO-EBV**



**B + "Wildtyp-EBV"**



**Abb. 4.19: Infektion von HeLa Zellen mit gp350/gp85-negativem EBV, das transient mit dem Glykoprotein des LCMV komplementiert wurde.** HeLa Zellen wurden mit je 1 ml Virusüberstand, der entweder die mit LCMV-GP pseudotypisierte Doppel-KO-Mutante (A) oder die mit gp350 und gp85 komplementierte EBV Mutante ("Wildtyp-EBV", B) enthielt, inkubiert. Die Detektion der GFP-positiven Zellen erfolgte drei Tage später mittels Fluoreszenzmikroskopie (A: Vergrößerung 200-fach; B: Vergrößerung 100-fach).

Anhand dieser Infektionsexperimente konnte gezeigt werden, daß die Retargetierung und Infektion von HeLa Zellen mit der nicht infektiösen gp350/gp85-negativen EBV Mutante durch die Glykoproteine eines artverschiedenen Virus möglich ist. Die Effizienz der Pseudotypisierung war allerdings gering, ähnlich der Versuche mit den c-kit-positiven Vorläuferzellen.

## 5. Diskussion

Bei den natürlichen Wirtszellen des Epstein-Barr Virus handelt es sich vornehmlich um B-Zellen, die in vivo und in vitro infiziert werden können. Durch diese Eigenschaft sind EBV-abgeleitete Genvektoren für die Entwicklung von B-zellspezifischen Gentransfersystemen prädestiniert. Andererseits können aufgrund dieses begrenzten Wirtsspektrums weitere Zelltypen, die für die Gentherapie von großem Interesse sind, nicht transduziert werden. Zu diesen Zelltypen zählen insbesondere hämatopoetische Stammzellen. Andere Viren wiederum weisen ein sehr breites Wirtsspektrum auf, wodurch auch die Spezifität der abgeleiteten Vektoren verloren geht. Um diese Limitationen zu umgehen, wird versucht, den Tropismus von umhüllten Viren zu manipulieren. Dieser Prozeß wird Pseudotypisierung genannt und beschreibt den Ersatz der intrinsischen, viralen Liganden durch den Einbau von heterologen Glykoproteinen oder zellulären Proteinen in die Virushülle. Die Fremdproteine vermitteln anschließend den Eintritt in gewünschte Zielzellen. Dieser Vorgang ist insbesondere bei Retroviren, aber auch bei anderen Viren wie Adenoviren, AAV und HSV-1 angewandt und in der Literatur beschrieben worden (siehe Kap. 1.2).

Über die Retargetierung von EBV liegen bisher keine Studien vor. Ziel meiner Arbeit war es daher, den Tropismus von EBV durch Pseudotypisierung spezifisch zu erweitern oder zu verändern. Auf der Basis des Maxi-EBV Plasmids (siehe Kap. 1.4.2) sollten die Glykoproteine gp350 und gp85, die für die Infektion der EBV Zielzellen von Bedeutung sind (siehe Kap. 1.4.1), deletiert und z. T. durch heterologe Liganden oder virale Glykoproteine ersetzt werden.

### 5.1 EBV Infektion von B-Zellen und Epithelzellen: ein alternativer Infektionsmechanismus in Abwesenheit von gp350/220

Die Herstellung von Nullmutanten der Glykoproteine gp350 und gp85 sowie die Konstruktion einer Doppelmutante erfolgte mittels homologer Rekombination in *E. coli*. Durch Einführung verschiedener Antibiotika-Resistenzgene in die Gene der

einzelnen Glykoproteine auf dem Maxi-EBV Plasmid war es möglich, positive Bakterienklone, die die mutierten EBV Genome tragen, zu selektionieren. Nach Überprüfung der daraus isolierten Maxi-EBV Plasmide wurden diese in 293 Zellen transfiziert. Es ist mir gelungen, stabile Zellklone zu etablieren, die das jeweilige mutierte EBV Genom episomal tragen (293-gp350-KO, 293-gp85-KO und 293-gp350/gp85-KO Zellen). Es konnte nachgewiesen werden, daß diese Zelllinien den lytischen Zyklus von EBV unterstützen und reife Viruspartikel mit den entsprechenden Mutationen produzieren (siehe Abb. 4.3, 4.5 und 4.6). Für das Glykoprotein gp85 war bereits früher gezeigt worden, daß es eine essentielle Rolle bei der Membranfusion der Virushülle mit der Wirtsmembran spielt (Miller and Hutt-Fletcher, 1988; Haddad and Hutt-Fletcher, 1989). Dies konnte durch die Infektionsexperimente mit Raji Zellen bestätigt werden. Auch die Doppel-KO-Mutante erwies sich, wie erwartet, als nicht infektiös.

Im Gegensatz dazu konnten nach Inkubation mit der gp350-negativen EBV Mutante GFP-positive Raji Zellen beobachtet werden. Die Infektionseffizienz war allerdings im Vergleich zur Infektion mit Wildtyp-EBV oder der mit gp350 in trans komplementierten Mutante stark reduziert (10- bis 12-fach). Vergleichsweise zeigte sich, daß gp350-negatives EBV auch in der Lage war, primäre B-Lymphozyten zu infizieren und zu immortalisieren. Die HLA-Klasse-II-negativen Raji 2.2.5 Zellen konnten ebenfalls in Abwesenheit von gp350 infiziert werden. In diesem Fall wies die Infektionsrate allerdings im Vergleich zu normalen Raji Zellen eine weitere Reduktion auf.

Diese Ergebnisse waren überraschend, da sie früheren Arbeiten widersprechen. Bisher war angenommen worden, daß die Bindung des viralen Liganden gp350 an den EBV Rezeptor CD21 eine Voraussetzung für den Viruseintritt in die B-Zelle ist. Anhand der Vorinkubation von B-Zellen mit multimeren gp350-abgeleiteten Peptiden wurde z. B. gezeigt, daß die Inhibierung der Interaktion zwischen gp350 und CD21 die Infektion und Immortalisierung von B-Lymphozyten durch EBV verhindert (Nemerow et al., 1989). Unter Verwendung einer Mutante des gp350 Proteins, der der N-Terminus einschließlich der CD21 Bindungsstelle fehlt oder durch Inkubation mit löslichem gp350 konnte ebenfalls eine Blockierung der EBV Adsorption beobachtet werden (Tanner et al., 1988). Eine mögliche Erklärung für die



widersprüchlichen Resultate ist, daß der Einsatz von multimeren gp350 Peptiden sowie von löslichem gp350 zu unspezifischen, sterischen Behinderungen auf der Zelloberfläche geführt haben könnte, wodurch der Zugang anderer, potentieller EBV Liganden inhibiert wurde. Die in meiner Arbeit beobachteten Ergebnisse auf der Basis von genetisch veränderten EBV Partikeln zeigen dagegen deutlich, daß gp350 sowohl für die Infektion und Immortalisierung von B-Lymphozyten als auch für die Infektion von Burkitt-Lymphom Zelllinien wie Raji und Raji 2.2.5 Zellen nicht essentiell ist. Diese Daten weisen auf die Existenz eines zusätzlichen viralen Liganden hin, der in der Lage ist, den gp350-negativen Phänotyp partiell zu komplementieren und die Bindung von EBV an die natürlichen Zielzellen zu vermitteln. Anhand der Ergebnisse des Inhibitionsexperimentes mit CD21-blockierenden Antikörpern (siehe Abb. 4.10, C) kann angenommen werden, daß im Fall der gp350-negativen EBV Mutante der Viruseintritt in die Zelle neben CD21 einen weiteren Rezeptor auf B-Zellen involviert.

Alternative Bindungs- und Infektionsmechanismen sind bei anderen Herpesviren wie den  $\alpha$ -Herpesviren HSV-1 und -2 schon länger bekannt (Übersicht in Spear, 1993; Spear et al., 2000). Das HSV-1 gC Glykoprotein wird z. B. für die Bindung des Virus an Heparansulfat auf der Zelloberfläche benötigt. Das Glykoprotein gB trägt ebenfalls, wenn auch in einem geringeren Grad, zur Bindung an Heparansulfat bei. Es wurde gezeigt, daß gC-negative Virusmutanten in ihrer Bindungsfähigkeit stärker eingeschränkt sind als solche, denen das gB Glykoprotein fehlt (Laquerre et al., 1998b). Daneben kodiert HSV-1 noch für ein weiteres virales Hüllprotein, gD. Für dieses Glykoprotein konnte gezeigt werden, daß es mit mehreren humanen Rezeptoren interagiert. Dazu gehören unter anderem das "herpesvirus entry protein A" HveA (HVEM), ein Mitglied der Familie der "tumor necrosis growth factor" Rezeptoren (Montgomery et al., 1996), sowie das Molekül HveC, das eine Homologie zum Poliovirus Rezeptor aufweist (Geraghty et al., 1998). Die Bindung an einen dieser Rezeptoren scheint die Fusion der Virushülle mit der Zellmembran auszulösen. Ähnliche Infektionsmechanismen sind auch beim humanen Cytomegalovirus (HCMV), einem  $\beta$ -Herpesvirus, bekannt. In diesem Fall wurde beobachtet, daß der gC-II Glykoproteinkomplex die Bindung an Heparin vermittelt (Kari and Gehrz, 1992). Wie für HSV beschrieben, ist das Glykoprotein gB des humanen CMV ebenfalls in der Lage, mit Heparansulfat zu interagieren (Compton et

al., 1993; Boyle and Compton, 1998). Neben dieser initialen Bindung erkennt gB verschiedene Rezeptoren wie z. B. Annexin II (Pietropaolo and Compton, 1997) und andere, noch nicht näher identifizierte Moleküle (Boyle and Compton, 1998).

Im Fall von EBV gibt es mehrere Hüllproteine, für die gezeigt werden konnte, daß sie für den Viruseintritt in die Zelle wichtig sind. Der gp85/gp25-Komplex z. B. vermittelt die Fusion der Virushülle mit der Zellmembran (Miller and Hutt-Fletcher, 1988; Yaswen et al., 1993). Das dritte Glykoprotein dieses Komplexes, gp42, besitzt die Eigenschaft, mit HLA-Klasse-II-Molekülen zu interagieren (Li et al., 1995; Spriggs et al., 1996). Diese Moleküle werden daher als Korezeptoren für die EBV Infektion von B-Lymphozyten angesehen (Li et al., 1997). Die Resultate der hier durchgeführten Infektionsexperimente mit Raji und Raji 2.2.5 Zellen zeigen jedoch, daß HLA-Klasse-II-Moleküle zumindest für die Infektion von Raji Zellen keine entscheidende Funktion haben. Dies ist in Übereinstimmung mit Ergebnissen der Arbeiten Faggionis et al. (Faggioni et al., 1990). Da auch gp350-negatives EBV HLA-Klasse-II-negative Raji Zellen infizieren kann, muß angenommen werden, daß diese Moleküle bei der Vermittlung der gp350-unabhängigen Infektion ebenfalls keine essentielle Rolle spielen. Allerdings kann aufgrund der stark reduzierten Infektionsrate von Raji 2.2.5 Zellen, im Vergleich zur normalen Raji Population, eine Funktion von gp42 bei diesem alternativen Infektionsmechanismus nicht ausgeschlossen werden.

EBV besitzt noch weitere Glykoproteine wie z.B. gp78, gp150 oder gM, deren Funktionen bislang nicht näher beschrieben worden sind. Ein Beitrag dieser Glykoproteine zum Viruseintritt in B-Zellen in Abwesenheit von gp350 ist möglich und kann bis dato nicht ausgeschlossen werden.

## **5.2 Die Rolle von CD21 bei der EBV Infektion von Epithelzellen**

Durch den Nachweis des viralen Genoms in Nasopharynxkarzinomen konnte gezeigt werden, daß EBV neben B-Zellen auch Epithelzellen in vivo infiziert (zur Hausen et al., 1970; Miller, 1990). Die Infektion von Epithelzellen in vitro ist ebenfalls beobachtet worden (Sixbey et al., 1983). Zur abschließenden Charakterisierung der gp350-negativen EBV Mutante wurden deshalb verschiedene Epithelzelllinien getestet und mit Virusüberständen, die entweder Wildtyp-EBV, gp350-negatives EBV

oder die mit gp350 in trans komplementierte EBV Mutante enthielten, inkubiert. Es zeigte sich, daß die Zelllinien 293, 293-TB und Vero, die mit Wildtyp-EBV infizierbar waren, sich auch mit gp350-negativem EBV prinzipiell infizieren liessen (siehe Tab. 4.1). Eine Ausnahme bildeten HEp-2 Zellen, die sich nur zu einem minimalen Prozentsatz mit Wildtyp-EBV infizieren liessen. Deswegen kann in Bezug auf die Infizierbarkeit dieser Zelllinie mit der gp350-negativen Mutante keine Schlußfolgerung gezogen werden. Wie es auch schon bei der Infektion von B-Zellen beobachtet worden war, liessen sich 293 und 293-TB Zellen mit der gp350-negativen EBV Mutante schlechter infizieren als mit Wildtyp-EBV. Nach Komplementierung der Virusmutante mit gp350 in trans erreichte die Infektionsrate von 293 und 293-TB Zellen wieder den Wert einer Wildtyp-EBV Infektion (siehe Tab. 4.1). Diese Beobachtungen weisen erneut auf die Existenz eines zusätzlichen EBV Hüllproteins hin, das die fehlende Funktion von gp350 auch bei der Infektion von Epithelzellen teilweise kompensieren kann.

Der Mechanismus, über den EBV Epithelzellen infiziert, ist weit weniger verstanden, als es für B-Lymphozyten der Fall ist. Zum Beispiel ist die Rolle von CD21 als EBV Rezeptor bei der Infektion von Epithelzellen bislang sehr kontrovers diskutiert worden. Mehrere Gruppen haben untersucht, ob noch ein weiterer EBV Rezeptor auf Epithelzellen existieren könnte. Es wurde gezeigt, daß einige epitheliale Zelllinien wie 293 oder primäre Epithelzellen der Rachenschleimhaut eine relativ niedrige CD21 Expression aufweisen (Young et al., 1986; Fingeroth et al., 1999). Dagegen konnte in Nasopharynxkarzinom- und Magenkarzinomzellen keine CD21 Expression detektiert werden (Miller, 1990; Yoshiyama et al., 1997). Die Untersuchungen in dieser Arbeit demonstrieren, daß 293 Zellen keine CD21 Expression in der FACS-Analyse aufweisen (Abb. 4.10, A). Im Gegensatz aber zu der Arbeit von Imai et al. (Imai et al., 1998) konnte ich mit Hilfe der RT-PCR CD21-spezifische mRNA Transkripte in diesen Zellen detektieren (Abb. 4.10, B). Dieses Resultat läßt vermuten, daß die Oberflächenexpression von CD21 posttranskriptionell reguliert wird oder das Expressionsniveau unter der Nachweisgrenze der FACS-Analyse liegt. Die Ergebnisse des CD21 Inhibitionsexperiments zeigten, daß die Vorinkubation mit einem CD21-blockierenden Antikörper zu einer Reduktion der Infektionsrate von 293 und 293-TB Zellen mit der komplementierten EBV Mutante ("Wildtyp-EBV") führt

(Abb. 4.10, C). Daher ist anzunehmen, daß diese Zellen eine sehr geringe CD21 Expression aufweisen, die bei der Infektion aber eine wichtige Rolle spielt. Die bessere Infizierbarkeit des 293-TB Subklons im Vergleich zur parentalen 293 Zellpopulation, ist deshalb sehr wahrscheinlich durch die Selektion auf eine höhere CD21 Oberflächenexpression dieses Zellklons zu erklären. Im Gegensatz dazu hatte die Blockierung des CD21 Moleküls keinen Einfluß auf die Infektion der 293 Zelllinien mit der gp350-negativen Mutante. Dieses Ergebnis demonstriert, daß die Bindung der gp350-KO-Mutante an Epithelzellen, wie im Fall von B-Zellen, ebenfalls über einen zusätzlichen alternativen Rezeptor erfolgen muß.

In einer neueren Arbeit von Molesworth et al. wurde gezeigt, daß eine EBV Mutante, der der gp85/gp25/gp42-Komplex fehlt, eine reduzierte Bindung an CD21-negative Epithelzellen aufweist. Die Bindung an B-Zellen wurde dagegen nicht beeinflusst. Zusätzliche Experimente mit entsprechenden inhibierenden Antikörpern ließen vermuten, daß gp85 eine Rolle bei der Bindung an diese Epithelzellen spielt (Molesworth et al., 2000). Im Hinblick auf die Infektionsexperimente mit der gp350-negativen EBV Mutante stellt diese Hypothese ein attraktives Modell für die Interaktion eines zusätzlichen viralen Liganden mit einem bis jetzt unbekanntem Rezeptor auf Epithelzellen als auch auf B-Zellen dar. Allerdings können anhand der in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnisse keine Aussagen bezüglich der Identität dieses EBV Liganden getroffen werden.

### **5.3 Pseudotypisierung von EBV durch einen zellulären Liganden, den humanen Stammzellfaktor (hSCF)**

Nach der Charakterisierung der gp350-negativen EBV Mutante bezüglich Reifung und Infektiosität wurde diese Glykoprotein-Nullmutante zur Generierung pseudotypisierter Viruspartikel eingesetzt. Die Bindungsaktivität des gp350 Proteins sollte durch die des humanen Stammzellfaktors (hSCF) ersetzt werden. Um prinzipiell den Einbau des zellulären Liganden in die Virushülle zu erreichen, sollte deshalb ein Fusionsprotein aus hSCF und gp350 konstruiert werden. Der hSCF Anteil besteht aus der Domäne, die die Bindung an den c-kit Rezeptor vermittelt, und dem Signalpeptid des Stammzellfaktors. Diese Proteinsequenzen fusionieren mit dem

intrazellulären Bereich, der Transmembrandomäne und weiteren C-terminalen Sequenzen des gp350 Proteins. Vorangehende Experimente mit verschiedenen GFP-gp350 Chimären zeigten, daß große N-terminale Bereiche des EBV Glykoproteins deletiert werden können, ohne den Transport der Fusionskonstrukte zur Plasmamembran zu beeinflussen (Abb. 4.11). Das anschließend klonierte hSCF-gp350 Fusionsprotein erwies sich, wie erwartet, als integrales Membranprotein mit eindeutiger Lokalisierung in der Plasmamembran in 293 Zellen (Abb. 4.12) wie auch in 293-gp350-KO Zellen (nicht gezeigt). Die Produktion der hSCF-gp350-komplementierten EBV Mutanten erfolgte durch transiente Expression des Fusionsproteins in 293-gp350-KO Zellen. Die Westernblot-Analyse der gereinigten Viruspartikel mit einem monoklonalen Antikörper gegen humanes SCF bestätigte, daß das Fusionsprotein tatsächlich in die Virushülle eingebaut wird (Abb. 4.13). Dieses Ergebnis läßt vermuten, daß EBV seine endgültige Hülle durch die Knospung an der Plasmamembran von infizierten Zellen erhält, wie es auch von Gong et al. vorgeschlagen worden ist (Gong and Kieff, 1990).

In der Literatur ist bislang keine gp350 Proteindomäne beschrieben worden, die für die Inkorporation des Glykoproteins in die EBV Hülle verantwortlich ist. Die Untersuchungen mit anderen Herpesviren weisen allerdings darauf hin, daß der intrazelluläre, C-terminale Teil verschiedener Hüllglykoproteine für die Prozessierung und Lokalisierung innerhalb der Zelle wichtig ist. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen meiner Arbeit. Im Fall des Glykoproteins gB des HSV-1 wurde z. B. beobachtet, daß der intrazelluläre Transport von gB-Mutanten, die Deletionen innerhalb der zytoplasmatischen Domäne tragen, gestört ist (Raviprakash et al., 1990; Rasile et al., 1993). Dies scheint auch auf das HSV-1 gC Glykoprotein zuzutreffen. Obwohl beobachtet wurde, daß der zytoplasmatische Bereich für die Inkorporation in die Virushülle nicht essentiell zu sein scheint (Holland et al., 1988), spielt er trotzdem eine Rolle bei der effizienten und korrekten Prozessierung des Glykoproteins (Skoff and Holland, 1993).

Das unterschiedliche Laufverhalten des hSCF-gp350 Fusionsproteins aus transient transfizierten 293 Zellen im Vergleich zu dem aus 293-gp350-KO Zellen und reifen Viruspartikeln weist auf posttranslationale Modifikationen in Abhängigkeit von der EBV Reifung hin. Das Konstrukt könnte in EBV-produzierenden Zellen sowie in den

entstehenden Viruspartikeln z. B. stärker glykosyliert vorliegen als in normalen 293 Zellen. Es wäre auch denkbar, daß das hybride Glykoprotein mit viralen Proteinen, die ebenfalls in die Virushülle eingebaut werden, sehr stark interagiert. Eine mögliche Komplexbildung des gp350 Proteins mit anderen EBV Proteinen ist bisher nicht in der Literatur beschrieben worden. Für das Fusionsprotein können jedoch keine Vorhersagungen getroffen werden. Die denaturierenden und reduzierenden Bedingungen bei der Probenaufbereitung lassen diese Erklärung allerdings als eher unwahrscheinlich erscheinen.

Im nächsten Schritt wurde unter Verwendung der myeloischen, c-kit exprimierenden Zelllinie TF-1 die Infektiosität der pseudotypisierten EBV Partikel analysiert. Die Resultate der Infektionsexperimente zeigten, daß sowohl gp350-negatives EBV, "Wildtyp-EBV" als auch die mit hSCF pseudotypisierte Mutante TF-1 Zellen infizieren können. Die Quantifizierung der GFP-positiven Zellen durch FACS-Analyse und Fluoreszenzmikroskopie zeigte jedoch deutlich, daß sich die Infektionseffizienz durch den Einbau des hSCF-gp350 Fusionsproteins in die EBV Hülle steigern ließ (siehe Abb. 4.14 und Tab. 4.3). Durch die parallele Infektion von Raji Zellen konnte ein erhöhter Virustiter im Vergleich zum Virusüberstand, der die gp350-negative EBV Mutante enthielt, weitgehend ausgeschlossen werden. Dafür spricht auch, daß alle verwendeten Virusüberstände durch Induktion derselben Zelllinie gewonnen wurden. Die Exposition des hSCF-gp350 Fusionsproteins auf der EBV Hülle scheint eher eine Inhibition der Infektion von Raji Zellen zu bewirken (siehe Tab. 4.3). Dies könnte z. B. durch die Behinderung der Bindung des alternativen EBV Liganden zustande kommen.

Die Blockierung des c-kit Rezeptors durch lösliches mSCF und einen Antikörper, der mit der Bindungsstelle des Stammzelloberflächenfaktors interferiert, demonstrierte, daß die "hSCF-EBV" Infektion mit großer Wahrscheinlichkeit durch die spezifische Bindung des hSCF Anteils an den c-kit Rezeptor auf TF-1 Zellen vermittelt wird (siehe Abb. 4.16 und Tab. 4.3). Anhand von Bindungsexperimenten konnte diese Interaktion zusätzlich nachgewiesen werden (Abb. 4.15). Da die TF-1 Zellen kein hSCF auf ihrer Zelloberfläche exprimieren (FACS-Daten nicht gezeigt), bestätigt dieses Experiment den erfolgreichen Einbau des Fusionsproteins in die Virushülle. Die Infektion der TF-1 Zellen durch Wildtyp-EBV und gp350-negatives EBV war überraschend, da es sich

um eine myeloische Vorläuferzelllinie handelt. Der Mechanismus dieser Infektion und ein möglicher Rezeptor für EBV auf diesen Zellen ist nicht bekannt.

Zusätzlich wurden aus Nabelschnurblut CD34-positive Vorläuferzellen isoliert und auf ihre Infizierbarkeit mit der hSCF-gp350-komplementierten EBV Mutante getestet. Die Infektion der CD34-positiven Vorläuferzellen mit "hSCF-EBV" scheint, wie im Fall der TF-1 Zellen, über die initiale Bindung des Stammzellfaktors an den c-kit Rezeptor zu erfolgen. Dieser wurde laut FACS-Analyse auf ca. 50% der isolierten CD34-positiven Zellen exprimiert. Die spezifische Interaktion konnte wiederum indirekt durch Präinkubation mit löslichem mSCF bestätigt werden (siehe Abb. 4.17 und Tab. 4.4). Da die GFP-positiven Zellen, die nach Inkubation mit "Wildtyp-EBV" beobachtet wurden, zu CD19-positiven, lymphoblastoiden Zelllinien auswuchsen, können diese mit großer Wahrscheinlichkeit der Subpopulation von kontaminierenden, CD19-positiven B-Zellen zugeordnet werden. Dafür spricht auch, daß die Infektion dieser Zellen durch Zugabe von löslichem mSCF nicht inhibiert werden konnte. Eine Infektion mit gp350-negativem EBV wurde erwartungsgemäß nicht beobachtet.

Die Retargetierung von Viren mit dem kit-Liganden ist bisher nur für retrovirale und adenovirale Systeme beschrieben worden. Eine Arbeitsgruppe konnte hämatopoetische, c-kit-positive Vorläuferzelllinien unter Verwendung eines SCF-konjugierten Adenovirus sehr effizient (über 90 %) infizieren. Hierbei handelte es sich jedoch nicht um eine Pseudotypisierung per Definition, da der zelluläre Ligand nicht in die Virushülle eingebaut wurde, sondern kovalent gebunden war (Schwarzenberger et al., 1996). Andere Studien zeigten, daß mit SCF pseudotypisierte MLV Vektoren an c-kit-positive Zellen wie TF-1 binden, diese aber nicht transduzieren können (Fielding et al., 1998). 293 Zellen, die den c-kit Rezeptor stabil exprimierten, konnten nur durch Zugabe von z. B. Chloroquin, das den pH-Wert in den Endosomen erhöht und dadurch eine Degradation der internalisierten Virusvektoren verhindert, infiziert werden (Yajima et al., 1998).

Die Infektionseffizienz stellt auch bei den in meiner Arbeit verwendeten pseudotypisierten EBV Partikeln ein Problem dar. Dabei können viele Stadien der Virusinfektion limitierend wirken. Zum einen ist zur Zeit nicht geklärt, mit welcher Effizienz das hSCF-gp350 Fusionsprotein, im Vergleich zum gp350 Wildtyp-Protein,

in die Virushülle eingebaut wird. Weiterhin könnte die richtige Faltung und Exposition der Bindungsdomäne des Stammzellfaktors innerhalb des hybriden Glykoproteins beeinträchtigt sein.

Normalerweise wird EBV über Endozytose in großen Vesikeln, die im Gegensatz zur Rezeptor-vermittelten Endozytose kein Clathrin enthalten, in B-Lymphozyten aufgenommen (Nemerow and Cooper, 1984). Dabei scheinen lysosomale Enzyme keine Rolle zu spielen. Die Infektion von Burkitt-Lymphom Zelllinien wie Raji Zellen erfolgt dagegen durch direkte Fusion der Virushülle mit der Plasmamembran (Seigneurin et al., 1977; Nemerow and Cooper, 1984). Es ist jedoch anzunehmen, daß das pseudotypisierte Virus nach erfolgter Bindung an c-kit durch Rezeptor-vermittelte Endozytose in Clathrin-positiven Vesikeln in die Zellen aufgenommen wird. Die Internalisierung des c-kit Moleküls nach Bindung von löslichem SCF ist z. B. für Mastzellen gezeigt worden (Shimizu et al., 1996). Im Fall der Tyrosinkinase-Rezeptoren wird der Komplex aus Ligand und Rezeptor zu den Lysosomen transportiert, in denen durch eine Reduktion des pH-Wertes die Dissoziation des Liganden vom Rezeptor und die anschließende Degradation des Liganden und des Rezeptors erfolgt. Bei einer mit Erythropoetin (EPO) pseudotypisierten HSV-1 Mutante wurde beobachtet, daß die Viruspartikel nach Bindung an den entsprechenden Rezeptor durch Endozytose internalisiert wurden (Laquerre et al., 1998a). Allerdings wurde bei diesen Experimenten keine produktive Infektion festgestellt, was auf den Einschluß der Viren in lysosomale Vesikel zurückgeführt werden könnte (Butcher et al., 1990). Die Internalisierung des "hSCF-EBV"-Rezeptor-Komplexes in solche Vesikel könnte ebenfalls eine Reduktion der ins Zytoplasma freigesetzten Viruskapside durch lysosomale Degradation oder durch eine eingeschränkte Membranfusion der Virushülle mit der Wirtsmembran zur Folge haben.

Wie schon in Kap. 1.4.2 erwähnt, stellt auch die reduzierte Genexpression in Stammzellen und Vorläuferzelllinien ein Problem dar. Trotz der Induktion durch die Zugabe von TPA und Butyrat könnte dies aufgrund einer schwachen GFP Fluoreszenz zu einer Unterschätzung der tatsächlich infizierten Zellen geführt haben. Durch die Verwendung alternativer, für hämatopoetische Vorläuferzellen besser



geeignete Promotoren wie z. B. der des "Spleen Focus-Forming Virus" könnte dieses Problem umgangen werden (Baum et al., 1995; Baum et al., 1997).

#### **5.4 EBV Retargetierung mittels des LCMV Glykoproteins**

Neben den erfolgreichen Pseudotypisierungsversuchen unter Verwendung der gp350-negativen EBV Mutante wurde untersucht, ob ein heterologes, virales Glykoprotein die Fähigkeit zur Komplementierung und Retargetierung des gp350/gp85-negativen EBV Phänotyps besitzt. Für diesen Zweck wurden lytisch induzierte 293-gp350/gp85-KO Zellen mit einem Expressionsplasmid für das Glykoprotein des "Lymphocytic Choriomeningitis Virus" (LCMV) transient transfiziert und die entstehenden Viren auf ihre Infektiosität getestet. Zur Infektion dienten die Zelllinien Vero, HeLa und TF-1, für die schon früher gezeigt werden konnte, daß sie sich mit LCMV infizieren lassen. Als Kontrollen diente Überstand, der entweder die Doppel-KO-Mutante oder in trans mit gp350 und gp85 komplementiertes "Wildtyp-EBV" enthielt. Die Inkubation mit der Doppel-KO-Mutante zeigte erwartungsgemäß keine erfolgreiche Infektion, während die Zelllinien Vero und TF-1 mit "Wildtyp-EBV" infizierbar waren. HeLa Zellen liessen sich bei diesem Experiment, im Vergleich zu früheren Versuchen mit der gp350-negativen Mutante (siehe Tab. 4.1), sehr ineffizient mit "Wildtyp-EBV" infizieren. Diese widersprüchlichen Ergebnisse und die äußerst geringe Effizienz lassen vermuten, daß eine erfolgreiche Infektion von HeLa Zellen auch von Versuchsbedingungen wie z. B. Virustiter oder Zelldichte abhängt. Da diese Zellen keine CD21-spezifische mRNA aufweisen (siehe Abb. 4.10, B), muß die beobachtete Infektion auf einem CD21-unabhängigen Weg erfolgt sein. Dies würde erneut auf die Existenz eines weiteren EBV Rezeptors auf Epithelzellen hinweisen.

Eine deutlich höhere Infektionsrate von HeLa Zellen ließ sich jedoch nach Inkubation mit der LCMV-GP komplementierten Mutante beobachten (Abb. 4.19). Da EBV in Abwesenheit von gp350 und gp85 nicht mehr infektiös ist, kann der Viruseintritt in diesem Fall nur durch das LCMV Glykoprotein vermittelt worden sein. Das LCMV Glykoprotein scheint also in der Lage zu sein, sowohl die Bindung an seinen Rezeptor als auch weitere Schritte wie die Fusion der EBV Virushülle zu

übernehmen. Insgesamt war die Infektionsrate jedoch immer noch niedrig. Da das heterologe Glykoprotein nicht als Fusionsprotein mit gp350 oder gp85 exprimiert wurde und somit keine EBV Sequenzen trägt, die als Inkorporationssignale in die Virushülle dienen könnten, ist anzunehmen, daß das LCMV-GP mit einer geringen Effizienz in die Hülle eingebaut wird. Zum anderen ist die niedrige Infektionsrate sehr wahrscheinlich auch mit Unterschieden im Infektionsmechanismus von LCMV und EBV zu erklären. Ein Beispiel aus der Literatur, bei dem eine gD-negative HSV-1 Mutante mit dem Glykoprotein des VSV pseudotypisiert wurde, zeigt, daß dieses Glykoprotein ebenfalls sehr ineffizient in die Virushülle eingebaut wird und Zielzellen nur mit einer stark reduzierten Infektionsrate infizieren kann (Anderson et al., 2000). Die Inkorporationseffizienz in die Virushülle konnte durch die Konstruktion entsprechender HSV Fusionsproteine gesteigert werden. Interessanterweise waren diese jedoch anschließend nicht mehr in der Lage, den Viruseintritt zu vermitteln.

Im Gegensatz zur erfolgreichen Infektion von HeLa Zellen liessen sich Vero und TF-1 Zellen nicht mit der LCMV-GP-komplementierten EBV Variante infizieren. Dies hängt sehr wahrscheinlich mit der geringen Infektionsrate der pseudotypisierten EBV Partikel zusammen. Es wurde gezeigt, daß sich z. B. TF-1 Zellen mit LCMV-GP-pseudotypisierten retroviralen Vektoren, im Vergleich zur Infektion von HeLa Zellen, nur mit einer 50- bis 100-fach geringeren Infektionsrate infizieren lassen (persönliche Mitteilung von Winfried Beyer, Heinrich-Pette-Institut, Hamburg). Da schon die Infektion von HeLa Zellen mit "hSCF-EBV", im Vergleich zu der Infektion mit den erwähnten retroviralen Vektoren, viel ineffizienter war, könnte diese Beobachtung die Nichtinfizierbarkeit der TF-1 Zellen mit dem "hSCF-EBV" erklären.

## **5.5 Ausblick**

Der Infektionsmechanismus von EBV ist immer noch nicht im Detail verstanden. Die Ergebnisse meiner Arbeit haben gezeigt, daß die Wechselwirkungen zwischen viralen EBV Glykoproteinen und zellulären Rezeptoren komplexer zu sein scheinen, als es bisher angenommen wurde. Sowohl für B-Zellen als auch für Epithelzellen scheint es einen alternativen, gp350-unabhängigen Infektionsmechanismus zu geben. Es zeigte sich, daß dieser Weg auch einen zellulären Rezeptor involviert, der

nicht mit CD21 identisch ist. Um den entsprechenden viralen Liganden genetisch zu identifizieren, könnten zusätzlich zum gp350-KO noch weitere Glykoproteinmutanten von potentiellen Kandidatengen konstruiert werden. Zur Überprüfung der Hypothese einer eventuellen Bindungsaktivität des gp85 Proteins müßte es möglich sein, eine entsprechende Domäne zu identifizieren. Im Zusammenhang mit der gp350/gp85-negativen EBV Mutante könnten verschiedene Deletionsmutanten des gp85 Proteins auf ihre Fähigkeit getestet werden, den Viruseintritt zu vermitteln.

Für eine Veränderung des EBV Tropismus gibt es bisher keine Beispiele in der Literatur. Mit Hilfe von verschiedenen EBV Glykoprotein-Nullmutanten ist es mir gelungen, das EBV Wirtsspektrum spezifisch zu erweitern. Insbesondere die Retargetierung des Virus mittels des humanen Stammzellfaktors in hämatopoetische Vorläuferzellen stellt eine interessante Perspektive für die Entwicklung von EBV-abgeleiteten Genvektoren dar. Die Größe dieser EBV Plasmide stellt dabei einen wesentlichen Vorteil gegenüber anderen viralen Vektoren dar. Zusätzlich zu der Einführung von therapierelevanten Genen für die somatische Gentherapie können z. B. auch die natürlich vorkommenden, regulatorischen Promotor- und Enhancerelemente dieser Gene in die Zellen geschleust werden. In diesem Zusammenhang wäre auch die Übertragung von Genen, deren Proteinprodukte für die Differenzierung der hämatopoetischen Vorläuferzellen in bestimmte Blutzelllinien notwendig sind, vorstellbar. Dafür muß zuvor geklärt werden, inwieweit das EBV Genom in hämatopoetischen Vorläuferzellen persistieren kann und ob die Zellen ihr Potential, in verschiedene Zelllinien zu differenzieren, nach einer EBV Infektion behalten. Diese Faktoren sind Voraussetzung für eine effiziente und gezielte Transgenexpression im hämatopoetischen System. Im Hinblick auf spätere Anwendungen müßte auch die Infektionseffizienz der Vorläuferzellen erhöht werden. Es könnten z. B. weitere Fusionsproteine zwischen gp350 und hSCF konstruiert werden, um vielleicht einen optimierten Einbau in die Virushülle und eine effektivere Bindung an den Rezeptor zu erreichen. Weiterhin kann versucht werden, die Effizienz der Membranfusion der Virushülle mit der Vesikelmembran zu erhöhen, indem anstelle des gp85 Glykoproteins retrovirale Glykoproteine mit hoher Fusionsaktivität in die pseudotypisierten EBV Partikel eingebaut werden. Das dies prinzipiell möglich ist, konnte durch die Retargetierung der Doppel-KO-Mutante mit

---

dem Glykoprotein des LCMV gezeigt werden. Diese Vorgehensweise würde auch einen Sicherheitsaspekt bei der Anwendung von EBV Vektoren berücksichtigen. Wie im ersten Teil der Arbeit gezeigt wurde, ist die gp350-negative Mutante immer noch in der Lage, die natürlichen Zielzellen von EBV zu infizieren. Dieses Ergebnis schließt eine sichere *in vivo* Anwendung eines pseudotypisierten Vektors auf der Basis der gp350-negativen Mutante aus. Allerdings werden gentherapeutische Ansätze heutzutage in der Regel *ex vivo* mit aufgereinigten Zellen durchgeführt. Trotzdem würde die Verwendung eines EBV Vektors auf der Basis einer nicht infektiösen EBV Mutante durch Deletion aller dafür verantwortlichen EBV Glykoproteine die Sicherheit und Spezifität solcher Genvektoren erhöhen.

## 6. Zusammenfassung

In meiner Arbeit sollte untersucht werden, ob eine Veränderung des Zelltropismus von Epstein-Barr Virus mit genetischen Methoden möglich ist. Ziel war es, durch Verwendung hybrider Glykoproteine oder Glykoproteine anderer Viren die Bindung bzw. die Fusion von EBV Partikeln zu vermitteln und dadurch eine sogenannte Pseudotypisierung zu erreichen.

Zu diesem Zweck wurden im ersten Teil EBV Glykoproteinmutanten des viralen Liganden gp350 und des für die Membranfusion wichtigen gp85 Proteins hergestellt. Die Charakterisierung der gp350-negativen EBV Mutante zeigte im Gegensatz zu früheren Beobachtungen, daß gp350 sowohl für die Immortalisierung und Infektion von primären B-Lymphozyten als auch für die Infektion von Burkitt-Lymphom Zelllinien wie Raji Zellen nicht absolut notwendig ist. Die Infektionseffizienz war jedoch reduziert. HLA-Klasse-II-negative Raji 2.2.5 Zellen konnten ebenfalls, wenn auch mit einer noch niedrigeren Infektionsrate, infiziert werden. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, daß gp350 zwar der Hauptligand für die Infektion von B-Zellen sein dürfte, daß es aber einen gp350-unabhängigen Infektionsmechanismus gibt, der durch einen zusätzlichen viralen Liganden vermittelt wird. Die Identität eines solchen Liganden konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht werden. Die Charakterisierung der gp85-negativen Mutante sowie der Doppel-KO-Mutante bestätigte, daß das gp85 Glykoprotein für die Infektion der Zielzellen von EBV essentiell ist.

Durch die Infektion verschiedener, z. T. CD21-positiver Epithelzelllinien mit der gp350-negativen Mutante konnte gezeigt werden, daß auch im Fall von Epithelzellen ein weiterer Ligand existieren muß, der die Funktion von gp350 bis zu einem gewissen Grad ersetzen kann. Die Analyse der CD21 Expression von 293 Zellen zeigte, daß diese Zellen geringe Mengen dieses EBV Rezeptors exprimieren und die Infektion durch Wildtyp-EBV in diesem Fall durch die Interaktion zwischen gp350 und CD21 vermittelt wird. Zusätzlich deuten die Ergebnisse darauf hin, daß der Viruseintritt der gp350-negativen Mutante in Epithelzellen über einen anderen

Rezeptor als CD21 erfolgt. Dies scheint auch auf die Infektion von B-Zellen zuzutreffen.

Im zweiten Teil meiner Arbeit konnte zunächst mit Hilfe von Fusionsproteinen zwischen GFP und gp350 gezeigt werden, daß große N-terminale Bereiche des gp350 Proteins deletiert werden können, ohne dadurch die Expression sowie den Transport dieser Chimären zur Plasmamembran zu beeinträchtigen. Darauf aufbauend wurde ein gp350 Fusionsprotein mit dem humanen Stammzellfaktor konstruiert. Es wurde gezeigt, daß dieses hybride Glykoprotein in die Virushülle von EBV eingebaut wird. Die mit dem Fusionsprotein pseudotypisierten Viren waren in der Lage, c-kit exprimierende Zellen wie TF-1 Zellen und CD34-positive, hämatopoetische Vorläuferzellen, wenn auch mit einer relativ niedrigen Infektionsrate, zu infizieren. Entsprechende Blockierungsexperimente bestätigten, daß die beobachtete Infektion durch die spezifische Interaktion des hSCF Anteils mit dem c-kit Rezeptor erfolgt.

Die Retargetierungsversuche mit der nicht infektiösen gp350/gp85-negativen EBV Mutante mit Hilfe des Glykoproteins des "Lymphocytic Choriomeningitis Virus" zeigten, daß ein einziges heterologes, virales Glykoprotein sowohl die Bindung an die Zelloberfläche wie auch den Viruseintritt in HeLa Zellen vermitteln kann.

## 7. Abkürzungen

|         |   |
|---------|---|
| Abb.    | Abbildung   |
| bp      | Basenpaar   |
| ca.     | zirka   |
| cDNA    | komplementäre DNA                                 |
| Ci      | Curie   |
| CMV     | Cytomegalovirus                                   |
| dCTP    | Desoxycytosintriphosphat                          |
| DMEM    | Dulbecco's Modified Eagle's medium                |
| DNA     | Desoxyribonukleinsäure                            |
| dpm     | radioaktive Zerfälle (disintegrations) pro Minute |
| DTT     | Dithiothreitol                                    |
| E. coli | Escherichia coli                                  |
| EDTA    | Ethylendiamintetraessigsäure                      |
| IL-3    | Interleukin-3                                     |
| Kap.    | Kapitel   |
| kb      | Kilobasenpaare                                    |
| kDa     | Kilo-Dalton                                       |
| LB      | Luria-Bertani                                     |
| mA      | Milliampere                                       |
| min     | Minute  |
| OD      | Optische Dichte                                   |
| PBS     | Phosphat-gepufferte Salzlösung                    |
| PCR     | Polymerase-Kettenreaktion                         |
| RNA     | Ribonukleinsäure                                  |
| RT-PCR  | Reverse Transkriptase-PCR                         |
| rpm     | Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)        |
| SDS     | Natriumdodecylsulfat                              |
| sec     | Sekunden  |
| Std     | Stunde  |
| Tab.    | Tabelle   |
| TPA     | 12-O-Tetradecanoyl-Phorbol-13-Acetat              |
| TPO     | Thrombopoetin                                     |
| Tris    | Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan                    |
| Vol.    | Volumen   |
| z. T.   | zum Teil  |

## 8. Literatur

Accolla, R.S. (1983) Human B cell variants immunoselected against a single Ia antigen subset have lost expression of several Ia antigen subsets. *J. Exp. Med.*, **157**, 1053-1058.

Anderson, D.B., Laquerre, S., Goins, W.F., Cohen, J.B. and Glorioso, J.C. (2000) Pseudotyping of glycoprotein D-deficient herpes simplex virus type 1 with vesicular stomatitis virus glycoprotein G enables mutant virus attachment and entry. *J. Virol.*, **74**, 2481-2487.

Asahara, T., Kalka, C. and Isner, J. (2000) Millennium Review: Stem cell therapy and gene transfer for regeneration. *Gene Therapy*, **7**, 451-457.

Baum, C., Hegewisch-Becker, S., Eckert, H.-G., Stocking, C. and Ostertag, W. (1995) Novel retroviral vectors for efficient expression of the multidrug resistance (mdr-1) gene in early hematopoietic cells. *J. Virol.*, **69**, 7541-7547.

Baum, C., Itoh, K., Meyer, J., Laker, C., Ito, Y. and Ostertag, W. (1997) The potent enhancer activity of the polycythemic strain of spleen focus-forming virus in hematopoietic cells is governed by a binding site for Sp1 in the upstream control region and by a unique enhancer core motif, creating an exclusive target for PEBP/CBF. *J. Virol.*, **71**, 6323-6331.

Beisel, C., Tanner, J., Matsuo, T., Thorley-Lawson, D., Kezdy, F. and Kieff, E. (1985) Two major outer envelope glycoproteins of Epstein-Barr virus are encoded by the same gene. *J. Virol.*, **54**, 665-674.

Benedict, C.A., Tun, R.Y., Rubinstein, D.B., Guillaume, T., Cannon, P.M. and Anderson, W.F. (1999) Targeting retroviral vectors to CD34-expressing cells: binding to CD34 does not catalyze virus-cell fusion. *Hum. Gene Ther.*, **10**, 545-557.

Biggin, M., Farrell, P.J. and Barrell, B.G. (1984) Transcription and DNA sequence of the BamHI L fragment of B95-8 Epstein-Barr virus. *EMBO J.*, **3**, 1083-1090.



Borrow, P. and Oldstone, M.B.A. (1992) Characterization of Lymphocytic Choriomeningitis Virus-binding protein(s): a candidate cellular receptor for the virus. *J. Virol.*, **66**, 7270-7281.

Boukamp, P., Petrussevska, R.T., Breitkreutz, D., Hornung, J., Markham, A. and Fusenig, N.E. (1988) Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J. Cell Biol.*, **106**, 761-771.

Boyle, K.A. and Compton, T. (1998) Receptor-binding properties of a soluble form of human cytomegalovirus glycoprotein B. *J. Virol.*, **72**, 1826-1833.

Broudy, V.C. (1997) Stem cell factor and hematopoiesis. *Blood*, **90**, 1345-1364.

Burns, J.C., Friedmann, T., Driever, W., Burrascano, M. and Yee, J.-K. (1993) Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 8033-8037.

Burns, J.W. and Buchmeier, M.J. (1991) Protein-protein interactions in lymphocytic choriomeningitis virus. *Virology*, **183**, 620-629.

Butcher, M., Raviprakash, K. and Ghosh, H.P. (1990) Acid pH-induced fusion of cells by herpes simplex virus glycoproteins gB and gD. *J. Mol. Biol.*, **265**, 5862-5868.

Cao, W., Henry, M.D., Borrow, P., Yamada, H., Elder, J.H., Ravkov, E.V., Nichol, S.T., Compans, R.W., Campbell, K.P. and Oldstone, M.B. (1998) Identification of alpha-dystroglycan as a receptor for lymphocytic choriomeningitis virus and Lassa fever virus. *Science*, **282**, 2079-2081.

Carel, J.C., Myones, B.L., Frazier, B. and Holers, V.M. (1990) Structural requirements for C3d,g/Epstein-Barr virus receptor (CR2/CD21) ligand binding, internalization, and viral infection. *J. Biol. Chem.*, **265**, 12293-12299.

Catlett, J.P., Leftwich, J.A., Westin, E.H., Grant, S. and Huff, T.F. (1991) c-kit expression by CD34+ bone marrow progenitors and inhibition of response to recombinant human interleukin-3 following exposure to c-kit antisense oligonucleotides. *Blood*, **78**, 3186-3191.

Church, G.M. and W., G. (1984) Genomic sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 1991-1995.

Compton, T., Nowlin, D.M. and Cooper, N.R. (1993) Initiation of human cytomegalovirus infection requires initial interaction with cell surface heparan sulfate. *Virology*, **193**, 834-841.

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. USA*, **82**, 4085-4089.

Cowan, K.H., Moscow, J.A., Huang, H., Zujewski, J.A., O'Shaughnessy, J., Sorrentino, B., Hines, K., Carter, C., Schneider, E., Cusack, G. and et al. (1999) Paclitaxel chemotherapy after autologous stem-cell transplantation and engraftment of hematopoietic cells transduced with a retrovirus containing the multidrug resistance complementary DNA (MDR1) in metastatic breast cancer patients. *Clin. Cancer Res.*, **5**, 1619-1628.

Cranage, M.P., Smith, G.L., Bell, S.E., Hart, H., Brown, C., Bankier, A.T., Tomlinson, P., Barrell, B.G. and Minson, T.C. (1988) Identification and expression of a human cytomegalovirus glycoprotein with homology to the Epstein-Barr virus BXLF2 product, varicella-zoster virus gpIII, and herpes simplex virus type 1 glycoprotein H. *J. Virol.*, **62**, 1416-1422.

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. USA*, **95**, 8245-8250.

Delecluse, H.J., Pich, D., Hilsendegen, T., Baum, C. and Hammerschmidt, W. (1999) A first-generation packaging cell line for Epstein-Barr virus-derived vectors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 5188-5193.

Douglas, J.T., Rogers, B.E., Rosenfeld, M.E., Michael, S.I., Feng, M. and Curiel, D.T. (1996) Targeted gene delivery by tropism-modified adenoviral vectors. *Nat. Biotechnol.*, **14**, 1574-1578.

- Edson, C.M. and Thorley-Lawson, D.A. (1981) Epstein-Barr virus membrane antigens: characterization, distribution, and strain differences. *J. Virol.*, **39**, 172-184.
- Engelstadter, M., Bobkova, M., Baier, M., Stitz, J., Holtkamp, N., Chu, T.H., Kurth, R., Dornburg, R., Buchholz, C.J. and Cichutek, K. (2000) Targeting human T cells by retroviral vectors displaying antibody domains selected from a phage display library. *Hum. Gene Ther.*, **11**, 293-303.
- Escribano, L., Ocqueteau, M., Almeida, J., Orfao, A. and San Miguel, J.F. (1998) Expression of the c-kit (CD117) molecule in normal and malignant hematopoiesis. *Leukemia and Lymphoma*, **30**, 459-466.
- Faggioni, A., Zompetta, C., Cirone, M., Barile, G., Frati, L. and Accolla, R. (1990) Superinfection by Epstein-Barr virus of a subset of Raji cells is independent of HLA class-II antigens. *Int. J. Cancer*, **45**, 989.
- 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 cooperative functions of two transactivators. *EMBO J.*, **19**, 3080-3089.
- Feinberg, A.P. and Vogelstein, B. (1983) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragment to high specific activity. *Anal. Biochem.*, **132**, 6-13.
- Fielding, A.K., Maurice, M., Morling, F.J., Cosset, F.L. and Russell, S.J. (1998) Inverse targeting of retroviral vectors: selective gene transfer in a mixed population of hematopoietic and nonhematopoietic cells. *Blood*, **91**, 1802-1809.
- Fingerroth, J.D., Diamond, M.E., Sage, D.R., Hayman, J. and Yates, J.L. (1999) CD21-dependent infection of an epithelial cell line, 293, by Epstein-Barr virus. *J. Virol.*, **73**, 2115-2125.
- Fingerroth, J.D., Weis, J.J., Tedder, T.F., Strominger, J.L., Biro, P.A. and Fearon, D.T. (1984) Epstein-Barr virus receptor of human B lymphocytes is the C3d receptor CR2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 4510-4514.

- Fuller, A.O., Santos, R.E. and Spear, P.G. (1989) Neutralizing antibodies specific for glycoprotein H of herpes simplex virus permit attachment to cells but prevent penetration. *J. Virol.*, **63**, 3435-3443.
- Galli, S.J., Zsebo, K.M. and Geissler, E. (1994) The kit ligand, stem cell factor. *Adv. Immunol.*, **55**, 1-96.
- Geraghty, R.J., Krummenacher, C., Cohen, G.H., Eisenberg, R.J. and Spear, P.G. (1998) Entry of alphaherpesviruses mediated by poliovirus receptor-related protein 1 and poliovirus receptor. *Science*, **280**, 1618-1620.
- Glorioso, J.C., Naldini, L. and Kay, M.A. (2001) Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics. *Nat. Med.*, **7**, 33-40.
- Gong, M. and Kieff, E. (1990) Intracellular trafficking of two major Epstein-Barr virus glycoproteins, gp350/220 and gp110. *J. Virol.*, **64**, 1507-1516.
- 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.
- Gregory, C.D., Kirchgens, C., Edwards, C.F., Young, L.S., Rowe, M., Forster, A., Rabbitts, T.H. and Rickinson, A.B. (1987) Epstein-Barr virus-transformed human precursor B cell lines: altered growth phenotype of lines with germ-line or rearranged but nonexpressed heavy chain genes. *Eur. J. Immunol.*, **17**, 1199-1207.
- Griffin, B.E., Bjorck, E., Bjursell, G. and Lindahl, T. (1981) Sequence complexity of circular Epstein-Barr virus DNA in transformed cells. *J. Virol.*, **40**, 11-19.
- Haddad, R.S. and Hutt-Fletcher, L.M. (1989) Depletion of glycoprotein gp85 from virosomes made with Epstein-Barr virus proteins abolishes their ability to fuse with virus receptor-bearing cells. *J. Virol.*, **63**, 4998-5005.
- Hammerschmidt, W. (2000) Herpesvirus vectors come of age. *Current Opinion in Molecular Therapeutics*, **2**, 532-539.

Hammerschmidt, W. and Sugden, B. (1988a) Identification and characterization of oriLyt, a lytic origin of DNA replication of Epstein-Barr virus. *Cell*, **55**, 427-433.

Hammerschmidt, W. and Sugden, B. (1988b) Vectors derived from Epstein-Barr virus. In (ed.), *Current Communications in Molecular Biology: Viral Vectors*. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, New York, pp. 23-30.

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, pp. 109-135.

Heineman, T., Gong, M., Sample, J. and Kieff, E. (1988) Identification of the Epstein-Barr virus gp85 gene. *J. Virol.*, **62**, 1101-1107.

Herrold, R.E., Marchini, A., Fruehling, S. and Longnecker, R. (1996) Glycoprotein 110, the Epstein-Barr virus homolog of herpes simplex virus glycoprotein B, is essential for Epstein-Barr virus replication in vivo. *J. Virol.*, **70**, 2049-2054.

Hirt, B. (1967) Selektive extraction of polyoma DNA from infected mouse cell cultures. *J. Mol. Biol.*, **26**, 365-369.

Hoffman, G.J., Lazarowitz, S.G. and Hayward, S.D. (1980) Monoclonal antibody against a 250,000-dalton glycoprotein of Epstein-Barr virus identifies a membrane antigen and a neutralizing antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 2979-2983.

Holland, T.C., Lerch, R.J. and Earhart, K. (1988) The cytoplasmic domain of herpes simplex virus type 1 glycoprotein C is required for membrane anchoring. *J. Virol.*, **62**, 1753-1761.

Hummel, M., Thorley-Lawson, D. and Kieff, E. (1984) An Epstein-Barr virus DNA fragment encodes messages for the two major envelope glycoproteins (gp350/300 and gp220/200). *J. Virol.*, **49**, 413-417.

Hutchinson, L., Browne, H., Wargent, V., Davis-Poynter, N., Primorac, S., Goldsmith, K., Minson, A.C. and Johnson, D.C. (1992) A novel herpes simplex virus

glycoprotein, gL, forms a complex with glycoprotein H (gH) and affects normal folding and surface expression of gH. *J. Virol.*, **66**, 2240-2250.

Imai, S., Nishikawa, J. and Takada, K. (1998) Cell-to-cell contact as an efficient mode of Epstein-Barr virus infection of diverse human epithelial cells. *J. Virol.*, **72**, 4371-4378.

Jarrett, O. and Macpherson, I. (1968) The basis of the tumorigenicity of BHK 21 cells. *Int. J. Cancer*, **3**, 654-662.

Jiang, A., Chu, T.H., Nocken, F., Cichutek, K. and Dornburg, R. (1998) Cell-type-specific gene transfer into human cells with retroviral vectors that display single-chain antibodies. *J. Virol.*, **72**, 10148-10156.

Kari, B. and Gehrz, R. (1992) A human cytomegalovirus glycoprotein complex designated gC-II is a major heparin-binding component of the envelope. *J. Virol.*, **66**, 1761-1764.

Kasahara, N., Dozy, A.M. and Kan, Y.W. (1994) Tissue-specific targeting of retroviral vectors through ligand-receptor interactions. *Science*, **266**, 1373-1376.

Kaye, J.F., Gompels, U.A. and Minson, A.C. (1992) Glycoprotein H of human cytomegalovirus (HCMV) forms a stable complex with the HCMV UL115 gene product. *J. Gen. Virol.*, **73**, 2693-2698.

Keller, P.M., Davison, A.J., Lowe, R.S., Riemen, M.W. and Ellis, R.W. (1987) Identification and sequence of the gene encoding gpIII, a major glycoprotein of varicella-zoster virus. *Virology*, **157**, 526-533.

Khyatti, M., Ahmad, A., Blagdon, M., Raymond, F. and Menezes, J. (1998) Binding of the endogenously expressed Epstein-Barr virus (EBV) envelope glycoprotein gp350 with the viral receptor masks the major EBV-neutralizing epitope and effects gp350-specific ADCC. *J. Leukoc. Biol.*, **64**, 192-197.

Kitamura, T., Tange, T., Terasawa, T., Chiba, S., Kuwaki, T., Miyagawa, K., Piao, Y.F., Miyazono, K., Urabe, A. and Takaku, F. (1989) Establishment and

characterization of a unique human cell line that proliferates dependently on GM-CSF, IL-3, or erythropoietin. *J. Cell. Physiol.*, **140**, 323-334.

Koch, W., Candeias, S., Guardiola, J., Accolla, R., Benoist, C. and Mathis, D. (1988) An enhancer factor defect in a mutant Burkitt lymphoma cell line. *J. Exp. Med.*, **167**, 1781-1790.

Landau, N.R., Page, K.A. and Littman, D.R. (1991) Pseudotyping with human T-cell leukemia virus type I broadens the human immunodeficiency virus host range. *J. Virol.*, **65**, 162-169.

Langley, K.E.e.a. (1994) Properties of variant forms of human stem cell factor recombinantly expressed in *Escherichia coli*. *Arch. Biochem. Biophys.*, **311**, 55-61.

Laquerre, S., Anderson, D.B., Stolz, D.B. and Glorioso, J.C. (1998a) Recombinant herpes simplex virus type 1 engineered for targeted binding to erythropoietin receptor-bearing cells. *J. Virol.*, **72**, 9683-9697.

Laquerre, S., Argnani, R., Anderson, D.B., Zucchini, S., Manservigi, R. and Glorioso, J.C. (1998b) Heparan sulfate proteoglycan binding by herpes simplex virus type 1 glycoproteins B and C, which differ in their contributions to virus attachment, penetration, and cell-to-cell spread. *J. Virol.*, **72**, 6119-6130.

Lehman, T.A., Modali, R., Boukamp, P., Stanek, J., Bennett, W.P., Welsh, J.A., Metcalf, R.A., Stampfer, M.R., Fusenig, N., Rogan, E.M. and et al. (1993) p53 mutations in human immortalized epithelial cell lines. *Carcinogenesis*, **14**, 833-839.

Li, Q., Spriggs, M.K., Kovats, S., Turk, S.M., Comeau, M.R., Nepom, B. and Hutt-Fletcher, L.M. (1997) Epstein-Barr virus uses HLA class II as a cofactor for infection of B lymphocytes. *J. Virol.*, **71**, 4657-4662.

Li, Q., Turk, S.M. and Hutt-Fletcher, L.M. (1995) The Epstein-Barr virus (EBV) BZLF2 gene product associates with the gH and gL homologs of EBV and carries an epitope critical to infection of B cells but not of epithelial cells. *J. Virol.*, **69**, 3987-3994.

Liu, D.X., Gompels, U.A., Foa-Tomasi, L. and Campadelli-Fiume, G. (1993) Human herpesvirus-6 glycoprotein H and L homologs are components of the gp100 complex

and the gH external domain is the target for neutralizing monoclonal antibodies. *Virology*, **197**, 12-22.

Martin, F.H., Suggs, S.V., Langley, K.E., Lu, H.S., Ting, J., Okino, K.H., Morris, C.F., McNiece, I.K., Jacobsen, F.W., Mendiaz, E.A. and et al. (1990) Primary structure and functional expression of rat and human stem cell factor DNAs. *Cell*, **63**, 203-211.

Mebatsion, T., Finke, S., Weiland, F. and Conzelmann, K.K. (1997) A CXCR4/CD4 pseudotype rhabdovirus that selectively infects HIV-1 envelope protein-expressing cells. *Cell*, **90**, 841-847.

Miletic, H., Bruns, M., Tsiakas, K., Vogt, B., Rezai, R., Baum, C., Kuhlke, K., Cosset, F.L., Ostertag, W., Lother, H. and von Laer, D. (1999) Retroviral vectors pseudotyped with lymphocytic choriomeningitis virus. *J. Virol.*, **73**, 6114-6116.

Miller, G. (1990) Epstein-Barr Virus : Biology, Pathogenesis, and Medical Aspects. In Fields, B.N. and Knipe, D.M. (ed.), *Virology*. Raven press. New York, second, pp. 1921-1958.

Miller, N. and Hutt-Fletcher, L.M. (1988) A monoclonal antibody to glycoprotein gp85 inhibits fusion but not attachment of Epstein-Barr virus. *J. Virol.*, **62**, 2366-2372.

Molesworth, S.J., Lake, C.M., Borza, C.M., Turk, S.M. and Hutt-Fletcher, L.M. (2000) Epstein-barr virus gH is essential for penetration of B cells but also plays a role in attachment of virus to epithelial cells. *J. Virol.*, **74**, 6324-6332.

Montgomery, R.I., Warner, M.S., Lum, B.J. and Spear, P.G. (1996) Herpes simplex virus-1 entry into cells mediated by a novel member of the TNF/NGF receptor family. *Cell*, **87**, 427-436.

Mueller-Lantzsch, N., Georg, B., Yamamoto, N. and zur hausen, H. (1980) Epstein-Barr virus-induced proteins: II. Analysis of surface polypeptides from EBV-producing and -superinfected cells by immunoprecipitation. *Virology*, **102**, 401-411.

Nemerow, G.R. and Cooper, N.R. (1984) Early events in the infection of human B lymphocytes by Epstein-Barr virus: the internalization process. *Virology*, **132**, 186-198.



Nemerow, G.R., Houghten, R.A., Moore, M.D. and Cooper, N.R. (1989) Identification of an epitope in the major envelope protein of Epstein-Barr virus that mediates viral binding to the B lymphocyte EBV receptor (CR2). *Cell*, **56**, 369-377.

Nemerow, G.R., Mold, C., Schwend, V.K., Tollefson, V. and Cooper, N.R. (1987) Identification of gp350 as the viral glycoprotein mediating attachment of Epstein-Barr virus (EBV) to the EBV/C3d receptor of B cells: sequence homology of gp350 and C3 complement fragment C3d. *J. Virol.*, **61**, 1416-1420.

Nemerow, G.R., Wolfert, R., McNaughton, M.E. and Cooper, N.R. (1985) Identification and characterization of the Epstein-Barr virus receptor on human B lymphocytes and its relationship to the C3d complement receptor (CR2). *J. Virol.*, **55**, 347-351.

Oba, D.E. and Hutt-Fletcher, L.M. (1988) Induction of antibodies to the Epstein-Barr virus glycoprotein gp85 with a synthetic peptide corresponding to a sequence in the BXLF2 open reading frame. *J. Virol.*, **62**, 1108-1114.

Oda, T., Imai, S., Chiba, S. and Takada, K. (2000) Epstein-Barr virus lacking glycoprotein gp85 cannot infect B cells and epithelial cells. *Virology*, **276**, 52-58.

Özel, M., Pauli, G. and Gelderblom, H.R. (1988) The organization of the envelope projections on the surface of HIV. *Arch. Virol.*, **100**, 255-266.

Panzer-Grumayer, E.R., Panzer, S., Wolf, M., Majdic, O., Haas, O.A. and Kersey, J.H. (1993) Characterization of CD7+CD19+ lymphoid cells after Epstein-Barr virus transformation. *J. Immunol.*, **151**, 92-99.

Pietro Paolo, R.L. and Compton, T. (1997) Direct interaction between human cytomegalovirus glycoprotein B and cellular annexin II. *J. Virol.*, **71**, 9803-9807.

Prodinger, W.M., Schwendinger, M.G., Schoch, J., Kochle, M., Larcher, C. and Dierich, M.P. (1998) Characterization of C3dg binding to a recess formed between short consensus repeats 1 and 2 of complement receptor type 2 (CR2; CD21). *J. Immunol.*, **161**, 4604-4610.

Pulvertaft, R.J.V. (1964) Cytology of Burkitt's tumour (African lymphoma). *Lancet*, **I**, 238-240.

Ragoczy, T., Heston, L. and Miller, G. (1998) The Epstein-Barr virus Rta protein activates lytic cycle genes and can disrupt latency in B lymphocytes. *J. Virol.*, **72**, 7978-7984.

Rasile, L., Ghosh, K., Raviprakash, K. and P., G.H. (1993) Effects of deletions in the carboxy-terminal hydrophobic region of herpes simplex virus glycoprotein gB on intracellular transport and membrane anchoring. *J. Virol.*, **67**, 4856-4866.

Raviprakash, K., Rasile, L., Ghosh, K. and Ghosh, H.P. (1990) Shortened cytoplasmic domain affects intracellular transport but not nuclear localization of a viral glycoprotein. *J. Biol. Chem.*, **265**, 1777-1782.

Reisbach, G., Bartke, I., Kempkes, B., Kostka, G., Ellwart, J., Birner, A., Thalmeier, K., Mailhammer, R., Bornkamm, G.W., Ullrich, A. and et al. (1993) Characterization of hemopoietic cell populations from human cord blood expressing c-kit. *Exp. Hematol.*, **21**, 74-79.

Rhim, J.S., Schell, K., Creasy, B. and Case, W. (1969) Biological characteristics and viral susceptibility of an African green monkey kidney cell line (Vero). *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **132**, 670-678.

Rickinson, A.B. and Kieff, E. (1996) Epstein-Barr virus. In Fields, B.N., Knipe, D.M., Howley, P.M., Chanock, R.M., Melnick, J.L., Monath, T., Roizman, B. and Straus, S.E. (ed.), *Virology*. Lippincott- Raven Publishers. Philadelphia, 3rd, pp. 2397-2446.

Sabatini, D.D., Kreibich, G., Morimoto, T. and Adesnik, M. (1982) Mechanisms for the incorporation of proteins in membranes and organelles. *J. Cell Biol.*, **92**, 1-22.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.

Schall, T.J., Lewis, M., Koller, K.J., Lee, A., Rice, G.C., Wong, G.H., Gatanaga, T., Granger, G.A., Lentz, R., Raab, H. and et al. (1990) Molecular cloning and expression of a receptor for human tumor necrosis factor. *Cell*, **61**, 361-370.

Schnell, M.J., Johnson, J.E., Buonocore, L. and Rose, J.K. (1997) Construction of a novel virus that targets HIV-1-infected cells and controls HIV-1 infection. *Cell*, **90**, 849-857.

Schwarzenberger, P., Spence, S.E., Gooya, J.M., Michiel, D., Curiel, D.T., Ruscetti, F.W. and Keller, J.R. (1996) Targeted gene transfer to human hematopoietic progenitor cell lines through the c-kit receptor. *Blood*, **87**, 472-478.

Scrimanti, C.R. and Calos, M.P. (1998) Epstein-Barr virus vectors for gene expression and transfer. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **9**, 476-479.

Seigneurin, J.-M., Vuillaume, V., Lenoir, G. and De-The, G. (1977) Replication of Epstein-Barr Virus: ultrastructural and immunofluorescent studies of P3HR1-superinfected Raji cells. *J. Virol.*, **24**, 836-845.

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

Shimizu, Y., Ashman, L.K., Du, Z. and Schwartz, L.B. (1996) Internalization of Kit together with stem cell factor on human fetal liver-derived mast cells: new protein and RNA synthesis are required for reappearance of Kit. *J. Immunol.*, **156**, 3443-3449.

Simmons, P.J., Aylett, G.W., Niutta, S., Bik To, L., Juttner, C.A. and Ashman, L.K. (1994) c-kit is expressed by primitive human hematopoietic cells that give rise to colony-forming cells in stroma-dependent or cytokine-supplemented culture. *Exp. Hematol.*, **22**, 157-165.

Sixbey, J.W., Vesterinen, E.H., Nedrud, J.G., Raab-Traub, N., Walton, L.A. and Pagano, J.S. (1983) Replication of Epstein-Barr virus in human epithelial cells infected in vitro. *Nature (London)*, **306**, 480-483.

Skoff, A.M. and Holland, T.C. (1993) The effect of cytoplasmic domain mutations on membrane anchoring and glycoprotein processing of herpes simplex virus type 1 glycoprotein C. *Virology*, **196**, 804-816.

Somia, N.V., Zoppe, M. and Verma, I.M. (1995) Generation of targeted retroviral vectors by using single-chain variable fragment: an approach to in vivo gene delivery. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 7570-7574.

Southern, E.M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.*, **98**, 503-517.

Spear, P.G. (1993) Entry of alphaherpesviruses into cells. *Sem. in Virology*, **4**, 167-180.

Spear, P.G., Eisenberg, R.J. and Cohen, G.H. (2000) Three classes of cell surface receptors for alphaherpesvirus entry. *Virology*, **275**, 1-8.

Spriggs, M.K., Armitage, R.J., Comeau, M.R., Strockbine, L., Farrah, T., Macduff, B., Ulrich, D., Alderson, M.R., Mullberg, J. and Cohen, J.I. (1996) The extracellular domain of the Epstein-Barr virus BZLF2 protein binds the HLA-DR beta chain and inhibits antigen presentation. *J. Virol.*, **70**, 5557-5563.

Steimle, V., Otten, L.A., Zufferey, M. and Mach, B. (1993) Complementation cloning of an MHC class II transactivator mutated in hereditary MHC class II deficiency (or bare lymphocyte syndrome). *Cell*, **75**, 135-146.

Suomalainen, M. and Garoff, H. (1994) Incorporation of homologous and heterologous proteins into the envelope of Moloney murine leukemia virus. *J. Virol.*, **68**, 4879-4889.

Tanner, J., Weis, J., Fearon, D., Whang, Y. and Kieff, E. (1987) Epstein-Barr virus gp350/220 binding to the B lymphocyte C3d receptor mediates adsorption, capping, and endocytosis. *Cell*, **50**, 203-213.

Tanner, J., Whang, Y., Sample, J., Sears, A. and Kieff, E. (1988) Soluble gp350/220 and deletion mutant glycoproteins block Epstein-Barr virus adsorption to lymphocytes. *J. Virol.*, **62**, 4452-4464.

Tedder, T.F., Clement, L.T. and Cooper, M.D. (1984) Expression of C3d receptors during human B cell differentiation: immunofluorescence analysis with the HB-5 monoclonal antibody. *J. Immunol.*, **133**, 678-683.

Thorley-Lawson, D.A. and Poodry, C.A. (1982) Identification and isolation of the main component (gp350-gp220) of Epstein-Barr virus responsible for generating neutralizing antibodies in vivo. *J. Virol.*, **43**, 730-736.

Witte, O.N. and Baltimore, D. (1977) Mechanism of formation of pseudotypes between vesicular stomatitis virus and murine leukemia virus. *Cell*, **11**, 505-511.

Wognum, A., De Jong, M.O. and Wagemaker, G. (1996) Differential expression of receptors for hemopoietic growth factors on subsets of CD34+ hemopoietic cells. *Leukemia and Lymphoma*, **24**, 11-25.

Wu, H., Ceccarelli, D.F.J. and Frappier, L. (2000) The DNA segregation mechanism of Epstein-Barr virus nuclear antigen 1. *EMBO reports*, **1**, 140-144.

Yajima, T., Kanda, T., Yoshiike, K. and Kitamura, Y. (1998) Retroviral vector targeting human cells via c-Kit-stem cell factor interaction. *Hum. Gene Ther.*, **9**, 779-787.

Yarden, Y., Kuang, W.-J., Yang-Feng, T., Coussens, L., Munemitsu, S., J., D.T., E., C., Schlessinger, J., Francke, U. and Ullrich, A. (1987) Human proto-oncogene c-kit: a new cell surface receptor kinase for an unidentified ligand. *EMBO J.*, **6**, 3341.

Yaswen, L.R., Stephens, E.B., Davenport, L.C. and Hutt-Fletcher, L.M. (1993) Epstein-Barr virus glycoprotein gp85 associates with the BKRF2 gene product and is incompletely processed as a recombinant protein. *Virology*, **195**, 387-396.

Yates, J.L., Warren, N. and Sugden, B. (1985) Stable replication of plasmids derived from Epstein-Barr virus in various mammalian cells. *Nature (London)*, **313**, 812-815.

Yoshiyama, H., Imai, S., Shimizu, N. and Takada, K. (1997) Epstein-Barr virus infection of human gastric carcinoma cells: implication of the existence of a new virus receptor different from CD21. *J. Virol.*, **71**, 5688-5691.

Young, L.S., Clark, D., Sixbey, J.W. and Rickinson, A.B. (1986) Epstein-Barr virus receptors on human pharyngeal epithelia. *Lancet*, **1**, 240-242.

Zeidler, R., Meissner, P., Eissner, G., Lazis, S. and Hammerschmidt, W. (1996) Rapid proliferation of B cells from adenoids in response to Epstein-Barr virus infection. *Cancer Res.*, **56**, 5610-5614.

Zsebo, K.M., Williams, D.A., Geissler, E.N., Broudy, V.C., Martin, F.H., Atkins, H.L., Hsu, R.Y., Birkett, N.C., Okino, K.H., Murdock, D.C. and et al. (1990a) Stem cell factor is encoded at the Sl locus of the mouse and is the ligand for the c-kit tyrosine kinase receptor. *Cell*, **63**, 213-224.

Zsebo, K.M., Wypych, J., McNiece, I.K., Lu, H.S., Smith, K.A., Karkare, S.B., Sachdev, R.K., Yuschenkoff, V.N., Birkett, N.C., Williams, L.R. and et al. (1990b) Identification, purification, and biological characterization of hematopoietic stem cell factor from buffalo rat liver--conditioned medium. *Cell*, **63**, 195-201.

zur Hausen, H., Schulte-Holthausen, H., Klein, G., Henle, W., Henle, G., Clifford, P. and Santesson, L. (1970) EB-virus DNA in biopsies of Burkitt tumors and anaplastic carcinomas of the nasopharynx. *Nature (London)*, **228**, 1056-1057.

---

## Danksagung

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

Herrn Prof. Dr. Henri-Jacques Delecluse für die hervorragende, wissenschaftliche Betreuung sowie für seine Unterstützung und seinen Beistand bei allen Problemen dieser Arbeit,

Herrn Prof. Dr. Wolfgang Hammerschmidt für die Vergabe des interessanten Themas, seine Unterstützung, Hilfe und wissenschaftlichen Rat sowie für seine ständige Diskussionsbereitschaft,

Herrn Prof. Dr. Georg W. Bornkamm für die guten Arbeitsbedingungen in seinem Institut,

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

Dr. Gilbert Reisbach für seinen Rat und die Versorgung mit allen erdenklichen Antikörpern und Zytokinen bezüglich der Handhabung hämatopoetischer Vorläuferzellen sowie Andreas Moosmann für seine Verbindungen zur Entbindungsstation des Klinikums Großhadern,

Christian Kurzeder dafür, daß stundenlange FACS-Sitzungen Spaß gemacht haben,

Dr. Muhsin Özel vom Robert Koch-Institut in Berlin für seine ausdauernde Hilfe und Kooperation in Sachen Elektronenmikroskopie,

Ute "Trulla" Schultheiß für ihren Beitrag zum Gelingen der Western Blots und Dr. Bernhard Neuhierl für zahlreiche Tips und Ratschläge,

den Mitgliedern (sowie mittlerweile Ex-Mitgliedern) der Arbeitsgruppe Hammerschmidt für die gute Zusammenarbeit, praktische Unterstützung und wissenschaftlichen Diskussionen und allen Kolleginnen und Kollegen des Instituts für Klinische Molekularbiologie und Tumorgenetik, die zum gutem Arbeitsklima beigetragen haben.

Mein ganz spezieller Dank geht an die Doktorandenclique Ute "Trulla", Uli, Markus (Quotendoktorand), Eva "Olle", Madelaine "Blondie", Sibille und, nicht zu vergessen, Ex-Lieblingskollege Matthias "MAB143" für die gegenseitigen Motivationen (mach Dir nichts draus, bei mir klappt auch nix....), die Hilfsbereitschaft und den Spaß!

---

## Lebenslauf

### Persönliche Angaben

Name: Annette Janz  
Geburtsdatum: 31.05.1972  
Geburtsort: Langenhagen  
Familienstand: ledig  
Staatsangehörigkeit: deutsch

### Ausbildung

1978-1982 Grundschole Isernhagen  
1982-1984 Orientierungsstufe Isernhagen  
1984-1991 Gymnasium Isernhagen  
Mai 1991 Erlangung der Allgemeinen Hochschulreife (Abitur)

seit Oktober 1991:

Studium der Biotechnologie an der Technischen Universität Braunschweig

Sept. 1993 Abschluß des Vordiploms  
Aug. 1996 bis Juni 1997 Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Maxine Linial am Fred Hutchinson Cancer Research Center in Seattle, USA  
Juli 1997 Abschluß des Studiums der Biotechnologie (Diplom)

März 1998 bis April 2001:

Promotion in der Arbeitsgruppe von apl. Prof. Dr. Wolfgang Hammerschmidt an der GSF, Institut für klinische Molekularbiologie und Tumorgenetik, Abteilung Genvektoren, München