

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

**Das EBNA1-Protein des Epstein-Barr Virus:
Genetische und funktionelle Analyse**

von

Sibille Humme

München, März 2004

Erklärung:

Diese Dissertation wurde im Sinne der Promotionsordnung von Prof. Dr. Wolfgang Hammerschmidt betreut und von Prof. Dr. Dirk Eick vor der Fakultät vertreten.

Ehrenwörtliche Versicherung:

Diese Dissertation wurde selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt.

München, am 2.3.2004

Sibille Humme

Dissertation eingereicht am	2.3.2004
1. Gutachter	Prof. Dr. Dirk Eick
2. Gutachter	PD Dr. Bettina Kempkes
Tag der mündlichen Prüfung:	2.7.2004

Wesentliche Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

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

Weitere Veröffentlichungen:

Lee, S., Brooks, J., Al-Jarrah, H., Thomas, W., Haigh, T., Taylor, S., **Humme, S.**, Schepers A., Hammerschmidt, W., Yates, J., Rickinson, A., and Blake, N. CD8 T-cell recognition of endogenously expressed EBNA1: A reappraisal of protection mediated by the Glycine-Alanine repeat. *J. Exp. Med.* *199* (10), 1409-20.

Casola, S., Otipoby, K. L., Alimzhanov, M., **Humme, S.**, Uyttersprot, N., Kutok, J. L., Carroll, M. C., and Rajewsky, K. (2004). B cell receptor signal strength determines B cell fate. *Nature Immunology* *5* (3), 317-27.

Ritzi, M., Tillack, K., Gerhardt, J., Ott, E., **Humme, S.**, Kremmer, E., Hammerschmidt, W., and Schepers, A. (2003). Complex Protein-DNA Dynamics at the Latent Origin of DNA Replication of Epstein-Barr Virus. *Journal of Cell Science* *116*, 3971-3984.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen.....	ix
I. Einleitung.....	1
1. Das Epstein-Barr Virus (EBV).....	1
1.1. EBV-Assoziation mit malignen Erkrankungen.....	1
1.2. Der duale Zyklus von EBV (latente und lytische Phase).....	2
1.3. <i>In vitro</i> -Infektion und Wachstumstransformation von primären humanen B-Zellen als Modellsystem für EBV	4
2. Das Epstein-Barr Virus nukleäre Antigen 1 (EBNA1).....	6
3. Die Replikation.....	9
3.1. <i>OriP</i> : Der latente Ursprung der EBV-Replikation	10
4. Das Tetrazyklin-regulierte System	12
5. Die HMG-I-Proteinfamilie.....	14
6. Das Histon H1	16
II. Zielsetzung	18
III. Material	20
1. Antikörper	20
2. Southern-Blot-Sonden	21
3. Oligonukleotide	21
4. Plasmide	23
5. Bakterien	25
6. Zelllinien.....	26

7. Mäuse.....	27
8. Chemikalien, Enzyme, Geräte und sonstiges.....	27
IV. Methoden	29
1. Bakterienkultur.....	29
1.1. Vermehrung und Aufbewahrung von Bakterien	29
1.2. Transformation und Elektroporation von <i>E.coli</i>	29
1.3. Fermentation von <i>E.coli</i>	30
2. Eukaryontische Zellkultur.....	30
2.1. Zellkulturbedingungen.....	30
2.2. Einfrieren, Auftauen und Aufbewahrung von Zellen	31
2.3. Präparation primärer humaner B-Zellen	31
2.4. Transfektion von Zellen und Selektion der Zellklone mit Hygromycin, Neomycin bzw. Puromycin.....	32
2.5. Produktion infektiöser Maxi-EBV-Partikel und Titerbestimmung	32
2.6. Produktion von Komplementations-Viren in der Zelllinie TR2-	33
2.7. Konzentrierung von Virusüberständen	33
2.8. Wachstumstransformation primärer B-Zellen durch Maxi-EBV	33
2.9. Koinfektion primärer humaner B-Zellen mit zwei Viren	34
3. DNA-Arbeitstechniken	34
3.1. Rekombinante Plasmide.....	34
3.2. Extraktion und Spaltung genomischer DNA.....	35
3.3. Präparative Plasmidreinigung.....	35
3.4. Präparation von EBV-Plasmid-DNA aus <i>E.coli</i>	35
3.5. Homologe Rekombination in <i>E.coli</i> zur Konstruktion von Maxi-EBV-Mutanten ...	35
3.6. Southern-Blot-Hybridisierung.....	36
3.7. Radioaktive Markierung von DNA-Sonden für Southern-Blots	36
3.8. Gel-Retentions-Analysen	37
3.9. Radioaktive Markierung von DNA für Gel-Retentions-Analysen	38
3.10. PCR-Amplifikation („ <i>polymerase chain reaction</i> “)	38
3.11. Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierungs-Analyse (FISH).....	38

4.	Untersuchungen auf extrachromosomale DNA	38
4.1.	Gardella-Gel-Analysen	38
4.2.	HIRT-Extrakte	39
4.3.	Plasmid-Wiedergewinnungs-Analysen („ <i>plasmid-rescue</i> “).....	39
5.	Plasmid-Verlust-Analysen	40
6.	Protein-Arbeitstechniken	40
6.1.	Immun-Fluoreszenz-Analysen.....	40
6.2.	Durchfluss-Zytometrie / FACS („ <i>fluorescence activated cell sorting</i> “)	41
6.3.	Immuno-Blot-Analyse / Western-Blot-Analyse.....	41
6.4.	Immuno-Blot-Analyse gegen LMP2A.....	42
7.	Reporter-Analysen für das Tet-System.....	42
8.	Mäuse.....	43
V.	Ergebnisse	44
1.	Herstellung und Analyse von Δ EBNA1-Epstein-Barr Viren.....	44
1.1.	Herstellung rekombinanter Epstein-Barr Viren.....	46
1.1.1.	Das rekombinante Maxi-EBV-Plasmid p2089	46
1.1.2.	Homologe Rekombination zur Erzeugung von Maxi-EBV-Mutanten in <i>E.coli</i> des Stammes DH10B am Beispiel des Δ EBNA1-Maxi-EBV p2828	46
1.1.3.	Etablierung von Zelllinien zur Produktion von Δ EBNA1-Maxi-EBV	49
1.1.4.	Induktion des lytischen Zyklus und Bestimmung des Virustiters	49
1.2.	Wachstumstransformation mit Δ EBNA1-2828-Maxi-EBV.....	51
1.2.1.	Infektion primärer humaner B-Zellen mit Δ EBNA1-2828-Maxi-EBV	51
1.2.2.	Koinfektion primärer humaner B-Zellen mit Δ EBNA1-2828-Maxi-EBV und EBNA1 <i>trans</i> -komplementierenden 2852-Virionen.....	51
1.3.	Charakterisierung von Δ EBNA1-LCLs und EBNA1-positiven-LCLs.....	54
1.3.1.	Analysen zur Verifizierung der genetischen Identität der LCLs	54
1.3.2.	Western-Blot-Analysen der latenten EBV-Proteine	54
1.3.3.	Untersuchung des viralen Genoms auf Extrachromosomalität	56
1.4.	Das onkogene Potential der verschiedenen LCLs in SCID-Mäusen	59

2.	Ersetzung von EBNA1 durch H1:EBNA1 bzw. HMG-I:EBNA1	61
2.1.	Etablierung von HMG-I:EBNA1- bzw. H1:EBNA1-Zelllinien.....	61
2.2.	Replikation und Erhaltung <i>oriP</i> -basierter Vektoren in H1:EBNA1- bzw. HMG-I: EBNA1-Zelllinien.....	63
2.3.	Charakterisierung der Funktionen des Δ EBNA1-p2828-Maxi-EBV in H1:EBNA1- bzw. HMG-I:EBNA1-Zelllinien.....	65
2.4.	Analysen zur Wachstumstransformation mit HMG-I:EBNA1	67
3.	Etablierung und Analyse eines konditional regulierbaren Vektor-systems durch EBNA1- TetR-Fusionsproteine.....	69
3.1.	Etablierung von EBNA1:TetR-Fusionsproteinen.....	69
3.2.	Nachweis der EBNA1:TetR – <i>TetO</i> -Interaktion in Reporter-Analysen	70
3.3.	Etablierung EBNA1:TetR-exprimierender 293-D-Zelllinien	72
3.4.	Etablierung EBNA1 und EBNA1:TetR-exprimierender 293-Zelllinien	72
3.5.	Lokalisation des EBNA1:TetR-Proteins im Zellkern	74
3.6.	Analysen zur Interaktion von EBNA1:TetR mit dem <i>TetO</i> -Motiv	74
3.7.	Herstellung eines Vektors mit zwanzig <i>TetO</i> -Motiven.....	76
3.8.	<i>In vivo</i> -Analysen der Doxzyklin-abhängigen Interaktion des EBNA1:TetR-Proteins mit <i>TetO</i> -Vektoren.....	77
3.9.	Plasmid-Verlust-Analysen des EBNA1:TetR – <i>TetO</i> -Systems.....	82
3.10.	Wachstumstransformations-Analysen mit dem EBNA1:TetR-Protein	85
4.	HMG-I:TetR: Zusammenführung der Ergebnisse mit EBNA1:TetR- und HMG-I :EBNA1- Fusionsproteinen	85
VI.	Diskussion.....	87
1.	Die Funktion von EBNA1 in EBV-infizierten B-Zellen bei der Initiation und Aufrechterhaltung des wachstumstransformierten Phänotyps.....	87
2.	Fusionen aus HMG-I bzw. Histon H1 mit der C-terminalen EBNA1-Domäne ersetzen die Chromosomen-Assoziation und die Replikation.....	95
3.	Konditional regulierte Vektor-Erhaltung durch EBNA1:TetR – <i>TetO</i>	97
4.	Weitere experimentelle Schritte.....	100

5. Ausblick.....	101
VII. Zusammenfassung.....	103
VIII. Literatur.....	105
Danksagungen.....	126
Lebenslauf.....	127
Anhang.....	129

Abkürzungen

Abb(n).	Abbildung(en)
Ala	Alanin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ARS	autonom replizierende Sequenz
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bp	Basenpaar(e)
BSA	Bovines Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	zirka
cDNA	„ <i>complementary DNA</i> “
ChIP	„ <i>chromatin-immunoprecipitation</i> “
Ci	Curie
CMV	Cytomegalo-Virus, der verwendete Promotor stammt von dem Gen IE1
c-Myc	zelluläres Myc
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure („ <i>acid</i> “)
Dox	Doxyzyklin, Tetrazyklin-Analogen
dpm	radioaktive Zerfälle („ <i>disintegrations</i> “) pro Minute
DS	„ <i>dyad symmetry element</i> “, <i>oriP</i> -Komponente
DTT	Dithiothreitol
EBER	„ <i>EBV expressed RNA</i> “
EBNA	Epstein-Barr Virus nukleäres Antigen
ΔEBNA1	ohne EBNA1
EBV	Epstein-Barr Virus
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FACS	„ <i>fluorescence activated cell sorting</i> “
FISH	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung
FKS	Fötale Kälberserum
FR	„ <i>family of repeats</i> “, <i>oriP</i> -Komponente
GFP	grün fluoreszierendes Protein
Gly	Glycin
GRE	grüne Raji Einheiten, Einheit für infektiöse Viren
Gy	Gray (1 gy = 100 rad)
h	Stunde
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethan-sulfonsäure
H1	Histon H1
HMG	„ <i>high mobility group</i> “, Familie von DNA-Bindeproteinen
HRP	gekoppelte Meerrettich-Peroxidase („ <i>horse reddish peroxidase</i> “)
HSV	Herpes Simplex Virus
Hyg	Hygromyzin
i.p.	intraperitoneal
Kana	Kanamycin
kbp	Kilobasenpaar(e)
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	Luria-Bertani
LCL	lymphoblastoide Zelllinie („ <i>lymphoblastoid cell line</i> “)

LMP	Latentes Membranprotein
LTR	„ <i>long terminal repeat</i> “, Erkennungssequenz der retroviralen Integration
mA	Milliampere
MCM	„ <i>minichromosome maintenance</i> “, Familie von Replikationsproteinen
MDV	Marek Disease Virus
min.	Minute
mRNA	Boten-RNA („ <i>messenger RNA</i> “)
Neo	Neomycin
NLS	nukleäres Lokalisations-Signal
nt	Nukleotid
OD	optische Dichte
ORC	„ <i>origin recognition complex</i> “, Familie von Replikationsproteinen
<i>oriP</i>	EBV-Ursprung der latenten Replikation
<i>oriLyt</i>	EBV-Ursprung der lytischen Replikation
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung („ <i>phosphate buffered saline</i> “)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion („ <i>polymerase chain reaction</i> “)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PNK	Polynukleotidkinase
Prä-RC	Prä-Replikations-Komplex
RAG	VDJ-Rekombinase aktivierendes Gen
RLU	Relative Licht Einheiten („ <i>relative light units</i> “)
RNAse	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
SAR	„ <i>scaffold attached region</i> “
SCID	„ <i>severe combined immunodeficiency</i> “, Krankheit mit Immunodepletion
SDS	Natriumdodecylsulfat
SV40	Simian Virus 40
Tc	Tetrazyklin
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
TetR	Tet-Repressor
<i>TetO</i>	<i>Tet-Operator</i> , palindromisches DNA-Bindemotiv des TetR
<i>TR</i>	„ <i>terminal repeats</i> “, EBV-Verpackungssignal
Tris	Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan
u.a.	unter anderem
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolett
UZ	Ultrazentrifuge
V	Volt
Vol	Volumen
VP16	virales Protein 16 des HSV
xg	x-fache Erdbeschleunigung
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

I. Einleitung

1. Das Epstein-Barr Virus (EBV)

Das Epstein-Barr Virus (EBV, auch „menschliches Herpesvirus 4“) ist ein auf der ganzen Welt verbreitetes Herpesvirus, das zu den γ -Herpesviren und unter diesen zu den Lymphokryptoviren eingeordnet wird (zur Übersicht: Bornkamm und Hammerschmidt, 2001; Rickinson und Kieff, 2001). Das 172 kbp große doppelsträngige DNA-Genom des EBV-Stammes B95.8 wurde als erstes Virusgenom vollständig kloniert und sequenziert (Baer et al., 1984). Weltweit sind mehr als 95 % der adulten Bevölkerung mit dem EBV infiziert. Der einzige natürliche Wirt ist der Mensch (zur Übersicht: Modrow und Falke, 1998), weshalb bislang kein Tiermodell der Infektion existiert. Wie alle Herpesviren hat auch EBV eine latente und eine lytische Phase der Infektion (schematisch dargestellt in Abb. 1 A). In seinem latenten Zustand persistiert es als kovalent zirkularisiertes Episom mit einer Kopienzahl zwischen 10 und 400 (Nonoyama und Pagano, 1973; Sternas et al., 1990). Das EBV hat sich als ein sehr effizienter und in der Regel gutartiger Parasit von humanen B-Zellen entwickelt, der wahrscheinlich viele Schritte der B-Zell-Entwicklung nachahmt bzw. begleitet (Thorley-Lawson und Babcock, 1999). Aus der Latenz kann das Virus lebenslang reaktiviert werden und in den lytischen Zyklus übergehen, bei dem die Wirtszelle zerstört wird (Abb. 1 A; Modrow und Falke, 1998).

1.1. EBV-Assoziation mit malignen Erkrankungen

Nicht zuletzt die Assoziation des EBV mit malignen Tumoren macht es zu einem der am intensivsten untersuchten (Herpes-)Viren. Schon 1964 wurde postuliert, dass das EBV mit der Entwicklung des Burkitt-Lymphoms assoziiert ist (Epstein et al., 1964; Epstein et al., 1965). Seitdem wurden weitere Tumor-Erkrankungen mit diesem Virus in Zusammenhang gebracht. Diese Neoplasien können sich sowohl aus B-Zellen (Burkitt-Lymphom, immunoblastische B-Zell-Lymphome, Hodgkin-Lymphom) als auch aus T-Zellen (T-Zell-Lymphome) und auch aus Epithel-Zellen (Nasopharynx-Karzinom, Magen-Karzinom) entwickeln (zur Übersicht: Baumforth et al., 1999; Kieff und Rickinson, 2001; Rickinson und Kieff, 2001). Bei vielen dieser Tumore gibt es jedoch Beispiele, in denen das EBV nicht gefunden wird, so dass die Assoziation nicht kausal ist. Es gibt z.B. das endemische EBV-assozierte Burkitt-Lymphom und das sporadische, bei dem meist kein Virus nachgewiesen werden kann. Es wird daher angenommen, dass die EBV-Infektion nur ein Schritt in einem mehrstufigen Prozess zum

Tumor ist (zur Übersicht: Rickinson und Kieff, 2001). Dies wird durch die Beobachtung unterstützt, dass die Tumore erst viele Jahre nach der primären EBV-Infektion entstehen und oft mit einem Sekundärereignis in Verbindung stehen, wie z.B. Malariainfektion beim Burkitt-Lymphom oder Chemikalienexposition beim Nasopharynx-Karzinom (zur Übersicht: Rickinson und Kieff, 2001).

Die Primärinfektion mit EBV findet in der Regel im frühen Kindesalter über Speichelkontakt statt. Sie erfolgt im Epithel des Mundrachenraums und verläuft meist inapparent. Infektionen können jedoch vor allem in fortgeschrittenem Alter auch zur akuten infektiösen Mononukleose führen, einer lymphoproliferativen Erkrankung, die durch das Immunsystem kontrolliert wird (zur Übersicht: Rickinson und Kieff, 2001).

1.2. Der duale Zyklus von EBV (latente und lytische Phase)

Die Infektion erfolgt über Bindung des viralen Glykoproteins gp350/220 an das B-Zell-Oberflächenprotein CD21 und darauf folgende Endozytose (Fingeroth et al., 1984; Nemerow et al., 1985; Tanner et al., 1987). Die virale DNA wird in den Zellkern eingeschleust und etabliert sich dort in episomaler Form (Abb. 1 A; Hurley und Thorley-Lawson, 1988). Die ruhende B-Zelle wird dadurch in den Zellzyklus entlassen und ähnelt einer Antigen-aktivierten Zelle (Suzuki et al., 1992). Einige infizierte Zellen verändern ihren Phänotyp zu lymphoblastoiden B-Zellen. Diese Zellen exprimieren bis zu neun latente virale Proteine: EBNA1 (Epstein-Barr Virus nukleäres Antigen), -2, -3A, -3B, -3C, -LP („*leader protein*“), LMP1, LMP2A und -2B (latentes Membran Protein) sowie die kleinen nicht polyadenylierten RNAs EBER1, -2 („*EBV expressed RNA*“). Dieses auch Latenz III genannte Expressionsmuster ist charakteristisch für immunoblastische B-Zell-Lymphome und kann *in vitro* nachgeahmt werden (s. I.1.3.; zur Übersicht: Young und Murray, 2003). Der Zeitraum der Proliferation (Latenz III) nach der Infektion ist kurz, da die Expression der viralen Gene eine Entdeckung und damit die Elimination der infizierten B-Zelle durch das humorale und zelluläre Immunsystem des Wirtes bewirkt. Für die Persistenz differenzieren die lymphoblastoiden Zellen wahrscheinlich zu ruhenden Gedächtnis-B-Zellen (Babcock et al., 1998), in denen nur wenige bis keine viralen Gene abgelesen werden (Babcock et al., 1999; Miyashita et al., 1997). Die Latenz II, in der EBNA1, LMP1, -2A und -2B gebildet werden, ist charakteristisch für Hodgkin- und T-Zell-Lymphome sowie das Nasopharynx-Karzinom. Burkitt-Lymphom-Zellen exprimieren in der Regel nur EBNA1 sowie die EBERs, was dem Zustand der Latenz I entspricht.

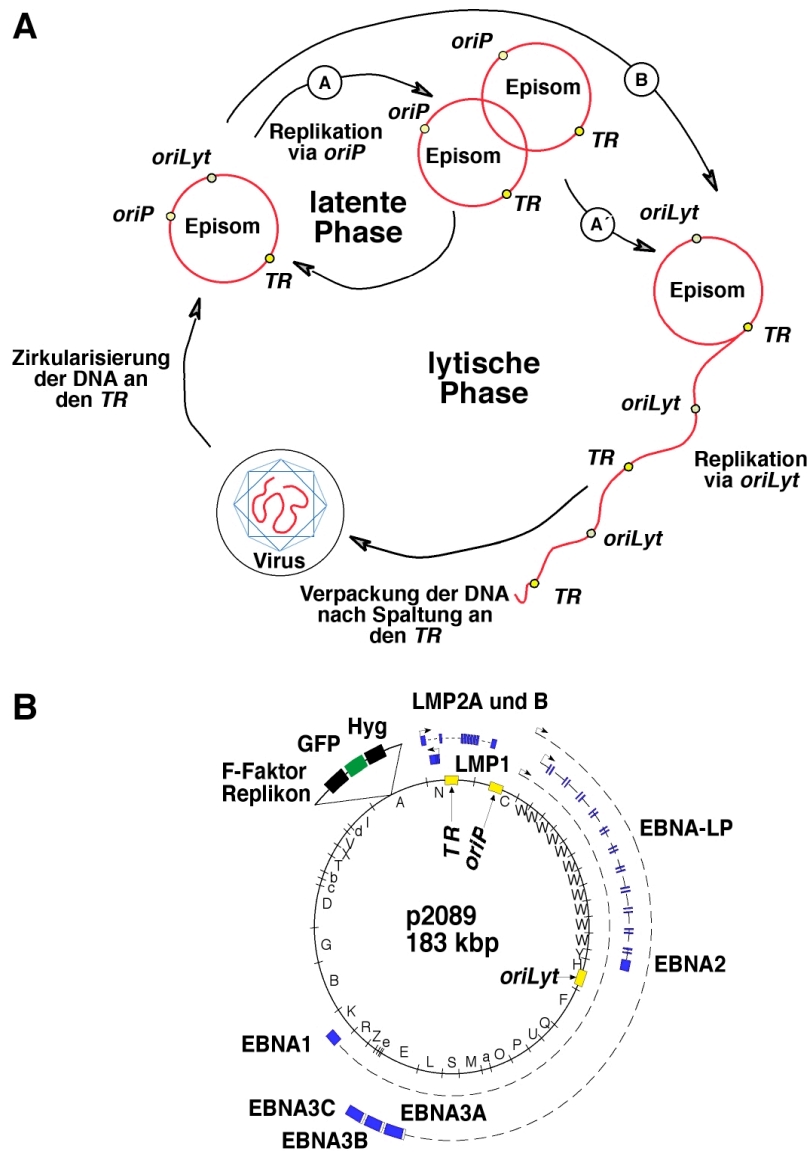


Abb. 1: Schematische Darstellungen der beiden Infektionsphasen von EBV (A) und des Maxi-EBVs p2089 (B):

(A) Nach der Primärinfektion zirkularisiert das virale Genom über die repetitiven endständigen Verpackungssignale der „terminal repeats“ (*TR*) zu einem ringförmigen Plasmid. In den meisten Fällen geht das Virus daraufhin in den lytischen Zyklus über (Weg B). In dieser Phase wird die Initiation der DNA-Replikation über den lytischen Replikations-Ursprung *oriLyt* vermittelt. Die DNA-Synthese erfolgt unidirektional über den „Rollenden Ring“-Mechanismus („rolling circle“, Jacob et al., 1979), so dass ein konkatemeres DNA-Molekül aus tandemrepetitiven Genom-Einheiten entsteht. Durch Spaltung an den *TR* werden einzelne lineare Virusgenome erzeugt, die in Viruskapside verpackt werden. In der latenten Phase liegt die virale DNA als episomaler Ring im Zellkern vor. Dabei wird der latente Replikations-Ursprung *oriP* zur Replikation des viralen Genoms verwendet (Weg A). Spontan tritt nur ein geringer Teil der latent infizierten Zellen in die lytische Phase ein (Weg A'). Durch Zugabe bestimmter Reagenzien kann die lytische Induktion verstärkt werden. Die Induktion der lytischen Phase geht mit einem Umschalten von *oriP* auf *oriLyt* als aktivem Replikations-Ursprung einher.

(B) Das Maxi-EBV p2089 basiert auf dem EBV-Stamm B95.8, auf dessen Episom ein F-Faktor-Plasmid kloniert wurde. Dies erlaubt die Amplifikation des viralen Genoms in *E.coli* und die Mutation von jedem Locus durch homologe Rekombination. Das zirkuläre Episom ist mit seinen durch *Bam*HI-Spaltung erzeugten Fragmenten gezeigt (innerer Kreis). Von den elf viralen Proteinen, die in der Latenz exprimiert werden, sind neun Gene gemeinsam mit ihren primären Transkripten und Promotoren als blaue Kästen gezeichnet (EBNA1, EBNA2, EBNA3A, -B, -C, EBNA-LP, LMP1, -2A und -2B). Der hinzugefügte prokaryontische Hintergrund mit den eingefügten Genen zur Detektion und Selektion ist vorgelagert dargestellt. Die Replikationsursprünge *oriP* bzw. *oriLyt* sowie das Verpackungssignal (*TR*) sind gelb zu sehen.

In den Stadien der Latenz I und II entgehen die Zellen der Überwachung durch das Immunsystem des Wirts vermutlich aufgrund der geringen Expression viraler Proteine (Babcock und Thorley-Lawson, 2000). Die Anzahl der latent infizierten Zellen im peripheren Blut eines Menschen ist über Jahre stabil, aber in jedem Individuum unterschiedlich (1-30 infizierte Zellen pro 10^6 B-Zellen im peripheren Blut; Khan et al., 1996; Miyashita et al., 1995).

Die lytische Phase erfolgt, nach einer Hypothese von Thorley-Lawson, vermutlich nach Reaktivierung der latenten Zellen in den Schleimhäuten des Oropharynx (Abb. 1 A; Babcock et al., 2000). Dort werden infektiöse Partikel in den Speichel entlassen. Die neu gebildeten Viren können entweder uninfizierte Zellen des Wirts befallen oder durch Speichelübertragung auf einen neuen Wirt übergehen. Während der lytischen Phase werden nahezu alle der ca. 90 EBV-Gene abgelesen, um die DNA zu replizieren, infektiöse Viruspartikel zu produzieren und die Zellen zu lysieren. Die reaktivierten Zellen werden zum größten Teil durch das Immunsystem eliminiert. In Fällen von geschwächter Immunabwehr (z.B. HIV-Infektion, Immunsuppression nach Transplantationen) kann EBV jedoch zu einer Tumorentwicklung wie z.B. immunoblastischen Lymphomen beitragen.

1.3. *In vitro*-Infektion und Wachstumstransformation von primären humanen B-Zellen als Modellsystem für EBV

Das Verständnis der molekularen Mechanismen, die an der Wachstumstransformation von B-Zellen durch EBV beteiligt sind, ist von großer Bedeutung für therapeutische Ansätze. Die Kenntnis der beteiligten Proteine und deren Wirkung könnte zur Entwicklung von spezifischen Inhibitoren beitragen. Außerdem kann EBV als Vektor in der Gentherapie eingesetzt werden (Franken et al., 1996; Wendtner et al., 2003). Als Genvektor ist EBV gut geeignet, da nur geringe Titerkonzentrationen für eine spezifische, auf B-Lymphozyten beschränkte Infektion benötigt werden und das Virus seine DNA in humanen Zellen stabil repliziert.

Als *in vitro*-Modell für die latente EBV-Infektion und die pathogenetischen Mechanismen bei der Tumorentstehung werden lymphoblastoide Zelllinien, sogenannte LCLs („*lymphoblastoid cellline*“), angesehen. LCLs können in Zellkultur leicht durch Infektion primärer humaner B-Zellen mit dem EBV etabliert werden (Thorley-Lawson und Mann, 1985). Der Einfluss von Virus-Mutanten auf die Wachstumstransformation von B-Zellen kann anhand dieses Systems gut untersucht werden (zur Übersicht: Young und Murray, 2003).

Das von H. J. Delecluse und W. Hammerschmidt entwickelte Maxi-EBV-System (Abb. 1 B), ist in dieser Hinsicht sehr wertvoll (Delecluse et al., 1998). Das vollständige Virus-Genom des EBV-Stamms B95.8 wurde auf ein prokaryontisches F-Faktor Plasmid kloniert und p2089 genannt (Delecluse et al., 1998). Zusätzlich enthält das Maxi-EBV zur Selektion in Pro- und Eukaryonten Resistenzgene und das Gen für das grün fluoreszierende Protein (GFP) zur Detektion. Das Maxi-EBV kann in Bakterien propagiert werden. Somit können durch homologe Rekombination beliebige Mutationen eingeführt werden. Wenn p2089 stabil in 293-Zellen propagiert wird, kann in diesen der lytische Zyklus induziert werden. Die entstehenden infektiösen Viruspartikel werden 2089 genannt. 2089-Maxi-EBV transformiert primäre humane B-Zellen effizient zu LCLs. Die LCLs exprimieren die in I.1.2. beschriebenen elf latenten Genprodukte (Latenzstufe III; zur Übersicht: Young et al., 2000). Damit ist ein *in vitro*-System vorhanden, mit dem Mutationen im EBV hergestellt und in humanen Zellen untersucht werden können.

Systematische *in vitro*-Analysen der latenten EBV-Gene mit dem LCL-System ergaben, dass nicht alle der genannten Genprodukte unabdingbar für den Prozess der Wachstumstransformation von B-Zellen sind. Es wird postuliert, dass die EBERs und EBNA3B entbehrlich sind und dass LMP2A und -2B die Effizienz der Wachstumstransformation lediglich verbessern (zur Übersicht: Young et al., 2000). EBNA1, EBNA2 und EBNA3A werden als essentiell für die Wachstumstransformation betrachtet (zur Übersicht: Farrell, 1995; Kieff und Rickinson, 2001). Bei LMP1, EBNA-LP und EBNA3C variieren die Meinungen über die Essentialität. Mit dem Maxi-EBV-System konnte gezeigt werden, dass LMP1 und EBNA3C entgegen der Lehrmeinung nicht essentiell sind (Dirmeier et al., 2003; Rickinson und Kieff, 2001; Tomkinson et al., 1993). LMP1 ist zwar essentiell für die Immortalisierung von B-Lymphozyten, jedoch proliferieren B-Zellen unter bestimmten Umständen ohne LMP1 (Dirmeier et al., 2003). Die widersprüchlichen Ergebnisse sind möglicherweise durch die Untersuchung mit Hilfe verschiedener Systeme (klassische Virusgenetik und Maxi-EBV-System) erklärbar. Bei dem klassischen System sind z.B. Verunreinigungen durch ursprüngliches Virus und unerwünschte Rekombinationen nicht auszuschließen, was die Ergebnisse verfälschen könnte (Norio et al., 2000). Ferner sind Titrationsreihen bei Verwendung des klassischen Systems wesentlich schwieriger durchzuführen als mit dem Maxi-EBV, bei dem höhere Titer erreicht werden.

2. Das Epstein-Barr Virus nukleäre Antigen 1 (EBNA1)

EBNA1 war das erste virale Protein, das in menschlichen EBV-assoziierten Tumoren gefunden wurde (Abb. 2A; Reedman und Klein, 1973). EBNA1 ist ein sequenzspezifisches DNA-Bindeprotein, das eine zentrale Rolle bei der Aufrechterhaltung der latenten Phase spielt. Es ist notwendig für die stabile extrachromosomale Erhaltung und Replikation des viralen Genoms. In der Literatur wird es daher als absolut essentiell für den Prozess der Wachstumstransformation von B-Zellen angesehen (Kang et al., 2001; Lee et al., 1999; Rickinson und Kieff, 2001).

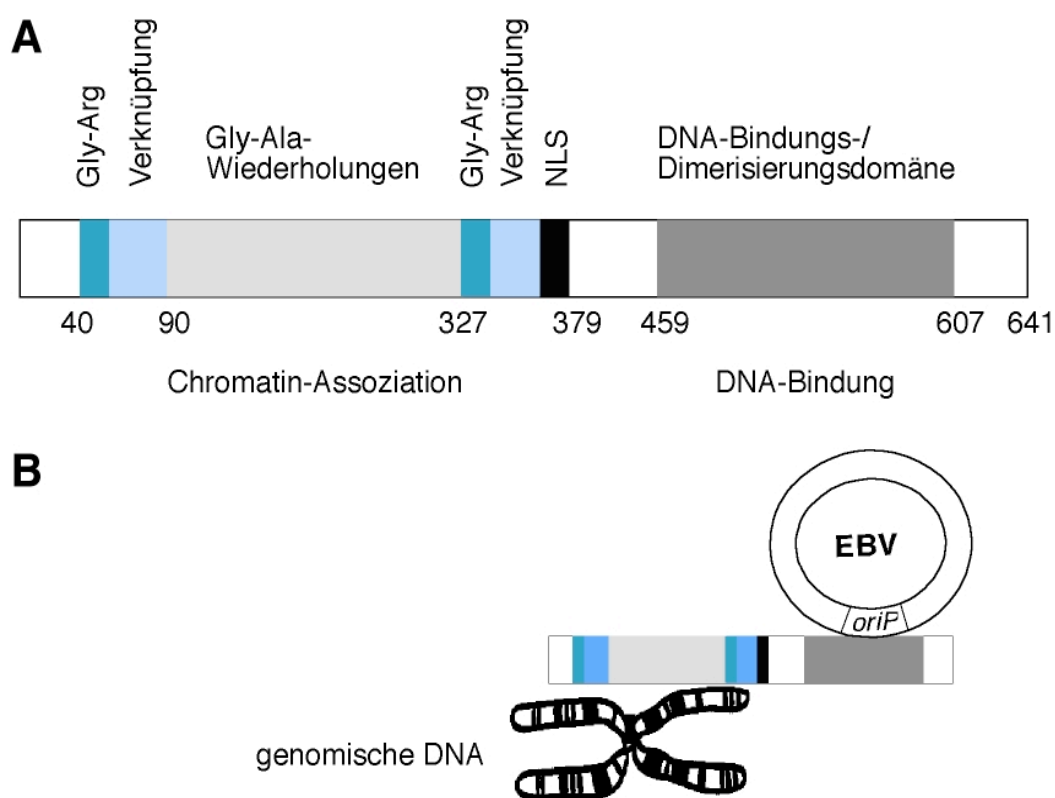


Abb. 2: Schematische Darstellung des Epstein-Barr Virus nukleären Antigens 1 (EBNA1, A) sowie ein Model, wie EBNA1 die Erhaltung der EBV-Episome ermöglicht (B):

(A) Die verschiedenen Domänen des Proteins, und die dazu korrespondierenden Aminosäurepositionen, sind schematisch gezeigt. EBNA1 ist ein Phosphoprotein von etwa 640 Aminosäuren, das aufgrund der unterschiedlichen Länge der Gly-Ala-Wiederholungen (hellgrau) in verschiedenen EBV-Trägern unterschiedlich lang ist. Das Protein besitzt eine modulare Struktur, die sich in seinen Eigenschaften in der Chromatin-Assoziation (N-Terminus) und der DNA-Bindedomäne (C-Terminus) manifestiert. EBNA1 besitzt in seinem N-terminalen Bereich die Verknüpfungsdomänen, zwei basische stark positiv geladene Bereiche (blau). Diese sind für die Replikation und die Erhaltung des Virus sowie für die transkriptionelle Aktivierung einiger viraler Gene wichtig. Mit der DNA-Bindungs- und Dimerisierungsdomäne (dunkelgrau) im C-Terminus bindet das Protein als Dimer an sein Sequenzmotiv. Auch diese Domäne ist für Replikation und Erhaltung des Virus notwendig. EBNA1 besitzt ein nukleäres Lokalisations-Signal (NLS, schwarz). (B) Schematische Darstellung der Anheftung des EBV-Episoms an die genomische DNA durch EBNA1. EBNA1 bindet dabei mit seinem N-terminalen Bereich an die Chromosomen der Zelle und mit der DNA-Bindedomäne an den latenten EBV-Replikationsursprung *oriP*. Dadurch wird die stabile Erhaltung episomaler Plasmide in der Zelle ermöglicht.

EBNA1 wird in den Latenzformen I, II, III und auch in EBV-assoziierten Tumoren nachgewiesen (Babcock et al., 2000; Rickinson und Kieff, 2001). Dabei ist es das einzige virale Protein in Zellen der Latenz I (Hochberg et al., 2004; Rowe et al., 1987).

EBNA1 wird durch das terminale Exon einer etwa 100 kb langen Transkriptionseinheit kodiert, die am *Wp*- oder am *Cp*-Promotor initiiert (Abb. 1; Speck und Strominger, 1985). Alternativ kann es auch vom *Qp*-Promotor abgelesen werden, wie z.B. in einigen Burkitt-Lymphom-Zellen (Schaefer et al., 1995). Über Bindung an den viralen *Qp*-Promotor reguliert EBNA1 seine eigene Transkription negativ (Davenport und Pagano, 1999; Sung et al., 1994).

EBNA1 ist ein Phosphoprotein modularen Aufbaus (Abb. 2 A; Ambinder et al., 1991). Der N-Terminus enthält eine Transaktivierungsdomäne und vermittelt eine Assoziation an das zelluläre Chromatin. Der C-Terminus enthält eine sequenzspezifische DNA-Bindedomäne, die am EBV-Episom bindet.

EBNA1 hat eine Länge von 416 bis 641 Aminosäuren. Die Länge des Proteins ist aufgrund einer N-terminalen, bei verschiedenen Wirten unterschiedlich langen Wiederholung aus Glycin und Alanin variabel (Falk et al., 1995). Diese Gly-Ala-Wiederholungen sind möglicherweise dafür verantwortlich, dass EBNA1 nicht vom Immunsystem des Wirts erkannt wird. Es wird diskutiert, dass die Wiederholungen zum einen die Ubiquitin-abhängige Degradation des Proteins im Proteasom sowie seine Erkennung durch zytotoxische T-Zellen verhindern und zum anderen die eigene mRNA Translation reprimieren (Levitskaya et al., 1995; Levitskaya et al., 1997; Yin et al., 2003). Die Transaktivierungsdomäne im N-Terminus des Proteins enthält zwei stark basische Arginin-reiche Verknüpfungsdomänen, die für die transkriptionelle Aktivierung, die Plasmid-Erhaltung und die Replikation wichtig sind (Kanda et al., 2001; Kapoor und Frappier, 2003; Leight und Sugden, 2000; Mackey und Sugden, 1999; Marechal et al., 1999; Yates, 1996). Die Verknüpfungsdomänen interagieren miteinander und führen zur Bildung von hochmolekularen Komplexen sowie einer Strukturänderung des Proteins (Mackey und Sugden, 1999). Die meisten EBNA1-Bindestellen im EBV-Genom liegen im latenten Replikations-Ursprung *oriP* (s. I.3.1.). *OriP* besteht aus zwei Elementen (*DS* und *FR*), die durch das Binden von EBNA1 in räumliche Nähe zueinander gebracht werden. Dies könnte die Replikations-Initiation erleichtern (Mackey et al., 1995; Middleton und Sugden, 1992). Eine enzymatische Funktion (z.B. als Helikase), die EBNA1 als „klassischen“ Replikationsfaktor auszeichnen würde, konnte nicht nachgewiesen werden (Frappier und O'Donnell, 1991). Den Verknüpfungsdomänen zugeordnet werden Abschnitte mit sehr vielen Glycin und Arginin (Aminosäuren 40-54 und

327-350; Wu et al., 2002). Von diesen Bereichen kann infolge experimenteller und struktureller Daten eine Homologie zu den sogenannten „*AT-hook*-Motiven“ der HMG-I-Familie abgeleitet werden (s. I.5.; persönliche Mitteilung A. Aiyar, Chicago). *AT-hook*-Proteine binden an die kleine Furche AT-reicher DNA.

Im C-Terminus von EBNA1 liegt die DNA-Bindungs- und Dimerisierungsdomäne, deren Kristallstruktur aufgeklärt ist (Bochkarev et al., 1995; Bochkarev et al., 1996; Bochkarev et al., 1998). Mit dieser bindet EBNA1 als Dimer sequenzspezifisch an seine ca. 16 bp langen Bindestellen im EBV-Genom (Rawlins et al., 1985; Sugden, 2002). Die Bindung von EBNA1 am *DS*-Element des *oriP* ermöglicht die Replikation, während seine Bindung an den *FR* die extrachromosomale Erhaltung des viralen Episoms vermittelt (Abb. 2 B und 3). Die EBNA1-vermittelte Interaktion zwischen viraler DNA und zellulären Chromosomen gewährleistet eine extrachromosomale Erhaltung des EBV und die gleichmäßige Verteilung der replizierten Virusgenome in die Tochterzellen (Abb. 2 B; zur Übersicht: Aiyar et al., 1998; Hung et al., 2001; Leight und Sugden, 2000; Sugden, 2002). Die Interaktion findet während des gesamten Zellzyklus statt, ist aber während der Metaphase essentiell, bei der die virale DNA zufällig verteilt an die Metaphase-Chromosomen anlagert (Harris et al., 1985; Kanda et al., 2001; Sears et al., 2003).

Neben seinen essentiellen Funktionen für die virale Replikation und die extrachromosomale Erhaltung des Episoms hat EBNA1 eine Aufgabe als transkriptioneller Transaktivator. Indem es an die *FR* von *oriP* bindet, dienen diese als transkriptionelle Verstärker der viralen *Cp*- und *lmp1*-Promotoren, wodurch die Expression der meisten latenten EBV-Gene erhöht wird (Gahn und Sugden, 1995; Puglielli et al., 1996). Zusätzlich transaktiviert EBNA1 heterologe Promotoren, wenn diese EBNA1-Motive besitzen (Kennedy und Sugden, 2003).

Es wurden mehrere zelluläre, mit EBNA1 interagierende Faktoren gefunden, von denen angenommen wird, dass sie bei der Erhaltung des Episoms eine Rolle spielen. Zu diesen zählen das humane p32/Tat assoziierte Protein (Van Scoy et al., 2000; Wang et al., 1997), das EBNA1-bindende Protein 2 (EBP2; Kapoor und Frappier, 2003; Kapoor et al., 2001; Shire et al., 1999), Rch/Importin α (Fischer et al., 1997; Ito et al., 2000; Kim et al., 1997) sowie der „*telomere repeat binding factor 2*“ (TRF2; Deng et al., 2002). Es wurden außerdem Faktoren gefunden, welche die Bedeutung von EBNA1 für die virale Replikation untermauern. Dazu zählt der zelluläre „*origin recognition complex*“ (ORC) sowie weitere Faktoren des Prä-Replikations-Komplexes (Chaudhuri et al., 2001; Dhar et al., 2001; Hirai und Shirakata, 2001; Ritzi et al., 2003; Schepers et al., 2001) und das Replikations-Protein A (RPA; Zhang et

al., 1998). Die Beobachtung, dass EBNA1 Nukleosomen destabilisiert, wird ebenfalls mit einer Funktion bei der Replikation in Übereinstimmung gebracht (Avolio-Hunter et al., 2001). EBNA1 wurde als virales Onkogen in transgenen Mäusen beschrieben (Tsimbouri et al., 2002; Wilson et al., 1996; Wilson und Levine, 1992). Das onkogene Potential des Proteins wird von einigen Autoren seiner Assoziation mit einer erhöhten Expression von CD25 und RAG 1 und -2 (VDJ-Rekombinase aktivierendes Gen) zugeordnet (Kube et al., 1999; Kuhn-Hallek et al., 1995; Srinivas und Sixbey, 1995). Die erhöhte Expression dieser Proteine soll zu genetischer Instabilität, damit zu einer Transformation der Zelle und daraus folgenden Tumoren beitragen. Diese Beobachtung und die Onkogenität des Proteins werden jedoch kontrovers diskutiert, da EBNA1 z.B. in Gen-Expressions-Analysen keinerlei Induktion zellulärer Zielgene zeigt (Kang et al., 2001). Ferner wird EBNA1 eine antiapoptotische Rolle zugeschrieben (Kennedy et al., 2003).

Die absolute Notwendigkeit von EBNA1 für den Wachstumstransformations-Prozess von primären humanen B-Lymphozyten wird aufgrund der essentiellen Eigenschaften von EBNA1 für die Replikation und die extrachromosomale Erhaltung sowie für die Transaktivierung essentieller latenter Gene postuliert (Kennedy et al., 2003; Lee et al., 1999). Experimentell bestätigt wurde dieses Postulat bisher jedoch nicht. Dies liegt an den elementaren Funktionen von EBNA1, die es bisher nicht erlaubt haben, Mutationen in entscheidenden Domänen des Proteins zu erzeugen, bzw. das Gen aus dem viralen Genom zu deletieren. Diese Möglichkeit besteht durch das Maxi-EBV-System.

3. Die Replikation

Im Verlauf der Zellteilung muss die genetische Information exakt repliziert und gleichmäßig auf die beiden Tochterzellen übertragen werden. Dieser komplexe, in der Evolution hochkonservierte genetische Prozess wird strikt kontrolliert, um die genetische Stabilität zu gewährleisten.

Die Startpunkte der Replikation auf DNA-Ebene werden als Replikations-Ursprünge („*origins*“) bezeichnet. In eukaryontischen Systemen konnten sie für einfache Vertreter wie *Saccharomyces cerevisiae* eindeutig beschrieben werden (Diffley und Cocker, 1992; Diffley und Stillman, 1992; Raghuraman et al., 2001). Bei höheren Eukaryonten wurden über zwanzig Ursprünge beschrieben, für die bisher jedoch kein gemeinsames Charakteristikum identifiziert werden konnte (zur Übersicht: Bielinsky und Gerbi, 2001; DePamphilis, 1999;

Gilbert, 2001). In Metazoen-Zellen ist es zur Zeit unklar, ob die Replikation in großen Initiationszonen oder an spezifischen Startpunkten beginnt (zur Übersicht: Bogan et al., 2000). Die Initiation der DNA-Replikation wird nach dem Modell von Jacob und Cuzin (Jacob et al., 1963) an einem sogenannten Replikator (*cis* DNA-Sequenz) von einem sogenannten Initiator (bindende Faktoren) gestartet. Der Initiator sollte den Origin entwinden und weitere Replikationsproteine rekrutieren. Bei Eukaryonten ist der Initiator ein Multiproteinkomplex, der Prä-Replikations-Komplex (prä-RC) genannt wird. Er besteht unter anderem aus den Proteinen der ORC- („*origin recognition complex*“) und der MCM-Familie („*minichromosome maintenance*“). Der Zusammenbau des prä-RC ist ein hoch geordneter sequentieller Prozess, an dem mehr als 20 Proteine beteiligt sind (z.B. CDC6, CDC45, CDT1; zur Übersicht: Kearsley und Cotterill, 2003; Kelly und Brown, 2000). Der Zusammenbau des prä-RC findet während der G1-Phase statt (Diffley, 1996; Dutta und Bell, 1997). Dadurch wird die Aktivierung individueller Replikations-Ursprünge auf einmal pro Zellzyklus limitiert und eine erneute Replikation des Genoms im gleichen Zellzyklus verhindert.

Die Untersuchung der zellulären Replikation ist aufgrund ihrer Komplexität, nur weniger geeigneter Methoden und des bisher geringen Wissens sehr schwierig. Für die Untersuchung der Replikation in Metazoenzellen ist es daher angebracht, sich eines einfachen Modellsystems zu bedienen. Der latente Replikations-Ursprung des EBV (*oriP*) bietet sich als Modell der humanen Replikation an, da er sich der zellulären Initiations- und Replikationsproteine bedient und zum Teil ähnlicher Regulation unterliegt (zur Übersicht: Sugden, 2002). *OriP* ist im Gegensatz zum humanen Genom zudem gut definiert und einfach genetisch manipulierbar.

3.1. *OriP*: Der latente Ursprung der EBV-Replikation

In seiner latenten Phase repliziert das EBV sein Episom genau einmal pro Zellzyklus (Adams, 1987; Yates und Guan, 1991). Die Verdopplung der DNA findet in der S-Phase gemeinsam mit der Replikation des Wirtszellgenoms statt, wobei die Zahl der Episomen in den Zellen konstant bleibt (Aiyar et al., 1998). Für die Replikation und die daran anschließende stabile extrachromosomale Erhaltung des EBV sind nur zwei virale Elemente notwendig (Middleton und Sugden, 1994; Sugden et al., 1985; Wysokenski und Yates, 1989). Dies ist der latente Ursprung der Replikation (*oriP*) als *cis*-Element, der von EBNA1 als *trans*-wirkendem Faktor erkannt und gebunden wird (Lupton und Levine, 1985; Yates et al., 1984; Yates et al., 1985). Alle weiteren Faktoren werden von der Wirtszelle zur Verfügung gestellt.

OriP ist ein 1,7 kbp langes DNA-Segment und besteht aus zwei essentiellen Elementen, die „family of repeats“ (*FR*) und „dyad symmetry element“ (*DS*) genannt werden (Abb. 3; Reisman et al., 1985). Beide Elemente enthalten 30 bp lange palindromisch aufgebaute Bindestellen für EBNA1.

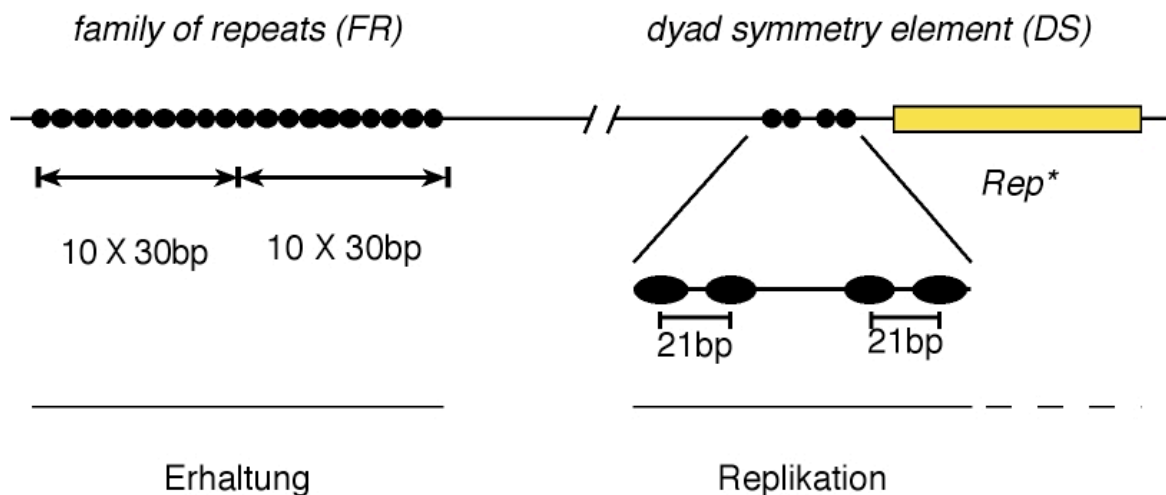


Abb. 3: Schematische Darstellung des latenten EBV-Replikations-Ursprungs *oriP*:

Der latente Replikations-Ursprung *oriP* ist das *cis*-Element, das gemeinsam mit dem viralen Protein EBNA1 die Replikation und die episodale Erhaltung von EBV erlaubt. *OriP* besitzt eine duale Struktur, die sich in seiner Beteiligung an der Erhaltung des EBV-Episoms und dessen Replikation manifestiert.

Die „family of repeats“ (*FR*) sind aus zwanzig Bindestellen für EBNA1 aufgebaut. Sie sind essentiell für die episodale Erhaltung von EBV-basierten Vektoren. Das „dyad symmetry element“ (*DS*) besteht aus vier EBNA1-Erkennungssequenzen, die in zwei Dyaden angeordnet sind. Das für die Replikation essentielle *DS* fungiert während der Latenz als viraler Replikator, an dem auch zelluläre Replikationsproteine binden. *Rep** (gelb) ist ein Element von *oriP*, welches nicht essentiell aber unterstützend für die Replikation ist.

Das *DS* besitzt vier EBNA1-Bindemotive, die in zwei Dyaden angeordnet sind (Harrison et al., 1994; Hsieh et al., 1993; Reisman und Sugden, 1986). Es fungiert in *oriP*-basierten Plasmiden als Replikator, in dessen unmittelbarer Nähe die Replikation initiiert (Chaudhuri et al., 2001; Norio et al., 2000; Schepers und Diffley, 2001). Das *DS*-Element reagiert auch auf kleine Punktmutationen sehr empfindlich (Harrison et al., 1994). Eine limitierte Replikation von Plasmiden ist möglich, wenn zumindest eine Dyade intakt bleibt (Chittenden et al., 1989; Koons et al., 2001). Im Gesamt-EBV-Kontext ist das *DS*-Element redundant (persönliche Mitteilung E. Ott, München; Little und Schildkraut, 1995; Norio et al., 2000). Die *FR* sind aus zwanzig EBNA1-Bindestellen aufgebaut. Sie gewährleisten die extrachromosomale Erhaltung von Plasmiden, indem EBNA1 zelluläres Chromatin und virales Episom aneinander heftet (Abb. 2 B; Gavin et al., 1995; Kirchmaier und Sugden, 1995; Mattia et al., 1999; Reisman und Sugden, 1986; Reisman et al., 1985; Wysokenski und Yates, 1989). Des Weiteren wirken die *FR* als starker Replikationsblock, an dem die Replikation pausiert und häufig zum

Erliegen kommt (Gahn und Schildkraut, 1989; Rawlins et al., 1985). Die *FR* dienen ferner als Transkriptions-Verstärker für nahe gelegene virale Promotoren, wie den von LMP1 (Reisman und Sugden, 1986). Im Gegensatz zu dem Mutations-sensitiven *DS*-Element sind für die Funktionen der *FR* vier bis sieben Motive für eine minimale *oriP*-Vektor-Erhaltung ausreichend (Hebner et al., 2003; Wysokenski und Yates, 1989). *Rep** (Abb. 3) ist ein nicht essentielles *oriP*-Element, das als Replikations-Startpunkt fungieren kann, wenn es auf ΔDS -Plasmiden multimerisiert vorliegt (Kirchmaier und Sugden, 1998).

Die *oriP*-vermittelte virale Replikation ist vollständig abhängig von den zellulären Proteinen, welche auch die chromosomale Replikation initiieren. Es wurde gezeigt, dass EBNA1 mit ORC interagiert und dass diese Interaktion für das Binden von ORC in der Nähe des *DS*-Elements verantwortlich ist (Dhar et al., 2001; Schepers et al., 2001). Ferner sind die MCM-Proteine während der G1-Phase des Zellzyklus am *oriP* angereichert (Chaudhuri et al., 2001; Ritzi et al., 2003). Diese Befunde legen die Vermutung nahe, dass *oriP* als ein quasi-chromosomaler Replikations-Ursprung fungiert (Dhar et al., 2001; Hirai und Shirakata, 2001; Ritzi et al., 2003; Schepers et al., 2001). Damit ist der kleine gut definierte *oriP* ein ideales System, um die zelluläre Replikation zu untersuchen.

4. Das Tetrazyklin-regulierte System

Tetrazyklin (Tc) ist ein Antibiotikum, das in gram-negativen Bakterien die Translation inhibiert (Epe et al., 1987; Spahn und Prescott, 1996). Resistenz gegen Tetrazyklin wird in der Regel durch den Proteintransporter TetA vermittelt (Eckert und Beck, 1989; McMurry et al., 1980; Yamaguchi et al., 1991; Yamaguchi et al., 1990). Die Expression des TetA muss strikt kontrolliert werden und steht unter der engen transkriptionellen Kontrolle des Regulators Tet-Repressor (TetR; Hillen und Berens, 1994; Schnappinger und Hillen, 1996). Der auf dem *E.coli* Transposon *Tn10* kodierte 23 kDa große TetR reguliert die Expression des eigenen TetR- und des TetA-Proteins in Abhängigkeit von Tetrazyklin (Hillen et al., 1983; Wray et al., 1981). TetR bindet als Dimer an zwei palindromischen, im Tandem angeordneten, 19 bp langen Bindemotiven. Diese werden „Operatoren“ (*TetO*) genannt und liegen zwischen den Genen *tetr* und *teta* (Heuer und Hillen, 1988; Meier et al., 1988; Wray und Reznikoff, 1983). Durch die TetR-Bindung wird eine Expression der Proteine verhindert. In Gegenwart von Tc können die Gene transkribiert werden, da Tc mit hoher Affinität an den TetR bindet, die DNA-Bindfähigkeit des Repressors verringert und dieser sich von der DNA löst (Hillen et al., 1983; Takahashi et al., 1986). Es gibt sieben Klassen (A-E, G, H) des TetR (Hansen et al.,

1993; Mendez et al., 1980), von denen der TetR-B der am besten untersuchte und am häufigsten verwendete ist. Es liegen diverse Kristallstrukturen verschiedener TetR in unterschiedlichen Konformationen (mit / ohne Tc bzw. *TetO*) vor (Kisker et al., 1995; Krafft et al., 1998a; Krafft et al., 1998b; Orth et al., 1998; Orth et al., 2000). Die Bindung des TetR an die *TetO* erfolgt über den N-Terminus (Helbl und Hillen, 1998; Hinrichs et al., 1994; Takahashi et al., 1986), während die Dimerisierung und die Tetrazyklin-Bindung über Kontakte im Proteinkern stattfinden und mit einer Konformationsänderung des Proteins einhergehen (Berens et al., 1997; Berens et al., 2001; Pook et al., 1998).

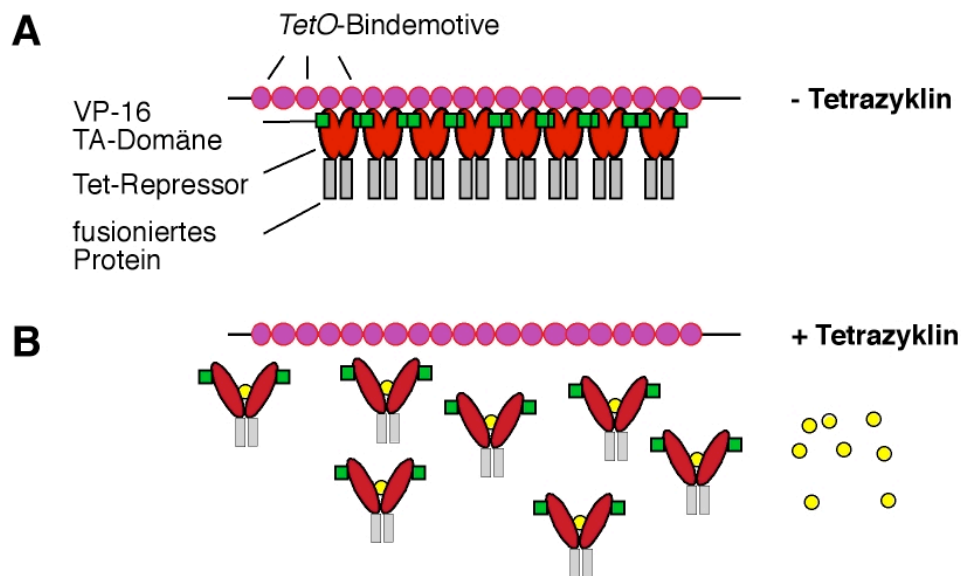


Abb. 4: Schematische Darstellung der Funktionsweise des Tetrazyklin-regulierten Systems (hier das „Tet-off“-System) in seinen zwei Zuständen (A) und (B):

Die DNA-Bindedomäne des Tet-Repressors (TetR, rote Ellipse) bindet als Dimer an seine DNA-Sequenz den *Tet-Operator* (*TetO*, violetter Kreis). Diese Bindung ist bei dem hier dargestellten „Tet-off“-System nur dann möglich, wenn dem Medium kein Tetrazyklin oder ein Analogon wie Doxzyklyn zugegeben wird (A). Bei Zugabe von Tetrazyklin (gelbe Kreise) bindet das Antibiotikum an den TetR und verhindert die TetR-*TetO*-Interaktion (B). Die mit der DNA-Bindedomäne des TetR fusionierten Proteine sind grau dargestellt. An die TetR-Proteine ist eine Transaktivierungsdomäne (TA) des Herpes simplex Virus Typ 1 (HSV1) Proteins VP16 fusioniert (grünes Quadrat). Diese Aktivierungsdomäne erlaubt eine Untersuchung der Interaktion von TetR und *TetO* durch Reporter-Analysen (Luziferase) und die Bestimmung der Induktionsrate.

Auf Grund dieser Eigenschaften eignet sich das Tet-System (schematisch dargestellt in Abb. 4) für ein regulierbares Gen-Expressions-System (zur Übersicht: Berens und Hillen, 2003; Hillen und Berens, 1994). Es ist das bisher am besten untersuchte, auf transkriptioneller Ebene induzierbare System zur Gen-Expression. Die Aktivierung und Inaktivierung erfolgt effizient und schnell (Gossen und Bujard, 1992). Ein weiterer Grund für die Verwendung des Tet-Systems ist, dass es sowohl in pro- als auch in eukaryontischen Zellen funktional ist und vielseitig (z.B. Hefe, Pflanzen, Drosophila, transgene Mäuse) eingesetzt werden kann, um

eine selektive Zielgen-Regulation zu erzielen (Baron et al., 1999; Freundlieb et al., 1997; Rossi und Blau, 1998).

Durch verschiedene Fusionen der Transaktivierungsdomäne aus dem Herpes simplex Virus Typ 1 (HSV-1)-Protein VP16 (Campbell et al., 1984; Triezenberg et al., 1988) an den C-Terminus des TetR entstanden Varianten des Regulators (Gossen und Bujard, 1992). Das VP16-Signal kann toxisch wirken. Das Problem toxischer Konzentrationen wird durch die verschiedenen Varianten des Fusionsproteins mit über mehrere Logstufen variierenden Transaktivierungs-Aktivitäten verringert (Baron et al., 1997; Berger et al., 1992; Kelleher et al., 1990). Ein weiterer Vorteil des Systems ist, dass eine Vielzahl von Tetracyclin-Analoga (z.B. Doxyzyklin) mit unterschiedlichen Eigenschaften (z.B. Stabilität, Lichtsensibilität, Toxizität) in der Lage sind, die Regulation zu bewirken (Bertrand et al., 1984; Gossen und Bujard, 1993; Lederer et al., 1996; Someya et al., 1995). Außerdem sind diese Antibiotika chemisch und pharmakologisch gut untersucht (Bujard und Gossen, 2001; Schultze et al., 1996; Sigler et al., 2000).

Es wurden diverse Mutanten des TetR hergestellt, die Probleme des klassischen Systems umgehen und besonders für die Regulation in höheren Eukaryonten, wie z.B. transgenen Mäusen, verwendet werden (Deuschle et al., 1995; Forster et al., 1999; Gossen et al., 1995; Krueger et al., 2003; Urlinger et al., 2000).

5. Die HMG-I-Proteinfamilie

Die HMG-I-Familie („*high mobility group*“) kodiert für HMG-I (neue Nomenklatur: HMG-A1a), -Y (HMG-A1b) und -C (HMG-A2; Bustin, 2001). Diese kleinen Proteine (10-12 kDa) wurden ursprünglich als basische nicht-Histon-Proteine identifiziert, die an die Metaphase-Chromosomen binden (Disney et al., 1989; Lund et al., 1983). HMG-I und -Y werden im Gegensatz zu HMG-C von einem alternativ gespleißten Gen kodiert. HMG-I und -Y unterscheiden sich in 11 internen Aminosäuren, die bei HMG-Y fehlen (Friedmann et al., 1993). Zusätzlich gibt es weitere Spleißvarianten des Proteins (Johnson et al., 1989; Nagpal et al., 1999). Die Mitglieder anderer HMG-Familien sind strukturell nicht mit denen der HMG-I-Familie verwandt (Bustin, 2001).

Die HMG-I-Proteine besitzen jeweils drei DNA-Bindedomänen, die „*AT-hooks*“ genannt werden (zur Übersicht: Reeves und Nissen, 1995). Diese vermitteln eine Bindung des Proteins in der kleinen DNA-Furche von AT-reicher chromosomaler DNA (Elton und Reeves, 1986;

Reeves et al., 1987; Solomon et al., 1986; Strauss und Varshavsky, 1984). Die DNA-Bindesequenz des evolutionär hoch konservierten *AT-hook*-Peptids ist Arg-Gly-Arg (Aravind und Landsman, 1998). Besonders AT-reiche DNA (70 %) wird z.B. in den *SARs* („*scaffold attached region*“) gefunden, die spezifisch an die nukleäre Matrix binden. Es wird angenommen, dass HMG-I in diesen DNA-Bereichen an der Regulation der Chromosomen-Struktur und der Gen-Expression beteiligt ist (Martelli et al., 1998). Die Bindung der HMG-I-Proteine erfolgt nicht über spezifische DNA-Sequenzen sondern eher über die DNA-Struktur. So wird z.B. präferentiell ungewöhnliche oder gebogene DNA erkannt und gebunden (Bustin und Reeves, 1996; Hill et al., 1999; Liu et al., 1999; Nissen und Reeves, 1995; Reeves und Wolffe, 1996). Durch seine Bindung kann das Protein die Form der DNA vielfältig verändern (z.B. entwinden, biegen, Schleifen bilden, begradigen; Bagga et al., 2000; Chase et al., 1999; Falvo et al., 1995; Lehn et al., 1988; Li et al., 2000). Neben der direkten DNA-Bindung bindet HMG-I an Nukleosomen und verändert dadurch die DNA-Struktur (Reeves und Nissen, 1993; Varshavsky et al., 1983). Da die HMG-Proteine die Konformation der DNA ändern, werden sie auch architekturelle Transkriptionsfaktoren genannt. In Lösung sind sie annähernd strukturlos, bilden jedoch durch verschiedene DNA- und Protein-Kontakte und durch viele verschiedene Modifikationen unterschiedliche Sekundärstrukturen aus (Evans et al., 1995; Huth et al., 1997; Reeves und Beckerbauer, 2001; Reeves und Nissen, 1990).

Die HMG-I-Familie spielt eine wichtige Rolle bei der Zellteilung und der Gen-Expressions-Regulation, obwohl die Mitglieder keine eigenen transkriptionellen Aktivitäten besitzen (zur Übersicht: Reeves, 1992). So werden sie z.B. im Zellzyklus durch CDK2 und PKC phosphoryliert (Nissen et al., 1991; Reeves et al., 1991). Sie vermitteln ihre Funktionen durch Protein-Protein- und DNA-Protein-Interaktionen. Eine Assoziation von HMG-I mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren wie PU.1, NFκB, AP-1, Oct-1 und c-Jun wurde beschrieben (Abdulkadir et al., 1998; Himes et al., 2000; Lewis et al., 2001; Yie et al., 1997; Zhang und Verdine, 1999). Im Gegensatz zu dem DNA-Bindeprotein Histon H1 wirken die HMG-I-Proteine aktivierend im Chromatin (Zhao et al., 1993). Das HMG-I/Y beendet so die Histon H1 vermittelte Repression der Transkription an durch H1 stillgelegtem Chromatin (Strick und Laemmli, 1995; Zhao et al., 1993), obwohl es wesentlich schwächer exprimiert wird als das Histon (Bustin, 1999). Möglicherweise binden die HMG-I-Proteine an reprimiertes Chromatin und rekrutieren dann weitere aktivierende Proteine an diese „geöffnete“ Stelle. Dadurch könnte die Protein-Familie in die Prozesse von Replikation und Gen-Expression eingreifen (zur Übersicht: Reeves, 2001).

Hmg-i/y ist ein direktes c-Myc-Zielgen und seine Expression ist mit neoplastischen Transformationen, schnell proliferierenden Geweben sowie einem erhöhten metastatischen Potential assoziiert (Friedmann et al., 1993; Reeves et al., 2001; Wood et al., 2000a; Wood et al., 2000b). Daher könnte es als diagnostischer Tumormarker für neoplastische Transformationen dienen (Bussemakers et al., 1991; Giacotti et al., 1991). Es wurde außerdem berichtet, dass überexprimiertes HMG-I durch Einleitung der Apoptose toxisch wirkt (Fedele et al., 2001; Reeves und Nissen, 1999).

6. Das Histon H1

Es gibt fünf Histon-Arten (H1, H2A, H2B, H3, H4), die eine ähnliche Struktur besitzen und alle durch verschiedene Modifikationen an den Aminosäuren verändert werden. Sie spielen alle eine Rolle beim Aufbau des Chromatins.

Das stark Lysin-haltige basische H1 scheint ein genereller Repressor der Gen-Expression zu sein, der das Ablesen der genetischen Information verhindert, indem er das Chromatin zu höher geordneten Strukturen faltet und transkriptionell stilllegt (Garrard, 1991; Laybourn und Kadonaga, 1991; Weintraub, 1984). Die Transkription wird ermöglicht, wenn das Chromatin durch Entfernung des Histons H1 entfaltet („geöffnet“) wird.

Das evolutionär hochkonservierte Histon H1 bindet bevorzugt an die AT-reichen Regionen der SARs. Nachdem dort einzelne H1-Moleküle gebunden haben, erfolgt die Bindung weiterer Moleküle an die angrenzende DNA, wodurch große Bereiche des Chromatins transkriptionell stillgelegt werden (Izaurrealde et al., 1989).

In der Gruppe von E. Kieff wurden Fusionen aus Histon H1 bzw. HMG-I mit der C-terminalen DNA-Binde- und Dimerisierungsdomäne von EBNA1 hergestellt (Abb. 5). Kieff und kürzlich die Gruppe von A. Aiyar beschrieben, dass sowohl das Histon H1 als auch HMG-I nach Fusion an die C-terminale EBNA1-Domäne in der Lage sind, die Funktion von nativem EBNA1 für die Replikation, die extrachromosomale Erhaltung und die Assoziation von kleinen *oriP*-Vektoren an Metaphase-Chromosomen zu ersetzen (Hung et al., 2001; Sears et al., 2003).

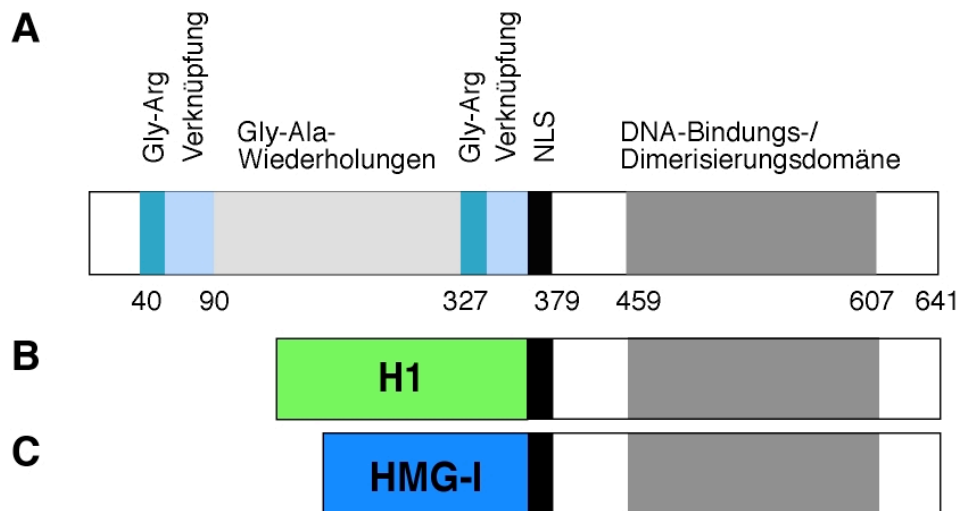


Abb. 5: Schematische Darstellung von EBNA1 (A) sowie den chimären EBNA1-Proteinen H1:EBNA1 (B) und HMG-I:EBNA1 (C):

(A) EBNA1: Die funktionalen Domänen des Proteins sind durch unterschiedlich gefärbte Kästen dargestellt. Die Aminosäurepositionen sind angegeben. Eine genaue Beschreibung der EBNA1-Domänen ist in Abb. 2 gegeben. (B) H1:EBNA1-Fusionsprotein: Das klonierte vollständige Histon H1-Protein ist grün gezeigt. Die EBNA1-Sequenzen entsprechen dem in (A) gezeigten Schema. (C) HMG-I:EBNA1-Fusionsprotein: Das klonierte vollständige HMG-I-Protein ist blau dargestellt. Die HMG-I:EBNA1- bzw. H1:EBNA1-Fusionsproteine sind in der Lage, die Transaktivierungsdomäne von EBNA1 funktional zu ersetzen.

II. Zielsetzung

Die zentralen Aufgaben des EBV-Proteins EBNA1 führten dazu, dass es für den Prozess der Wachstumstransformation von primären humanen B-Lymphozyten als essentiell beschrieben wurde (Rickinson und Kieff, 2001). Da allgemein angenommen wurde, dass EBNA1 für die virale DNA-Replikation, die extrachromosomale Erhaltung des EBV-Genoms und die Transaktivierung der latenten Gene essentiell sei, wurde dieses Postulat nie experimentell überprüft. Zusätzlich war die Analyse bisher technisch unmöglich.

Eine Aufgabe meiner Doktorarbeit war, die verschiedenen EBNA1-Domänen funktional voneinander zu trennen und durch heterologe Faktoren zu ersetzen. Damit sollten Grundlagen für ein konditionales EBV-basiertes Vektorsystem geschaffen werden.

Um dieses Ziel zu erreichen, musste zunächst die Frage geklärt werden, ob EBNA1 für die Wachstumstransformation von B-Zellen essentiell ist. Als methodische Grundlage diente das Maxi-EBV-System (Delecluse et al., 1998), mit dem es erstmals möglich war, EBNA1-negative Viren herzustellen und zu analysieren.

Der Aspekt, ob EBNA1 in einem konditional regulierbaren System für die Funktion der extrachromosomalen Erhaltung und Replikation von EBV-Genomen oder *oriP*-Plasmiden ersetzbar ist, sollte wegen des potentiell onkogenen Charakters des Proteins untersucht werden. Die Verfügbarkeit eines regulatorischen Systems ohne EBNA1 wäre für die Gentherapie und bei eukaryontischen Vektorsystemen ein großer Fortschritt. Außerdem wäre es dadurch zum ersten Mal möglich, die virale Replikation ohne Einfluss auf die episomale Erhaltung des Genoms zu erforschen. Hinweise auf einen funktionalen Ersatz von EBNA1 gab es aufgrund unveröffentlichter Daten der Gruppe von E. Kieff (Hung et al., 2001).

Es wurde geplant, verschiedene heterologe Fusionsproteine herzustellen (HMG-I:EBNA1, H1:EBNA1, unterschiedliche EBNA1:TetR-Chimären). Diese sollten sowohl in kleinen Vektoren als auch im Maxi-EBV in verschiedenen *in vivo*- und *in vitro*-Systemen auf ihre Funktionalität hin untersucht werden. Die konditionale Trennung der Plasmid-Erhaltungs- und Replikationsfunktionen von EBNA1 sollte durch das Tet-System gewährleistet werden, indem die *FR* durch zwanzig *TetO*-Bindemotive ausgetauscht wurden.

Zur Übersicht zeigt Abb. 6 schematisch die verschiedenen Proteine und DNA-Konstrukte.

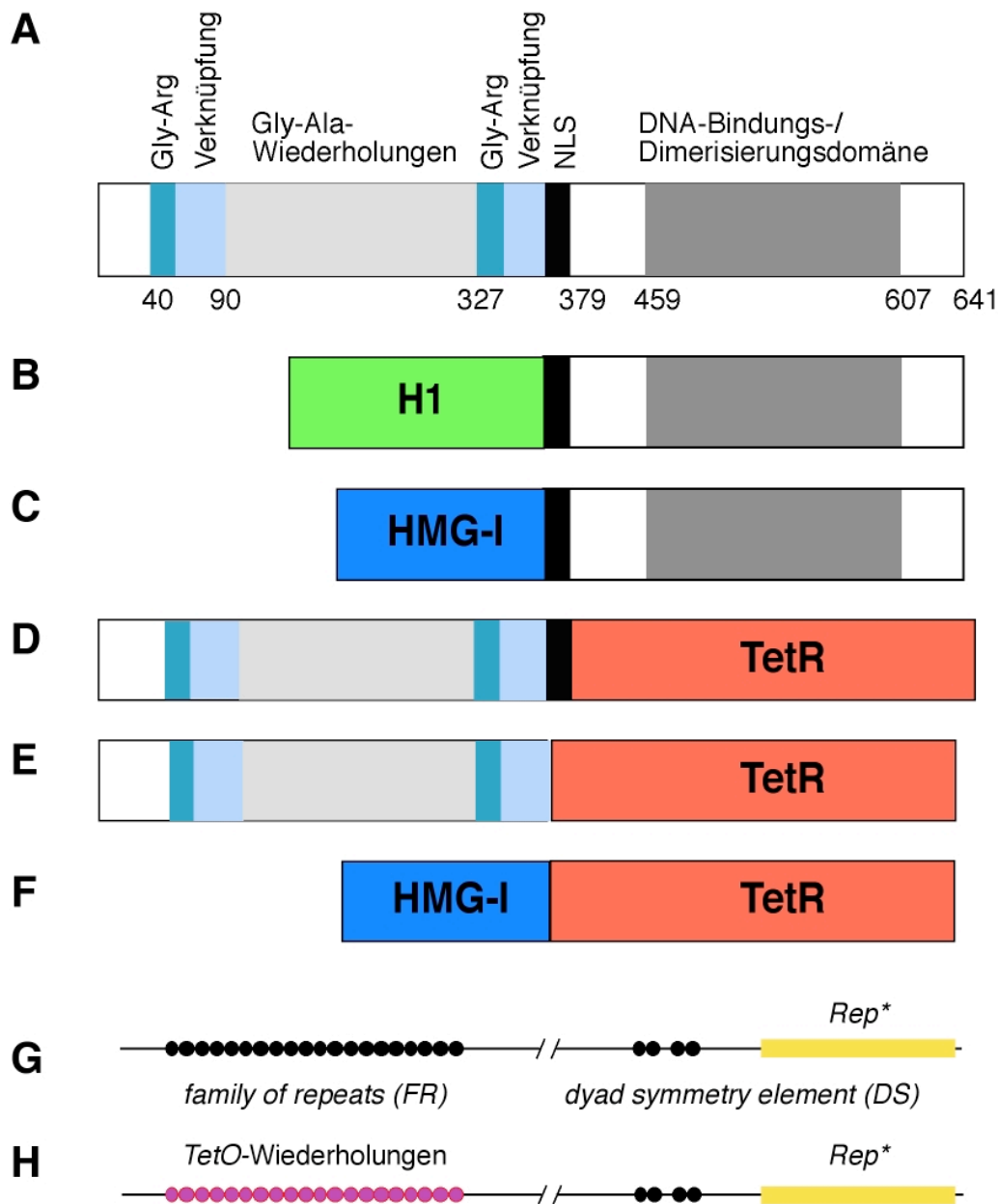


Abb. 6: Schematische Darstellung von EBNA1 (A), den hergestellten heterologen Protein-Chimären (B-F) sowie von *oriP* (G) und seiner *TetO*-Mutante (H):

(A) Schema des nativen EBNA1-Proteins. Die funktionalen Domänen und die Aminosäurepositionen sind durch unterschiedlich gestaltete Kästen gekennzeichnet (s. Abb. 2). (B) Schema des chimären H1:EBNA1-Fusionsproteins. Das vollständige Histon H1 ist grün gezeigt. (C) Schema des chimären HMG-I:EBNA1-Fusionsproteins. Das vollständige HMG-I ist blau dargestellt. (D) Schema des Fusionsproteins aus EBNA1 und der DNA-Bindedomäne des TetR, bei dem das NLS von EBNA1 eingeschlossen ist. Die Sequenz des TetR ist rot zu sehen. (E) Schema des EBNA1:TetR-Fusionsproteins, bei dem das NLS fehlt. (F) Schema des Fusionsproteins aus HMG-I und dem TetR. (G) Schema des nativen latenten Replikations-Ursprungs (*oriP*, s. Abb. 3). (H) Schema des mutierten *oriP*, in dem die zwanzig EBNA1-Bindestellen (schwarze Kreise) der *FR* durch zwanzig *TetO*-Bindemotive (violett), damit die in (D-F) gezeigten Fusionsproteine binden und die extrachromosomale Erhaltung des Episoms durch EBNA1 ersetzen können.

III. Material

1. Antikörper

gekoppelte Antikörper:

aufgelistet nach: Spezifität; Spezies; Isotyp; Markierung; Hersteller

CD3;	Maus; IgG; FITC; DAKO
CD4;	Maus; IgG; PE; DAKO
CD5;	Maus; IgG; PE; BectonDickinson
CD8;	Maus; IgG; PE; DAKO
CD19;	Maus; IgG; FITC; DAKO
CD19;	Maus; IgG; PE; Dianova
CD86;	Maus; IgG; APC; BectonDickinson
Kaninchen;	Ziege; IgG; HRP; Dianova
Maus;	Esel; IgG; PE; Dianova
Maus;	Ziege; IgG; Cy3; Dianova
Maus;	Ziege; IgG; HRP; Promega
Ratte;	Ziege; IgG; HRP; Dianova

sonstige Antikörper

aufgelistet nach: Spezifität; Spezies; Name; Hersteller

CD11a;	Maus; IgG; DAKO
EBNA1;	Ratte; 1H4; E. Kremmer, GSF
EBNA2;	Ratte; R3+1E6; E. Kremmer, GSF
EBNA3B;	Ratte; 5F6; E. Kremmer, GSF
EBNA3C;	Ratte; E3c.A10; M. Rowe, Cardiff, UK
gp350/220;	Maus; 72A1; ATCC (Hybridom)
LMP1;	Ratte; CS1-4; DAKO
LMP2A;	Ratte; 14B6; E. Kremmer, GSF
MCM3;	Kaninchen; SA8492
TetR;	Kaninchen; SA1851; C. Berens, Erlangen

2. Southern-Blot-Sonden

aufgelistet nach: Sonde; nachgewiesene DNA; Größe der Sonde

Bluescript;	<i>OriP</i> -Vektoren (p2832, p2833, p2835, p2903); Gesamtplasmid
Sonde A/2761;	Δ EBNA1-2828 in Bakterien, 293-Zellen und LCLs; <i>MluI</i> - <i>SspI</i> (3,9 kb)
135.16;	Gardella-Gel-Analysen für EBV; Gesamtplasmid
2089;	Gesamt-EBV; Gesamtplasmid
2545(a);	<i>OriP</i> im Maxi-EBV; Gesamtplasmid
2545(b);	<i>OriP</i> in Plasmid-Erhaltungs-Analysen; <i>Eco47III</i> - <i>EcoRI</i> 2,4 kb Fragment
2766;	TR; Gesamtplasmid
2832;	<i>OriP</i> -Plasmide (p2832, p2833, p2835, p2903) in 293-Zellen; Gesamtplasmid
2835;	<i>OriP</i> -Plasmide (p2832, p2833, p2835, p2903) in 293-Zellen; Gesamtplasmid
2852;	Gardella-Gel episomaler Komplementations-Viren; Gesamtplasmid
2903;	<i>OriP</i> -Plasmide (p2832, p2833, p2835, p2903) in 293-Zellen; Gesamtplasmid
2982;	EBNA1-Fusionsproteine im Maxi-EBV; Gesamtplasmid
3097;	EBNA1-Fusionsproteine im Maxi-EBV; Gesamtplasmid

3. Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion (Martinsried) synthetisiert. Die Sequenzen der Oligonukleotide sind in 5'-3' Orientierung angegeben. Vorhandene oder eingefügte Restriktionsenzym-Motive, die zur Klonierung verwendet wurden, sind durch Unterstreichung markiert. Der Name des Restriktionsenzym ist in Klammern nach dem Namen des Oligonukleotids notiert. Die Sequenzen, an denen die Primer in den jeweiligen Plasmiden binden, sind durch (# Basen-Position) gekennzeichnet.

Primer für die Amplifikation des vollständigen HMG-I/Y-Gens aus einer cDNA-Bank zur Fusion mit dem EBNA1 C-Terminus:

HMG 5' (*SacII*) CCGCGGGCAACCATGAGTGAGTCGAGCTCGAAGTCCAG

HMG 3' (*XhoI*): AAAAAACTCGAGCTGCTCCTCCTCCGAGGACTCCTGCG

Primer für die Amplifikation des vollständigen Histon H1-Gens aus einer cDNA-Bank zur Fusion mit dem EBNA1 C-Terminus:

H1 5' (*SacII*): AAAAAACCGGGGCCACCATGACCGAGAATTCCACGTC

p2761*	vollständige EBNA1-Deletion mit Insertion einer Kanamycin-Resistenzkassette zur Etablierung von p2828; pCP15 (<i>HindIII-SmaI</i> , Klenow) in p2759.5 (<i>EclI36II</i> , dephosphoryliert)
p2762*	p2760 (20x <i>TetO</i>) mit destabilisiertem eGFP; eGFP aus p2523 (<i>SspI-AflIII</i>) in p2760 (<i>PmlI-AflIII</i>)
p2774	EBNA1 mit wenigen Gly-Ala-Wiederholungen
p2832*	Vektor mit <i>oriP</i> , Puromycin-Resistenzgen und eGFP; PINCO (<i>AvrII-XmnI</i>) in p2545 (<i>EclI36II-XbaI</i>)
p2835*	<i>FR</i> durch 20x <i>TetO</i> ersetzt, Puromycin-Resistenzgen, eGFP; PINCO (<i>AvrII-XmnI</i>) in p2834 (<i>EclI36II-XbaI</i>)
p2852*	Komplementations-Virus-Vektor mit dem ORF von EBNA1 zur Verpackung in TR2- Zellen; p1327 (<i>BamHI-DraI</i>) in p2823 (<i>BglII-BstI107I</i>)
p2853*	Komplementations-Virus-Vektor mit H1: EBNA1 zur Verpackung in TR2-Zellen; p2680 (<i>BamHI-PvuII</i>) in p2823 (<i>BglII-BstI107I</i>)
p2854*	Komplementations-Virus-Vektor mit HMG-I:EBNA1 zur Verpackung in TR2-Zellen; p2679 (<i>BamHI-PvuII</i>) in p2823 (<i>BglII-BstI107I</i>)
p2971.3*	HMG-I:TetR-Fusionsprotein im pRK5 Expressions-Vektor; PCR Produkt an p2679 (<i>EcoRI-BamHI</i>) in p2691 (<i>EcoRI-BamHI</i>)
p3154*	Vektor mit <i>oriP</i> , Puromycin-Resistenzgen und mRFP; p3056 (<i>NaeI-NotI</i>) in p2835 (<i>NotII-PmlI</i>)
p3155*	<i>FR</i> durch 20x <i>TetO</i> ersetzt, Puromycin-Resistenzgen und mRFP; p3056 (<i>NaeI-NotI</i>) in p2832 (<i>NotII-PmlI</i>)

Maxi-EBV-Plasmide

p2089	natives Maxi-EBV: F-Faktor-Plasmid (pMBO131) mit eGFP- und Hygromycin-Resistenzgen in B95.8 DNA (Delecluse et al., 1998)
p2828*	vollständige EBNA1-Deletion; homologe Rekombination von p2089 mit p2761 (<i>MluI-SspI</i>)
p2978.5*	<i>FR</i> ersetzt durch 20x <i>TetO</i> ; homologe Rekombination von p2089 mit p2970.1 (<i>EcoRV-AvrII</i>)
p2986.4*	EBNA1 ersetzt durch HMG-I:EBNA1, Orientierung 1; homologe Rekombination von p2089 mit p2981.12, (<i>MluI-AvrII</i>)
p2988.D*	EBNA1 ersetzt durch EBNA1:TetR; homologe Rekombination von p2978.5 mit p2982.1, (<i>MluI-AflIII</i>)

p2989.6 *	EBNA1 ersetzt durch HMG-I:TetR, Orientierung 1; homologe Rekombination von p2978.5 mit p2983.2, (<i>MluI-AvrII</i>)
p3084*	EBNA1 ersetzt durch HMG-I:EBNA1, Orientierung 2; homologe Rekombination von p2089 mit p2981.1, (<i>MluI-AvrII</i>)
p3085*	EBNA1 ersetzt durch EBNA1:TetR; Orientierung 2; homologe Rekombination von p2978.5 mit p2982.3, (<i>MluI-AfIII</i>)
p3086*	EBNA1 ersetzt durch HMG-I:TetR, Orientierung 2; homologe Rekombination von p2978.5 mit p2983.3, (<i>MluI-AvrII</i>)
p3105.C*	Δ EBNA1-p2828 komplementiert durch HMG-I:EBNA1 im prokaryonten Anteil, OR 1; Rekombination von p2828 mit p3097.3 (<i>HpaI-PacI</i>)
p3106.B*	Δ EBNA1-p2828 komplementiert durch HMG-I:EBNA1 im prokaryonten Anteil, OR 2; Rekombination von p2828 mit p3097.2 (<i>HpaI-PacI</i>)
p3199.4*	Maxi-EBV mit HMG-I:EBNA1, unter Kontrolle des endogenen EBNA1-Promotors (p3176 aufgelöst)
p3200*	Maxi-EBV mit HMG-I:TetR, unter Kontrolle des endogenen EBNA1-Promotors (p3178.T aufgelöst)
p3201.41*	Maxi-EBV mit EBNA1:TetR, unter Kontrolle des endogenen EBNA1-Promotors (p3177.G aufgelöst)

5. Bakterien

Die Bakterienstämme stammen aus der Glycerol-Sammlung der Abteilung Genvektoren oder wurden von mir etabliert und eingefroren (mit * gekennzeichnet).

<i>E.coli</i> DH5 α	F-, <i>lacI</i> -, <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> , Δ (<i>lacZYA-argF</i>), U169, F80 <i>dlacZ</i> Δ M15, <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> (Hanahan, 1983)
<i>E.coli</i> DH10B	F-, <i>mcrA</i> , Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>), Φ 80 <i>dlacZ</i> Δ M15, Δ <i>lacX74</i> , <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>araD139</i> , Δ (<i>ara</i> , <i>leu</i>)7697, <i>galU</i> , <i>galK</i> , λ -, <i>rpsL</i> , <i>nupG</i> (Life Technologies)
<i>E.coli</i> BJ5183	F-, <i>endA</i> , <i>sbcB</i> -, <i>recBC</i> -, <i>galK</i> , <i>met</i> -, <i>str</i> ^R , <i>thi-1</i> , <i>bioT</i> , <i>hsdR</i> (<i>r_k</i> -, <i>m_k</i> +), λ - (Hanahan, 1983)
2089/2650*	<i>E. coli</i> des Stammes DH10B mit p2089 und p2650
2089/pKD46*	<i>E. coli</i> des Stammes DH10B mit p2089 und pKD46
2828/pKD46*	<i>E. coli</i> des Stammes DH10B mit p2828 und pKD46
2978/pKD46*	<i>E. coli</i> des Stammes DH10B mit p2978 und pKD46

6. Zelllinien

Die verwendeten Zelllinien stammen aus der Sammlung der Abteilung Genvektoren. Die mit einem Stern (*) markierten Zelllinien wurden von mir hergestellt.

Akata27	EBV-negative Burkitt-Lymphom-Zelllinie (Takada et al., 1991)
BJAB	EBV-negative Lymphom-Zelllinie
B95.8	lymphoblastoide Zelllinie aus EBV des Stammes B95.8, die permanent Virus ins Medium abgibt (Miller et al., 1972)
HEK293	humane embryonale Nierenepithel-Zelllinie, durch die Gene E1a und E1b von Adenovirus Typ 5 transformiert (Graham et al., 1977)
HEK293-D	EBV-transfizierte 293-Zelllinie, die das Virus verlor, aber eine höhere Rate der Virusproduktion erlaubt als HEK293.
HeLaX1/6	Zellen mit Integration eines Luziferase-Reportergens, das durch einen <i>TetO</i> -regulierten CMV-Promotor kontrolliert wird (Gossen und Bujard, 1992).
Raji	humane EBV-positive Burkitt-Lymphom-Zelllinie (Pulvertaft, 1964)
TR2-	293-Zelllinie mit stabiler Erhaltung eines nicht verpackbaren ΔTR Maxi-EBV; Verpackungszelllinie für Komplementations-Viren (Delecluse et al., 1999)
WI38	humane Fibroblasten-Zelllinie (ATCC)

293-D-Zelllinien mit stabiler Expression transfizierter Gene:

Die Vektoren, die für das inserierte Gen kodieren, sowie der Name des verwendeten Klons sind in sind Klammer angegeben. „Neo“ bedeutet Neomycin-Resistenz. Sie wurde durch Kotransfektion des jeweiligen Vektors mit p2727 erreicht. „Hyg“ bedeutet Hygromycin-Resistenz und wurde entweder durch Kotransfektion mit p1897 erreicht (HMG-I:TetR) oder dadurch, dass das Resistenzgen auf dem Insertions-Vektor kodiert war (12.12.A und 2.2.10).

EBNA1*	CMV-kontrolliertes EBNA1 (aus p2816) in 293-D-Zellen (Neo); (Klon 1)
pWHE *	doppelter TetR (aus pWHE120scB+sB in 293-D-Zellen (Neo)
2679*	HMG-I:EBNA1 (p2679) CMV-kontrolliert in 293-D-Zellen (Neo); (Klon 7)
2680*	CMV-kontrolliertes H1:EBNA1 (p2680) in 293-D-Zellen (Neo); (Klon 5)
2.2*	CMV-kontrolliertes EBNA1:TetR (aus p2729.1) in 293-D-Zellen (Neo)
2.210*	CMV-kontrolliertes EBNA1 (aus p2774) in 2.2-Zellen (Neo / Hyg)
12.12*	CMV-kontrolliertes EBNA1:TetR (aus p2729.2) in 293-D-Zellen (Neo)
12.12.A*	CMV-kontrolliertes EBNA1 (aus p2774) in 12.12-Zellen (Neo / Hyg)
2971*	CMV-kontrolliertes HMG-I:TetR (p2971) in EBNA1-Zellen (Neo / Hyg)

293-D-Zelllinien, mit stabiler Erhaltung von transfizierten Maxi-EBV-Plasmiden

2089*	natives Maxi-EBV, transfiziert in 293-D-Zellen
2.4/6*	Δ EBNA1-Maxi-EBV (p2828), kotransfiziert mit EBNA1-exprimierendem pHeBo Vektor (p2747) in 293-D-Zellen
2679.5*	Δ EBNA1-Maxi-EBV (p2828) in 2679-Zellen (HMG-I:EBNA1)
2680.16*	Δ EBNA1-Maxi-EBV (p2828) in 2680 -Zellen (H1:EBNA1)

Lymphoblastoide Zelllinien (LCL):

Die LCLs wurden aus B-Zellen verschiedener Spender mit den angegebenen infektiösen Maxi-EBV-Partikeln hergestellt. Von jedem Stamm gibt es daher mehrere unabhängig erhaltene Linien. Die infektiösen Viren stammten aus den jeweiligen 293-Zelllinien.

2089*	LCL aus Infektion mit nativem Maxi-EBV (2089-Maxi-EBV)
2828*	LCL aus Infektion mit Δ EBNA1-Maxi-EBV (2828 aus 2/4.6-, 2680.16- oder 2679.5-Zellen)
2828/2852*	LCL aus Koinfektion mit Δ EBNA1-Maxi-EBV (2828 aus 2/4.6, 2680.16 oder 2679.5-Zellen) und EBNA1-Komplementations-Virus (2852 verpackt in TR2-Zellen)

7. Mäuse

Die verwendeten SCID-Mäuse stammten aus Inzuchtkreuzungen des Mausstalls im GSF-Hämatologikum, Großhadern, München.

8. Chemikalien, Enzyme, Geräte und sonstiges

Alle hier nicht aufgeführten Chemikalien wurden von den Firmen Merck (Darmstadt) und Sigma (München) in reinsten Form „*pro analysi*“ bezogen.

Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg

Hybond-ECL-Zellulose-Membran, Hybond-N+-Nylonmembran, α [³²P]-dCTP (3000 Ci/mmol), ECL-Western blotting analysis System, G50- und G25-Sepharose-Säulen („Nick columns“)

Beckmann, Heidelberg

Avanti J25 Zentrifuge, L7-55 Ultrazentrifuge, TL-100 Ultrazentrifuge

BectonDickinson GmbH, Heidelberg

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

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

Gene Pulser

Calbiochem GmbH, Frankfurt/Main

Dithiothreitol (DTT), Hygromycin B

Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA

Bacto-Agar, Hefeextrakt, Trypton

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

Röntgenfilme XAR5

Eppendorf Gerätebau, Hamburg

Tischzentrifuge 5415, Reaktionsgefäße verschiedener Größe, BioPhotometer

Genomed, Bad Oeynhausen

Maxi-Präparations-Kit für Plasmidpräparationen (Jetstar)

Hofer Scientific Instruments, San Francisco, USA

Mighty Small II Gel-Elektrophorese-Einheit, SemiPhor, Semidry Blottingsystem

Infors GmbH, Einsbach

Labfors, Klein-Fermenter-System

Labor Schubert, München

Reagenzröhrchen mit Rundboden für FACS; 48 Loch Platten

Life Technologies, Eggenstein

Amphoterin B (Fungizone), HBSS-Puffer, HEPES, 1 kb DNA-Leiter, Lipofectamin Transfektionsreagenz, Optimum I, Penicillin, Streptomycin, Trypsin-EDTA (1x), Trypton, Zellkulturmedium RPMI 1640, BenchMark Prestained Protein Ladder; Elektromax DH10B elektrokompente Bakterien

Macherey-Nagel, Düren

Nucleobond AX500 Säulen

MBI Fermentas, St. Leon-Rot

Restriktionsenzyme

MEDCO, München

Markierte Objektträger

New England Biolabs, Schwalbach

Restriktionsenzyme, DNA-modifizierende Enzyme

Nunc GmbH, Wiesbaden

Einfrierröhrchen 2ml, Zellkulturflaschen, Zellkulturschalen, 48- und 96-Loch-Platten, PCR-Reaktionsgefäße

Pall Gelman Sciences, Dreieich

Acrodisc Syringe Filter, 0,8µm

Peqlab, Erlangen

Elektroporationsküvetten, Elektrophorese-Kammern, dNTPs

Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

dNTPs, Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS), alkalische Phosphatase, DNase I, High Prime DNA labeling Kit, RNase I, Klenow-Fragment, Restriktionsenzyme,

Roth, Karlsruhe

Natriumdodecylsulfat, Phenol, Roti-Block, Acrylamid

Qiagen, Mannheim

Polyfect-Zelltransfektionsreagenz; RNeasy-Kit; Quiaquick PCR Purification Kit, Quiaquick Gel Extraction Kit

Stratagene, Heidelberg

Taq PCR Precision System, Robocycler

Schleicher & Schuell, Dassel

Blottingpapier GB40; Filtereinheit 1,2 µm

Zeiss, Oberkochen

Axiovert 10-Fluoreszenzmikroskop

IV. Methoden

1. Bakterienkultur

1.1. Vermehrung und Aufbewahrung von Bakterien

Bakterien wurden als Suspensionskultur in LB-Medium (Millers Luria Broth) oder zur Vereinzelnung von Kolonien auf LB-Agar-Platten kultiviert. Zur Selektion auf Resistenz gegen ein oder mehrere Antibiotika wurden dem LB-Medium Ampizillin (100 $\mu\text{g/ml}$), Chloramphenicol (30 $\mu\text{g/ml}$), Kanamycin (30 $\mu\text{g/ml}$) oder Tetrazyklin (10 $\mu\text{g/ml}$) zugegeben. Zur Selektion auf Resistenz gegen Zeozin (100 $\mu\text{g/ml}$) wurde LB-Medium mit wenig Salz verwendet.

Zur Lagerung von Bakterien über längere Zeiträume wurde eine dicht gewachsene Bakterienkultur mit 50 % Glycerin versetzt und bei -80°C aufbewahrt.

<u>LB-Medium:</u>	1 % Trypton; 0,5 % Hefeextrakt; 1 % NaCl
<u>LB-Agar-Platten:</u>	15 g Bacto-Agar pro 1 l LB-Medium
<u>LB-Medium mit wenig Salz:</u>	1 % Trypton; 0,5 % Hefeextrakt; 0,5 % NaCl (pH 7,5)

1.2. Transformation und Elektroporation von *E.coli*

Transformation:

Die Herstellung chemisch-kompetenter *E.coli*-Stämme und ihre Transformation über Hitzeschock erfolgte nach einem Protokoll von Hanahan (Hanahan, 1983). Alternativ dazu wurde nach einem Transformationsprotokoll von Chung gearbeitet (Chung et al., 1989).

Elektroporation:

Für die homologe Rekombination wurden lineare DNA-Fragmente mit einem „Gene-Pulser“ (Bio-Rad) durch Elektroporation in DH10B-Bakterien transfiziert (Gruffat et al., 2002), die bereits ein Maxi-EBV und p2650 (RecA, Red γ , Ampizillin) bzw. pKD46 (Red α , Red β , Red γ , Ampizillin) trugen. Außerdem wurden für Plasmid-Wiedergewinnungs-Experimente HIRT-Extrakte in gekaufte DH10B-Bakterien (Life Technologies) durch Elektroporation eingebracht (s.IV.4.2.). Die Herstellung elektrokompeter DH10B-Bakterien erfolgte nach einem Protokoll von Sheng (Sheng et al., 1995). Die Elektroporation von 50 bis 100 μl kompetenten Bakterien mit bis zu 3 μg DNA erfolgte in gekühlten Elektroporationsküvetten (0,2 cm Elektrodenabstand) bei 2 kV, 200 Ω und 25 μF . Zur homologen Rekombination wurden die Bakterien für zwei Stunden bei 30°C in LB-Medium inkubiert und auf

Agarplatten mit entsprechenden Antibiotika ausplattiert. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 42°C, damit nur Kolonien wuchsen, die bereits homolog rekombiniert und das Temperatur-sensitive Plasmid verloren hatten. Der Verlust des Rekombinations-Plasmids wurde durch Replikaplattierung auf Ampizillin-haltigen Platten kontrolliert.

1.3. Fermentation von *E.coli*

Zur Gewinnung großer Mengen an EBV-Plasmid-DNA wurden die entsprechenden DH10B-Bakterien in einem 5 Liter-Tischfermenter (LABFORS) kultiviert. 800 ml einer stationär gewachsenen Vorkultur wurden in dem Gerät zu 3,8 l LB-Medium, 300 ml 5M NaCl, 100 ml 87%-igem Glycerin und den entsprechenden Antibiotika (siehe Endkonzentrationen unter IV.1.1.) hinzugegeben. Die Kultivierung erfolgte bei 37°C, pH 7.0, einer Rührerdrehzahl von 400 UpM (Umdrehung pro Minute) und einer Begasungsrate von 1 Vol Luft / Vol Kultur pro min.. Die einzelnen Parameter wurden durch Elektroden gemessen und von einem Mess- und Regelsystem erfasst und reguliert (Handbuch 1.4, LABFORS Klein Fermenter System). Die pH-Regulation erfolgte mit 1N NaOH, mit Zugabe von 50%-igem Glycerin als zusätzliche Kohlenstoffquelle. Zu heftiges Schäumen wurde durch Elektroden-geregelte Zugabe von Speiseöl verhindert. Die Kultivierung der DH10B-Bakterien erfolgte bis zu einer OD₆₀₀ von 4 bis 5. Nach Erreichen dieser Zelldichte wurden die Bakterien für die anschließende DNA-Präparation geerntet (s. IV.3.4.). Alternativ zu der Fermenterkultivierung wurden 6 x 800 ml LB-Medium mit einem Milliliter einer dichtgewachsenen Bakterienkultur angeimpft, 1 % Glycerin und 250 mM NaCl zugesetzt und bei 37°C über Nacht kultiviert.

2. Eukaryontische Zellkultur

2.1. Zellkulturbedingungen

Alle Zellen wurden unter Standardbedingungen bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert. Das Kulturmedium RPMI 1640 (Life Technologies) wurde mit 10 % Kälberserum (Biochrom), 100 µg/ml Streptomycin und 100 µg/ml Penizillin versetzt. Die Zellen wurden nach Bedarf alle 3 bis 4 Tage verdünnt. Bei der Kultur von Maxi-EBV-Zelllinien wurden zur stabilen episomalen Erhaltung des Maxi-EBV-Genoms 80 bis 100 µg/ml Hygromycin zugesetzt. Bei der Kultur bestimmter Zelllinien wurde dem Medium 200 µg/ml Neomycin (Zelllinien EBNA1, 2.2, 2.2.10, 12.12, 12.12.A, pWHE, 2679, 2680, 2971), 80 bis 100 µg/ml Hygromycin (Zelllinien 2.2.10, 12.12.A, 2971) bzw. 0,22 bis 1 µg/ml Puromycin (für

Analysen zur Plasmid-Erhaltung und zum Plasmid-Verlust) zugesetzt. Die adhärenen WI38 Fibroblasten-Zellen wurden zur Kokultivierung mit primären B-Lymphozyten teilweise für 90 min. mit einer 50 Gy- γ -Strahlung behandelt, um die Proliferation zu stoppen. Zum Ablösen und Verdünnen von adhärenen Zellen wurden die Zellen mit Trypsin behandelt, wie vom Hersteller (Life Technologies) beschrieben. Die semiadhärente Zelllinie HEK293 und ihre Derivate wurden regelmäßig trypsiniert, um ein Wachstum als Einzelzellen zu gewährleisten. Die Anfärbung einer Zellkultur mit 0,1%-iger Eosinlösung erlaubte eine Unterscheidung der toten von den lebenden Zellen. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte in einer Neubauer-Zählkammer.

2.2. Einfrieren, Auftauen und Aufbewahrung von Zellen

Etwa 10^7 Zellen wurden langsam in 1 ml RPMI-Medium mit 30-90 % FKS und 10 % DMSO bei -80°C in 2 ml-Gefäßen (NUNC-Cryotube™) eingefroren und in flüssigem Stickstoff gelagert. Zur Wiederverwendung wurden die Zellen durch Spülen mit warmem RPMI-Medium schnell aufgetaut. Anschließend wurden die Zellen in 15 ml Medium gewaschen und in ein Kulturgefäß mit frischem Medium überführt.

2.3. Präparation primärer humaner B-Zellen

Humane primäre B-Zellen wurden aus Routineentnahmen von Nasenpolypen (Adenoiden) kleiner Kinder (2-4 Jahre alt) präpariert, wie von Zeidler (Zeidler et al., 1996) beschrieben. Dabei wurde aus den Adenoiden durch mechanisches Zerkleinern und Filtrieren durch ein Zellsieb ($100\ \mu\text{m}$ Maschengröße) eine Einzelzellsuspension hergestellt. Die T-Zellen wurden durch Zugabe von Schafs-Erythrozyten für 15 min. bei Raumtemperatur rosettiert. Die B-Lymphozyten wurden in einem 30%-igen Ficoll-Gradienten (Ficoll-Dichte 1.077) aufgereinigt. Nach Zentrifugation ($700\ \text{xg}$, 45 min., 4°C) wurde die Interphase des Gradienten (neben Monozyten fast ausschließlich B-Lymphozyten) abgenommen, und Ficollreste und restliche Thrombozyten wurden durch dreimaliges fraktioniertes Waschen der Zellen (Zentrifugationen: $620\ \text{xg}$, $460\ \text{xg}$, $290\ \text{xg}$, je 7 min. bei 4°C) mit PBS entfernt. Die primären humanen B-Zellen wurden in Kulturmedium resuspendiert und sofort verarbeitet oder maximal über Nacht bei 37°C gehalten.

2.4. Transfektion von Zellen und Selektion der Zellklone mit Hygromycin, Neomycin bzw. Puromycin

Die zu transfizierenden 293-D-Zellen wurden in 6-Loch-Platten bis zu 80%-iger Konfluenz kultiviert (ca. 5×10^5 Zellen). Die Transfektion mit Lipofectamin (Life Technologies) wurde in serumfreiem Medium (Optimem I, Life Technologies) nach Angaben des Herstellers durchgeführt (6 μ l Reagenz pro 1 μ g transfizierte DNA). Alternativ wurde ein modifiziertes Protokoll der Transfektion mit Polyfectamin der Firma Qiagen (Hilden) verwendet. Hierbei wurde, entgegen den Angaben des Herstellers, die Menge an Polyfectamin auf 4 μ l pro μ g transfizierter DNA verringert.

Zur Etablierung von Zelllinien mit stabiler EBV-Erhaltung wurden 293-D-Zellen mit 1 μ g Maxi-EBV-Plasmid transfiziert. Am folgenden Tag wurden die Zellen in Zellkulturschalen (Durchmesser 140 mm) überführt. Einige Stunden nach dem Absetzen der Zellen wurde dem Medium Hygromycin (80-100 μ g/ml Endkonzentration) zugegeben. In den ersten Tagen nach der Transfektion wurde das Kulturmedium täglich gewechselt, um die toten Zellen zu entfernen. Nach drei bis vier Wochen wurden Einzelzellklone, die sich im Fluoreszenzmikroskop als positiv für die GFP-Expression erwiesen, mit einer Pipettenspitze von der Zellkulturschale abpipettiert und klonal expandiert.

Zur Etablierung von Zellklonen mit stabil integrierter DNA und Resistenz gegen G418 (Neomycin), Hygromycin oder Puromycin wurden Zellen mit 1 μ g DNA transfiziert. Wenn die transfizierte DNA kein Resistenzgen enthielt (Zelllinie 2.2, 2.2.10, 12.12, 12.12.A, pWHE, EBNA1, 2679, 2680, 2971), wurden Plasmide, die für Resistenzgene kodieren (p2727 für Neomycin- bzw. p1897 für Hygromycin-Resistenz), in einem molaren Verhältnis von 1:10 zugemischt. Das 10:1 Verhältnis von Expressions- zu Resistenzvektor erhöht die Chance auf transfizierte Zellen mit stabiler Integration beider Gene. Die Selektion erfolgte mit 80-100 μ g/ml Hygromycin, 200 μ g/ml Neomycin bzw. 0,18-1 μ g/ml Puromycin. Klonal expandierte Zellklone wurden mittels Western-Blot-Analysen überprüft.

2.5. Produktion infektiöser Maxi-EBV-Partikel und Titerbestimmung

293-Zellklone mit stabiler Erhaltung von Maxi-EBV wurden in 6-Loch-Platten bis zu einer 50%-igen Konfluenz kultiviert. Sie wurden mit Expressions-Plasmiden für BZLF1 (p509, 0,5 μ g/Loch) und BALF4 (p2670, 0,5 μ g/Loch) transfiziert, wodurch der lytische Zyklus induziert wird. Nach dreitägiger Kultivierung bei 37°C wurden die Virus-enthaltenden

Überstände filtriert. Die Quantifizierung der Virustiter erfolgte über GFP-Expression infizierter Raji-Zellen. Dazu wurden 3×10^5 Raji-Zellen mit definierten Volumina an Kulturüberständen für drei Tage bei 37°C in 24-Loch-Platten inkubiert. Am Tag nach der Infektion wurde das Medium gewechselt. Drei Tage nach Infektion wurden die Zellen in PBS gewaschen, in 1 ml PBS aufgenommen und der Prozentsatz GFP-positiver Zellen in einem UV-Mikroskop ausgezählt. Diese „grünen Raji-Einheiten“ (GRE) pro ml Kulturüberstand wurden als Maß der absoluten Zahl infektiöser Maxi-EBV-Partikel in den einzelnen Kulturüberständen definiert. Die Virusüberstände konnten ohne starke Reduktion des Titers über Monate bei 4°C gelagert werden.

2.6. Produktion von Komplementations-Viren in der Zelllinie TR2-

Die für die Koinfektions-Analysen verwendeten Komplementations-Viren (2852, 2853, 2854) enthalten den lytischen und latenten Ursprung der Replikation von EBV (*oriLyt* und *oriP*) sowie die Verpackungssignale *TR* und das Gen des DsRed2-Fluoreszenzproteins. 1 µg Komplementations-Virus-DNA wurde zur Induktion des lytischen Zyklus zusammen mit den Plasmiden p509 und p2670 in ca. 5×10^5 Zellen der Verpackungszelllinie TR2- transfiziert. Die Zelllinie TR2- enthält ein, aufgrund fehlender *TR*, verpackungsinkompetentes Maxi-EBV, kann aber alle Proteine bilden, welche die Replikation, Verpackung und Freisetzung der Komplementations-Viren unterstützen (Delecluse et al., 1999). Ernte und Quantifizierung der Virusüberstände erfolgte wie unter IV.2.5. beschrieben, nur, dass infizierte Raji aufgrund des DsRed-Proteins rot fluoreszierten. Die Komplementations-Virus-Überstände wurden innerhalb weniger Tage eingesetzt, da bei Lagerung ein starker Infektiositäts-Verlust erfolgte.

2.7. Konzentrierung von Virusüberständen

Bei Benötigung hoher Viruskonzentration wurden die infektiösen Partikel durch 2 bis 3 h Ultrazentrifugation bei 4°C und 20.000 xg (SS28 Ausschwingrotor) aufkonzentriert. Die präzipitierten Viren wurden zur vollständigen Resuspendierung über Nacht bei 4°C in einem zehntel Volumen Zellkulturmedium inkubiert.

2.8. Wachstumstransformation primärer B-Zellen durch Maxi-EBV

Primäre humane B-Lymphozyten wurden mit verschiedenen Verdünnungen von Virusüberständen inkubiert und dadurch infiziert. Die Infektion erfolgte in 96-Loch-Platten.

1×10^5 B-Zellen wurden in einem Volumen von $100 \mu\text{l}$ pro Loch auf WI38-Zellen als Nährzellschicht ausplattiert. Einmal wöchentlich wurde ein Teil des Kulturmediums durch frisches ersetzt. Nach 4-8 Wochen konnte die Anzahl der proliferierenden B-Lymphozytenklone bestimmt und einzelne Klone weiter expandiert werden. Ein Experiment bestand meist aus drei bis sechs 96-Loch-Platten (insgesamt 300 bis 600 Einzelgefäße).

2.9. Koinfektion primärer humaner B-Zellen mit zwei Viren

Zur *trans*-Komplementation des $\Delta\text{EBNA1-2828-Maxi-EBV}$ mit nativem EBNA1 oder EBNA1-Chimären wurden die Zellen gleichzeitig mit 2828-Viren und Komplementationsviren (2852 (EBNA1), 2853 (H1:EBNA1) oder 2854 (HMG:EBNA1)) infiziert. Für die Koinfektionen wurden in Titrationsreihen unterschiedliche Konzentrationen der Viren verwendet, um die optimalen Bedingungen zu ermitteln.

3. DNA-Arbeitstechniken

Die Anwendung allgemein üblicher Techniken, die im Umgang mit Nukleinsäuren benutzt wurden, wie z.B. Phenol-Chloroform-Reinigung, DNA-Fällung durch Ethanol und Isopropanol, Konzentrationsbestimmung im Spektralphotometer, Auftrennung bzw. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen, enzymatische Restriktionshydrolyse, Dephosphorylierung von DNA mit alkalischer Phosphatase, Kinasierung von DNA mit T4-Polynukleotidkinase, Behandlung von DNA-Fragmenten mit T4-DNA-Polymerase oder Klenow-Polymerase, Ligation freier DNA-Enden, Präparation von Plasmid-DNA über alkalische Lyse, Ultrazentrifugation in einem CsCl-Gradienten etc. erfolgten in Anlehnung an Standard-Protokolle und werden daher nicht näher beschrieben (Sambrook et al., 1989).

3.1. Rekombinante Plasmide

Alle Mutationen im EBNA1-Genlocus wurden in Bakterien über konventionelle Klonierung in das Plasmid p2759.5.UA1 eingeführt, das die Nukleotidkoordinaten #101947 bis #113284 aus dem EBV-Stamm B95.8 (Baer et al., 1984) trägt. Derivate von p2759.5, die verschiedene EBNA1-mutierte Allele tragen, dienten als Vorkonstrukte für den Transfer linearer Fragmente in das ursprüngliche Maxi-EBV-p2089 bzw. dessen Derivate. Alle EBNA1-Mutanten im Kontext von p2759.5 stehen unter Kontrolle eines CMV-Promotors oder unter der Kontrolle des endogenen EBNA1-Promotors (p3199, p3200, p3201). Die Mutationen im prokaryonten

F-Faktor-Hintergrund wurden durch Klonierung in das Plasmid p2985 eingeführt. Diese Fusionsgene stehen ebenfalls unter der Kontrolle eines CMV-Promotors.

3.2. Extraktion und Spaltung genomischer DNA

Zur Präparation genomischer DNA für Southern-Blot-Analysen wurden ca. 1×10^7 eukaryontische Zellen mit PBS gewaschen, in 3 ml Lysepuffer mit 0,4 $\mu\text{g/ml}$ Proteinase-K aufgenommen und für mindestens 5 h bei 56°C lysiert. Anschließend wurde die DNA mit Ethanol präzipitiert und in ca. 500 μl TE über Nacht resuspendiert. Zur enzymatischen Spaltung genomischer DNA wurde ein abgewandeltes Protokoll verwendet.

Lysepuffer: 10 mM Tris-HCl (pH 7,5); 10 mM EDTA; 10 mM NaCl; 0,5 % Sarkosyl

Spaltungsansatz: 50 $\mu\text{g/ml}$ RNase; 1 mM Spermidin; 100 $\mu\text{g/ml}$ BSA; 1 mM DTT; 1x Enzympuffer; Restriktionsenzym

3.3. Präparative Plasmidreinigung

Die präparative Plasmidreinigung aus einer 400 ml Bakterienkultur erfolgte mit Hilfe von DNA-Adsorptionssäulen nach Angabe des Herstellers (Genomed). Außerdem wurden teilweise Plasmide in großem Maßstab nach Standard-Protokollen über alkalische Lyse und CsCl-Gradienten präpariert (Sambrook et al., 1989).

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

Die Plasmide aus 5 l dichtgewachsener Bakterienkultur aus dem Fermenter oder aus sechs 800 ml Schüttelkolben wurden nach dem Prinzip der alkalischen Lyse präpariert (Sambrook et al., 1989). Ein ausführliches Protokoll der Aufarbeitung von Maxi-EBV-DNA und der Präparation der DNA im CsCl-Gradienten ist im Internet unter der folgenden Adresse niedergeschrieben (<http://haema145.gsf.de/>). Alternativ zu diesem Protokoll wurde EBV-DNA teilweise mit Nucleobond-AX500-Säulen der Firma Macherey-Nagel (Düren) nach Angaben des Herstellers gewonnen.

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

Lineare DNA-Fragmente wurden zur homologen Rekombination mit einem Maxi-EBV-Plasmid durch Elektroporation in *E.coli* des Stammes DH10B transformiert. Dieser rekombinationsinkompetente Bakterienstamm trug p2089 bzw. andere Maxi-EBV-

Rezipienten (p2828, p2978) sowie das Rekombinations-Plasmid p2650 (RecA, Red γ , Ampizillin) oder pKD46 (Red α , Red β , Red γ , Ampizillin). p2650 und pKD46 stehen unter Kontrolle eines Temperatur-sensitiven Replikations-Ursprungs und kodieren für Proteine, welche die Rekombination ermöglichen (Red α , Red β , Red γ). Nach Transformation des linearen DNA-Fragments und 1-2 h phänotypischer Expression bei 30°C wurden doppelt-resistente Klone (Chloramphenikol durch das Maxi-EBV sowie Kanamycin oder Zeozin durch das rekombinierte Fragment) bei 42°C propagiert. Dabei ging das Temperatur-sensitive und Ampizillin-Resistenz-vermittelnde Plasmid p2650 bzw. pKD46 verloren, was auf Replikplatten anhand der Ampizillin-Sensitivität der gewachsenen Kolonien geprüft wurde.

3.6. Southern-Blot-Hybridisierung

Die Southern-Blot-Hybridisierung erfolgte nach Standard-Protokollen (Church und Gilbert, 1984; Sambrook et al., 1989; Southern, 1975). Dazu wurden ca. 15 μ g zelluläre DNA mit entsprechenden Restriktionsenzymen gespalten und in einem 0,8%-igen Agarosegel in TAE-Puffer (oder TBE bei Gardella-Gelen (s. IV.4.1.) elektrophoretisch aufgetrennt. Denaturierung und Transfer der DNA erfolgten nach Standard-Protokollen. Die Hybridisierung mit radioaktiv markierten Sonden (mindestens 3 x 10⁷ dpm) fand in Church Puffer statt.

Entfernen einer Sonde von Southern-Blots

Sollte die Membran nacheinander mit verschiedenen Sonden hybridisiert werden, welche Banden detektieren, die etwa dieselbe Größe hatten, so wurde der Filter für mindestens 20 min. mit Waschpuffer gekocht.

1x TAE-Puffer: 40 mM Tris-HCl (pH 8,0); 5 mM NaAc; 1 mM EDTA

1x TBE-Puffer: 89 mM Tris; 89 mM Borat; 2 mM EDTA

Church-Puffer: 400 mM Na₂HPO₄; 100 mM NaH₂PO₄; 7 % SDS; 1 mM EDTA (pH 7,2); 1 % BSA

Waschpuffer: 0,2x SSC; 1 % SDS

3.7. Radioaktive Markierung von DNA-Sonden für Southern-Blots

Für die radioaktive Markierung einzelsträngiger DNA-Fragmente mit α [³²P]-dATP wurde eine von Feinberg und Vogelstein entwickelte Methode verwendet (Feinberg und Vogelstein, 1983). Hexanukleotide zufälliger Sequenz binden an hitzedenaturierte einzelsträngige DNA und dienen der Klenow-Polymerase als Primer. Die Markierung von 50-100 ng DNA wurde mit dem "*High Prime labeling kit*" nach Herstellerangaben durchgeführt (Roche). Die Abtrennung der nicht eingebauten Nukleotide erfolgte über Sephadex-G50-Säulen

(Amersham). Nach Hitzedenaturierung wurde die markierte Sonde zu der Hybridisierungslösung gegeben. Oft wurde die Sonde mehrfach verwendet, indem sie vor Gebrauch für 5 min. bei 95°C hitzedenaturiert wurde.

3.8. Gel-Retentions-Analysen

Gel-Retentions-Versuche dienen zum Nachweis stabiler Protein-DNA-Komplexe in nativen Polyacrylamidgel-Elektrophoresen (PAGE), da die Komplexe ein anderes Laufverhalten als freie DNA zeigen (Fried und Crothers, 1981). Es wurden Extrakte aus 293-D-, 2.2-, 2.2.10-, 12.12- und 12.12.A-Zellen nach Wachstum mit bzw. ohne Doxyzyklin im Zellkulturmedium verwendet. Ca. 2×10^6 Zellen wurden mit PBS gewaschen, in 250 μ l kaltem Puffer I resuspendiert und für 20 min. auf Eis inkubiert. Dadurch wurden die Zellmembranen aufgebrochen, die Kerne blieben jedoch intakt. Die Zellen wurden auf Trockeneis schockgefroren, sofort wieder aufgetaut, mit 12,5 μ l 5M NaCl versetzt und für 20 min. auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation (Beckmann TL100-Ultrazentrifuge, 100.000 UpM, 10 min., 0°C) wurde der Überstand mit den Kernproteinen in gekühlte Reaktionsgefäße aliquotiert, in Stickstoff eingefroren und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert. Für jede Reaktion wurden 10 μ l auf Eis aufgetauten Extrakts mit 10 μ l Bindepuffer und 2 fmol markierter Probe gemischt und für 25 min. bei RT inkubiert. Die gebildeten Protein-DNA-Komplexe („Shift“) wandern im nativen PAGE langsamer als „nackte“ DNA. In sogenannten „Supershift“-Reaktionen wurde nach 20 min. Komplexbildung 1 μ l α -TetR-Antikörper zu dem Reaktionsansatz gegeben und anschließend für weitere 20 min. inkubiert. Bei *in vitro*-Studien zur Doxyzyklin-Abhängigkeit der Reaktion wurden zunächst Extrakt, Bindepuffer und Doxyzyklin für 20 min. bei RT inkubiert. Die DNA-Probe wurde danach zugegeben. Als Probe diente ein doppelsträngiges Oligonukleotid, das ein *TetO*-Motiv kodiert und durch Aneinanderlagern einzelsträngiger Oligonukleotide (s. III.3.) erzeugt wurde.

Das doppelsträngige Oligonukleotid wurde durch die Polynukleotidkinase (PNK) mit γ [³²P]-ATP radioaktiv markiert, wie unter IV.3.9. beschrieben. Die Protein-DNA-Komplexe wurden in einem 5%-igen nativen Polyacrylamid-Gel (PAA) aufgetrennt. Als Laufpuffer diente 1x TBE. Das Gel wurde nach der PAGE getrocknet und autoradiographiert.

Puffer I: 10 mM HEPES; 10 mM KCl; 1,5 mM MgCl₂; 0,5 mM DTT; 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)

Bindepuffer: 10 mM Tris HCl (pH 7,5); 10 mM MgCl₂; 10 % Glycerol; 1 mg/ml BSA; 2 mg/ml Kalbs-Thymus DNA

Polyacrylamid-Gel (5 %): 5 % Acrylamid; 0,13 % Bisacrylamid; 5 % Glycerol; in 0,2x TBE

3.9. Radioaktive Markierung von DNA für Gel-Retentions-Analysen

Als Probe in Gel-Retentions-Analysen dienten etwa 300 pg doppelsträngige Oligonukleotide mit unphosphorylierten Enden, die durch PNK-katalysierte Phosphorylierung mit γ [³²P]-ATP nach Herstellerangaben (MBI Fermentas) radioaktiv markiert wurden. Das Zusammenlagern der Oligonukleotide erfolgte durch Inkubation für 2 min. bei 88°C, 10 min. bei 65°C, 10 min. bei 37°C und abschließende 5 min. bei Raumtemperatur. Freie Nukleotide wurden über eine Sephadex-G25 Säule (Amersham) abgetrennt.

3.10. PCR-Amplifikation („*polymerase chain reaction*“)

Die PCR-Amplifikationen (EBNA1, HMG-I/Y, Histon H1, Umgebung von EBNA1 im Maxi-EBV) wurden nach Angaben der Hersteller (Promega, Stratagene) mit „Taq“-DNA-Polymerase und „Pfu“-Polymerase durchgeführt. Die optimalen Schmelztemperaturen der Oligonukleotide wurden über einen Temperaturgradienten in einer speziellen PCR Maschine (Robocycler, Stratagene) ermittelt. In der Regel wurden 30 Zyklen für die PCR Amplifikation durchlaufen. Die verwendeten Oligonukleotide sind unter III.3. beschrieben.

Standard-Protokoll für die Amplifikation von DNA Fragmenten aus Plasmiden oder einer cDNA-Bank:

<u>Reaktionsansatz:</u>	100 ng DNA; 4 μ l dNTP-Mix (2,5 mM); je 1 μ l Primer (30-100 pmol); 5 μ l 10x Taq-Polymerase-Puffer; 1 μ l Taq-DNA-Polymerase (5 U/ μ l) mit Pfu-Polymerase (2,5 U/ μ l; 1:1); bei Bedarf 2 μ l 25 mM MgCl (Promega); H ₂ O ad 50 μ l
<u>PCR-Programm:</u>	95°C / 5 min.; 30 Zyklen: 95°C / 1 min., 50-64°C / 1 min., 72°C / 1,5 min.; 72°C / 10 min.; 4°C / ∞

3.11. Fluoreszenz *in situ* Hybridisierungs-Analyse (FISH)

Die FISH-Analysen der LCLs wurden freundlicherweise im Labor von Henri-Jacques Delecluse in Birmingham durchgeführt. Als Sonde wurden Cosmide mit EBV-DNA verwendet. Eine ausführliche Beschreibung der Arbeitsschritte ist nachzulesen in (Delecluse et al., 1993a; Delecluse und Hammerschmidt, 1993).

4. Untersuchungen auf extrachromosomale DNA

4.1. Gardella-Gel-Analysen

Für die Unterscheidung zwischen großer extrachromosomaler Maxi-EBV-DNA und genomischer DNA wurde die Gardella-Gel-Technik angewendet (Delecluse und Hammerschmidt, 1993; Gardella et al., 1984). Dazu wurden 3 x 10⁶ Zellen in PBS gewaschen

und in 20 μ l Ficoll (15 %) resuspendiert. Von der Raji-Linie (etwa 50 EBV-Kopien pro Zelle) wurden die Zellen 1/50 verdünnt, um eine Detektionsgrenze von einer Kopie pro Zelle zu definieren. Die Zellen wurden in die Taschen eines TBE-Agarosegels mit lysierenden Bedingungen (10 % SDS, 40 mg Proteinase-K) pipettiert. Bei 250 mA und 30 V wurden die Zellen für mindestens 4 h bei 4°C lysiert, bevor die DNA über Nacht mit 120 V bei 4°C elektrophoretisch aufgetrennt wurde. Am nächsten Tag erfolgte ein Southern-Blot (s. IV.3.6.) mit p135.16 als Probe (Hammerschmidt und Sugden, 1989).

Gardella-Gel: 500 ml Agarose (1 %) in TBE (ohne EtBr). Nach dem Erstarren direkt oberhalb der Ladetaschen mit einem Skalpell die Agarose entfernen. Die entstehende Lücke mit 32 ml Agarose (1,2 %, TBE), 8 ml SDS (10 %), 40 mg Proteinase-K auffüllen.

4.2. HIRT-Extrakte

Zur Präparation von niedermolekularer Plasmid-DNA aus 293-D-Zellen wurde eine konfluente 14 cm Zellkulturplatte mit TEN-Puffer gewaschen. Auf den Zellen wurden je 1,5 ml TEN- und 2x HIRT-Puffer gemischt, wodurch die Zellen lysierten. Nach Überführung in 12 ml Röhrchen wurde das Lysat 1 min. rollend inkubiert, bevor 750 μ l 5M NaCl zum Fällen von Proteinen und genomischer DNA zugegeben wurde. Nach 1 min. Inkubation wurde das Röhrchen über Nacht im Kühlschrank oder für mindestens 5 h auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation (4°C, 20.000 xg, 30 min.) wurde der Überstand durch Phenol-Chloroform-Extraktion gereinigt und mit Isopropanol gefällt. Die DNA wurde in 50 μ l TE aufgenommen und angegliche Mengen wurden durch Southern-Blot (IV.3.6.) oder durch Plasmid-Wiedergewinnungs-Experimente (IV.4.3.) auf extrachromosomale Plasmid-DNA untersucht.

TEN-Puffer: 10 mM Tris-HCl (pH 7,5); 150 mM NaCl; 1 mM EDTA

2x HIRT-Puffer: 20 mM Tris-HCl (pH 7,5); 1,2 % SDS; 20 mM EDTA

4.3. Plasmid-Wiedergewinnungs-Analysen („*plasmid-rescue*“)

Zum Nachweis replizierter extrachromosomaler Plasmide in genomischer DNA von 293-D-Zellen (IV.3.2., IV.4.2.) wurden ca. 0,5 μ g DNA durch Elektroporation in elektrokompente *E.coli* des Stammes DH10B (Life Technologies) eingebracht (IV.1.2.). Vor der Elektroporation wurde die DNA mit dem Methylierungs-sensitiven Restriktionsenzym *DpnI* gespalten, um restliche nichtreplizierte DNA zu entfernen. Die DNA wurde gefällt und in 10 μ l Wasser aufgenommen. Die Bakterien wurden auf Agarplatten mit Ampizillin

ausplattiert und die auswachsenden Kolonien gezählt. Durch enzymatische Spaltung wurde die Identität der Plasmid-DNA bestätigt.

5. Plasmid-Verlust-Analysen

Zur Bestimmung der Verlustrate wurden 1×10^5 293-D-, EBNA1- bzw. 2.2.10-Zellen mit den Plasmiden p3154 bzw. p3155 transfiziert und mit Puromyzin (220 bis 360 ng/ml) selektioniert. Nach Erreichen einer Population mit mindestens 50 % roten Zellen (etwa Tag 5 bis 8 der Selektion) wurde das Selektionsmedium durch normales Medium ersetzt. Die Zellen wurden auf Duplikat-Platten geteilt, von denen eine Platte mit 2 µg/ml Doxzyklin und eine ohne Doxzyklin im Medium kultiviert wurde. Über eine Verlaufsdauer von etwa zwei Wochen wurden die Zellen in Abständen zwischen einem und 4 Tagen geerntet und durch FACS-Analysen auf die prozentuale Anzahl roter Zellen untersucht. Zusätzlich wurden die Zellen im UV- und Durchlicht fotografiert und manuell die Anzahl roter Zellen bestimmt.

6. Protein-Arbeitstechniken

Die Anwendung allgemein üblicher Techniken, die im Umgang mit Proteinen benutzt wurden, wie z.B. Proteinextraktionen mit RIPA, Konzentrationsbestimmung von Proteinen durch BCA, PAA-Gele, PAGE, Antikörpernachweis durch Chemilumineszenz, Proteinnachweis auf Nitrozellulose-Membranen mit Amidoblack oder Ponceau-Lösung, Entfernen von Antikörpern auf Nitrozellulose-Membranen etc. erfolgten in Anlehnung an Standard-Protokolle und werden daher hier nicht näher beschrieben (Gassen und Schrimpf, 1999).

6.1. Immun-Fluoreszenz-Analysen

Zum Nachweis von EBV-Proteinen (gp350, EBNA1) in 293-D-Zellen wurden die Zellen mit PBS gewaschen, abzentrifugiert, auf markierten Objektträgern (MEDCO, München) getrocknet und für ca. 20 min. in Aceton fixiert und permeabilisiert. Anschließend wurden sie mit spezifischen monoklonalen Mausantikörpern für 30 min. bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit dem Cy3-konjugierten Sekundär-α-Mausantikörper für weitere 30 min. in der feuchten Kammer bei 37°C inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen in einer 1%-igen PBS/Glycerin-Lösung eingebettet. Zur Analyse wurden die Zellen mit Licht der

Wellenlänge 546 nm bestrahlt und in einem Invers-Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Axiovert 10) mit dem geeigneten Filtersatz auf rot aufleuchtende Zellen untersucht.

6.2. Durchfluss-Zytometrie / FACS („*fluorescence activated cell sorting*“)

Es kann durch FACS bestimmt werden, wie viele Zellen einer Population ein bestimmtes Protein exprimieren und welches relative Expressionsniveau erreicht wird. Zur Detektion in einem FACS-Gerät müssen die Zellen einer Einzelzellsuspension entweder eine Autofluoreszenz besitzen oder durch fluoreszierende Antikörper markiert sein. Die Bedienung des FACS-Geräts erfolgte nach Angaben des Herstellers mit Hilfe von G. Reisbach (Abteilung Genvektoren, GSF).

Markierung von Oberflächenproteinen:

Für die Detektion des Proteins CD11a wurden ca. 5×10^5 Zellen in PBS mit 3 % FKS gewaschen und mit dem spezifischen CD11a-Antikörper für 20 min. auf Eis inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in PBS wurden die Zellen mit einem PE-konjugierten Sekundärantikörper für 20 min. auf Eis im Dunklen inkubiert und anschließend erneut gewaschen. Zellen, die anstelle des spezifischen Erstantikörpers mit einem irrelevanten Antikörper gleichen Isotyps oder nur mit Sekundärantikörper inkubiert wurden, dienten als Negativkontrolle. Für die Detektion von CD3, CD4, CD5, CD8, CD19 und CD86 wurden direkt markierte FITC-, Cyochrome-, APC- oder PE-konjugierte monoklonale Antikörper verwendet. Nach 20-minütiger Inkubation wurden die Zellen dreimal in PBS mit 3 % FKS gewaschen und anschließend im FACS-Gerät analysiert.

6.3. Immuno-Blot-Analyse / Western-Blot-Analyse

Ca. 1×10^7 Zellen wurden mit PBS gewaschen und nach Standard-Protokollen in 200 μ l RIPA-Puffer lysiert. Nach Zugabe von SDS-Probenpuffer wurden die Proteine denaturiert (2 min, 95°C) und anschließend elektrophoretisch auf 7,5 bis 12%-igen PAA-Gelen in der SDS-PAGE bei 45 mA und 300 V nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt (Laemmli, 1970). Unmittelbar nach der Elektrophorese wurden die Proteine für 40 min. bei 15 V und 400 mA auf eine Nitrozellulose-Membran (Amersham) transferiert. Nach Kontrolle von Proteinauftrennung und -transfer über Ponceaufärbung wurden die gewünschten Proteine über Anfärbung mit Antikörpern nachgewiesen. Dies erfolgte nach Standard-Protokollen mit

Blockierung und Antikörperinkubation in Blocklösung. Die Entwicklung des Western-Blots erfolgte mit Hilfe von Chemilumineszenz (ECL, Amersham).

<u>RIPA-Puffer:</u>	150 mM NaCl; 0,1 % SDS; 0,5 % SDS; 0,5 % DOC; 1 % NP40; 50 mM Tris-HCl (pH 8)
<u>SDS-Probenpuffer (5x):</u>	250 mM Tris-HCl (pH 6,8); 500 mM DTT; 10 % SDS; 20 % Glycerin; 2 % Bromphenolblau
<u>Transferpuffer:</u>	48 mM Tris; 39 mM Glycin; 0,038 % SDS; 20 % Methanol
<u>PBS-T:</u>	PBS; 0,05 % Tween
<u>Blocklösung:</u>	PBS-T; 5 % Magermilchpulver

6.4. Immuno-Blot-Analyse gegen LMP2A

Ca. 10^7 Zellen wurden in 200 μ l NP40-Puffer resuspendiert, gemischt (Vortex) und für 1 h über Kopf rollend bei 4°C lysiert (Fruehling et al., 1996). Die unlösliche Fraktion wurde durch zweifache Zentrifugation (15 min., 20.000 xg, 4°C) abgetrennt. Dabei wurde der Überstand immer in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von SDS-Probenpuffer wurden die Proteine denaturiert (10 min., 70°C) und in 12%-igen SDS-Gelen durch PAGE bei 35 mA und 300 V aufgetrennt. Nach dem Transfer auf eine Nitrozellulose-Membran (Amersham) und der Kontrolle des Transfers durch Ponceau-Färbung wurde die Membran für 1 h in Blockpuffer geblockt. Die Membran wurde über Nacht mit dem primären LMP2A-Antikörper (14B6, 0,8 μ g/ml) in Waschpuffer bei 4°C inkubiert und anschließend gewaschen (5 x 5 min. in Waschpuffer). Die Inkubation mit dem Peroxidase-gekoppelten α -Ratte-Sekundärantikörper in Waschpuffer (Verdünnung 1:10.000) erfolgte für 2 h bei RT. Der Immuno-Blot wurde gewaschen (3 x 5 min. in Waschpuffer, 2 x 5 min. in PBS) und mit Hilfe von verstärkter Chemilumineszenz (ECL+, Amersham) entwickelt. Die Exposition musste auf mindestens 12 h ausgedehnt werden, um LMP2A Proteine zuverlässig zu detektieren.

<u>NP40-Puffer:</u>	1 % Nonidet P40; 50 mM Tris-HCl (pH 7,4); 150 mM NaCl; 2 mM EDTA; 0,5 mM PMSE; Aprotinin (10 μ g/ml); Leupeptin (10 μ g/ml); Pepstatin A (10 μ g/ml); 1 mM Natriumorthovanadat
<u>Blockpuffer:</u>	20 mM Tris-HCl (pH 7,4); 150 mM NaCl; 4 % Magermilchpulver
<u>Waschpuffer:</u>	20 mM Tris-HCl (pH 7,4); 150 mM NaCl; 1 % Magermilchpulver; 0,04 % Tween-20

7. Reporter-Analysen für das Tet-System

Die Reporter-Analysen mit den EBNA1:TetR-Fusionsproteinen wurden freundlicherweise im Labor von C. Berens (Erlangen) durchgeführt. Die Zelllinie HeLaX1/6, die ein durch heptamere *TetO* kontrolliertes Luziferase-Reportergen trägt, wurde transient mit DNA transfiziert, die für EBNA1:TetR kodiert. Durch die VP16-Transaktivierungsdomäne am TetR

wurde das Luziferasegen transkribiert und die Expressionshöhe wurde photometrisch durch Messung der RLU („*relative light units*“) bestimmt. Da das Tet-System Doxyzyklin-abhängig arbeitet, wurde die Induktion aus Messungen mit und ohne Doxyzyklin im Zellkulturmedium errechnet. Für Zelllinien mit stabilen Integrationen erfolgten die Reporter-Analysen analog. Dabei wurde das Plasmid pUHC13-3 (Gossen und Bujard, 1992) in die Zelllinie mit stabiler Expression des TetR-(Fusions)proteins transfiziert. Der Vektor kodiert für das transaktivierbare Luziferasegen, so dass auch in diesem Fall die Induktion über Messung der RLU bestimmt werden konnte.

8. Mäuse

Für die *in vivo*-Untersuchung des onkogenen Potentials von Δ EBNA1-LCLs im Vergleich zu LCLs, die mit EBNA1-EBV etabliert wurden, wurden 10-12 Wochen alte SCID („*severe combined immunodeficiency*“) Mäuse (Mauszucht des Hauses) verwendet. Den Tieren wurden intraperitoneal (i.p.) 3×10^7 oder 1×10^8 Zellen der jeweiligen Zelllinie injiziert. Beim Auftreten klinischer Krankheits-Symptome wurden die Mäuse getötet und auf pathologische Veränderungen hin untersucht. Tumor-Material, Blutzellen und Organproben wurden in Kultur genommen. Die Biopsien und die kultivierten Zellen wurden auf GFP-Expression und über Western-Blot-Analyse auf EBNA1- und EBNA2-Expression untersucht, um Zellen humanen Ursprungs nachzuweisen.

V. Ergebnisse

Das Ziel meiner Doktorarbeit war, die Funktionen des Epstein-Barr Virus nukleären Antigens 1 (EBNA1) zu analysieren. In einem genetischen Ansatz entfernte ich zum einen *ebna1* aus dem EBV-Genom und komplementierte es zum anderen durch verschiedene heterologe Gene. Meine Doktorarbeit lässt sich daher in drei verschiedene Bereiche aufteilen.

Der **erste Teil** beschäftigt sich mit der Herstellung eines rekombinanten Δ EBNA1-Virus (Maxi-EBV) und dessen funktioneller Analyse. Ich beschreibe allgemein die genetische Manipulation der DNA in *E.coli*, die Herstellung von 293-Zelllinien mit stabiler Erhaltung des Maxi-EBV sowie die Induktion des lytischen Zyklus zur Produktion von infektiösen Partikeln. Mit den hergestellten Virusüberständen führte ich Experimente zur Wachstumstransformation von primären humanen B-Zellen durch. Wachstumstransformierte B-Zellen wurden auf Proteinexpression, den Status des viralen Genoms und auf ihre Onkogenität in SCID-Mäusen analysiert.

Der **zweite Teil** der Arbeit beinhaltet die Analyse von HMG-I:EBNA1- und H1:EBNA1-Fusionsproteinen. Bei diesen Proteinen ist die EBNA1-DNA-Bindedomäne an die zellulären Proteine HMG-I bzw. Histon H1 fusioniert (Hung et al., 2001). Diese Proteine wurden auf ihre Funktionalität im Kontext von *oriP*-Vektoren und Viren untersucht.

Im **dritten Teil** wurden die Funktionen von EBNA1 getrennt, indem die Plasmid-Erhaltung von einem EBNA1:TetR-Chimär übernommen wurde. Dazu fusionierte ich den N-terminalen Anteil von EBNA1 an die DNA-Bindedomäne des TetR. Ich analysierte, ob die EBNA1:TetR-Chimären in der Lage sind, die Erhaltung von Vektoren in Zellen zu gewährleisten, wenn die Plasmide statt der *FR* zwanzig *TetO*-Bindemotive tragen. Des Weiteren untersuchte ich, ob diese Interaktion durch Doxyzyklin regulierbar ist.

1. Herstellung und Analyse von Δ EBNA1-Epstein-Barr Viren

Ich stellte Epstein-Barr Viren her, denen das Gen für EBNA1 vollständig fehlt (Δ EBNA1). Mit diesen Viren wurde die allgemein akzeptierte Vermutung, dass EBNA1 essentiell für die Wachstumstransformation von B-Zellen ist, untersucht. Neben der Herstellung und genetischen Analyse des Δ EBNA1-Maxi-EBVs wird in diesem Kapitel die Infektion primärer B-Zellen und die Analyse der durch Wachstumstransformation entstandenen Δ EBNA1-LCLs beschrieben.

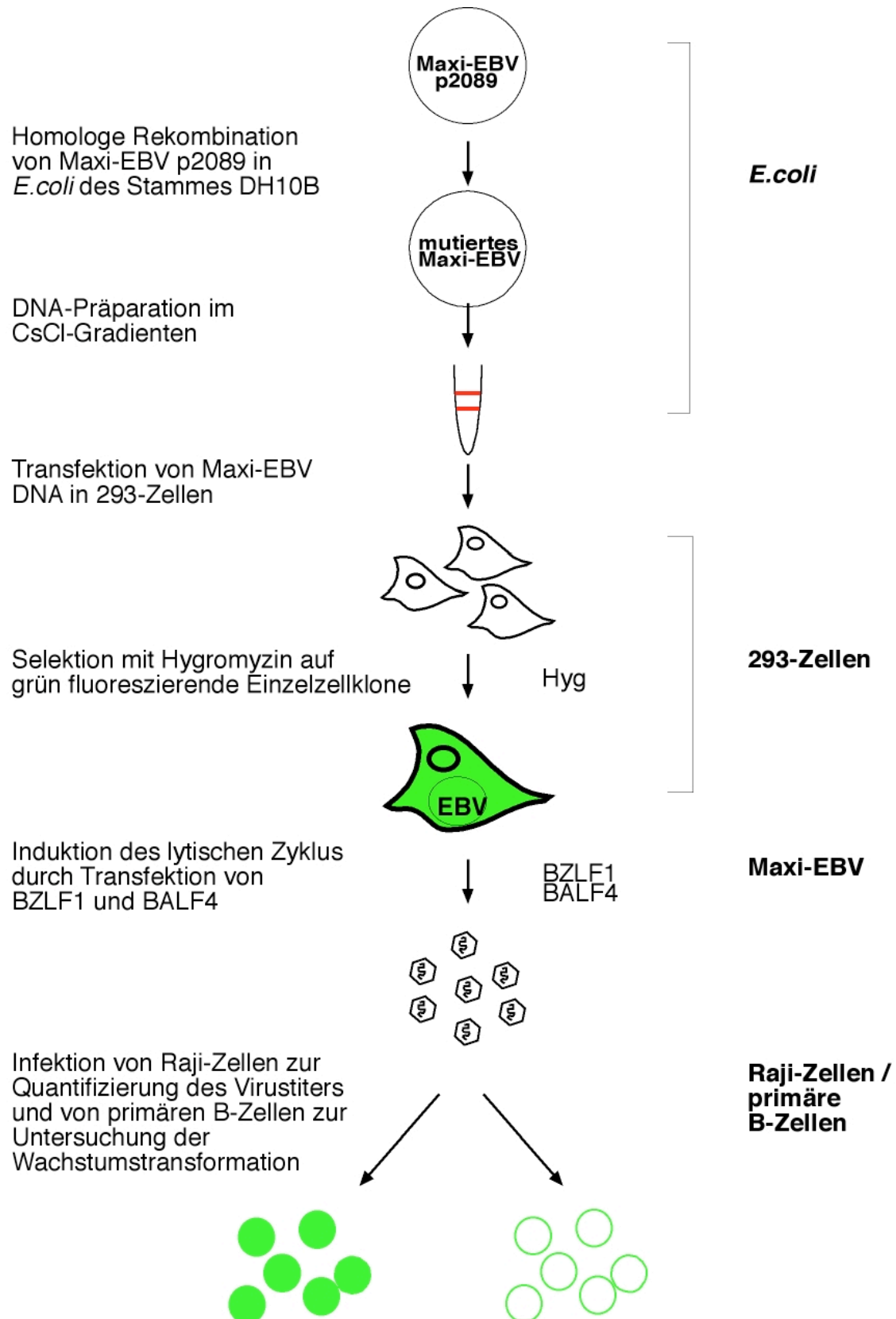


Abb. 7: Prozessschritte zur Herstellung rekombinanter Epstein-Barr Viren :

Rekombinante Maxi-EBVs wurden in *E. coli* durch homologe Rekombination hergestellt. Es folgte die Selektion von 293-Zelllinien mit stabiler Plasmid-Erhaltung als Virusproduzenten, der Nachweis und die Quantifizierung infektiöser Viruspartikel in Raji-Zellen und die Infektion primärer B-Zellen.

1.1. Herstellung rekombinanter Epstein-Barr Viren

Zur Herstellung von rekombinanten Epstein-Barr Viren wurde das Maxi-EBV-System verwendet. Eine schematische Übersicht der einzelnen Arbeitsschritte ist in Abb. 7 gezeigt.

1.1.1. Das rekombinante Maxi-EBV-Plasmid p2089

Die Voraussetzung für eine Manipulation beliebiger EBV-Gene wurde durch die Klonierung des gesamten EBV-Genoms geschaffen (Delecluse et al., 1998). Durch die Integration eines prokaryontischen F-Faktor Plasmids in das Genom des EBV-Stamms B95.8 ist dieses für jede beliebige genetische Manipulation in *E.coli* erreichbar. Zusätzlich wurden in den prokaryonten Anteil die Resistenzgene für Chloramphenikol (prokaryontische Selektion) und Hygromycin (eukaryontische Selektion) eingebracht. Des Weiteren trägt das sogenannte Maxi-EBV-Plasmid p2089 das durch einen CMV-Promotor kontrollierte Gen des grün fluoreszierenden Proteins (GFP). Durch die GFP-vermittelte Fluoreszenz ist eine Identifizierung transfizierter bzw. infizierter Zellen möglich. Stabil mit p2089 transfizierte 293-Zellen produzieren nach Induktion des lytischen Zyklus infektiöses Maxi-EBV, das 2089 genannt wird. Primäre humane B-Zellen werden effizient mit diesem 2089-Maxi-EBV, das alle Eigenschaften von nativem EBV besitzt, wachstumstransformiert (Delecluse et al., 1998). P2089 diente als Ausgangsplasmid für die im Laufe dieser Doktorarbeit erzeugten Mutanten. Diese entstanden in *E.coli* meist durch homologe Rekombination bzw. über „*chromosomal building*“ (Kempkes et al., 1995). Eine schematische Darstellung der einzelnen Arbeitsschritte von der Erzeugung rekombinanter Maxi-EBV-DNA, über Viren-produzierende 293-Zellen bis zum Nachweis und der Verwendung der produzierten Viren ist in Abb. 7 dargestellt.

1.1.2. Homologe Rekombination zur Erzeugung von Maxi-EBV-Mutanten in *E.coli* des Stammes DH10B am Beispiel des Δ EBNA1-Maxi-EBV p2828

Im Verlauf dieser Arbeit habe ich verschiedene Maxi-EBV-Mutanten auf der Basis von p2089 hergestellt. Zur genetischen Modifikation des Virusgenoms etablierte ich intermediäre konventionell klonierte Plasmide, die den mutierten Genort im Kontext flankierender EBV-Abschnitte tragen. Die flankierenden EBV-Sequenzen erlauben die homologe Rekombination mit den entsprechenden Sequenzen des Maxi-EBV-Plasmids p2089. Die Modifikation der verschiedenen Genorte erfolgte prinzipiell gleich. Exemplarisch beschreibe ich hier die

Herstellung des Δ EBNA1-Maxi-EBV p2828. Um die Δ EBNA1-Mutante p2828 herzustellen, wurde das Plasmid p2761.UA1 konventionell kloniert. In p2761 ist der offene Leserahmen für EBNA1 punktgenau deletiert und durch das Kanamycin-Resistenzgen ersetzt (Nukleotid-Koordinaten #107949 bis 109873 des B95.8 Genoms; Abb. 8; Baer et al., 1984). Die DNA von p2761.UA1 wurde an den Koordinaten #107949 und #110770 linearisiert und nach Elektroporation in *E.coli* des Stammes DH10B mit p2089 homolog rekombiniert, wie beschrieben (Abb. 9; Gruffat et al., 1995; Neuhierl et al., 2002).

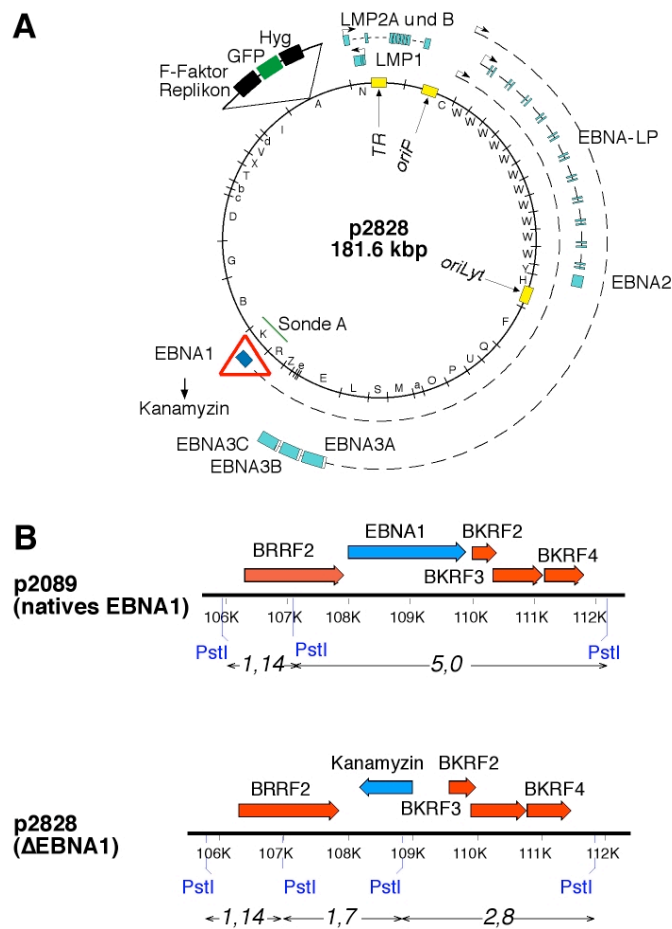


Abb. 8: Schematische Darstellung des Δ EBNA1-Maxi-EBVs p2828 (A) und des Genlokus von EBNA1 in nativem p2089 und der Mutante p2828 (B):

(A) Δ EBNA1-Maxi-EBV p2828: Das zirkuläre Episom ist mit seinen durch *Bam*HI-Spaltung erzeugten Fragmenten dargestellt (innerer Kreis). Der EBNA1-Lokus ist durch ein rotes Dreieck markiert. Die kodierende EBNA1-DNA wurde vollständig entfernt und durch das Kanamycin-Resistenzgen ersetzt. Die latenten und lytischen Replikations-Ursprünge *oriP* und *oriLyt* sowie das Verpackungssignal der „terminal repeats“ (TR) sind gelb zu sehen. Der plasmidale F-Faktor-Anteil mit den nicht viralen Genen zur Detektion und Selektion ist vorgelagert gezeigt. Die im Southern-Blot verwendete Sonde A ist im Inneren eingezeichnet.

(B) Darstellung der flankierenden Regionen im EBNA1-Lokus. Sie wurden verwendet, um EBNA1 durch das Kanamycin-Resistenzgen zu ersetzen. Das Resistenzgen enthält eine diagnostische Schnittstelle für *Pst*I, die im Southern-Blot verwendet wurde, um das ursprüngliche p2089 (oben) von Δ EBNA1-p2828 (unten) unterscheiden zu können. Die durch *Pst*I-Spaltung entstandenen und durch Southern-Blot mit der Sonde A nachgewiesenen Fragmente sind unterhalb der Darstellung aufgeführt (s. auch Anhang A).

Lineare DNA-Fragmente werden in *E.coli*-Zellen schnell durch die endogenen Exonukleasen degradiert. Die homologe Rekombination mit linearer DNA wurde daher in Degradationsinkompetenten Bakterienstämmen (ExonukleaseV-RecBCD⁻) durchgeführt. Für die Rekombination ist eine Rekombinase (RecA) notwendig, die allerdings eine genetisch stabile Erhaltung von Plasmid-DNA in Bakterien nicht über längere Zeiträume erlaubt. Ein Temperatur-sensitives Rekombinationssystem umgeht diese Schwierigkeiten und ermöglicht eine homologe Rekombination mit anschließender stabiler Erhaltung der Mutante (Abb. 9; Neuhierl et al., 2002).

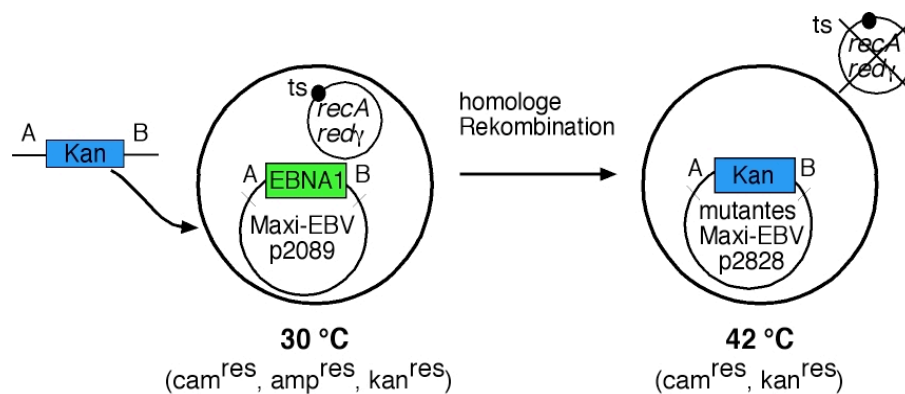


Abb. 9: Erzeugung von Mutationen innerhalb des Maxi-EBV-Genoms durch homologe Rekombination in *E.coli* des Stamms DH10B

Die Abbildung zeigt schematisch, wie homologe Rekombinationen im Maxi-EBV erfolgten. Exemplarisch ist die Herstellung des Δ EBNA1-Maxi-EBV p2828 dargestellt, in dem *ebna1* durch das Kanamycin-Resistenzgen (*Kan*) ersetzt wurde. Durch Einführung eines Plasmids mit einem Temperatur-sensitiven Replikations-Ursprung (*ts*, p2650 oder pKD46), das für Rekombinationsgene kodiert, konnte die Rekombination erfolgen. Ein konventionell kloniertes linearisiertes Plasmid, das die einzuführende Mutation flankiert durch zum Maxi-EBV homologe Sequenzen (A und B) trug, wurde transformiert. Durch Wachstum bei der permissiven Temperatur von 30°C erfolgte die Rekombination. Aufgrund einer Temperaturerhöhung auf 42°C ging das Plasmid, das die Rekombinationsgene kodiert, verloren, so dass eingefügte Mutationen stabil erhalten blieben. Durch Doppel-selektion auf Agarplatten mit Chloramphenikol (*Cam*) und die zweite Resistenz (hier Kanamycin) wurde spezifisch auf homolog rekombinierte Bakterienklone selektiert.

Der rekombinationsinkompetente *E.coli*-Stamm DH10B propagiert das Maxi-EBV p2089 stabil. Er wurde zusätzlich zu der linearen DNA für die homologe Rekombination mit dem Plasmid p2650 (kodiert für *RecA*, *Redγ*) oder pKD46 (kodiert für *Redα*, *Redβ*, *Redγ*) transfiziert. *Redγ* ist ein ExonukleaseV-Inhibitor, der die Degradation der eingefügten linearen DNA verhindert (Muyrers et al., 2001). *RecA*, *Redα* und *Redβ* sind Proteine, die eine Rekombination ermöglichen. Die Vektoren enthalten neben den beschriebenen Genen noch das Ampizillin-Resistenzgen und einen Temperatur-sensitiven Replikations-Ursprung. Die homologe Rekombination von linearer DNA und Maxi-EBV erfolgte bei der permissiven Temperatur von 30°C. Nach Temperaturerhöhung auf 42°C wurde auf doppeltresistente Klone selektiert (Chloramphenikol für das Maxi-EBV, Kanamycin für die neu

eingebraachte lineare DNA). Diese Klone hatten den Rekombinations-Vektor verloren, was anhand von Replikaplattierung auf Ampizillin-LB-Agarplatten bestätigt wurde. Die Deletion von *ebna1* wurde durch Restriktionsspaltungen und anschließende Southern-Blot-Analysen überprüft (Abb. 8, Anhang A). Der Bakterienklon 8 des entstandenen Δ EBNA1-p2828-Maxi-EBV wurde in großem Maßstab in einem Fermenter expandiert und die DNA nach Aufreinigung über einen CsCl-Gradienten isoliert.

1.1.3. Etablierung von Zelllinien zur Produktion von Δ EBNA1-Maxi-EBV

Zur Produktion infektiöser Viren werden die Maxi-EBV-Mutanten generell stabil in 293-D-Zellen etabliert (Abb. 7). Die EBV-Vektoren werden darin als extrachromosomale Plasmide in latenter Form erhalten, repliziert und gleichmäßig an die Tochterzellen weitergeben.

EBNA1 ist essentiell für die Replikation und die Erhaltung des viralen Episoms. Aus diesem Grund wurde das Δ EBNA1-Plasmid p2828 zusammen mit dem EBNA1-kodierenden pHeBo-Vektor p2727 in 293-D-Zellen propagiert. Nach mehrwöchiger Selektion mit Hygromycin konnten GFP-positive Einzelkolonien expandiert werden. Die Anzahl ausgewachsener Klone war geringer als bei p2089-transfizierten Zellen und auch die Intensität der grünen Fluoreszenz war weniger stark ausgeprägt.

1.1.4. Induktion des lytischen Zyklus und Bestimmung des Virustiters

Etablierte Hygromycin-resistente und grün fluoreszierende Klone wurden auf ihre Fähigkeit untersucht, das lytische Programm von EBV zu unterstützen. Der Übergang von der Latenz in den lytischen Zyklus von EBV kann durch die Expression des viralen Transaktivators BZLF1 eingeleitet werden (Hammerschmidt und Sugden, 1988). Die Menge der produzierten infektiösen Partikel wird außerdem durch die Kotransfektion des viralen Glykoproteins BALF4 deutlich gesteigert (Neuhierl et al., 2002). Zur lytischen Induktion wurden expandierte 293-D-Einzelzellklone mit Expressions-Plasmiden für BZLF1 und BALF4 kotransfiziert. Der lytische Zyklus wurde drei Tage nach Transfektion durch Immunfärbung des späten lytischen Glykoproteins gp350/220 nachgewiesen (Abbn. 10 A und B; Janz et al., 2000). Zur Kontrolle von Infektiosität und Titerkonzentration der produzierten Viren wurden Raji-Zellen mit Kulturüberständen der induzierten 293-D-Zellen inkubiert. Raji ist eine Burkitt-Lymphom-Zelllinie, die leicht mit EBV superinfizierbar ist. Es wurden bekannte Mengen an Raji-Zellen mit definierten Aliquots der Virusüberstände für drei Tage bei 37°C inkubiert. Die am invertierten Fluoreszenzmikroskop bestimmte Anzahl der GFP-positiven

B-Zellen ermöglicht eine direkte Konzentrationsbestimmung der infektiösen Viruspartikel im Kulturüberstand (Abbn. 10 C und D). Eine grün fluoreszierende Raji-Zelle ist als eine grüne Raji Einheit (GRE), dem Äquivalent eines infektiösen Partikels, definiert. Anhand dieser Information können die Titer mit denen anderer Viren verglichen werden.

Der grün fluoreszierende mit Δ EBNA1-p2828-Maxi-EBV transfizierte 293-D-Zellklon 2/4.6 erlaubte die Erzeugung eines Virustiters von bis zu 1×10^6 infektiösen Viren pro ml Überstand, was etwa dem Titer von nativem 2089-Maxi-EBV entspricht. 2/4.6 war der einzige aus 100 analysierten grün fluoreszierenden Zellklonen, der vertretbare Titer erzeugte. Er stellte zudem nach längerer Kultivierung (zwei bis drei Monate) die Produktion der Viren ein. Für die Versuche zur Wachstumstransformation (V.1.2.) wurden daher zumeist die in V.2.3. beschriebenen Virusproduzenten 2979.5 und 2980.16 verwendet. Die Identität und genetische Integrität der Virusproduzenten wurden im Southern-Blot bestätigt (Anhang A).

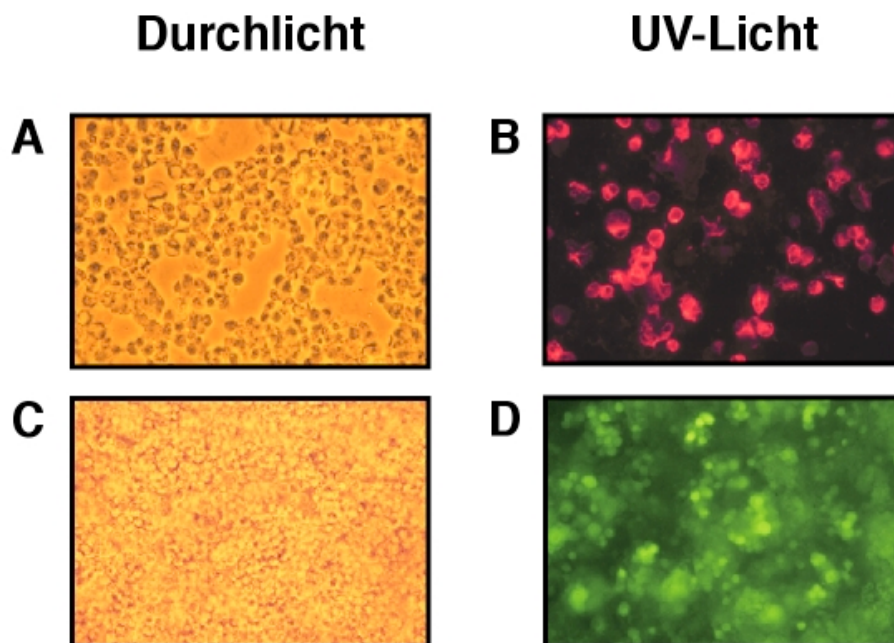


Abb. 10: Induktion des lytischen Zyklus eines in 293-D-Zellen stabil etablierten Maxi-EBV-Klons (A, B) und GFP-Expression Maxi-EBV infizierter Raji-Zellen (C, D):

(A, B): In einer stabil mit einem Maxi-EBV transfizierten 293-D-Zelllinie wurde der lytische Zyklus durch transiente Kotransfektion von Expressions-Plasmiden für die Aktivatoren des lytischen Zyklus BZLF1 und BALF4 induziert. Die Zellen wurden drei bis vier Tage nach der Transfektion auf Objektträgern fixiert und permeabilisiert. Als Nachweis der erfolgreichen lytischen Induktion wurde eine Immun-Fluoreszenz gegen das virale Glykoprotein gp350/220 durchgeführt. Die Detektion erfolgte über einen Cy3-gekoppelten Sekundärantikörper in einem invertierten Fluoreszenz-Mikroskop. Der Kulturüberstand der so kontrollierten induzierten 293-D-Zellen wurde für die Infektion von Raji-Zellen verwendet.

(C, D): 3×10^5 Raji-Zellen wurden für etwa 3 Tage mit 0,1 ml Kulturüberstand bei 37°C inkubiert. Anhand der GFP-Expression der Raji-Zellen kann auf eine erfolgreiche Infektion geschlossen werden. Eine Titerquantifizierung erfolgte durch Auszählen der GFP-positiven Zellen des Kulturüberstands. Eine grün fluoreszierende Raji-Zelle pro ml Kulturüberstand wird dabei als eine grüne Raji Einheit (GRE) definiert.

1.2. Wachstumstransformation mit Δ EBNA1-2828-Maxi-EBV

Zur Untersuchung der Beteiligung von EBNA1 an der Wachstumstransformation primärer humaner B-Zellen wurden frisch präparierte B-Zellen mit Δ EBNA1-2828-Viren infiziert und die entstehenden lymphoblastoiden Zelllinien (LCLs) analysiert.

1.2.1. Infektion primärer humaner B-Zellen mit Δ EBNA1-2828-Maxi-EBV

Die essentielle Funktion von EBNA1 für Replikation und extrachromosomale Erhaltung des Virusgenoms hat zur allgemeinen Akzeptanz des Postulats geführt, dass eine Wachstumstransformation primärer humaner B-Zellen ohne EBNA1 nicht möglich ist. Um diese Annahme erstmals zu überprüfen, inkubierte ich primäre B-Zellen mit den Δ EBNA1-2828-Virusüberständen. Die B-Zellen wurden aus Biopsien von Nasenpolypen (Adenoiden) kleiner Kinder präpariert und zusammen mit Virusüberständen für 6 bis 8 Wochen auf einer Lage aus humanen Fibroblastenzellen (Wi38) kultiviert (Kempkes et al., 1995).

Überraschenderweise waren die Δ EBNA1-2828-Viren in der Lage, wachstumstransformierte proliferierende LCLs zu etablieren. Insgesamt wurden 31 Δ EBNA1-LCLs aus acht verschiedenen B-Zell-Spendern hergestellt (aus über 30 Experimenten mit insgesamt mehr als 17.000 Einzelansätzen). Die Zeitspanne, die benötigt wurde, um wachstumstransformierte Δ EBNA1-B-Zell-Klone zu erhalten, war länger als mit 2089-Virus (eher 8 als 6 Wochen). Alle Δ EBNA1-LCLs waren nach der Etablierung (bis auf eine Ausnahme) über Monate ohne Unterstützung von Fibroblastenzellen kultivierbar.

Eine dramatische Reduktion der Wachstumstransformationseffizienz durch Δ EBNA1-Viren war sofort ersichtlich, wenn man sie mit der des ursprünglichen 2089-Virus verglich. Die extrem niedrige Transformationsrate durch Δ EBNA1-2828-EBV erlaubte es nicht, die genaue Frequenz zu bestimmen. Abschätzungen ergaben, dass zur Erzeugung proliferierender Δ EBNA1-LCLs mindestens 10.000- bis 100.000-fach mehr 2828-Viren benötigt wurden, als bei der Verwendung von nativem 2089-Virus (Dirmeier et al., 2003; Humme et al., 2003).

1.2.2. Koinfektion primärer humaner B-Zellen mit Δ EBNA1-2828-Maxi-EBV und EBNA1 *trans*-komplementierenden 2852-Virionen

Die geringe Rate wachstumstransformierter B-Zellen, die mit Δ EBNA1-2828-Viren erhalten wurde, kann entweder durch die eingefügte Deletion von *ebna1* hervorgerufen worden sein oder aber durch irrtümlich erzeugte Veränderungen im Virusgenom. Um diese beiden

möglichen Ursachen zu unterscheiden, sollten *trans*-Komplementationen mit EBNA1 durchgeführt werden (Abb. 11). Dazu wurde der EBV-basierte Vektor p2852 kloniert (Delecluse et al., 1999; Wendtner et al., 2003), der EBNA1 durch Koinfektion zusammen mit dem 2828-Maxi-EBV in die primären B-Zellen einbrachte (Abbn. 11 und 12).

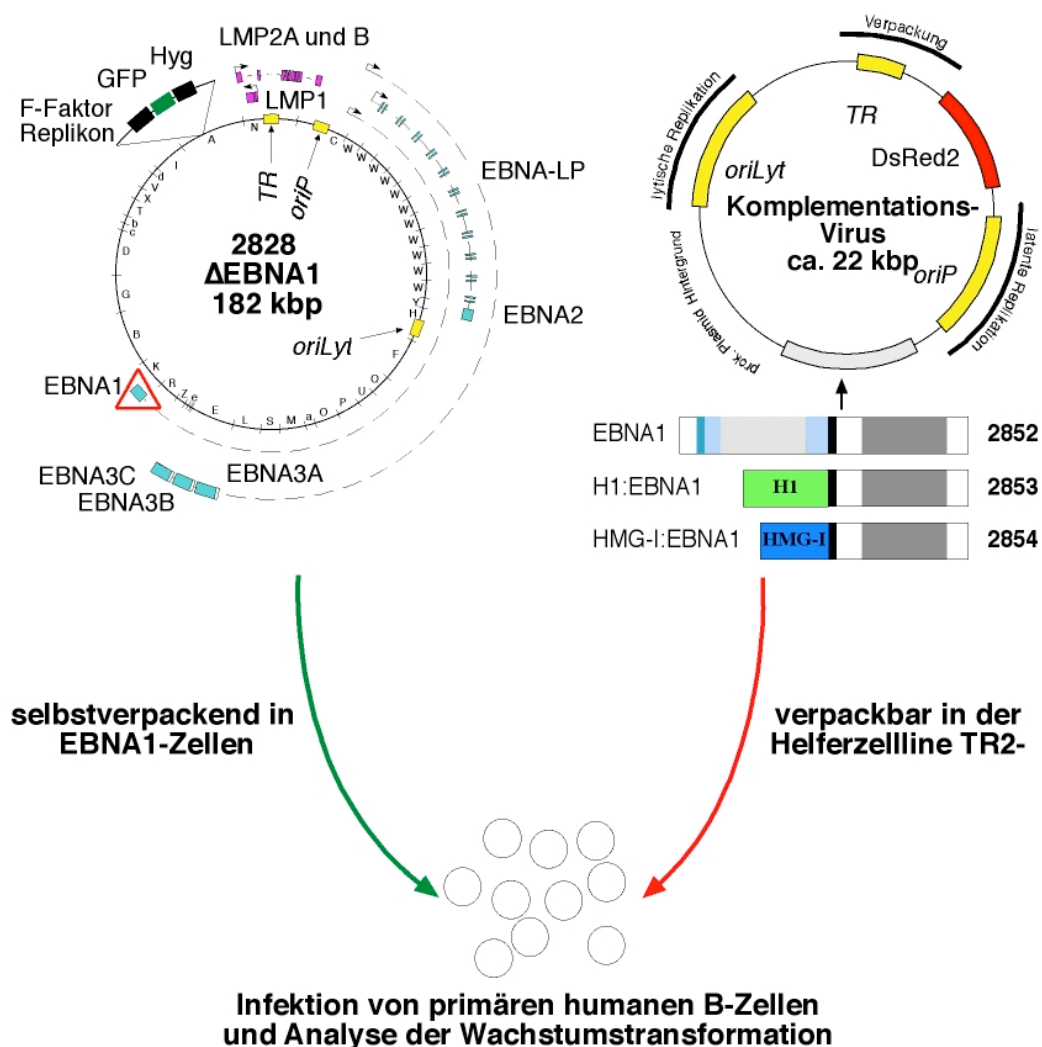


Abb. 11: Schematische Darstellung der Koinfektion von primären B-Zellen mit zwei Viren, um die EBNA1-Funktion zu rekonstituieren:

Primäre humane B-Zellen wurden gleichzeitig mit Δ EBNA1-2828-Maxi-EBV und Komplementations-Viren infiziert. Die Komplementations-Viren bringen die Gene für entweder EBNA1 (2852), H1:EBNA1 (2853) oder HMG-I:EBNA1 (2854) in die Zellen. Das Maxi-EBV kodiert für GFP, während die in der Helferzelllinie TR2-verpackten Komplementations-Viren das Gen für DsRed2 tragen. Die infizierten primären humanen B-Zellen wurden auf Wachstumstransformation untersucht.

Der Vektor p2852 kodiert neben dem, von einem CMV-Promotor kontrollierten, EBNA1 für keine weiteren EBV-Gene (Abb. 12). Dies ist wichtig, um auszuschließen, dass unerwünschte Faktoren in den Prozess der Wachstumstransformation eingreifen. P2852 enthält neben den viralen Replikations-Ursprüngen *oriP* und *oriLyt* die Verpackungssignale (TR) von EBV (Delecluse et al., 1999). Diese erlaubten das Verpacken von p2852 in der Verpackungs-

zelllinie TR2-. Die Verpackungszelllinie TR2- enthält ein EBV-Episom, dem die *TR* fehlen und das deswegen nicht in Virushüllen verpackt werden kann. Dieses Verpackungsinkompetente Virus bildet jedoch in *trans* alle viralen Genprodukte, die an der Produktion und Verpackung von Virionen beteiligt sind. Virusinduktion und Quantifizierung erfolgten wie in V.1.1.5. beschrieben, nur mit dem Unterschied, dass die infizierten Raji-Zellen unter UV-Licht nicht grün, sondern rot fluoreszierten. Die 2852-Virionen konnten ohne Infektiositätsverlust für einige Tage bei 4°C aufbewahrt werden.

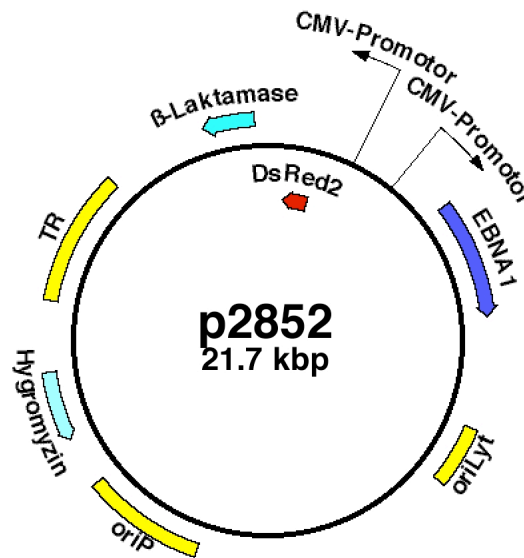


Abb. 12: Schematische Darstellung des Komplementations-Virus-Genoms p2852:

Das Plasmid p2852 wurde verwendet, um mit Hilfe der Verpackungszelllinie TR2- Komplementations-Viren herzustellen. In *trans*-Komplementierungsexperimenten ersetzen diese Viren das EBNA1 von Δ EBNA1-Viren. Der Vektor trägt neben dem Gen für EBNA1 (blau) das Gen für das rot fluoreszierende DsRed2 (rot). Beide Proteine stehen unter der Kontrolle eines CMV-Promotors. Auf dem Vektor sind neben dem Verpackungssignal *TR* (gelb) die Replikations-Ursprünge für die latente (*oriP*) und die lytische Replikation (*oriLyt*) zu finden. Außer den dargestellten Elementen sind keine weiteren EBV-Sequenzen auf dem Vektor vorhanden.

Durch Koinfektion von B-Zellen mit Δ EBNA1-2828-Virus und EBNA1 *trans*-komplementierenden 2852-Partikeln wurden LCLs erzeugt (schematisch dargestellt in Abb. 11). Die EBNA1-exprimierenden Zelllinien wurden parallel mit Δ EBNA1-LCLs analysiert.

Die Rate der Koinfektion war sehr gering, insgesamt konnte ich nur sechs LCLs aus über 15 Koinfektions-Experimenten erzeugen (aus insgesamt mehr als 5000 Einzelansätzen). Alle analysierten Linien zeigten denselben Phänotyp, wie in den nächsten Abschnitten erläutert wird. Die LCLs besaßen meist nicht die erwarteten Fluoreszenzeigenschaften. Sie leuchteten bei Anregung farblos, grün (GFP) oder rot (DsRed), obwohl durch Western-Blot- und Southern-Blot-Analysen die Anwesenheit beider Plasmide nachgewiesen werden konnte. Beide Farben zusammen wurden in nur einem Klon detektiert.

1.3. Charakterisierung von Δ EBNA1-LCLs und EBNA1-positiven-LCLs

1.3.1. Analysen zur Verifizierung der genetischen Identität der LCLs

Die Unversehrtheit der genetischen Komposition des Maxi-EBV-Genoms in den verschiedenen Zelllinien wurde durch Southern-Blot-Hybridisierung und Western-Blot-Analysen bestätigt. Abb. 13 zeigt B-Zelllinien, die aus den Zellen von drei verschiedenen Spendern etabliert wurden (Spender 18, 20, 27). Es sind sowohl Δ EBNA1-2828-transformierte Linien (Spuren 4-8) abgebildet, als auch solche, die aus Koinfektionen mit 2852-Virionen (Spuren 9-12) entstanden. B-Zellen der Raji-Linie (Spur 1) und 2089-wachstumstransformierte LCLs (Spur 2) dienten als Positivkontrolle.

Wie erwartet, zeigten die *trans*-komplementierten Zellen (Spuren 9-12) im EBNA1-Western-Blot (Abb. 13 A) ein Signal für EBNA1. Das Protein besaß ähnliche Migrations-eigenschaften wie das von Raji bzw. 2089-LCLs kodierte EBNA1. Das unterschiedliche Migrations-Verhalten der EBNA1-Proteine beruht auf der variablen Anzahl der Gly-Ala-Wiederholungen in den Proteinen. Die LCLs, die mit Δ EBNA1-2828-EBV alleine (Spuren 4–8) hergestellt wurden, zeigten kein Signal für EBNA1.

Neben der EBNA1-Expression im Western-Blot wurde die Integrität des EBNA1-Lokus durch Southern-Blot mit der Sonde A, an *Pst*I-geschnittener genomischer DNA, kontrolliert. Durch diese Analyse wurde nachgewiesen, ob die LCL durch Infektion mit nativem EBV oder durch Δ EBNA1-2828-EBV entstand (Abbn. 8 B und 13 B). Die durch Infektionen mit Δ EBNA1-2828-EBV erhaltenen LCLs (Spuren 4-12) zeigten das Bandenmuster, das die Deletionsmutante charakterisiert. Im Gegensatz dazu zeigten Raji-Zellen und 2089-LCL das Bandenmuster des ursprünglichen EBV (Abbn. 8 B und 13 B Spuren 1 und 2). Diese Ergebnisse beweisen die genetische Unversehrtheit des Δ EBNA1-2828-Maxi-EBV, das primäre humane B-Zellen transformiert.

1.3.2. Western-Blot-Analysen der latenten EBV-Proteine

Native EBNA1-positive LCLs exprimieren alle neun viralen latenten Gene. Über den *Cp*-Promotor transaktiviert EBNA1 mehrere dieser Gene. Es interessierte daher, ob latente EBV-Gene in Zellen abgelesen werden, die durch Δ EBNA1-2828-EBV wachstumstransformiert wurden, bzw. ob sich die Expressionshöhen der Proteine im Vergleich zu nativem EBV unterscheiden.

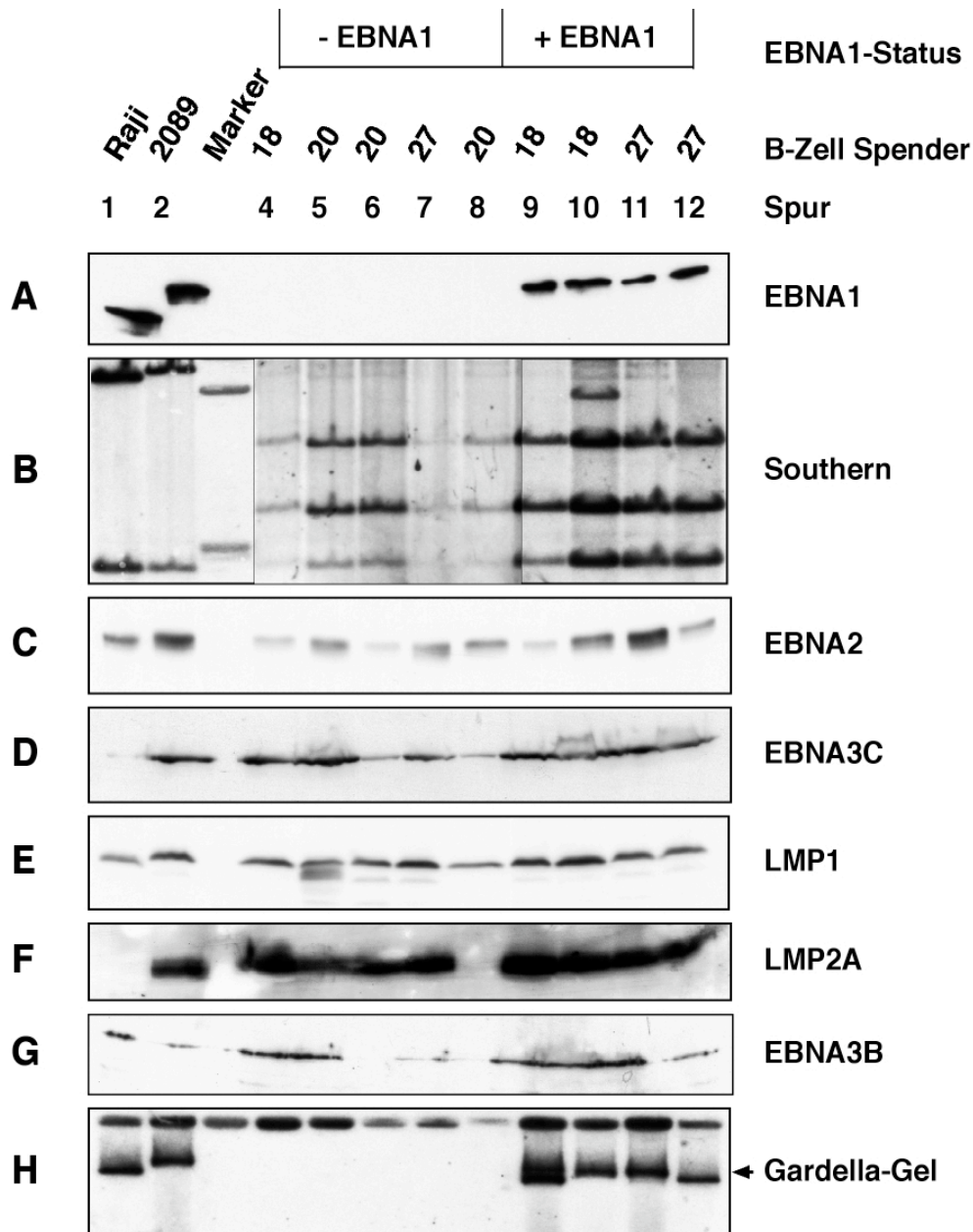


Abb. 13: Analyse von LCLs, die durch das Δ EBNA1-2828-Maxi-EBV erzeugt wurden und von LCLs, die durch Koinfektion von 2828-Virus und EBNA1 *trans*-komplementierenden 2852-Virionen entstanden:

LCLs von drei verschiedenen B-Zell-Spendern (18, 20 und 27) wurden entweder durch Infektion der primären B-Zellen mit Δ EBNA1-Viren (Spuren 4-8) oder durch Koinfektion von diesen zusammen mit EBNA1 *trans*-komplementierenden 2852-Virionen (Spuren 9-12) erhalten. Raji-Zellen (Spur 1) und eine aus nativem 2089-Maxi-EBV hergestellte LCL (Spur 2) dienten als Positivkontrollen. Das Raji-Genom enthält Deletionen im Bereich der Gene LMP2A und EBNA3C und exprimiert diese Proteine nicht. **(A)** Western-Blot-Analyse auf die Expression von EBNA1. **(B)** Southern-Blot-Analyse genomischer DNA, um ursprüngliches EBV von dem mutanten Δ EBNA1-EBV-Genom zu unterscheiden. Für das native EBV betragen die erwarteten DNA-Fragmente 1,1 kb und 5 kb, für das mutierte Virus 1,1 kbp, 1,7 kbp und 2,8 kbp (s. Abb. 8). Die oberste Bande in Spur 10 zeigt ein unspezifisches Signal. Die Spuren 4-8 stammen aus demselben Southern-Blot wie die anderen Spuren. Da die Signale hier deutlich schwächer waren, wird eine längere Exposition gezeigt. **(C-G)** Western-Blot-Analysen auf die Expression verschiedener latenter EBV-Proteine: EBNA2 **(C)**, EBNA3C **(D)**, LMP1 **(E)**, LMP2A **(F)** und EBNA3B **(G)**. Diese Proteine wurden in allen untersuchten LCLs nachgewiesen (Ausnahme: LMP2A, Spur 8). **(H)** Gardella-Gel-Analyse zum Nachweis episomaler viraler DNA. Als Hybridisierungssonde wurde p135.16 verwendet, das für etwa 50 kb EBV-DNA kodiert. Die EBV-Genome lagen in der Zelle extrachromosomal vor, wenn EBNA1 anwesend war (Spuren 1, 2, 9-12, durch den Pfeil markiert), waren jedoch integriert, wenn das Protein fehlte (Spuren 4-8). Die obere Bande zeigt ein unspezifisches Signal.

Zu diesem Zweck führte ich Western-Blot-Analysen mit verschiedenen, gegen latente EBV-Proteine gerichteten Antikörpern durch (Abbn. 13 C bis G). Dabei wurde folgendes beobachtet: Alle untersuchten LCLs exprimierten EBNA2 (C), EBNA3B (G), EBNA3C (D), LMP1 (E) und LMP2A (F, Ausnahme: in Spur 8 gezeigte Zelllinie). Auch die Kontrolllinien Raji und 2089 exprimierten diese Proteine. Da das Genom von Raji in den Bereichen von *ebna3c* und *lmp2a* Deletionen aufweist, sind diese Zellen negativ für die beiden Proteine (Farrell, 2001). Vergleich man die Signalstärken in den Western-Blots mit den aufgetragenen Mengen an Gesamtprotein (nicht gezeigt), wurden keine signifikanten Unterschiede der Expression zwischen den verschiedenen B-Zelllinien beobachtet. Da die, aufgrund fehlender Antikörper nicht untersuchten, Gene für EBNA3A, EBNA-LP und LMP2B ebenfalls vom *Cp*-Promotor reguliert werden, werden höchstwahrscheinlich auch diese Proteine exprimiert werden. Meine Ergebnisse zeigten daher, dass auch in den Δ EBNA1-LCLs alle latenten Gene in vergleichbaren Expressionsniveaus gebildet wurden, wie es in nativen LCLs der Fall war.

Bei der Analyse der genetischen Integrität besitzt LMP2A eine Sonderrolle. Der *lmp2a*-Leserahmen erstreckt sich über die *TR*. Da im Virion das Virusgenom als lineare DNA vorliegt, muss nach der Infektion die Nukleinsäure zunächst zirkularisiert werden, um eine LMP2A-Expression zu erlauben. Bis auf eine Ausnahme zeigten alle untersuchten Zelllinien ein Signal für das Protein (Abb. 13 F). Interessanterweise wuchsen die in Spur 8 gezeigten Zellen ohne EBNA1 und LMP2A weniger lange in Kultur als alle anderen von mir etablierten LCLs. Nach einigen Wochen schnellen Wachstums verlängerte sich zunächst die Generationszeit, bis die Zelllinie schließlich das Wachstum einstellte. Diese Zellen schienen den Übergang von wachstumstransformierten zu immortalen Zellen nicht zu bewältigen.

1.3.3. Untersuchung des viralen Genoms auf Extrachromosomalität

Alle publizierten Daten deuteten bisher darauf hin, dass EBNA1 unverzichtbar für Replikation und extrachromosomale Erhaltung des EBV ist. Angesichts dieser Voraussetzung für die stabile Propagierung des Virus wurde die These aufgestellt, dass das Protein auch für die *in vitro*-Wachstumstransformation von primären B-Zellen zu LCLs unverzichtbar sei. Im Widerspruch zu dieser These zeigten meine Untersuchungen allerdings, dass eine Infektion von B-Zellen mit Δ EBNA1-Virionen möglich war und dass die Infektion zur Erzeugung von wachstumstransformierten LCLs führen konnte. Eine Erklärung für die scheinbare Diskrepanz der Aussagen ist, dass in den Δ EBNA1-LCLs die virale DNA nicht extrachromosomal sondern in das Genom der Wirtszelle integriert vorliegt. Bei einer solchen Integration wäre

die Erhaltungsfunktion des Proteins nicht nötig und die Replikation würde im Kontext des Wirtsgenoms erfolgen.

Um diese Arbeitshypothese über den Status des viralen Genoms zu verifizieren, fertigte ich Gardella-Gele an (Abb. 13 H). Im Gardella-Gel wurde DNA aus intakten Zellen aufgrund ihrer Größe und der daher unterschiedlichen Laufeigenschaften elektrophoretisch aufgetrennt (Delecluse und Hammerschmidt, 1993; Delecluse et al., 1993a; Delecluse et al., 1993b). Dazu wurden lebende Zellen in einem Agarosegel durch SDS lysiert. Die kleinere virale DNA wanderte im elektrischen Feld, während die genomische DNA nicht in das Gel einwanderte. Die Virus-DNA wurde über Southern-Blot mit einer spezifischen EBV-Sonde (p135.16) nachgewiesen (Hammerschmidt und Sugden, 1989). Der episomale Status von EBV in den EBNA1-positiven Raji-Zellen, in 2089-LCLs sowie in durch Koinfektion mit 2852-Virionen entstandenen Zelllinien wird durch die unteren Signale (Pfeil) in den Spuren 1, 2, 9-12 deutlich (Abb. 13 H). In den Spuren, die DNA von Δ EBNA1-LCLs enthalten, sind keine Signale zu erkennen. Die Befunde der Gardella-Gel-Analyse deuteten daher an, dass in den Δ EBNA1-Linien das Virus nicht episomal sondern integriert vorlag.

Um diesen Befund der Integration viraler DNA zu bestätigen, wurden in Kooperation mit Henri-Jaques Delecluse (Birmingham, England) Fluoreszenz *in situ* Hybridisierungs-Analysen (FISH) an LCLs unterschiedlicher Entstehung durchgeführt (Abb. 14).

Als repräsentatives Beispiel werden in Abb. 14 FISH-Bilder wachstumstransformierter Linien von zwei verschiedenen B-Zell-Spendern gezeigt. Die Zellen entsprachen den in Abb. 13 gezeigten Spuren 7 (14 A), 4 (14 B), 11 (14 C) und 9 (14 D).

Die Hybridisierung fluoreszenzmarkierter DNA-Sonden (grün) an die Metaphase-Chromosomen (rot) der LCLs bewies, dass das virale Genom bei allen Δ EBNA1-LCLs integriert vorlag (Abbn. 14 A und B). Die Integrationen werden durch Doppelsignale auf Schwesterchromatiden deutlich (Pfeile). Hingegen erscheinen extrachromosomale Genome als Einzelsignale, die nicht zwingend an DNA gebunden vorliegen (Abbn. 14 C und D).

Das Virus besaß offensichtlich keine Präferenz für bestimmte Chromosomen, sondern integrierte zufällig. Dies wurde durch die Ergebnisse der FISH-Analysen verschiedener Δ EBNA1-LCLs nahe gelegt. Im vorliegenden Beispiel (Abb. 14 A) war das Virus in die Chromosomen 1 und 3 integriert (Chromosomen-Identifikation durch C. Schoch, München). Im Gegensatz dazu waren die Integrationsorte der in Abb. 14 B gezeigten Linie drei kleine, in dieser Abbildung nicht genau zu identifizierende, Chromosomen. Die Abbildung zeigt auch,

dass die LCLs monoklonalen Ursprungs waren, was durch die individuellen Integrationsmuster der Doppelsignale deutlich wird (Delecluse und Hammerschmidt, 1993; Delecluse et al., 1993a). Das in der Abbildung 14 B gut zu erkennende Phänomen der Polyploidität ist ein bekanntes Charakteristikum von LCLs (persönliche Mitteilung H.-J. Delecluse, Birmingham).

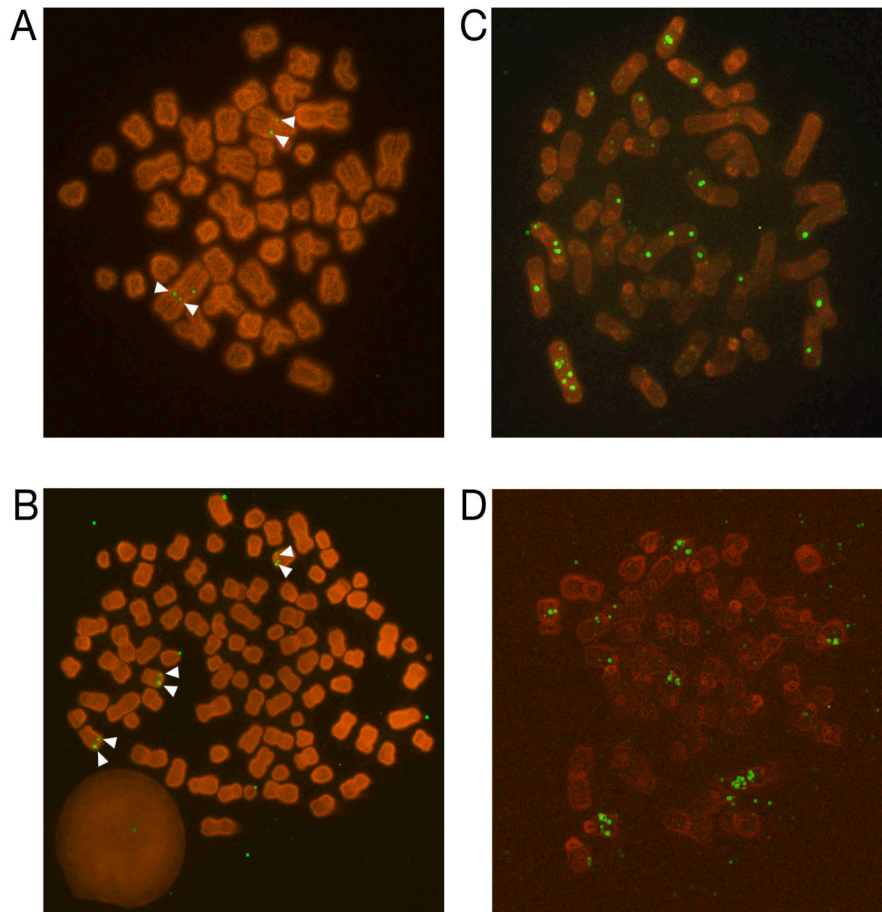


Abb. 14: Nachweis von Integrationsereignissen bei Δ EBNA1-LCLs durch FISH-Analysen

Über Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) wurden Präparationen von Metaphase-Chromosomen aus verschiedenen LCLs auf den Status der viralen DNA untersucht. Als Beispiele sind LCLs aus zwei unterschiedlichen B-Zell-Donoren dargestellt (A und C = Donor 27, B und D = Donor 18). Die Metaphase-Chromosomen sind rot zu sehen, während die EBV-DNA als grünes Signal erscheint. Die Bilder entsprechen den folgenden Spuren der Abb. 13: A = Spur 7, B = Spur 4, C = Spur 11 und D = Spur 9.

(A, B) Die LCLs wurden mit Δ EBNA1-2828-Viren hergestellt. Die virale DNA war in das Zellgenom integriert, was an den grünen Punkten auf den roten Chromosomen erkennbar ist. Die unterschiedlichen LCLs waren klonaler Abstammung, da die Integrationen als Dubletten auf den Chromatiden erscheinen (weiße Pfeile). Die Integrationsstellen waren außerdem in unterschiedlichen Chromosomen zu finden.

(C, D) LCLs, die durch Koinfektion von Δ EBNA1-Virus und EBNA1 *trans*-komplementierenden 2852-Virionen erzeugt wurden. Die meisten der zahlreichen viralen Episome lagen extrachromosomal und zufällig an die Metaphase-Chromosomen angeheftet vor.

Die Anzahl der episomalen EBV-Signale in EBNA1-positiven Zellen war deutlich größer als in Δ EBNA1-LCLs, in denen das Virusgenom chromosomal integriert vorlag. Der Befund der

hohen Kopienzahl in EBNA1-positiven Zellen deckte sich mit der Signalstärke des Southern-Blots in Abb. 13 B. Die Genome waren zufällig über das Chromatin verteilt und lagen nicht zwingend Chromosomen-assoziiert oder als Dubletten vor.

Um die Integrationsstelle im viralen Genom zu bestimmen und um zu erfahren, ob es durch die Integration deutlich geschädigt wurde, wurden Southern-Blot-Analysen genomischer DNA durchgeführt. Dabei diente das vollständige Maxi-EBV-p2089 als Sonde. Die Autoradiographie ergab, dass das charakteristische Spaltungsmuster von EBV auch in den LCLs mit integrierten Viren erhalten blieb (nicht gezeigt). Dies bestätigte erneut die bereits durch die Western-Blot-Analysen gezeigte Integrität des Virusgenoms.

Die beschriebenen Ergebnisse unterstützen die aufgestellte Arbeitshypothese, dass Δ EBNA1-LCLs nur dann entstehen, wenn die virale DNA vollständig in das Genom der Wirtszelle integriert. Eine Herstellung proliferierender Zellen ist nur dann möglich, wenn die Integration auch eine Expression der latenten EBV-Gene gewährleistet (mit Ausnahme von EBNA1 und in einem Fall LMP2A). Diese Voraussetzungen erklären die sehr geringe Rate der Wachstumstransformation mit Δ EBNA1-EBV 2828.

1.4. Das onkogene Potential der verschiedenen LCLs in SCID-Mäusen

Humane EBV-wachstumsansformierte B-Zellen verursachen nach Injektion in SCID-Mäuse („*severe combined immunodeficiency*“) lymphoproliferative Erkrankungen (zur Übersicht: Johannessen und Crawford, 1999; Rowe et al., 1991). SCID-Mäuse haben keine B- und T-Zellen und sind daher nicht in der Lage, fremdes Gewebe abzustößen. Daher gelten die Tiere als System für die Untersuchung eines eventuell onkogenen Potentials von Zellen. J. Wilson und Kollegen haben berichtet, dass EBNA1-transgene Mäuse Tumore entwickeln (Tsimbouri et al., 2002; Wilson et al., 1996; Wilson und Levine, 1992). Infolgedessen lag es nahe, das onkogene Potential der verschiedenen LCLs in SCID-Mäusen zu untersuchen.

Um das onkogene Verhalten unterschiedlich erzeugten Zelllinien von zwei verschiedenen B-Zell-Spendern zu untersuchen, wurden in zwei Versuchsreihen SCID-Mäuse intraperitoneal mit je 3×10^7 bzw. 1×10^8 Zellen injiziert. Von beiden Spendern wurden LCLs aus 2089-EBV, Δ EBNA1-2828-EBV und aus Koinfektionen von 2828- und 2852-Virionen verwendet. Zur statistischen Auswertung der Daten wurden für jede Zelllinie Gruppen aus sechs Tieren gebildet. Die Durchführung der Versuchsreihen erfolgte mit Hilfe von G. Reisbach (Abteilung Genvektoren, GSF, München). Wenn Zeichen schwerer Krankheit (z.B. Apathie,

Gewichtsverlust, struppiges Fell) auftraten, wurden die Inzuchttiere getötet und auf Tumorentwicklung untersucht. Das Biopsiematerial und Blutproben wurden verwendet, um darin enthaltene humane Zellen zu kultivieren. Diese Zellen wurden, ebenso wie das primäre Tumormaterial, auf Expression von EBNA1, EBNA2 und GFP untersucht, um Mauszellen von Zellen humanen Ursprungs zu unterscheiden. Das Vorhandensein von EBNA1 erlaubte zusätzlich eine Unterscheidung der injizierten EBNA1-positiven und -negativen Linien. EBNA1 und -2 wurden über Western-Blot-Analysen nachgewiesen. GFP-positive Zellen wurden im Fluoreszenz-Mikroskop detektiert und dienten im primären Tumormaterial als visueller Hinweis auf das onkogene Verhalten der injizierten Zellen.

Alle Zelllinien waren unabhängig vom EBNA1-Status in der Lage, in SCID-Mäusen zu proliferieren und Tumore zu induzieren. Es war möglich, die injizierten Zellen *in vitro* aus Tumormaterial und Blut zu reetablieren. Außerdem konnten EBNA2, GFP und gegebenenfalls EBNA1 nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Es war jedoch nicht möglich, ein graphisch darstellbares Ergebnis zu erhalten. Eine dreifache Erhöhung der injizierten Zellmenge von 3×10^7 auf 1×10^8 Zellen in der zweiten Versuchsreihe erbrachte nicht die erwartete Beschleunigung der Sterblichkeit. In beiden Versuchsreihen war das Ergebnis divers. So zeigte z.B. eine Gruppe von Δ EBNA1-LCL-injizierten Tieren keinerlei Krankheits-Anzeichen, jedoch waren alle Tiere nach Abbruch des Versuchs und folgender Tötung von großen Tumoren durchsetzt. Auch 2089-LCL-injizierte Tiere zeigten unterschiedliche Krankheitsbilder. In einer Gruppe von 2089-LCL injizierten Mäusen wurden keine Tumoren gefunden, während die Tiere mit Δ EBNA1 und EBNA1 *trans*-komplementierten LCLs deutlich maligne Erkrankungen humanen Ursprungs zeigten. Die Entwicklung des Phänotyps könnte durch den B-Zell-Spender und den Zustand der Kultur (Zelldichte) der injizierten Zellen beeinflusst werden. Das Alter der Zelllinie (Zeit in Kultur) und das Alter der Tiere haben möglicherweise auch einen größeren Einfluss. Alte SCID Mäuse sind in der Lage, eine schwache Abwehr gegen Fremdgewebe aufzubauen, was den Verlauf des Experimentes beeinflussen könnte (Mason et al., 2001). Es lässt sich aus diesen Versuchsreihen daher nicht ableiten, ob EBV-wachstumstransformierte B-Zellen stärker oder schwächer onkogen sind als Δ EBNA1-2828-transformierte Zellen. Die Versuche zeigen jedoch eindeutig, dass LCLs, die kein EBNA1 exprimieren, in der Lage sind, Tumore bei SCID-Mäusen hervorzurufen. Damit kann EBNA1 nicht als unabdingbar für die Entstehung von EBV-assoziierten Tumoren betrachtet werden.

2. Ersetzung von EBNA1 durch H1:EBNA1 bzw. HMG-I:EBNA1

Das zweite Ziel meiner Doktorarbeit war der Austausch verschiedener EBNA1-Domänen durch heterologe Proteine. Durch die Fusions-Proteine sollten die molekularen Mechanismen von EBNA1 untersucht und ein tieferer Einblick in seine Funktionen gewonnen werden.

Die Gruppen von E. Kieff und A. Aiyar publizierten gleichzeitig mit meiner Arbeit, dass Fusionen aus der DNA-Bindedomäne von EBNA1 mit den zellulären Proteinen Histon H1 bzw. HMG-I in der Lage sind, die Funktionen von EBNA1 für die Replikation und die Chromatin-Assoziation zu ersetzen (Hung et al., 2001; Sears et al., 2003). Die Ergebnisse wurden mit kleinen *oriP*-basierten Vektoren erhalten. Diese wurden in Zellen transfiziert, die die jeweiligen EBNA1-Varianten integriert tragen. Die Vektoren enthalten den minimalen Replikations-Ursprung *oriP* und das Puromyzin-Resistenzgen. Die Plasmide wurden in Zellen mit H1:EBNA1- bzw. HMG-I:EBNA1-Expression stabil extrachromosomal erhalten.

Das in diesem Kapitel besprochene Ziel meiner Arbeit war, die für kleine Plasmide gewonnenen, aber bis dahin noch nicht publizierten, Erkenntnisse zu bestätigen und auf das Maxi-EBV zu übertragen. Darauf aufbauend sollte überprüft werden, ob die Fusionsproteine (H1:EBNA1 bzw. HMG-I:EBNA1) auch die Produktion infektiöser Partikel und die Wachstumstransformation primärer humaner B-Zellen unterstützen.

Für die Durchführung der erwähnten Analysen war es notwendig, ein Maxi-EBV herzustellen, bei dem der offene Leserahmen von EBNA1 vollständig deletiert ist. Die Herstellung und Analyse dieses Δ EBNA1-2828-EBV wurde in Kapitel V.1. beschrieben.

2.1. Etablierung von HMG-I:EBNA1- bzw. H1:EBNA1-Zelllinien

Zu Beginn dieser Doktorarbeit waren die HMG:EBNA1- und H1:EBNA1-Fusionsproteine der Kieff-Gruppe weder publiziert noch verfügbar. Daher stellte ich die Proteine durch PCR-Klonierung selbst her. Zu diesem Zweck wurde die cDNA der zellulären Proteine Histon H1 bzw. HMG-I/Y über PCR aus einer cDNA-Bank amplifiziert und in einen Expressions-Vektor kloniert. Über Sequenzierung wurde die genetische Unversehrtheit der amplifizierten DNA verifiziert. HMG-I und HMG-Y sind Spleißvarianten desselben Gens. Die Proteine unterscheiden sich in einer Deletion von 33 bp in Exon 5 in HMG-Y voneinander (zur Übersicht: Friedmann et al., 1993; Reeves, 2001). Ich klonierte die längere HMG-I-Variante des Proteins. Diese wurde, wie sich später herausstellte, auch von anderen Gruppen verwendet (Hung et al., 2001; Sears et al., 2003).

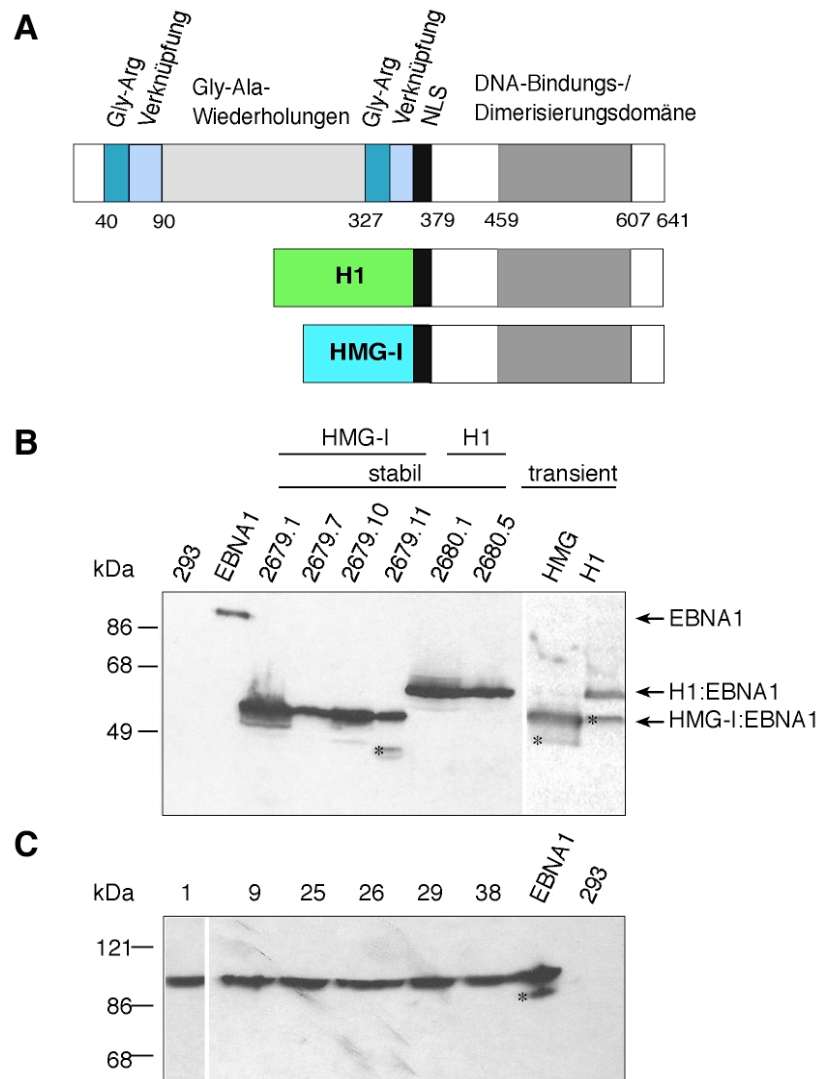


Abb. 15: Etablierung stabiler EBNA1, HMG-I:EBNA1 bzw. H1:EBNA1 exprimierender 293-D-Zelllinien:

(A) Schema des EBNA1-Proteins aus p1327 sowie der H1:EBNA1- und HMG-I:EBNA1-Fusionsproteine. Die funktionalen Domänen und die Aminosäurepositionen sind dargestellt. H1 ist grün, HMG-I blau gezeigt.

(B) Western-Blot-Analyse verschiedener etablierter 293-D-Einzelzellklone auf die Expression der Fusionsproteine HMG-I:EBNA1 bzw. H1:EBNA1 mit dem monoklonalen EBNA1-Antikörper 1H4. Als Positivkontrolle für den Antikörper wurden EBNA1-positive 293-Zellen verwendet, als Negativkontrolle dienten 293-D-Zellen. Im rechten Bildteil sind Extrakte aus transienten Transfektionen aufgetragen. Für alle nachfolgenden Experimente wurden der HMG-I:EBNA1-Klon 2679.7 und der H1:EBNA1-Klon 2680.5 verwendet.

(C) Western-Blot-Analyse verschiedener etablierter 293-D-Zellklone auf die Expression des EBNA1-Proteins mit dem monoklonalen EBNA1-Antikörper 1H4. Als Positivkontrolle für den Antikörper wurden Extrakte aus transienten Transfektionen mit p1327 verwendet, als Negativkontrolle 293-D-Zellen. Für alle nachfolgenden Experimente wurde der EBNA1-Klon 1 verwendet. Die mit * markierten Banden zeigen Abbauprodukte der Proteine.

Für den EBNA1-Anteil der Fusionsproteine wurde an dem EBNA1-Expressions-Vektor p1327 eine PCR unternommen, die den C-terminalen Anteil des Proteins amplifizierte. Dieser Teil von EBNA1 enthält die DNA-Bindungs- und Dimerisierungsdomäne des Proteins. Die amplifizierte Sequenz begann direkt nach dem NLS von EBNA1. Durch transiente Transfektion der klonierten Vektoren p2679 (HMG-I:EBNA1) und p2680 (H1:EBNA1) in

293-D-Zellen und anschließende Western-Blot-Analysen mit dem monoklonalen EBNA1-Antikörper 1H4, wurde das Expressionsniveau der Fusionsproteine und ihr Migrationsverhalten in der SDS-PAGE untersucht (Abb. 15 B). Beide Proteine wanderten, wie auch natives EBNA1 aus p1327, in der SDS-PAGE langsamer als theoretisch errechnet (Theorie: EBNA1 ca. 70 kDa, HMG-I:EBNA1 ca. 40 kDa, H1:EBNA1 ca. 50 kDa). Nach der Verifizierung in transienten Transfektionen wurden die Plasmide p2679 (HMG-I:EBNA1) bzw. p2680 (H1:EBNA1) verwendet, um Neomycin-resistente Zelllinien zu etablieren, die das jeweilige Gen stabil integriert tragen und exprimieren. Nach klonaler Expansion wurden ausgewachsene Klone auf Expression der Fusionsproteine untersucht (Abb. 15 B). Im Verlauf dieser Arbeit verwendetet ich die Einzelzellklone 2680.5 (H1-EBNA1) und 2679.7 (HMG-I:EBNA1). Mit p1327 wurde die stabil EBNA1-exprimierende Neomycin-resistente Kontrollzelllinie EBNA1 hergestellt (Abb. 15 C). Der Klon EBNA1.1 wurde für die beschriebenen Versuche verwendet. Alle von mir etablierten Zelllinien besitzen, durch Verwendung des CMV-Promotors, eine sehr starke Expression des jeweiligen Proteins.

2.2. Replikation und Erhaltung *oriP*-basierter Vektoren in H1:EBNA1- bzw. HMG-I:EBNA1-Zelllinien

Zur Überprüfung der Funktionalität der Fusionsproteine, führte ich Plasmid-Wiedergewinnungs-Experimente durch, mit denen ich analysierte, ob die Fusionsproteine in der Lage sind, die Replikation und die extrachromosomale Erhaltung kleiner *oriP*-Vektoren ohne EBNA1 zu erlauben. Dazu wurde der *oriP*-basierte Vektor p2832 kloniert. Er enthält neben dem minimalen latenten EBV-Replikations-Ursprung *oriP* die Gene für Puromycin-Resistenz und eGFP sowie das Ampizillin-Resistenzgen zur Propagierung in Bakterien. P2832 wurde in vier verschiedene 293-D-Zelllinien transfiziert (EBNA1, H1:EBNA1, HMG-I:EBNA1, 293-D) und anschließend wurde für etwa vier Wochen mit 1 $\mu\text{g/ml}$ Puromycin selektioniert (Abb. 16). Nach etwa vier Wochen Selektion wurden die Zellen durch Plasmid-Wiedergewinnungs-Experimente auf extrachromosomale Erhaltung und Replikation des Vektors p2832 untersucht. Bei dieser Technik wurde DNA (hier genomische DNA) aus den verschiedenen Zelllinien präpariert und äquivalente Mengen DNA wurden über Elektroporation in Bakterienzellen eingebracht. Transfizierte extrachromosomale Plasmide wurden in *E.coli* propagiert und vermittelten dort Ampizillin-Resistenz. Durch Auszählen der Bakterienkolonien auf LB-Ampizillin-Agarplatten konnte auf die Menge der extrachromosomalen p2832-DNA geschlossen werden. Die Präsenz von p2832 wurde in

einigen Bakterienkolonien exemplarisch durch Spaltung präparierter Plasmid-DNA mit verschiedenen Restriktionsenzymen untersucht. Das Ergebnis einer der Analysen ist in der Tabelle von Abb. 16 zusammengefasst.

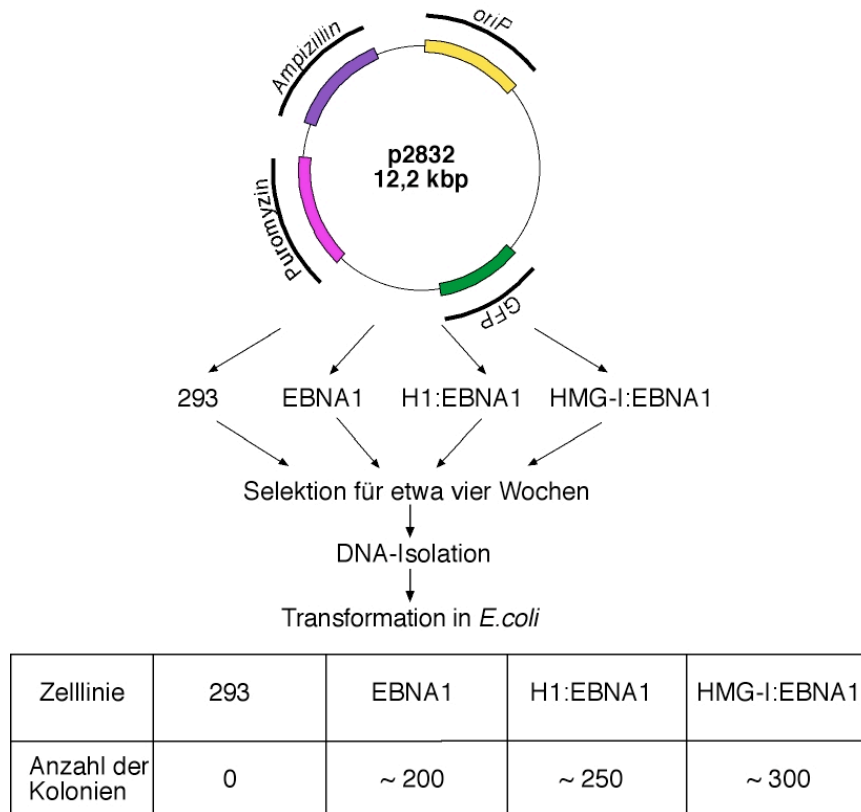


Abb. 16: Die chimären Fusionsproteine H1:EBNA1 und HMG-I:EBNA1 unterstützen die extrachromosomale Erhaltung und Replikation von *oriP*-Vektoren:

293-D-Zellen, EBNA1-Zellen oder Zellen, die eines der beiden EBNA1-Fusionsproteine (HMG-I:EBNA1, H1:EBNA1) exprimieren, wurden mit dem Plasmid p2832 transfiziert, das den latenten Ursprung der EBV-Replikation *oriP* (gelb) trägt. Der Vektor trägt des Weiteren die Gene für die Puromycin- (magenta), die Ampizillin-Resistenz (violett) und für eGFP (grün). Nach etwa vier Wochen unter Puromycin-Selektion (1 µg/ml) wurde genomische DNA isoliert und äquivalente Mengen davon wurden durch Elektroporation in *E. coli* des Stammes DH10B eingebracht. Die Anzahl der in der Tabelle aufgeführten Kolonien ist repräsentativ für die episodale Erhaltung der *oriP*-Vektoren. Die Versuchsreihe wurde dreimal wiederholt. Die gezeigten Werte stammen aus einem exemplarischen Versuch. Als Negativkontrolle dienten 293-D-Zellen, als Positivkontrolle EBNA1-Zellen, die mit p2832 transfiziert wurden.

DNA-Präparationen aus 293-D-Zellen ergaben in Plasmid-Wiedergewinnungsversuchen keine Kolonien. Demgegenüber führten DNA-Präparationen aus EBNA1-Zellen zu einer hohen Anzahl an Bakterienkolonien, die eine effiziente extrachromosomale Erhaltung des *oriP*-Vektors anzeigten. Auch die beiden Fusionsproteine (H1:EBNA1 bzw. HMG-I:EBNA1) ermöglichten die extrachromosomale Erhaltung des p2832, welches an der erhaltenen großen Anzahl an Bakterienkolonien ersichtlich war. Dabei lag die Anzahl der Kolonien in beiden Fällen sogar leicht höher als bei DNA-Präparationen aus EBNA1-Zellen. Verglichen mit

EBNA1 und H1:EBNA1 führten Extrakte aus HMG-I:EBNA1-Zellen in drei unabhängigen Versuchen immer zu den höchsten Kolonienzahlen. Da die Experimente zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Transfektion durchgeführt wurden, war die Bildung eines Mittelwertes der verschiedenen Versuche nicht möglich. Die gezeigten Werte stammten aus einem der Versuche und sind repräsentativ. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass HMG-I:EBNA1 und H1:EBNA1 die Funktionen von EBNA1 für die Replikation und die extrachromosomale Erhaltung des *oriP*-Vektors effizient substituieren können.

2.3. Charakterisierung der Funktionen des Δ EBNA1-p2828-Maxi-EBV in H1:EBNA1- bzw. HMG-I:EBNA1-Zelllinien

Nachdem bestätigt war, dass die chimären HMG-I:EBNA1- und H1:EBNA1-Proteine in der Lage sind, die Replikation und extrachromosomale Erhaltung von kleinen *oriP*-basierten Vektoren zu gewährleisten, sollte getestet werden, ob dies auch im Kontext des gesamten EBV-Genoms der Fall ist. Ferner analysierte ich, ob die Fusionsproteine in der Lage sind, die Produktion von EBV zu unterstützen (Abb. 17).

Dazu wurde Δ EBNA1-p2828-DNA in die vier Zelllinien 293-D, EBNA1, H1:EBNA1 bzw. HMG-I:EBNA1 transfiziert und mit Hygromyzin selektiert. Nach einigen Wochen wurden grün fluoreszierende Hygromyzin-resistente Einzelkolonien auf den Status des Maxi-EBV-Genoms untersucht. Wegen der Größe des viralen Episoms war eine Analyse durch Plasmid-Wiedergewinnungs-Analysen nicht möglich. Daher wählte ich zur Untersuchung die bereits beschriebene, von Gardella etablierte Technik (s.V.1.3.3.; Delecluse und Hammerschmidt, 1993; Gardella et al., 1984), die eine Trennung extrachromosomaler und genomischer DNA erlaubt. Als spezifische EBV-Sonde verwendete ich auch hier p135.16.

Exemplarisch sind in Abb. 17 Autoradiographien von Gardella-Gelen p2828-transfizierter H1:EBNA1- und HMG-I:EBNA1-Zellen zu sehen. Sowohl für HMG-I:EBNA1 als auch für H1:EBNA1 wurden Klone etabliert (exemplarisch sind zwei Klone gezeigt), die im Southern-Blot des Gardella-Gels ein Signal für extrachromosomal erhaltene Virusgenome zeigten. Da die Zellen über vier Wochen selektiert wurden, kann von einer stabilen Replikation des Vektors ausgegangen werden. Als Positivkontrolle dienten 293-D-Zellen, die das rekombinante EBV-Plasmid p2089 tragen, und EBV-positive Raji-Zellen (linke Spuren). Das unterschiedliche Migrations-Verhalten der Raji- und 2089-Episomen ist bekannt (z.B. Delecluse und Hammerschmidt, 1993).

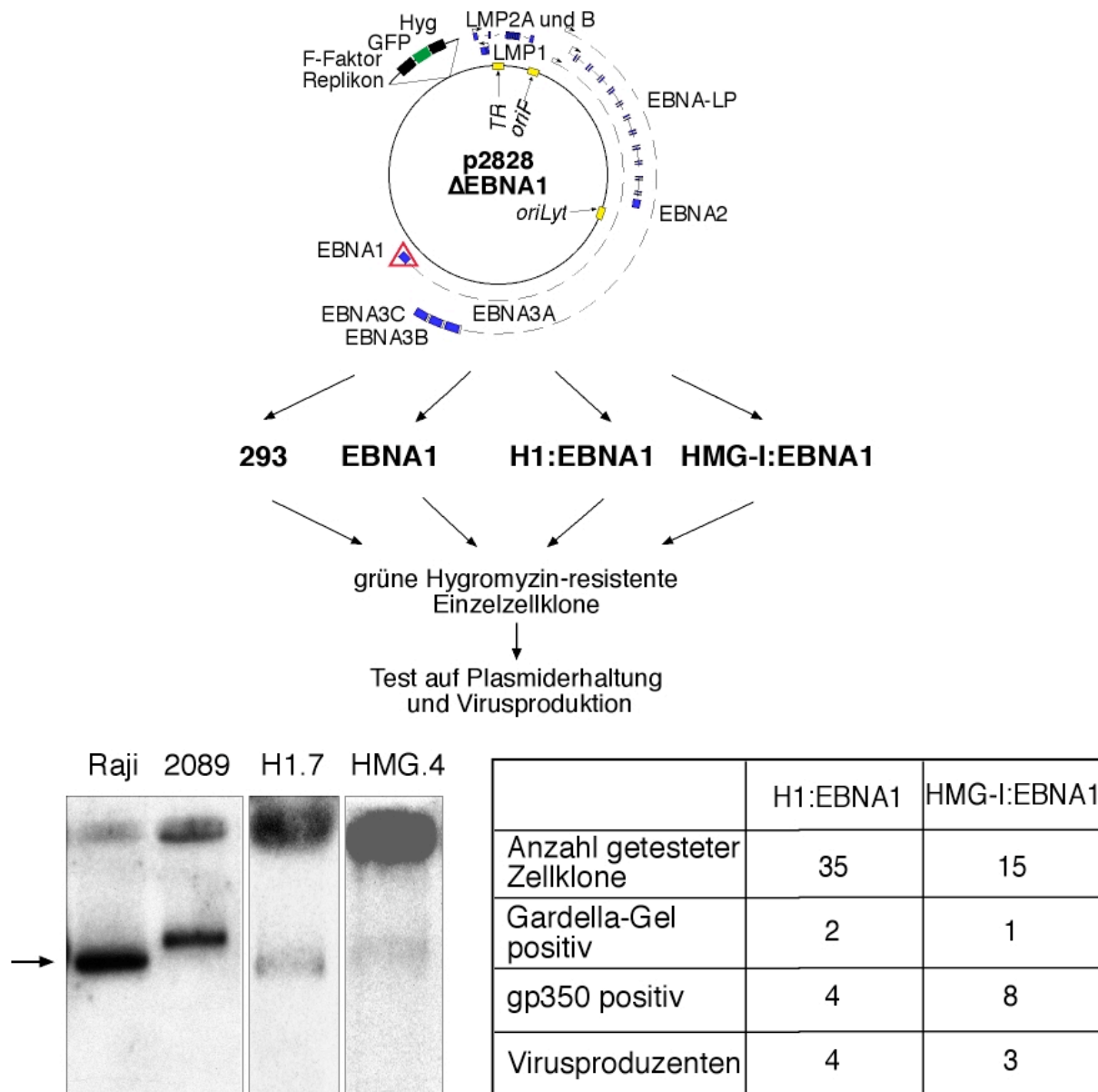


Abb. 17: Die H1:EBNA1 bzw. HMG-I:EBNA1-Fusionsproteine unterstützen die Replikation, die extrachromosomale Erhaltung und die Virusproduktion des Δ EBNA1-Maxi-EBV:

Zelllinien, welche die EBNA1-Fusionsproteine (H1:EBNA1 bzw. HMG-I:EBNA1) exprimieren, wurden mit dem Δ EBNA1-p2828-Maxi-EBV transfiziert und mit Hygromycin selektiert. Grün fluoreszierende Hygromycin-resistente Einzelzellklone wurden durch Gardella-Gel-Analysen auf die Existenz episomaler Virus-DNA untersucht. Der Pfeil neben den Gardella-Gelen markiert die Bande für extrachromosomale Virus-DNA. Als Positivkontrollen dienten Raji-Zellen und 293-D-Zellen, die das 2089-Maxi-EBV enthalten. Des Weiteren wurde untersucht, ob das Δ EBNA1-2828-Maxi-EBV in der Lage ist, den lytischen Zyklus zu durchlaufen und infektiöse Viren zu produzieren. Der Eintritt in den lytischen Zyklus wurde durch Kotransfektion von DNA für BZLF1 und BALF4 induziert und durch Immun-Fluoreszenz gegen das Glykoprotein gp350 nachgewiesen. Eine erfolgreiche Virusproduktion wurde durch Superinfektion von Raji-Zellen detektiert. Die Anzahl der getesteten Klone sowie die Zahl positiver Zellklone für die jeweiligen Analysen sind in der Tabelle aufgeführt.

Als nächstes untersuchte ich, ob die Fusionsproteine in der Lage sind die, Virusproduktion zu unterstützen. Dazu wurden grün fluoreszierende Hygromycin-resistente H1:EBNA1- bzw. HMG-I:EBNA1-Zellklone verwendet, die das transfizierte Δ EBNA1-p2828-Maxi-EBV stabil propagieren. In diesen wurde der lytische Zyklus induziert, wie bereits in V.1.1.4.

beschrieben. Der Eintritt in die lytische Phase wurde über gp350-Immun-Fluoreszenz gezeigt, während die Produktion infektiöser Viren durch Superinfektion von Raji-Zellen nachgewiesen wurde (nicht gezeigt, jedoch Abb. 10 entsprechend). Den Eintritt in die lytische Phase konnte ich für beide Fusionsproteine in vier bzw. acht Linien nachweisen. Die erhaltenen Virusproduzenten (vier für H1:EBNA1, drei für HMG-I:EBNA1) erzeugten Virustiter, die dem von ursprünglichem 2089-Maxi-EBV vergleichbar sind (1×10^5 bis 1×10^6 GRE pro ml). Die Tabelle in Abb. 17 fasst die Ergebnisse aus den Untersuchungen mit Gardella-Gelen, Immun-Fluoreszenz-Färbungen und Raji-Infektionen zusammen. Die Produktion von infektiösen EBV-Partikeln konnte nur erfolgen, wenn das virale Genom episomal vorlag (Rickinson und Kieff, 2001). Daher war die Anzahl der Linien, in denen die Fusionsproteine eine Replikation und extrachromosomale Erhaltung des Virus gewährleisten, höher, als aus den Gardella-Gel-Analysen ersichtlich.

Die gezeigten Ergebnisse belegen, dass die chimären H1:EBNA1- bzw. HMG-I:EBNA1-Proteine in der Lage sind, das Δ EBNA1-Maxi-EBV extrachromosomal zu erhalten, zu replizieren und die Produktion von infektiösen Viren zu unterstützen.

2.4. Analysen zur Wachstumstransformation mit HMG-I:EBNA1

Wie gezeigt, sind die Fusionsproteine H1:EBNA1 und HMG-I:EBNA1 in der Lage, alle essentiellen Funktionen von EBNA1 im Maxi-EBV-System zu ersetzen. Als nächstes sollte untersucht werden, ob die Chimären die Wachstumstransformation von primären humanen B-Zellen durch EBV unterstützen. Es gibt zwei experimentelle Ansätze, um die wachstumstransformierenden Eigenschaften der Proteine zu untersuchen. Eine Möglichkeit ist, die Fusionsgene an Stelle von *ebna1* auf das Maxi-EBV zu klonieren. Die andere Variante ist, primäre B-Zellen neben Δ EBNA1-2828 mit einem zweiten Virus zu koinfizieren, welches das Fusionsgen in *trans* zur Verfügung stellt.

Im Rahmen der Koinfektions-Strategie (Abb. 11) klonierte ich die Komplementations-Plasmide 2852 (Abb. 12), 2853 und 2854. Die *trans*-Komplementation erfolgte in über 15 Titrationsreihen mit den koinfizierenden HMG-I:EBNA1- (2854) und H1:EBNA1-Viren (2853; s.V.1.2.2.). Raji-Infektionen zeigten, dass die in der Verpackungszelllinie TR2-hergestellten Virusüberstände infektiöse Viruspartikel in verwertbaren Titern enthielten (1 bis 5×10^5 GRE pro ml). Wie in V.1.2.2. beschrieben, war schon die Koinfektion mit nativem EBNA1 durch 2852-Virionen sehr ineffizient. Es gelang nicht, wachstumstransformierte B-

Zellen durch Koinfektionen mit 2853- bzw. 2854-Virionen zu erhalten (über 15 Experimente mit insgesamt mehr als 5000 Einzelansätzen).

Um dennoch Analysen zur Wachstumstransformation durchzuführen, ersetzte ich in vier verschiedenen Maxi-EBV-Mutanten das *ebna1* durch die cDNA für HMG-I:EBNA1 (p2986, p3084, p3105, p3106). Diese Mutanten unterscheiden sich in dem Insertionslokus des Gens und der Orientierung des eingeführten *hmg-i:ebna1* (Abb. 18 und Anhang). Aus V.2.3. war offensichtlich, dass es möglich sein sollte, Virusproduzenten der Maxi-EBVs herzustellen. Es gelang jedoch mit keinem der hergestellten vier verschiedenen Maxi-EBVs, Virusproduzenten in 293-D-Zellen zu etablieren. Die Analyse auf Virusproduktion erfolgte über gp350-Immunfluoreszenz an mehreren hundert lytisch induzierten Einzelzellklonen aus 293-, 293-D-, EBNA1- bzw. HMG-I:EBNA1-Zellen. Um einen Einfluss des CMV-Promotors auf die Versuche auszuschließen, klonierte ich kürzlich über „*chromosomal building*“ das Maxi-EBV p3199. In diesem wird das HMG-I:EBNA1-Fusionsprotein von dem endogenen EBNA1-Promotor abgelesen. Es wurde neben dem Fusionsgen keine weitere fremde DNA eingeführt und die Expression von HMG-I:EBNA1 sollte in endogener Höhe erfolgen. Die Analyse dieser Mutante auf Virusproduktion ist bisher nicht abgeschlossen.

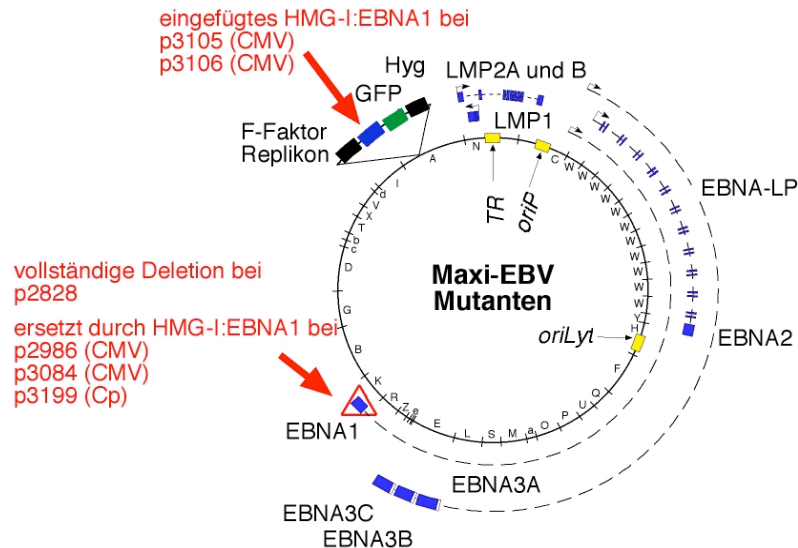


Abb. 18: Schematische Darstellung der Insertionsstellen des Gens für HMG-I:EBNA1 in das Maxi-EBV:

Die Abbildung zeigt schematisch das Genom des Maxi-EBVs p2089 und die Stellen, an denen es genetisch verändert wurde (durch Pfeile markiert), um *hmg-i:ebna1* einzubringen. Die Insertion des Fusionsgens erfolgte am EBNA1-Lokus. Ein weiterer Insertionsort war der prokaryontische Hintergrund des Maxi-EBVs. Bei Insertion in diesen Lokus wurde das p2828 als Ausgangsvektor verwendet, in dem *ebna1* vollständig deletiert ist. Die einzelnen Mutanten unterscheiden sich in der Orientierung des eingefügten Gens und den verwendeten Promotoren (in Klammer angegeben). Die Vektoren wurden durch homologe Rekombination (p2986, p3084, p3105, p3106) bzw. durch „*chromosomal building*“ (p3199) hergestellt.

3. Etablierung und Analyse eines konditional regulierbaren Vektorsystems durch EBNA1-TetR-Fusionsproteine

Wie in V.2. beschrieben sind die H1:EBNA1- und HMG-I:EBNA1-Fusionsproteine in der Lage, die Funktionen von EBNA1 für die episomale Erhaltung, die Replikation und die Virusproduktion des EBV zu ersetzen. Der N-terminale Anteil von EBNA1, der die Transaktivierungsdomäne enthält, ist damit funktionell austauschbar.

Das dritte Ziel meiner Doktorarbeit war, auch die DNA-Bindedomäne von EBNA1 durch ein heterologes Protein zu ersetzen. Diese C-terminale EBNA1-Domäne bindet an die EBNA1-Motive im latenten Replikations-Ursprung *oriP*. Durch die Bindung von EBNA1 an die *FR* wird die Erhaltung des viralen Episoms gewährleistet (Sugden, 2002). Seine Bindung an das *DS*-Element vermittelt die Positionierung der zellulären Replikations-Maschinerie und damit die Verdopplung des Virusgenoms (Yates, 1996). Die DNA-Bindedomäne des Tet-Repressors (TetR), die mit dem *Tet-Operator* (*TetO*, DNA-Bindemotiv) interagiert, wird häufig zur Herstellung von konditional regulierbaren Fusionsproteinen verwendet.

Fusionsproteine aus der N-terminalen Transaktivierungsdomäne von EBNA1 mit dem TetR sollten eine konditional regulierbare Interaktion des Proteins mit den *TetO*-Motiven ermöglichen (Abbn. 6 und 19). Der EBNA1-Anteil gewährleistet gleichzeitig eine Assoziation mit dem zellulären Chromatin. Nach Austausch der zwanzig EBNA1-Bindestellen der *FR* gegen zwanzig *TetO*-Bindemotive (20x *TetO*) sollte das EBNA1:TetR-Fusionsprotein die Chromatin-Assoziation von *TetO*-Vektoren herbeiführen. Diese Interaktion sollte durch Tetrazyklin regulierbar sein. In dem angestrebten System ist der aktive Zustand die Bindung von Protein und DNA. Daher wurde das Tet-System gewählt, bei dem die Bindung von TetR an *TetO* in der Abwesenheit von Tetrazyklin erfolgt („*Tet-off*“).

Im folgenden Kapitel wird die Herstellung der EBNA1:TetR-Fusionsproteine sowie der Vektoren mit 20x *TetO* beschrieben. Zur Analyse der Funktionalität wurde zunächst *in vitro* und *in vivo* die Fähigkeit zur Doxyzyklin-abhängigen DNA-Bindung untersucht. Später wurde durch verschiedene Verfahren experimentell nachgeprüft, ob Vektoren Doxyzyklin-regulierbar erhalten werden.

3.1. Etablierung von EBNA1:TetR-Fusionsproteinen

Ich habe zwei Varianten von EBNA1:TetR hergestellt, die sich in der Präsenz oder Abwesenheit des EBNA1-NLS unterscheiden (Abb. 6). Ich etablierte die beiden Varianten

des Fusionsproteins, um zu analysieren, ob der TetR-Anteil einen Kerntransport des Proteins garantiert. Die Klonierung der Fusionsproteine erfolgte über PCR an dem EBNA1-Expressions-Vektor p1327. Die PCR-Amplifikation von EBNA1 war schwierig, weil der N-terminale Anteil des Proteins zum großen Teil aus repetitiven Sequenzen besteht, die während der PCR-Amplifikation (fast) vollständig deletiert wurden. Die Gly-Ala-Wiederholungen haben zwar wahrscheinlich keinen Einfluss auf die Funktionen von EBNA1 und sind auch in der Natur unterschiedlich lang (Levitskaya et al., 1997), aber die Homologie des Fusionsproteins sollte zum nativen EBNA1 so groß wie möglich sein. Aus diesem Grund präparierte ich nach der PCR die DNA der etwa gewünschten Größe und klonierte sie in einen TetR-Expressions-Vektor. Der klonierte TetR enthält ein trimeres Transaktivierungssignal des HSV-Proteins VP16.

Die klonierten Vektoren mit der Nummer p2729.1, -.2 usw. wurden durch Spaltung mit verschiedenen Restriktionsenzymen auf die Größe des Fusionsproteins analysiert. Fünf der Plasmide, deren Anzahl an Gly-Ala-Wiederholungen etwa der des nativen EBNA1-Proteins entsprachen, wurden zusätzlich sequenziert. Zwei davon enthielten das NLS aus EBNA1 (Klone +14 und +38), drei nicht (Klone -2, -12, -34).

3.2. Nachweis der EBNA1:TetR—*TetO*-Interaktion in Reporter-Analysen

Die fünf ausgesuchten EBNA1:TetR-Fusionsproteine wurden im Labor von Dr. Christian Berens (Erlangen) durch Reporter-Analysen auf ihre Fähigkeit untersucht, mit dem *TetO*-Motiv zu interagieren (Abb. 19). Des Weiteren wurde getestet, ob die Bindung durch das Tetrazyklinanalogon Doxzyklin reguliert werden kann.

Die verwendete Analysemethode ist schematisch in Abb. 19 A dargestellt. Die EBNA1:TetR-DNA wurde transient in HeLaX1/6-Zellen transfiziert, die eine stabile Integration eines Luziferase-Reportergens tragen. Das Gen steht unter der Kontrolle eines minimalen CMV-Promotors, der durch sieben *TetO*-Bindestellen reguliert wird (Gossen und Bujard, 1992). Bei Bindung des TetR mit der VP16-Transaktivierungsdomäne an den *TetO* wurde das Reporter-Gen transkribiert und Luziferase gebildet. Die Messung der Promotoraktivität erfolgte photometrisch durch Bestimmung der relativen Licht-Einheiten (RLU). Die Messungen wurden jeweils mit bzw. ohne Zugabe von Doxzyklin in das Kulturmedium der Zellen durchgeführt, so dass die Induzierbarkeit bestimmt werden konnte. Abb. 19 B zeigt die Zusammenfassung von drei Versuchsreihen, dargestellt in einem Balkendiagramm mit logarithmischem Maßstab. Als Positivkontrolle diente der TetR-Expressions-Vektor

pWHE120. Für alle fünf untersuchten EBNA1:TetR-Klone ist die Induzierbarkeit des Reportergens gegeben, unabhängig davon ob die Proteine das EBNA1-NLS enthalten (grüne Balken) oder nicht (blaue Balken).

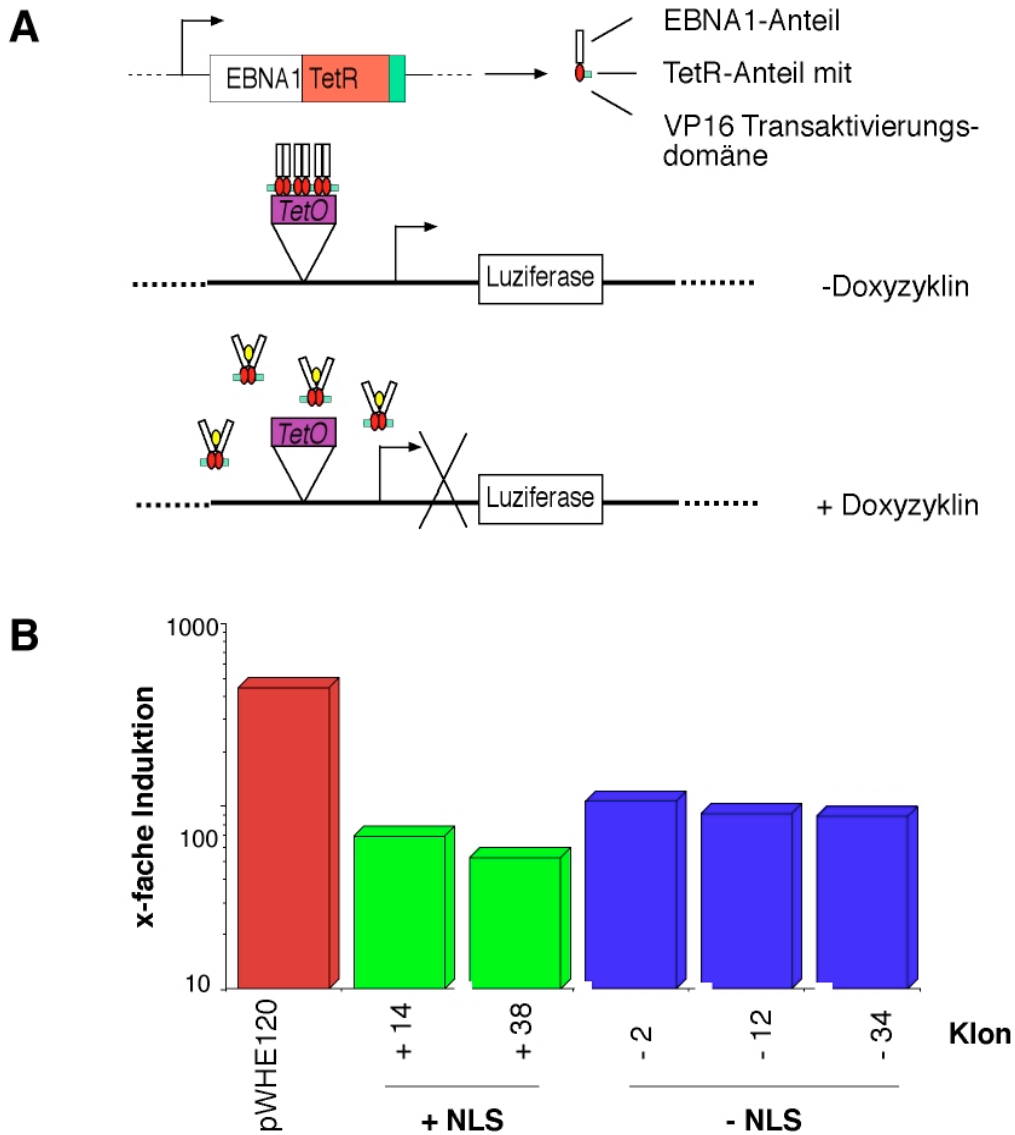


Abb. 19: EBNA1:TetR-Fusionsproteine binden an *TetO*-Motive und induzieren ein Reportergen:

(A) Schematische Darstellung der Reporter-Analysen: DNA, die für EBNA1:TetR kodiert, wurde transient in HeLaX1/6-Zellen transfiziert, die eine stabile Integration des Luziferase-Reportergens tragen. Das Luziferasegen wird von sieben *TetO*-Sequenzen in einem CMV-Minimal-Promotor transaktiviert. An den C-Terminus des TetR ist eine dreifache HSV VP16-Transaktivierungsdomäne fusioniert (grün). Wenn der TetR an die heptameren *TetO* band, aktivierte diese Transaktivierungsdomäne die Transkription des Luziferasegens. Bei Zugabe von Doxycyclin in das Zellkulturmedium wurde die Interaktion von TetR und *TetO* unterbrochen, so dass keine Luziferase exprimiert wurde. Durch Messung der relativen Licht-Einheiten (RLU) in Gegenwart bzw. Abwesenheit von Doxycyclin konnte die Induktionsrate des jeweiligen TetR-Fusionsproteins bestimmt werden.

(B) Induktionsraten verschiedener EBNA1:TetR-Fusionsproteine. Die DNAs von fünf individuellen EBNA1:TetR-Klonen (dargestellt durch verschiedenfarbige Balken auf der X-Achse) wurden auf ihre Luziferase-Induktion getestet. Als Positivkontrolle (rot) diente der TetR-Expressions-Vektor pWHE120. Die grünen Balken zeigen die Induktionsraten der Fusionsproteine, die das NLS von EBNA1 enthalten. Dieses Signal fehlt bei den Klonen, die durch blaue Balken dargestellt werden. Die Induktion ist auf der Ordinate in logarithmischem Maßstab dargestellt. Die Daten zeigen die Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten.

Die beiden Klone mit der höchsten Induzierbarkeit wurden für die weiterführenden Versuche ausgewählt. Dies waren die Klone -2 und -12, denen in beiden Fällen das EBNA1-NLS fehlt. Da die Δ NLS-Konstrukte das Reporter-gen transaktivierten, schien der TetR-Anteil die Lokalisation des chimären Proteins in den Zellkern zu vermitteln. Die Lokalisation von EBNA1:TetR im Zellkern bestätigte ich (V.3.5.). Damit ist das NLS von EBNA1 verzichtbar.

3.3. Etablierung EBNA1:TetR-exprimierender 293-D-Zelllinien

Die Reporter-Analysen zeigten *in vitro* eine Interaktion von EBNA1:TetR und *TetO*. Dabei besaßen die EBNA1:TetR-Fusionsproteine -2 und -12 die höchste Induktionsrate. Diese beiden Klone verwendete ich, um 293-D-Zelllinien mit stabiler EBNA1:TetR-Expression zu etablieren. Dazu wurde der EBNA1:TetR-Expressions-Vektor p2729.1 (Klon -2) bzw. 2729.2 (Klon -12) mit dem Neomycin-Resistenz-Vektor p2727 in 293-D-Zellen kotransfiziert. Nach klonaler Expansion wurden ausgewachsene Neomycin-resistente Klone mit einem polyklonalen TetR-Antikörper auf Expression der Fusionsproteine untersucht (nicht gezeigt, aber dem EBNA1:TetR-Signal in Abb. 20 B entsprechend). Das Migrations-Verhalten der EBNA1:TetR-Fusionsproteine und des nativen TetR stimmte nicht mit dem theoretisch errechneten Molekulargewicht überein (Theorie: ca. 60 kDa).

C. Berens (Erlangen) berichtete, dass eine hohe Expression des TetR die Induzierbarkeit negativ beeinflussen kann. Daher arbeitete ich im Verlauf dieser Arbeit mit zwei der etablierten Zelllinien, die sich nicht nur in der Expressionsstärke des Fusionsproteins (12.12 = schwache Expression, 2.2 = starke Expression) sondern auch in der Länge der Gly-Ala-Wiederholungen unterscheiden. Da ich keine signifikanten Differenzen der Versuchsergebnisse zwischen den beiden Linien nachweisen konnte, arbeitete ich später (V.3.9.) nur noch mit Klon 2.2. Ich entschied mich für diesen Klon, weil seine hohe Expressionsstärke es erlaubte, das Fusionsprotein verlässlich nachzuweisen. In Klon 12.12 war dies aufgrund der am Rande der Detektionsgrenze liegenden schwachen Expression nicht immer möglich.

3.4. Etablierung EBNA1 und EBNA1:TetR-exprimierender 293-Zelllinien

Das EBNA1:TetR-Fusionsprotein soll in Kooperation mit dem *TetO*-Motiv die extrachromosomale Erhaltung von *oriP*-Vektoren gewährleisten. Zur Replikation der Plasmide wird die Interaktion von EBNA1 mit dem *DS* benötigt (Krysan und Calos, 1993; Krysan et al., 1989). Es war daher notwendig, Zelllinien herzustellen, die sowohl das EBNA1:TetR-Fusionsprotein als auch das native EBNA1 exprimieren. Zur Etablierung von

Zelllinien mit stabiler Expression der beiden Proteine wurde das Plasmid p2774 in 2.2- und 12.12-Zellen mit einem GFP-Expressions-Plasmid kotransfiziert, um die Transfektions-Effizienz zu überprüfen. Das p2774 kodiert neben *ebna1* für das Hygromyzin-Resistenzgen. Das p2774-kodierte EBNA1 (416 Aminosäuren) enthält keine Gly-Ala-Wiederholungen mehr, so dass es in der PAGE schneller wandert als das EBNA1 aus p1327 (641 Aminosäuren, schematisch dargestellt in Abb. 20 A). Hygromyzin- und Neomycin-doppeltresistente Einzelzellklone wurden im Western-Blot auf Expression von EBNA1 und EBNA1:TetR untersucht. Für die weiteren Arbeiten wurden die Klone 2.2.10 (starke EBNA1:TetR-Expression, Abb. 20 B) und 12.12.A (schwache EBNA1:TetR-Expression, nicht gezeigt) verwendet. Beide Zelllinien enthalten auch das GFP-Gen stabil integriert. Die etablierten Zelllinien wurden in der Arbeitsgruppe von C. Berens (Erlangen) durch Reporter-Analysen untersucht. Sie wurden mit dem Luziferase-Reporterplasmid pUHC13-3 transfiziert, welches für das *TetO*-kontrollierte Luziferase-Gen kodiert (V.3.2.; Gossen und Bujard, 1992). Die Analysen ergaben, dass auch in den Zelllinien mit stabiler Expression von EBNA1:TetR das Protein Doxzyklyn-abhängig mit dem *TetO*-Bindemotiv interagiert (nicht gezeigt).

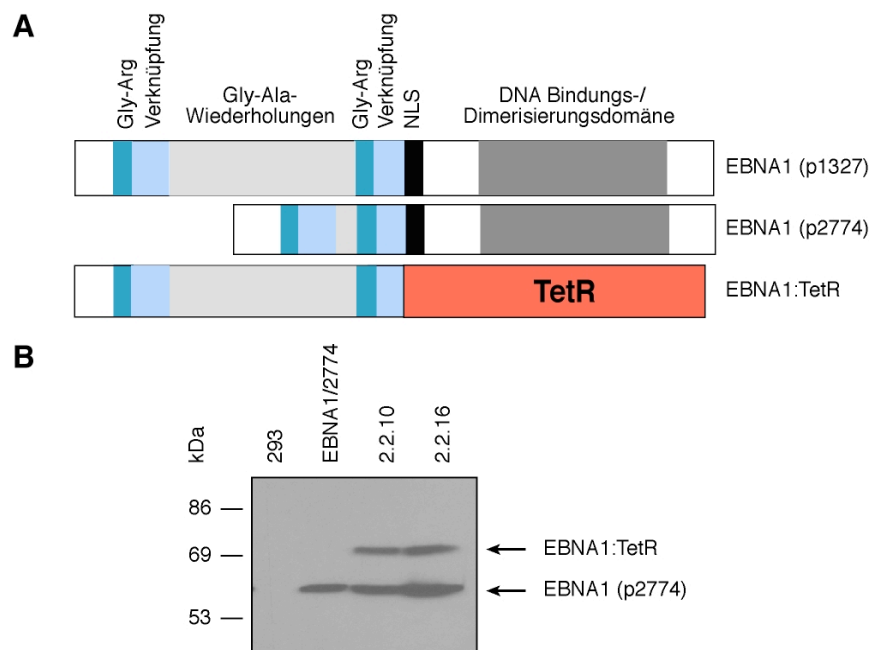


Abb. 20: Etablierung von 293-D-Zelllinien mit stabiler Expression von EBNA1 und EBNA1:TetR:

(A) Schema des EBNA1-Proteins aus p1327 (641 Aminosäuren, oben), des EBNA1 aus p2774 (416 Aminosäuren, Mitte) sowie des EBNA1:TetR-Fusionsproteins (unten). Die DNA-Bindedomäne des TetR ist rot dargestellt. Das EBNA1 aus p2774 enthält keine Gly-Ala-Wiederholungen, so dass das daraus gebildete Protein deutlich kleiner ist als das der EBNA1-Zelllinie (durch p1327 hergestellt). (B) Western-Blot-Analyse von zwei 293-D-Zellklonen auf die stabile Expression von EBNA1:TetR und EBNA1 (aus p2774). EBNA1 wurde mit dem monoklonalen EBNA1-Antikörper 1H4 nachgewiesen, das EBNA1:TetR-Protein mit einem polyklonalen TetR-Antikörper. Als Positivkontrolle wurden Extrakte aus transienten Transfektionen mit p2774 verwendet, als Negativkontrolle 293-D-Zellen. Klon 2.2.10 wurde für die weiteren Experimente verwendet.

3.5. Lokalisation des EBNA1:TetR-Proteins im Zellkern

Die EBNA1:TetR-Konstrukte, denen das EBNA1-NLS fehlt, konnten in den Reporter-Analysen das Luziferasegen transaktivieren (V.3.2. und V.3.4.). Dies legte nahe, dass der TetR die Lokalisation des chimären Proteins in den Zellkern vermitteln kann.

Zur Bestätigung der nukleären Lokalisation des Fusionsproteins stellte ich zytoplasmatische und nukleäre Extrakte der 2.2.10-Zelllinie für Western-Blot-Analysen her (Abb. 21). Der untere mit dem polyklonalen TetR-Antikörper gefärbte Western-Blot zeigt, dass das chimäre EBNA1:TetR-Protein vorrangig im Zellkern vorlag. Um die Qualität der Kernextrakte zu überprüfen, wurden sie zusätzlich durch einen MCM3-Immuno-Blot untersucht. MCM3 ist ein Replikationsprotein, das in der G1-Phase im Zellkern vorliegt (Labib et al., 2001). MCMs sind sehr empfindlich im Hinblick auf die Qualität der Extrakte (Donovan et al., 1997; Ritzi et al., 2003). Die Analysen bestätigten, dass die Herstellung der Proteinextrakte fachgerecht durchgeführt wurde und dass das EBNA1:TetR-Protein auch ohne NLS in den Zellkern transportiert wurde.

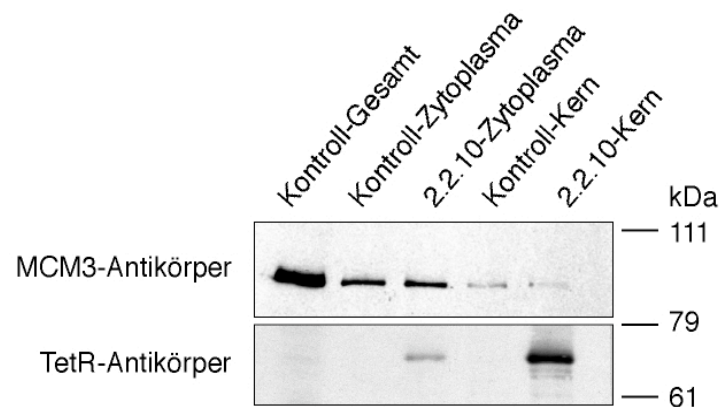


Abb. 21: Das EBNA1:TetR-Fusionsprotein ist vorrangig im Zellkern lokalisiert:

Nachweis, dass das EBNA1:TetR-Protein hauptsächlich im Zellkern vorliegt. Es wurden Gesamtzellextrakte sowie Kern- und Zytoplasmaextrakte einer Kontrollzelllinie (ohne TetR) und der EBNA1:TetR-exprimierenden 2.2.10-Zelllinie hergestellt. Mit den angegebenen Antikörpern wurden Western-Blots angefertigt. Der untere mit dem TetR-Antikörper behandelte Western-Blot zeigt, dass das EBNA1:TetR-Fusionsprotein zum größten Teil im Zellkern vorlag. Die obere Abbildung zeigt einen Western-Blot gegen das kernständige Replikationsprotein MCM3. Das Protein ist sehr empfindlich im Hinblick auf die Extraktpräparation. Der Nachweis von MCM3 im Zellkern beweist daher, dass die EBNA1:TetR-Lokalisation im Zellkern kein Artefakt der Präparation war.

3.6. Analysen zur Interaktion von EBNA1:TetR mit dem *TetO*-Motiv

Die Reporter-Analysen (V.3.2. und V.3.4.) mit Plasmiden bzw. Zelllinien lieferten erste Hinweise darauf, dass eine Doxyzyklin-abhängige Interaktion zwischen EBNA1:TetR und der *TetO*-Konsensus-Sequenz möglich ist. Zur weiteren Bestätigung wurde die Interaktion durch Gel-Retentions-Analysen untersucht. Mit dieser Technik konnte ich die molekulare

Interaktion von DNA (*TetO*-Sequenz), Protein (EBNA1:TetR) und Regulator (Doxyzyklin) demonstrieren. Ein repräsentatives Beispiel der Experimente ist in Abb. 22 für die 2.2.10-Zelllinie gezeigt.

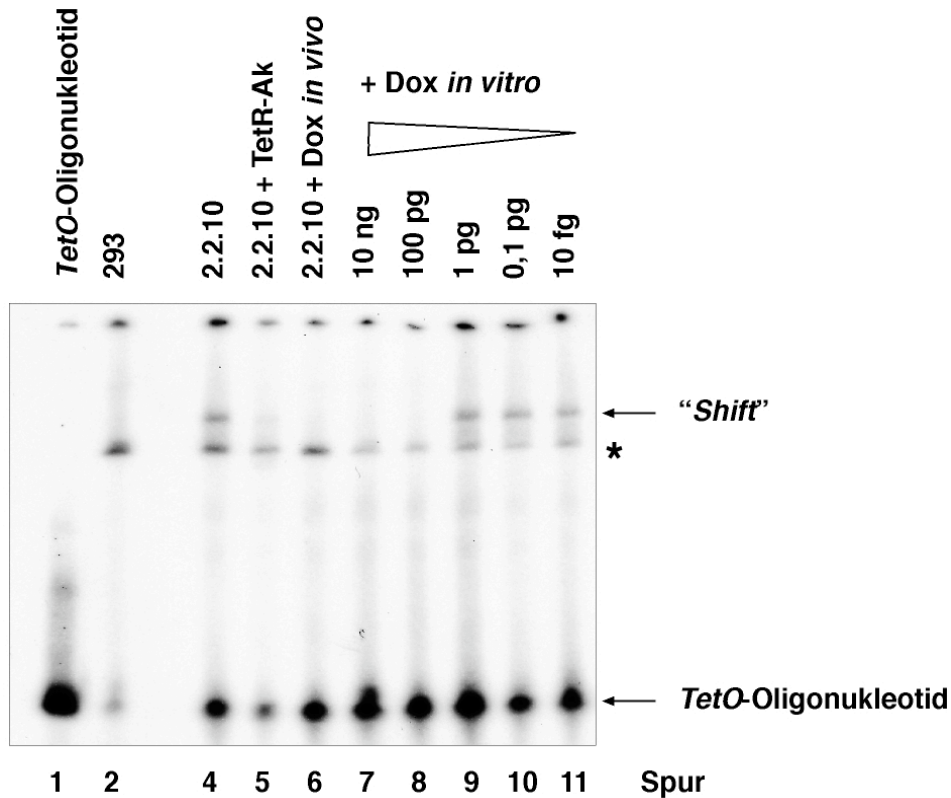


Abb. 22: EBNA1:TetR interagiert mit *TetO*-Motiven in Abhängigkeit von Doxyzyklin:

Repräsentative Gel-Retentions-Analyse zur Untersuchung der Doxyzyklin-regulierten Bindung von EBNA1:TetR mit dem *TetO*-Motiv: 2.2.10-Zellen (EBNA1:TetR, EBNA1) wurden entweder mit (2 µg/ml) oder ohne Doxyzyklin kultiviert. Anschließend wurden Zellextrakte hergestellt und mit einem radioaktiv markierten doppelsträngigen *TetO*-Oligonukleotid inkubiert (Spuren 4-11). Durch Interaktion bildete sich ein Protein-DNA-Komplex (durch einen Pfeil markiert), der im Gel langsamer wanderte als das DNA-Fragment alleine und der als „Shift“ bezeichnet wird (Spuren 4, 9-11). Bei Zugabe von Doxyzyklin verschwand der „Shift“ des *TetO*-Oligonukleotids, da der Komplex sich nicht bilden konnte (Spuren 6-8). Die Spuren 7-11 zeigen Zellextrakte aus Zellen, die *in vitro* mit unterschiedlichen Doxyzyklin-Konzentrationen und radioaktiv markiertem *TetO* inkubiert wurden. In Spur 6 erfolgte bereits im Kulturmedium eine Doxyzyklin-Zugabe von 2 µg/ml. In Spur 5 wurde polyklonaler Antikörper gegen den TetR zugegeben. Da der Antikörper auch gegen die DNA-Bindedomäne des Proteins gerichtet ist, löste sich der EBNA1:TetR-*TetO*-Komplex auf. In Spur 1 ist das *TetO*-Oligonukleotid ohne Zusatz von Proteinextrakten aufgetragen. In Spur 2 wurde die DNA mit Extrakten aus 293-Zellen inkubiert. Die im Autoradiogramm mit * markierte Bande stellt ein unspezifisches Signal dar.

Die Gel-Retentions-Analysen basieren darauf, dass ein radioaktiv markiertes DNA-Oligonukleotid (hier das doppelsträngige *TetO*-Motiv) mit Proteinextrakten inkubiert wird. Bei Interaktion von Protein und DNA entsteht ein Komplex, der aufgrund seiner Größe in PAA-Gelen langsamer läuft als das Oligonukleotid alleine (im Autoradiogramm von Abb. 22 mit einem Pfeil gekennzeichnet): Die DNA „shiftet“. Der EBNA1:TetR-*TetO*-Komplex ist in den Spuren 4, 9-11 der Autoradiographie zu sehen (Abb. 22). In den Spuren 6–8 ist kein

Protein-DNA-Komplex sichtbar, da hier Zellen (2 $\mu\text{g/ml}$, Spur 6) bzw. Zellextrakte mit Doxyzyklin inkubiert wurden (Spuren 7 und 8). Das Antibiotikum band an den TetR und verhinderte dadurch eine Interaktion des Proteins mit dem *TetO*. Die in den Spuren 7–11 gezeigte und in weiteren Versuchsreihen erweiterte Titration der Doxyzyklin-Zugabe ergab, dass bei einer Konzentration zwischen 10 und 1 pg Doxyzyklin im Reaktionsansatz eine Bildung des DNA-Protein-Komplexes wieder möglich wurde.

In Spur 5 wurde dem Reaktionsansatz ein Aliquot des polyklonalen TetR-Antikörpers zugegeben. Der „*Shift*“ verschwand hier fast vollständig. Die Zugabe des Antikörpers kann zu zwei verschiedenen Ergebnissen führen, je nachdem gegen welchen Teil des Proteins der Antikörper gerichtet ist. Wenn Protein, Antikörper und DNA einen trimeren Komplex bilden, verlangsamt sich die Migrationsgeschwindigkeit dieses sogenannten „*Supershifts*“ aufgrund seiner zusätzlichen Größe im Gel. Wenn der Antikörper gegen die DNA-Bindedomäne des Proteins gerichtet ist, kann kein DNA-Protein-Komplex entstehen: Das Signal verschwindet. Der hier verwendete polyklonale Antikörper ist gegen das gesamte Antigen gebildet worden u.a. auch gegen die DNA-Bindedomäne. Daher wurde der DNA-Protein-Komplex bei Zugabe des Antikörpers nicht gebildet (Spur 5). Die Negativkontrollen mit Extrakten aus 293-D-Zellen bzw. dem reinen Oligonukleotid sind in den Spuren 1 und 2 aufgetragen. Die Analysen zeigten, dass EBNA1:TetR und *TetO* Doxyzyklin-regulierbar interagieren.

3.7. Herstellung eines Vektors mit zwanzig *TetO*-Motiven

Die beschriebenen Ergebnisse zeigen, dass EBNA1:TetR und die *TetO*-Motive *in vitro* und *in vivo* miteinander interagieren. Des Weiteren konnte ich zeigen, dass diese Bindung durch Doxyzyklin regulierbar ist. Somit waren Voraussetzungen geschaffen, der Frage nachzugehen, ob das System aus Fusionsprotein und DNA-Bindemotiv es erlaubt, *oriP*-Vektoren extrachromosomal zu erhalten. Dazu wurde zunächst ein Vektor (p2762) kloniert, der zwanzig *TetO*-Bindestellen (20x *TetO*) enthält. Es wurden 20 Bindestellen verwendet, um das native System mit zwanzig EBNA1-Bindesequenzen nachzuahmen. Die 20x *TetO* multi-merisierte ich nach derselben Klonierungsstrategie, die Gossen und Bujard für die Erzeugung des *TetO*₇-Bindemotivs aus komplementären Oligonukleotiden mit zueinander kompatiblen Restriktionsenzymststellen verwendeten (Gossen und Bujard, 1992). Die beiden DNA-Sequenzen für ein *TetO*-Motiv (III.3.) wurden zunächst aneinandergelagert und dann gerichtet ligiert, indem die kompatiblen Enzyme *XhoI* und *SalI* verwendet wurden, die nach Spaltung denselben Überhang besitzen. Nach Auftrennung auf einem Agarosegel wurden Multimere

isoliert und kloniert. Als Zwischenprodukte entstanden *TetO*-Pentamere (p2757) und Dekamere (p2758), die zum finalen 20x *TetO*-Multimer (p2762) führten. Zusätzlich zur Überprüfung durch enzymatische Spaltung wurden die Vektoren sequenziert.

3.8. *In vivo*-Analysen der Doxyzyklin-abhängigen Interaktion des EBNA1:TetR-Proteins mit *TetO*-Vektoren

Die bisher gezeigten Ergebnisse beweisen, dass die EBNA1:TetR-Fusionsproteine in der Lage sind, Doxyzyklin-abhängig mit dem *TetO*-Motiv zu interagieren. In diesem Abschnitt beschreibe ich *in vivo*-Analysen der EBNA1:TetR-Interaktion mit 20x *TetO*-Vektoren.

Zunächst erfolgte die Funktions-Analyse an Replikations-inkompetenten Vektoren. In einem transienten Ansatz wurde der Vektor p2762 (20x *TetO*, GFP) in 2.2- und 12.12-Zellen (EBNA1:TetR) transfiziert. Die transfizierten grün fluoreszierenden Zellen wurden durch Sortierung mit dem FACS-Gerät angereichert und auf Duplikat-Platten aufgeteilt. Eine davon wurde mit und eine ohne 2 $\mu\text{g/ml}$ Doxyzyklin im Medium kultiviert. Anhand täglicher Durchfluss-Zytometrie-Analysen beider Platten wurde die Anzahl an grün fluoreszierenden Zellen in einer Zeitkurve bestimmt. Ohne Doxyzyklin-Zugabe sollten die Plasmide durch die EBNA1:TetR—*TetO*-Interaktion länger erhalten bleiben. Die Auswertung ließ keine quantitative Darstellung zu, weil in dem transienten System der Vektor-Verlust zu schnell erfolgte, um Unterschiede zu detektieren.

Nach dem nicht auswertbaren transienten Ansatz verwendete ich zur Analyse der EBNA1:TetR—*TetO*-Interaktion ein stabiles System mit replikationskompetenten Vektoren (schematische Darstellung in Abb. 23 A). Dazu wurden die Zelllinien 2.2, 12.12 (EBNA1:TetR), 2.2.10 und 12.12.A (EBNA1:TetR, EBNA1) sowie 293-D- und EBNA1-Zellen als Kontrollen benutzt. Als transiente Reporter dienten die vier Plasmide (p2832, p2833, p2835, p2903), die alle die Gene für Puromycin-Resistenz und eGFP enthalten. In p2835 sind die *FR* durch 20x *TetO* ersetzt. P2833 enthält zusätzlich zu *oriP* direkt 5' neben den *FR* 20x *TetO*. Die Negativkontrolle war p2903, die Positivkontrolle p2832 (nativer *oriP*). Über Plasmid-Wiedergewinnungs- (Abb. 24 A) bzw. Southern-Blot-Experimente (Abb. 24 B) wurde nach mehrwöchiger Puromycin-Selektion (zwischen 1 $\mu\text{g/ml}$ und 220 ng/ml) der Status der verschiedenen Vektoren (extrachromosomal, integriert) analysiert.

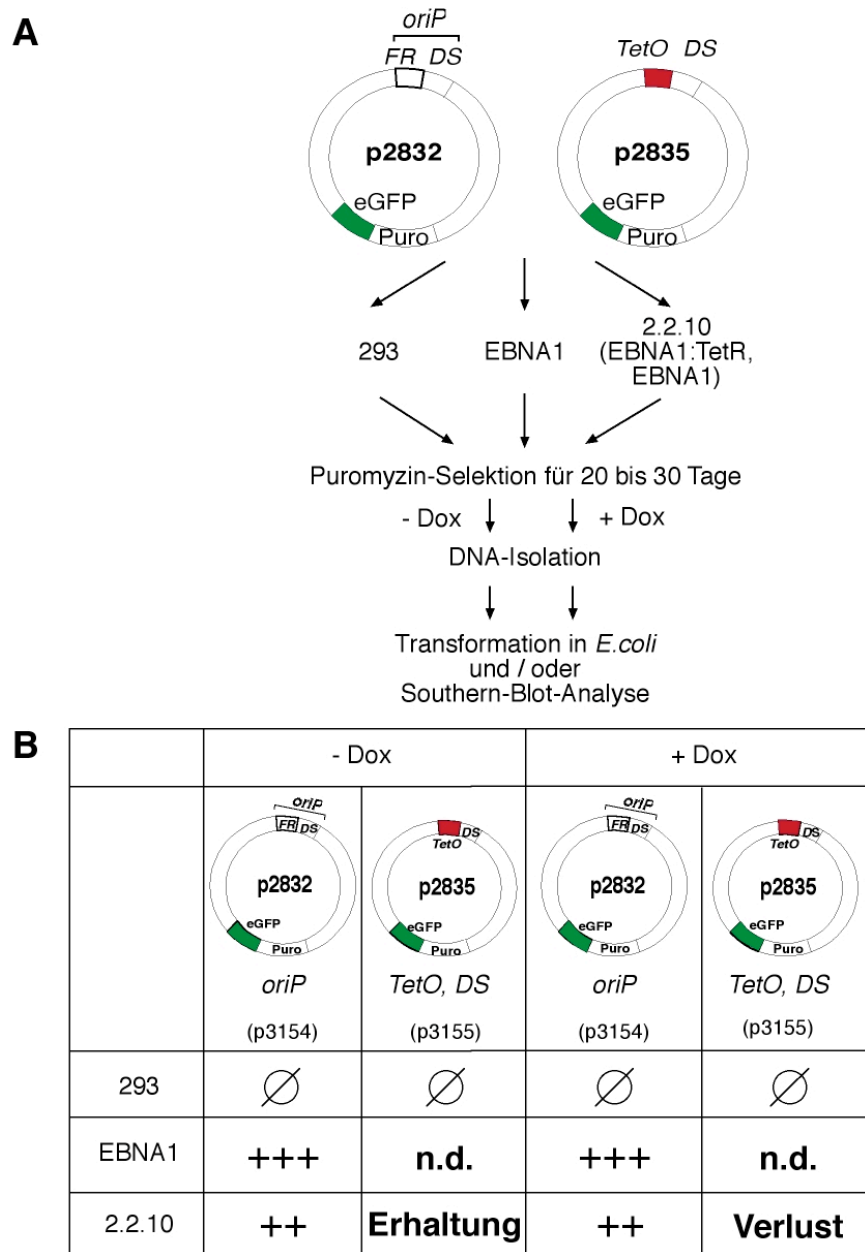


Abb. 23: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs zur Analyse der Funktionalität des EBNA1:TetR–*TetO*-Systems (A) und tabellarische Darstellung der Ergebnisse (B):

(A) In verschiedene Zelllinien (293-D, EBNA1, 2.2.10) wurden die Vektoren p2832 bzw. p2835 transfiziert. P2832 enthält *oriP*, während in p2835 die *FR* durch zwanzig *TetO*-Motive (20x *TetO*) ersetzt sind. Beide Plasmide kodieren für das Puromylin-Resistenzgen und für eGFP. Nach der Transfektion wurden die Zellen geteilt und unter Puromylin-Selektion mit oder ohne Doxzyklin-Zugabe so lange selektioniert, bis eine 14 cm Kulturschale konfluent bewachsen war. Durch HIRT-Extraktion wurde niedermolekulare DNA angereichert. Äquimolare DNA-Mengen wurden durch Plasmid-Wiedergewinnungs- (Abb. 24 A) und/oder durch Southern-Blot-Analysen (Abb. 24 B) auf replizierte extrachromosomale Plasmid-DNA untersucht.

(B) Tabellarische Darstellung der erwarteten und erhaltenen Ergebnisse: Extrachromosomale DNA wurde nur dann nachgewiesen, wenn die Zellen in der Lage waren, sowohl Replikation als auch Erhaltung des Plasmids zu gewährleisten. Die Replikation wurde durch Interaktion von EBNA1 mit dem *DS*-Element ermöglicht. EBNA1:TetR in Kooperation mit 20x *TetO* erlaubte die Erhaltung des Episoms. Die EBNA1-*oriP*-Interaktion war unabhängig von Doxzyklin und diente als Positivkontrolle (+). Die Vektor-Erhaltung durch EBNA1:TetR und 20x *TetO* war hingegen Doxzyklin-abhängig. Wenn Replikation oder Erhaltung der DNA nicht möglich waren, wurde keine extrachromosomale DNA detektiert (∅). „N.d.“ bedeutet, dass ich diese Kombination nicht statistisch analysiert habe. P3154 und p3155 entsprechen p2832 und p2835 mit dem Unterschied, dass erstere DsRed2 kodieren und letztere eGFP. Sie wurden für Plasmid-Verlust-Analysen verwendet (s. V.3.9.)

In ersten, nicht näher erläuterten Versuchsreihen habe ich die Versuchsbedingungen optimiert. Verfolgt habe ich die in Abb. 23 beschriebenen Kombinationen. Die Vektoren p2832 (ursprünglicher *oriP*) und p2835 (*FR* durch 20x *TetO* ersetzt) wurden in die Zelllinien 293-D, EBNA1 und 2.2.10 transfiziert. Nachdem unter Puromyzin-Selektion (220 ng/ml) jeweils mindestens eine konfluent bewachsene 14 cm Platte vorhanden war, wurde durch HIRT-Extraktionen niedermolekulare DNA angereichert. Die Konfluenz war in der Regel nach 2,5 bis vier Wochen erreicht. Dabei war diese Zeitspanne von Zelllinie, Plasmid und Puromyzin-Konzentration abhängig. Um ausschließlich replizierte Vektoren nachzuweisen, wurde die DNA mit *DpnI* gespalten. Dieses Methylierungs-sensitive Restriktionsenzym spaltet spezifisch nichtreplizierte methylierte DNA bakteriellen Ursprungs. Die so präparierten DNA-Proben wurden mit Plasmid-Wiedergewinnungs- und/oder Southern-Blot-Analysen auf die Gegenwart extrachromosomaler replizierter Vektoren untersucht. Die Ergebnisse sind in Abb. 23 B tabellarisch zusammengefasst.

Initiale Versuchsreihen ergaben, dass die 2.2.10-Zelllinie in der Lage war, *TetO*-Vektoren extrachromosomal zu erhalten. Im Gegensatz dazu konnten 293-D-Zellen sowie Vektoren ohne *oriP* (p2903) die Erhaltung nicht gewährleisten. Die als Positivkontrolle fungierenden EBNA1-Zellen zeigten die erwartete episomale Erhaltung des *oriP*-Plasmids p2832. Damit hatte ich gezeigt, dass die EBNA1:TetR-Fusionsproteine die extrachromosomale Erhaltung durch EBNA1 ersetzen können, wenn die Vektoren *TetO*-Motive enthalten.

Das nächste Ziel der Arbeit war, die Plasmid-Erhaltung auf die Doxzyklin-Regulierbarkeit hin zu untersuchen (Abb. 23). Die Transfektionsansätze wurden vor dem Start der Selektion auf Duplikat-Platten geteilt. Eine Platte wurde mit Zugabe von 2 µg/ml Doxzyklin im Medium bis zur Konfluenz kultiviert, die andere ohne. Die Konfluenz war auch hier je nach Zelllinie, Plasmid und Doxzyklin-Zusatz nach 2,5 bis vier Wochen erreicht. Äquimolare DNA-Mengen der *DpnI*-gespaltenen HIRT-Extrakte wurden sowohl über Plasmid-Wiedergewinnungs- (Abb. 24 A) als auch über Southern-Blot-Analysen (Abb. 24 B) untersucht.

Abb. 24 A zeigt die logarithmisch aufgetragenen Mittelwerte von über zwanzig Plasmid-Wiedergewinnungs-Analysen. Bei den als Negativkontrolle dienenden 293-D-Zellen bewegte sich die Anzahl der Kolonien in der Nähe der Nulllinie (0-3 Kolonien). P2835 (20x *TetO*, *DS*) transfizierte 2.2.10-Zellen (EBNA1:TetR, EBNA1) zeigten dagegen eine hohe Anzahl an Bakterienkolonien (ca. 80 Kolonien). Die Zellen waren somit in der Lage, die Vektoren extrachromosomal zu replizieren. Im Gegensatz dazu zeigten p2835 transfizierte 2.2.10-

Zellen mit Doxzyklin im Medium eine deutlich verringerte Anzahl an Kolonien, die ähnlich der Kolonienzahl der Negativkontrolle war (ca. 9 Kolonien). Dies offenbarte einen Vektor-Verlust. EBNA1-exprimierende-Zellen in Kooperation mit dem *oriP*-Vektor p2832 führten zu der höchsten Rückgewinnungsquote (zwischen 150 und 1000 Kolonien). Die Menge episomaler Vektoren wurde durch Doxzyklin-Zugabe nicht beeinflusst. Ein deutlicher Unterschied manifestierte sich zwischen den beiden EBNA1-positiven Zelllinien EBNA1 (alleine) und 2.2.10 (EBNA1, EBNA1:TetR). Bei den 2.2.10-Zellen war die Zahl der Bakterienkolonien deutlich geringer (ca. 150 Kolonien) als bei der EBNA1-Zelllinie (ca. 1000 Kolonien). Die für die Grafik präparierten Zellen stammten aus vielen verschiedenen Transfektionsansätzen, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Transfektion geerntet wurden. Vier bis fünf Wochen nach Transfektion war es kaum noch möglich, extrachromosomale DNA nachzuweisen. Der Zeitfaktor spielte daher bei der Menge der erhaltenen Bakterienkolonien eine erhebliche Rolle. Dadurch wurden die hohen Standard-Abweichungen bewirkt.

Mit Southern-Blot-Analysen ließ sich die konditionale Regulierbarkeit des EBNA1:TetR-*TetO*-Systems bestätigen (Abb. 24 B). Die Versuche wurden mit denselben DNA-Präparationen unternommen wie die Plasmid-Wiedergewinnungs-Analysen. Zur Detektion wurde die präparierte DNA mit *Bgl*III linearisiert und mit einer spezifischen Sonde auf replizierte extrachromosomale Vektoren analysiert. P2835 blieb in 2.2.10-Zellen in Abwesenheit von Doxzyklin extrachromosomal erhalten, da EBNA1 mit dem *DS*-Element die Replikation gewährleistete und gleichzeitig *TetO* und EBNA1:TetR die Erhaltung des Plasmids ermöglichten. Bei Doxzyklin-Zugabe in das Kulturmedium wurde die extrachromosomale Erhaltung unterbunden, da *TetO* und EBNA1:TetR nicht mehr interagieren konnten. Auch in diesen Ansätzen dienten die Kombination aus nativem EBNA1 und *oriP* als Positivkontrolle und 293-D-Zellen als Negativkontrolle. Beide Kontrollen zeigten die erwarteten, in Abbn. 23 B und 24 B dargestellten Ergebnisse. Die Extrakte aus 293-D-Zellen zeigten kein Signal für extrachromosomale Vektor-DNA, während p2832 transfizierte EBNA1-Zellen das Plasmid in hoher Kopienzahl episomal erhielten.

Die Ergebnisse der Southern-Blot- und der Plasmid-Wiedergewinnungs-Analysen verdeutlichen, dass das EBNA1:TetR-Fusionsprotein in Kooperation mit zwanzig *TetO*-Motiven die extrachromosomale Erhaltung von Vektoren durch EBNA1 ersetzen kann. Ferner konnte ich zeigen, dass diese Interaktion konditional durch Doxzyklin regulierbar ist.

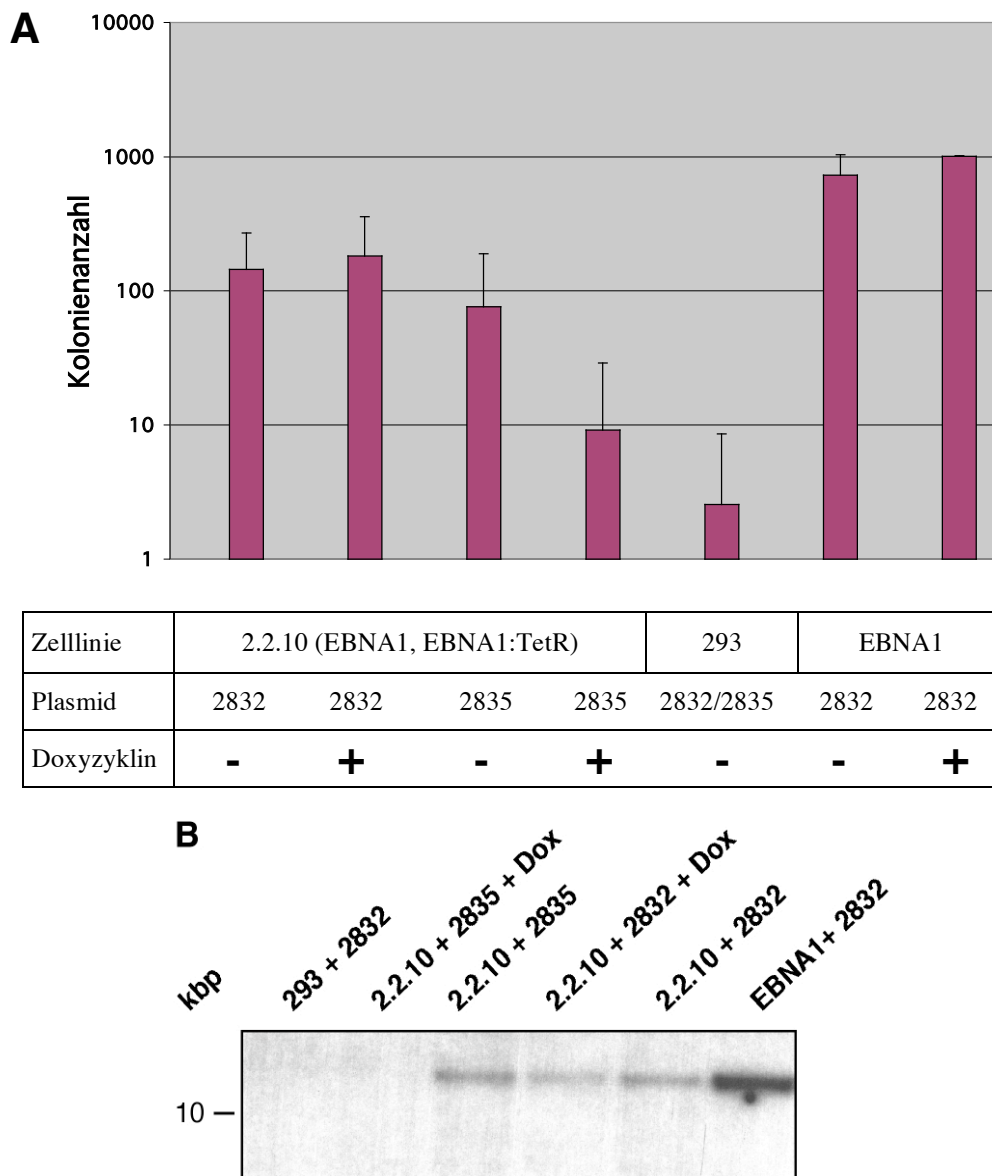


Abb. 24: Das EBNA1:TetR-Protein erlaubt die episomale Replikation von Vektoren mit 20x *TetO*:

In verschiedene 293-D-Zelllinien (293-D, EBNA1, 2.2.10) wurden die Vektoren p2832 bzw. p2835 transfiziert und analysiert, wie in Abb. 23 diskutiert. P2832 enthält *oriP*, während in p2835 die *FR* durch 20x *TetO*-Motive ersetzt sind. Die Zellen wurden nach Transfektion unter Puromyzin-Selektion mit oder ohne Doxyzyklin bis zur Konfluenz kultiviert. Anschließend wurde durch HIRT-Extraktion präferentiell niedermolekulare DNA präpariert. Äquimolare Mengen *DpnI*-gespaltener DNA wurden durch Plasmid-Wiedergewinnungs- (A) und/oder Southern-Blot- Analysen (B) auf episomal replizierte Vektor-DNA untersucht.

(A) Zusammenfassung von mehr als zwanzig Plasmid-Wiedergewinnungs-Experimenten: Unterhalb des Histogramms ist angegeben, welches Plasmid in die entsprechende Zelllinie transfiziert wurde und ob die Selektion in Gegenwart von Doxyzyklin erfolgte. Auf der Ordinate sind in logarithmischem Maßstab die Mittelwerte der Bakterienkolonienzahl aufgetragen. Die Standard-Abweichungen sind als dünne Balken dargestellt. 293-D-Zellen dienen als Negativkontrolle, EBNA1-Zellen mit p2832 als Positivkontrolle. P2832 blieb in EBNA1-positiven Zellen unabhängig von Doxyzyklin extrachromosomal erhalten, während der Status von p2835 in 2.2.10-Zellen durch Doxyzyklin reguliert wurde. Agarplatten mit sehr vielen Bakterien-Kolonien wurden auf 1000 Kolonien geschätzt. Bei EBNA1-Zellen mit p2832 unter Doxyzyklin-Selektion wurden alle Bakterienplatten auf diese Weise geschätzt, so dass keine Standard-Abweichung eingezeichnet wurde.

(B) Southern-Blot-Analyse äquimolarer Mengen *DpnI*- und *BglII*-gespaltener HIRT-Extrakte: Replizierte extrachromosomale Vektoren wurden durch spezifische Sonden nachgewiesen. Die Abbildung zeigt eine repräsentative Southern-Blot-Analyse, bei der linearisierte p2832 bzw. p2835 DNA als 12 kbp-Fragment nachgewiesen wurde.

3.9. Plasmid-Verlust-Analysen des EBNA1:TetR—*TetO*-Systems

Die Ergebnisse des Abschnitts V.3.8. zeigen, dass das EBNA1:TetR-Fusionsprotein in der Lage ist, *TetO*-Vektoren episomal zu erhalten. Dieser Prozess ist Doxyzyklin-abhängig. Um den Vektor-Verlust genauer zu untersuchen, führte ich Plasmid-Verlust-Analysen durch. Mit diesen untersuchte ich die Verlustrate der verschiedenen Vektoren (mit *FR* bzw. 20x *TetO*) in den Zelllinien und die Doxyzyklin-induzierten Unterschiede in der Verlust-Geschwindigkeit. Zur weiteren Bestätigung wollte ich analysieren, ob das System auch ohne Selektionsdruck funktional ist.

Bei den durchgeführten Experimenten wurden die Vektoren p3154 und p3155 in drei verschiedene Zelllinien (293-D, EBNA1, 2.2.10) transfiziert und die Plasmid-Verlustraten bestimmt (Abbn. 23 B und 25). Die Vektoren entsprechen den Plasmiden p2832 bzw. p2835 mit dem Unterschied, dass in ihnen das Gen für eGFP durch das Gen des monomeren rot fluoreszierenden Proteins (mRFP) ersetzt ist (Campbell et al., 2002). P3154 enthält den minimalen *oriP*, p3155 trägt *DS* und 20x *TetO*. Eine Umklonierung der Fluoreszenz-Farbstoffe war notwendig, da die 2.2.10-Zelllinie *egfp* stabil integriert trägt. Damit konnten keine FACS-Analysen anhand der GFP-Fluoreszenz unternommen werden. Die Transfektionsansätze wurden für einige Tage mit 220 ng/ml Puromycin anselektioniert. Die Selektion wurde so lange durchgeführt, bis eine genügende Anreicherung der rot fluoreszierenden Zellen (im weiteren Verlauf rote Zellen genannt) erreicht war (je nach Zelllinie und Plasmid etwa 40 bis 100 % der Zellen). Dieser Zeitpunkt wurde als „Tag 0“ definiert und war nach drei bis sechs Tagen erreicht. Die Zellen wurden am „Tag 0“ auf je zwei Platten geteilt und zugleich wurde das Puromycin-haltige Medium durch selektionsfreies Kulturmedium ersetzt. Eine der Duplikat-Platten wurde mit Zusatz von 2 µg/ml Doxyzyklin kultiviert, die andere ohne Antibiotikum. In einer Zeitreihe wurde im Abstand weniger Tage am FACS-Gerät der Prozentsatz an roten Zellen gemessen. Gleichzeitig wurden die Zellen am Mikroskop im Durchlicht und unter UV-Licht photographiert. Anhand der Photographien konnte durch manuelles Auszählen der Prozentsatz der roten Zellen bestimmt und mit den FACS-Daten verglichen werden. Die angestrebte Auswertung am FACS-Gerät war nicht möglich, da die Fluoreszenz des eGFP der 2.2.10-Zellen nicht vollständig absorbiert wurde und daher ein in den mRFP-Kanal strahlendes unspezifisches Signal erzeugte. Selbst eine starke Filter-Kompensation führte nicht zu auswertbaren Ergebnissen. Zusätzlich war der Filtersatz der verwendeten Laser nicht in der Lage, das Maximum des Emissions-Spektrums

von mRFP anzuregen. Aus diesen Gründen wurden die manuell erhobenen Werte verwendet, die jedoch eine quantitative Analyse nicht erlaubten.

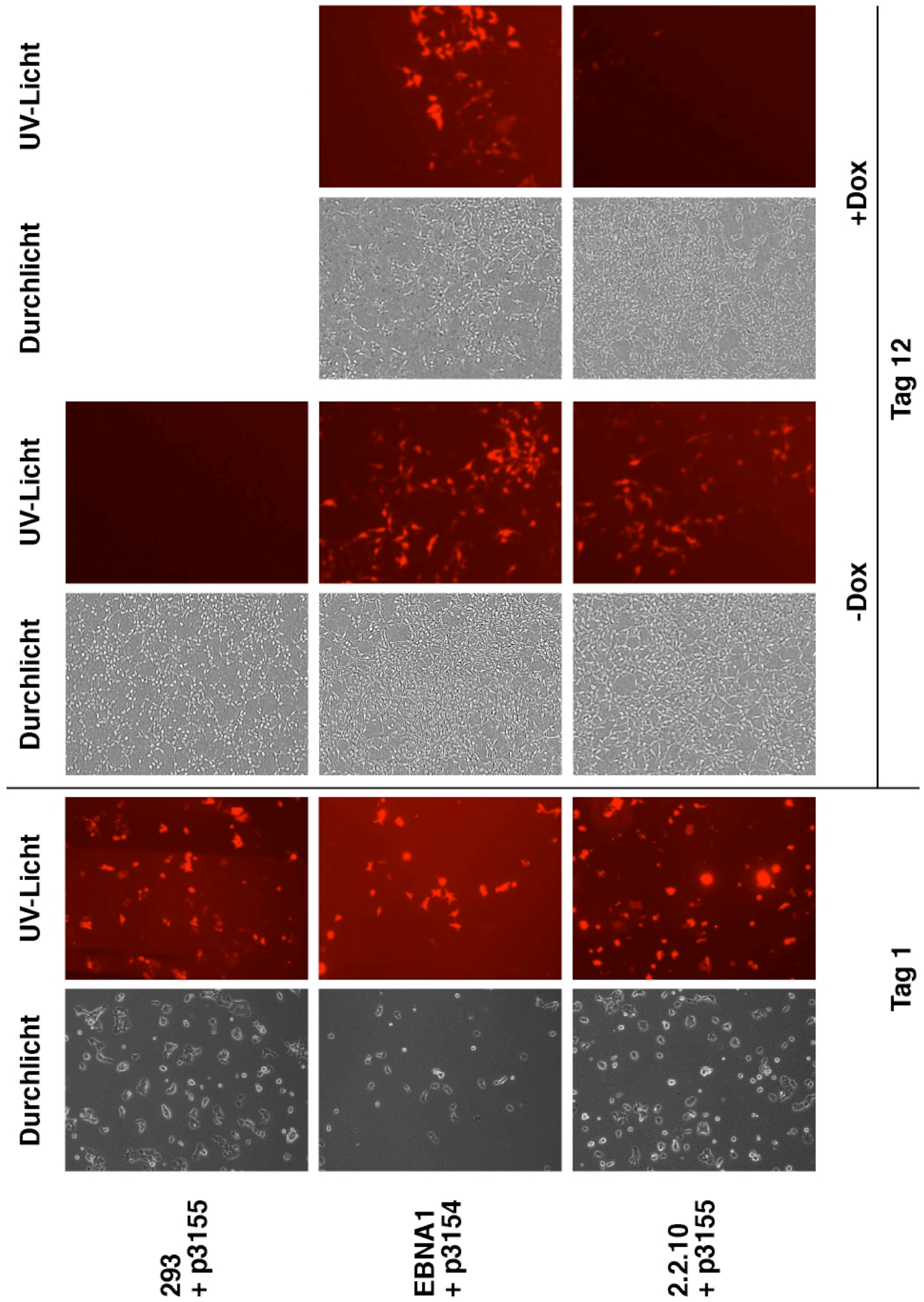
Im Verlauf der Zeitreihe nahm die Zahl der roten Zellen je nach Zelllinie, transfiziertem Vektor und Doxyzyklin-Zugabe unterschiedlich schnell ab. Die Experimente wurden so lange fortgeführt, bis bei 2835-transfizierten 2.2.10-Zellen mit Doxyzyklin-Zugabe so gut wie keine roten Zellen mehr nachweisbar waren. Dies war nach etwa zwei Wochen der Fall. Die Vektoren konnten anhand der Rot-Färbung in den Zellen nachgewiesen werden. Bei Verlust des Vektors wurde kein mRFP mehr gebildet, so dass die Zelle bei Anregung farblos erschien.

Abb. 25 zeigt Aufnahmen einer repräsentativen Versuchsreihe. An Tag 1 nach der Selektion erschien die Mehrheit der Zellen rot. An Tag 12 waren in 293-D-Zellen so gut wie keine roten Zellen mehr sichtbar. Dies zeigte den erwarteten vollständigen Verlust des Vektors an. In p3154 (*oriP*) transfizierten EBNA1-Zellen waren auch an Tag 12 noch rote Zellen in großer Zahl vorhanden. Dies war unabhängig von der Doxyzyklin-Zugabe und entsprach dem erwarteten Ergebnis, da EBNA1 und *oriP* vorhanden waren. Bei 2.2.10-Zellen (EBNA1:TetR, EBNA1) mit p2835 (20x *TetO*, *DS*) war das Ergebnis abhängig von der Doxyzyklinzugabe. Ohne Zusatz des Antibiotikums waren deutlich rote Zellen sichtbar. Bei Zugabe von Doxyzyklin hingegen waren so gut wie keine fluoreszierenden Zellen mehr nachweisbar, was einen (fast) vollständigen Verlust der Vektoren andeutete. Somit erlaubt das System aus EBNA1:TetR und *TetO* eine konditional regulierbare Vektor-Erhaltung. Insgesamt erfolgte der Verlust der mRFP-Expression und der damit angezeigte Plasmid-Verlust sehr schnell (innerhalb von weniger als zwei Wochen auf Werte unter 10 %). Die Verlustraten bei den verschiedenen Zelllinien waren sehr unterschiedlich.

Auch dieser Versuchsansatz belegt, dass EBNA1:TetR in Kooperation mit multimeren *TetO*-Sequenzen kleine Vektoren episomal erhalten kann.

Abb. 25 (folgende Seite): EBNA1:TetR unterstützt den episomalen Status von Vektoren mit 20x *TetO*:

Drei verschiedene Zelllinien (293-D, EBNA1, 2.2.10) wurden mit den Vektoren p3154 bzw. p3155 transfiziert. P3154 enthält ursprüngliches *oriP*, während in p3155 die *FR* durch 20x *TetO* ersetzt sind. Die Zellen wurden durch 125 ng/ml Puromyzin selektioniert, bis eine genügende Anreicherung an roten Zellen erreicht war. Zu diesem Zeitpunkt, als „Tag 0“ definiert, wurden die Zellen auf je zwei Platten mit normalem Kulturmedium geteilt. Eine der Duplikat-Platten wurde mit Zusatz von 2 µg/ml Doxyzyklin kultiviert, die andere ohne Antibiotikum-Zugabe. Im Abstand einiger Tage wurden Zellen von beiden Duplikat-Platten geerntet und der Anteil der roten Zellen im FACS sowie durch manuelles Auszählen anhand von Photographien bestimmt. Die Zeitreihe wurde so lange geführt, bis bei 2835-transfizierten 2.2.10-Zellen mit Doxyzyklin-Zugabe ins Kulturmedium praktisch keine roten Zellen mehr nachweisbar waren. Die Abbildung zeigt Photos einer repräsentativen Versuchsreihe. Die Photos wurden an Tag 1 (links) und Tag 12 (rechts) aufgenommen. Es sind jeweils ein Durchlicht- und das dazugehörige UV-Licht-Photo gezeigt. Bei Tag 12 sind im linken Bildteil Zellen abgebildet, die ohne Zusatz von Doxyzyklin wuchsen, im rechten solche, die mit Zusatz von 2 µg/ml des Antibiotikums kultiviert wurden. Die Abbildung zeigt vergrößerte Ausschnitte der aufgenommenen Photographien.



Tag 12

Tag 1

3.10. Wachstumstransformations-Analysen mit dem EBNA1:TetR-Protein

Das EBNA1:TetR-Fusionsprotein ist in der Lage, die Funktion von EBNA1 für die extrachromosomale Erhaltung in einer konditional regulierbaren Art zu ersetzen. Die Analysen wurden zunächst mit kleinen *oriP*-basierten Vektoren durchgeführt. Im nächsten Schritt sollte dieses System auf das Maxi-EBV übertragen und untersucht werden, ob das Chimär auch im Gesamt-EBV-Kontext funktional ist. Dies ist nach den beschriebenen Ergebnissen sehr wahrscheinlich. Des Weiteren sollte ein Einfluss des Fusionsproteins auf Virusproduktion und Wachstumstransformation untersucht werden.

Zur Untersuchung dieser Fragen integrierte ich das Gen für EBNA1:TetR in das Maxi-EBV-Genom. Außerdem war es notwendig die *FR* des *oriP* durch *TetO*-Motive zu ersetzen. Durch homologe Rekombination stellte ich zunächst das Maxi-EBV p2978 her, in dem die *FR* des nativen Maxi-EBV-p2089 vollständig durch zwanzig *TetO* ersetzt sind. In einem weiteren Schritt der homologen Rekombination ersetzte ich das endogene *ebna1* durch das Fusionsgen für EBNA1:TetR, das von einem CMV-Promotor kontrolliert wird. Das *ebna1:tetr* wurde im EBNA1-Lokus in unterschiedlichen Orientierungen integriert (p2988, p3085). Wie bereits die HMG-I:EBNA1-Maxi-EBV-Mutanten (V.2.5.) waren auch diese EBV-Derivate nicht in der Lage, Virus in 293-D-Zellen zu produzieren. Daher klonierte ich durch „*chromosomal building*“ auch das EBNA1:TetR-Fusionsgen so in den EBNA1-Lokus, dass es vom endogenen EBNA1-Promotor kontrolliert wird (p3201). Die Analyse auf Virusproduzenten ist bis zu diesem Zeitpunkt nicht abgeschlossen. Die hergestellten Maxi-EBVs p2978, p2988, p3085 und p3201 sind im Anhang und in Abb. 26 beschrieben.

4. HMG-I:TetR: Zusammenführung der Ergebnisse mit EBNA1:TetR- und HMG-I:EBNA1-Fusionsproteinen

Die Befunde, dass die HMG-I:EBNA1- und EBNA1:TetR-Fusionsproteine *TetO*-Vektoren episomal erhalten können (V.2. und V.3.), legen die Vermutung nahe, dass auch das vollständig heterologe HMG-I:TetR-Protein in der Lage ist, die extrachromosomale Erhaltung von Vektoren mit 20x *TetO* zu ermöglichen. Zur Überprüfung dieser Hypothese stellte ich verschiedene Maxi-EBV-Mutanten her, um sie auf episomale Erhaltung, Virusproduktion und Wachstumstransformation zu untersuchen. Die Mutanten p2989, p3086 und p3200 sind im Anhang und in Abb. 26 beschrieben und zeigten dieselben Probleme bei der Virusproduktion wie auch schon die HMG-I:EBNA1- (s.V.2.5.) und EBNA1:TetR-EBV-Mutanten (s.V.3.10.).

Zur Untersuchung der episomalen Erhaltung von Vektoren durch das HMG-I:EBNA1-*TetO*-System stellte ich eine 293-D-Zelllinie her (2971), in der sowohl EBNA1 als auch HMG-I:TetR stabil in das Wirtsgenom integriert sind. In diese Zelllinie 2971 wurden für die Analyse Vektoren transfiziert, die anstelle der *FR* 20x *TetO* besitzen. Die Untersuchung der Plasmiderhaltung erfolgte über Plasmid-Verlust- und Plasmid-Wiedergewinnungs-Experimente (s. V.3.8. und V.3.9.). Gegenwärtig werden die Untersuchungen von D. Pich weitergeführt. Die bisherigen vorläufigen Versuchsergebnisse deuten an, dass *TetO*-Vektoren durch HMG-I:EBNA1 episomal erhalten werden. Die konditionale Regulierbarkeit des episomalen Status durch Doxozyklin als Mediator ist bisher fraglich.

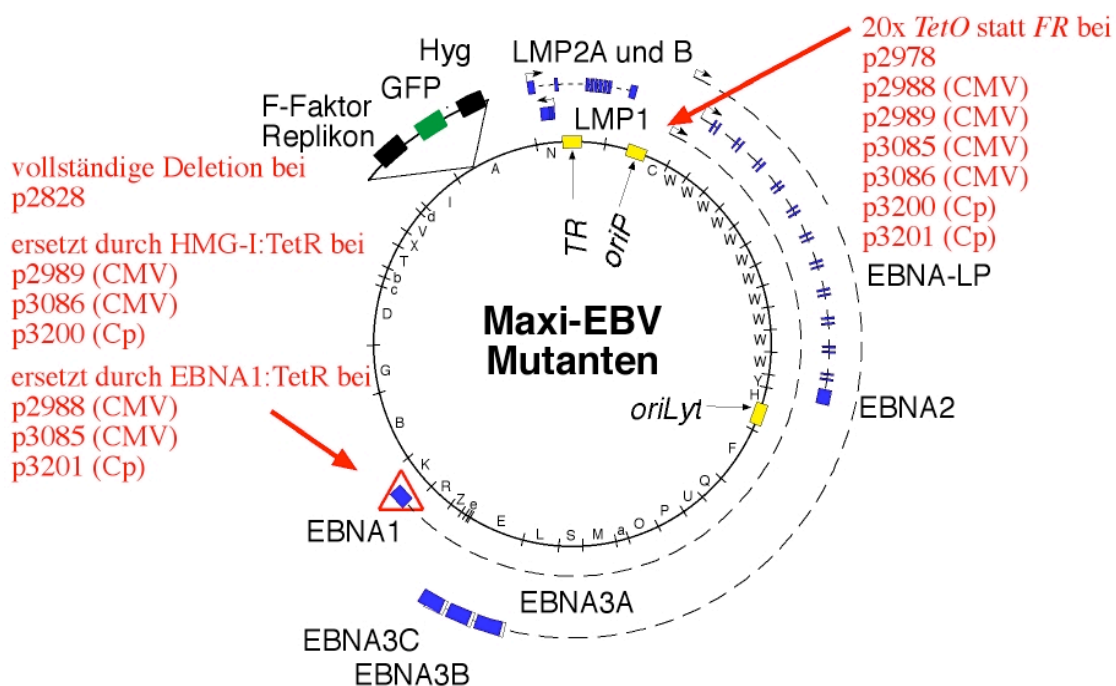


Abb. 26: Schematische Darstellung der Insertionsstellen von *ebna1:tetr* und *hmg-i:tetr* in das Maxi-EBV:

Die Abbildung zeigt schematisch das Genom des ursprünglichen Maxi-EBV-p2089 und die Loci, an denen dieses genetisch verändert wurde (durch Pfeile markiert). Die Fusionsgene für HMG-I:TetR bzw. EBNA1:TetR wurden im EBNA1-Lokus integriert. Die einzelnen Mutanten unterscheiden sich in der Orientierung der eingefügten DNA sowie den benutzten Promotoren (in Klammer angegeben). Die Vektoren p3200 und p3201 wurden durch „*chromosomal building*“ hergestellt, während bei den anderen Vektoren homologe Rekombination zu den EBV-Varianten führte. Bei allen hier gezeigten Mutanten war es notwendig, im *oriP* die *FR* durch *TetO*-Motive (20x *TetO*) zu ersetzen. Dieser mutierte Locus ist ebenfalls durch einen roten Pfeil markiert.

VI. Diskussion

1. Die Funktion von EBNA1 in EBV-infizierten B-Zellen bei der Initiation und Aufrechterhaltung des wachstumstransformierten Phänotyps

Die Fähigkeit des Epstein-Barr Virus, *in vitro* primäre humane B-Lymphozyten wachstumstransformieren, wurde vor über 30 Jahren beschrieben (Henle et al., 1979; Pope et al., 1968). EBNA1 ist das einzige latente EBV-Protein, das in allen EBV-assoziierten Tumoren gefunden wird. Es ist eines der Gene, die als absolut essentiell für die Wachstumstransformation von humanen B-Zellen *in vitro* eingeschätzt werden (zur Übersicht: Rickinson und Kieff, 2001). Neben EBNA1 werden nur wenige Proteine (wie z.B. EBNA2 und EBNA3A) im Genom von EBV als unabdingbar für die Wachstumstransformation von B-Zellen angesehen (zur Übersicht: Kieff und Rickinson, 2001). Bei einem weiteren viralen Genprodukt, dem LMP1-Protein, ist die Literaturlage zur Notwendigkeit widersprüchlich (Dirmeier et al., 2003; Kaye et al., 1993). Für EBNA1 fehlte bisher der direkte Beweis der unabdingbaren Bedeutung für die Wachstumstransformation, da die notwendigen technischen Methoden nicht zur Verfügung standen. Die Analyse der EBNA1-Funktion bei der Wachstumstransformation von primären humanen B-Zellen war ein Teil meiner Doktorarbeit.

Ein Großteil meiner Arbeit basiert auf dem Maxi-EBV-System. Um die Bedeutung von EBNA1 für die Wachstumstransformation untersuchen zu können, habe ich die Δ EBNA1-Maxi-EBV-Mutante p2828 hergestellt. Ein Vorteil des Maxi-EBV-Systems sind die höheren, für die Erzeugung der Δ EBNA1-LCLs notwendigen, Virustiter, die mit einem klassischen System sicherlich nicht zu erreichen gewesen wären. Außerdem können bei der klassischen Methode unerwünschte Rekombinationen nicht ausgeschlossen werden (Norio et al., 2000). Zur Wachstumstransformation wurden Δ EBNA1-Viren benötigt. Zur Produktion dieser Viren war es aufgrund der EBNA1-Funktionen für die Replikation und die extrachromosomale Erhaltung des EBV notwendig, ein System zu etablieren, in dem das Δ EBNA1-p2828-Maxi-EBV stabil episomal in 293-D-Zellen propagiert wird. Dafür musste das in *cis* deletierte EBNA1 in *trans* ersetzt werden. Dazu wurde das EBNA1-negative p2828 gemeinsam mit einem EBNA1-exprimierenden pHeBo-Vektor stabil in 293-D-Zellen transfiziert (Klon 2/4.6). Als weitere Virusproduzenten dienten HMG-I:EBNA1- (2679.5) bzw. H1:EBNA1-Zellen (2680.16), die p2828 nach Transfektion extrachromosomal als Episome propagierten. Es war mit jedem der drei Ansätze möglich, genetisch homogene Virussuspensionen mit bis zu 1×10^6 Viren pro ml herzustellen.

Die Infektion von B-Zellen mit Δ EBNA-Viren zeigte, dass EBNA1 für die Infektion entbehrlich ist. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass im lytischen Zyklus EBNA1-Moleküle mit in die Virionen verpackt wurden, die bei der Infektion eine Rolle spielten. Die EBNA1-Funktionen für die Replikation und die extrachromosomale Erhaltung des Virus machen eine Beteiligung bei der Primärinfektion jedoch unwahrscheinlich (zur Übersicht: Leight und Sugden, 2000).

Δ EBNA1-EBV kann B-Zellen unter bestimmten Bedingungen wachstumstransformieren

Mit den Δ EBNA1-Viren infizierte ich primäre humane B-Zellen. Im Gegensatz zu der erwarteten essentiellen Rolle von EBNA1 konnte ich wachstumstransformierte LCLs etablieren. Insgesamt konnte ich aus über 30 Versuchsreihen (mehr als 17.000 Einzelansätze) nur 31 Δ EBNA1-LCLs aus Zellen von acht Spendern etablieren. 26 dieser LCLs wurden mit Zellen von drei Spendern erzeugt. Das seltene Ereignis der Wachstumstransformation und die Tatsache, dass die Zellen aus wenigen Spendern stammten, legen die Vermutung nahe, dass es für diesen Prozess zusätzlich zu den viralen Voraussetzungen auch bestimmter Prädispositionen seitens der B-Zellen bedarf. Die Deletion von EBNA1 reduzierte die Effizienz des Wachstumstransformations-Prozesses um das mindestens 10.000- bis 100.000-fache, im Vergleich zur Verwendung von nativem 2089-Virus (Dirmeier et al., 2003; Humme et al., 2003). Die extrem niedrige Rate der Wachstumstransformation durch Δ EBNA1-2828-EBV erlaubte es nicht die genaue Frequenz zu bestimmen.

Integration in das Wirtszellgenom

Das EBV-Genom liegt normalerweise als Episom in der Wirtszelle vor. EBNA1 spielt für diese extrachromosomale Erhaltung und die Replikation des Virus eine zentrale Rolle. Daher stellte sich die Frage, in welchem Status das Genom in Δ EBNA1-LCLs vorliegt. Die Analyse der Δ EBNA1-LCLs über Gardella-Gel- und FISH-Analysen ergab, dass bei Δ EBNA1-2828-LCLs das virale Episom ausnahmslos an multiplen Stellen in das Wirtsgenom integriert war (Abbn. 13 H und 14). Da die Etablierung von Zelllinien mit stabilen DNA-Integrationen ein wesentlich selteneres Ereignis ist, als die episomale Aufrechterhaltung von pHeBo-Vektoren, bietet die Integration eine Erklärung für die Seltenheit der Wachstumstransformation.

Die Beobachtung der multiplen Integrationen kann durch zwei Theorien erklärt werden. Eine Theorie besagt, dass nach der EBV-Infektion in einigen B-Zellen ein abortiver lytischer Zyklus erfolgt (Beobachtung M. Altmann, München; Pfuller und Hammerschmidt, 1996).

Demnach wird das virale Genom nach der Infektion über den lytischen Zyklus amplifiziert (Abb. 1 A). Im Fall der Δ EBNA1-LCLs könnten mehrere dieser amplifizierten Genome in das Wirtsgenom integriert sein. Ein abortiver lytischer Zyklus würde auch die Integration konkatemerer DNA erklären, die durch bestimmte Ergebnisse nahegelegt werden, die später diskutiert werden. Eine zweite Erklärungsmöglichkeit der multiplen Integrationen ist, dass eine B-Zelle gleichzeitig durch mehrere Viren infiziert wurde, und dies zu mehrfachen Integrationen führte. Diese Erklärung ist unwahrscheinlich, da eine Konzentrierung der Virusüberstände nicht zu einer Erhöhung der Transformationsrate führte und, da bei den Analysen 10^5 B-Zellen mit maximal gleichen Mengen infektiöser Viren infiziert wurden. Beide Theorien zu den multiplen Integrationen erklären jedoch eine zusätzliche Verringerung der ohnehin geringen Wachstumstransformationsrate.

Die genetische Integrität des Virusgenoms wurde über Southern-Blot-Analysen anhand gesamt-genomischer DNA aus Δ EBNA1-2828-LCLs untersucht. Dabei wurde die charakteristische Fragmentabfolge des Maxi-EBVs sichtbar. Es war nicht möglich, Abweichungen vom Bandenmuster nachzuweisen. Dies deutet darauf hin, dass keine größeren Deletionen durch die Integration entstanden waren. Die Untersuchung des Bandenmusters wurde weithin durchgeführt, um die Integrationsstelle im Virusgenom bestimmen zu können. Das Bandenmuster im Southern-Blot entsprach der Vorhersage für das zirkuläre Δ EBNA1-EBV-Genom. Die in jeder der Δ EBNA1-Zelllinien gefundenen multiplen Integrationsereignisse erfolgten wahrscheinlich jeweils an unterschiedlichen Stellen des Virusgenoms. Dadurch entstanden im Southern-Blot verschiedene Fragmente, die insgesamt die episomale Fragmentabfolge des intakten Virus widerspiegeln und eine Identifikation des Integrationslokus nicht erlaubten. Es ist außerdem möglich, dass das Virusgenom in mehreren aneinanderhängenden (konkatemer) Kopien integrierte und damit das native Bandenmuster im Southern-Blot wieder herstellte. Die Integration von Konkatemerem bedingt eine EBNA1-unabhängige Replikation, die ein abortiver lytischer Zyklus ermöglichen würde.

Eine naheliegende Integrationsstelle des Virusgenoms waren die *TR*, über die z.B. in der Burkitt-Lymphom-Zelllinie Namalwa die Integration erfolgte (Matsuo et al., 1984). Um dies zu untersuchen, bot es sich an, die LMP2A-Expression zu analysieren. Die kodierende Sequenz von LMP2A erstreckt sich über das Verpackungssignal der *TR*. Da EBV als lineare DNA im Virion vorliegt, muss das virale Genom zur Transkription von *Imp2a* zunächst zirkularisiert werden (Laux et al., 1988). Die Detektion von LMP2A in den Δ EBNA1-LCLs (Ausnahme Spur 8 in Abb. 13 F) könnte, zusätzlich zu den Southern-Blot-Daten, darauf

hindeuten, dass die Integration des viralen Genoms erst nach der Zirkularisierung erfolgte und nicht direkt nach dem Viruseintritt. Eine Integration konkatemerer DNA wäre auch für die LMP2A-Expression eine Erklärungsmöglichkeit. Die Untersuchung der Integrationsloci im viralen Genom ist technisch möglich, jedoch sehr aufwändig. Aufgrund des geringen Erkenntnisgewinns wurden die Analysen nicht durchgeführt.

Bei den Integrationen des viralen Genoms kann nicht ausgeschlossen werden, dass wichtige zelluläre Gene (z.B. Tumor-Suppressorgene oder Proto-Onkogene wie *p53* oder *c-myc*) betroffen wurden. Eine solche Insertions-Mutagenese wurde kürzlich bei gentherapeutischen-Ansätzen SCID-X1 kranker Kinder publiziert (Hacein-Bey-Abina et al., 2003). Bei diesen klinischen Studien integrierten die verwendeten Retrovirusvektoren lokusspezifisch und verursachten durch deregulierte Gen-Expression eine maligne Zellproliferation. Ich halte es jedoch für unwahrscheinlich, dass bei den in dieser Arbeit etablierten Δ EBNA1-LCLs der Integrationsort des Maxi-EBV für die Wachstumstransformation der B-Zellen verantwortlich ist. Wenn dies der Fall wäre, sollten auch bei Infektionen mit Δ EBNA2- und Δ EBNA-LP-Viren proliferierende LCLs entstehen, was nicht der Fall ist (persönliche Mitteilung W. Hammerschmidt, München; Hammerschmidt und Sugden, 1989). Die FISH-Daten zeigen zusätzlich, dass die Integrationen in verschiedenen Chromosomen erfolgten und es keine Präferenz spezifischer Chromosomenloci gab (Abb. 14).

Um den Phänotyp der Integration und der geringen Transformationsfrequenz auf die EBNA1-Deletion zurückzuführen, *trans*-komplementierte ich die Δ EBNA1-Viren während der Infektion primärer B-Lymphozyten mit nativem EBNA1. Primäre B-Zellen können *in vitro* mit guter Effizienz infiziert, jedoch nur sehr eingeschränkt mit DNA transfiziert werden (Kempkes et al., 1995). Daher wurde durch Verpackung in der Zelllinie TR2- das Komplementations-Virus 2852 hergestellt, das neben *ebna1* noch *dsred* als Detektionsmarker enthält. Die aus Koinfektionen mit 2828- und 2852-Virionen entstandenen *trans*-komplementierten LCLs waren phänotypisch nicht von nativen LCLs zu unterscheiden. Sie erhielten nicht nur das episomale Virusgenom in hoher Kopienzahl, sondern exprimierten auch alle untersuchten latenten Gene (Abbn. 13 und 14). Die Koinfektionsrate von 2828-Viren mit 2852-Virionen lag in derselben geringen Größenordnung wie die Etablierung von Δ EBNA1-LCLs. Aus mehr als 15 Experimenten (über 5000 Einzelansätze) wuchsen nur bei zwei Spendern insgesamt sechs LCLs aus. Das sehr seltene Ereignis der Koinfektion basiert wahrscheinlich darauf, dass eine B-Zelle erfolgreich von zwei verschiedenen Viren infiziert werden muss. Die Titer der Virussuspensionen müssen daher hoch sein. Bei einer zu starken

Überinfektion sterben die Zellen allerdings. Zusätzlich bestehen vermutlich bestimmte Voraussetzungen seitens der B-Zelle, welche die Rate der *trans*-komplementierten LCLs weiter verringern. Es ist außerdem nicht auszuschließen, dass die gebildeten sehr hohen Mengen an EBNA1 toxisch auf die Zellen wirken (Kennedy et al., 2003). Es ist jedoch eindeutig, dass die Präsenz von EBNA1 den episomalen Status des Virus gewährleistet.

Expression der latenten Gene

Ein weiterer für die Wachstumstransformation wichtiger Faktor ist die notwendige Expression einiger latenter Gene (wie *lmp1*, *ebna-lp*, *ebna2*, *ebna3a*, *-3b*, und *3c*) von den *Cp*- und *Wp*-Promotoren (Rickinson und Kieff, 2001). Dabei erfolgt bei der zeitlichen Regulation der Gene ein Promotorwechsel vom *Wp*- zum *Cp*-Promotor. Die Transkriptionseinheiten der erwähnten latenten Gene umspannen einen großen Teil des viralen Genoms von über 100 kbp (Abb. 1). Die Integration des Virus darf folglich nicht in diesen Bereichen erfolgen, um die Proteinexpression zu gewährleisten. Dadurch schränkt sich der Integrationsbereich erheblich ein und reduziert so die Rate der Wachstumstransformation der Δ EBNA1-LCLs weiter. Außerdem erklärt die Notwendigkeit der genetischen Integrität die multiplen Integrationsereignisse der analysierten Δ EBNA1-LCLs. Viele Kopien erhöhen die Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen die Proteinexpression unterstützenden Integration. Ein weiterer Punkt, der die Komplexität der Wachstumstransformation erhöht, ist, dass EBNA1 den *Cp*-Promotor über das *FR*-Element transaktiviert und damit die Expression der latenten Gene beeinflusst (Borestrom et al., 2003). Anhand der Western-Blot-Analysen gegen EBNA2, -3B, -3C, LMP1 und -2A war ersichtlich, dass die Expressionsstärken der analysierten latenten Proteine unabhängig von EBNA1 zu sein scheinen. Da die latenten Gene gemeinsame Promotoren verwenden, ist es wahrscheinlich, dass auch die nicht untersuchten Proteine EBNA3A, -LP und LMP2B gebildet wurden. Obwohl der Wechsel vom *Wp*- zum EBNA1-regulierten *Cp*-Promotor ein allgemein akzeptierter Schritt bei der zeitlichen Regulation der latenten viralen Gene ist, wäre es denkbar, dass er in Δ EBNA1-LCLs nicht erfolgt (zur Übersicht: Rickinson und Kieff, 2001).

EBNA1 ist bei der Tumorentstehung im SCID-Maus-Modell entbehrlich

Eine Vielzahl von Publikationen legen eine Rolle von EBNA1 bei wachstumstransformierenden oder onkogenen Prozessen nahe. Daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass das Protein ein tumorigenes Potential besitzt. So wird EBNA1 mit verschiedenen Tumoren wie Burkitt-Lymphomen assoziiert und soll in transgenen Mäusen tumorigen sein (Rickinson

und Kieff, 2001; Tsimbouri et al., 2002; Wilson und Levine, 1992). Bisher war es nicht möglich, den Beitrag von EBNA1 zur Tumorentwicklung im Gesamt-EBV zu untersuchen. Die in dieser Arbeit hergestellten LCLs bot zum ersten Mal die Möglichkeit das onkogene Potential von Δ EBNA1-LCLs im Vergleich zu EBNA1-positiven LCLs zu untersuchen. Dafür wurde das etablierte SCID-Maus-Modell verwendet (zur Übersicht: Johannessen und Crawford, 1999; Rowe et al., 1991). Alle untersuchten LCLs waren - im Gegensatz zu Δ LMP1-LCLs - ungeachtet ihres EBNA1-Status, in der Lage, in SCID Mäusen zu proliferieren und malignes Wachstum zu induzieren (Dirmeier et al., 2003; Humme et al., 2003). Meine Ergebnisse zeigen daher, dass EBNA1 nicht als essentielles Onkogen angesehen werden kann. Die hier präsentierten Ergebnisse stehen damit im Gegensatz zu Beobachtungen von Wilson und Kollegen, die eine Tumorentwicklung in EBNA1-transgenen Mäusen beschreiben (Wilson und Levine, 1992). Die Untersuchungen dieser Arbeitsgruppe werden jedoch kontrovers diskutiert: Bei den klassisch erzeugten transgenen Mäusen ist es nicht eindeutig, ob die Tumore aufgrund der EBNA1-Expression oder wegen unkalkulierbarer Faktoren entstanden (z.B. Integrationsort des Transgens, Einfluss des Transgens auf benachbarte Gene). Auch die Reproduzierbarkeit der Tumorentstehung ist fraglich. In der Literatur wird diskutiert, ob die potentielle transformierende Funktion von EBNA1 mit der Aktivierung zellulärer Gene wie z.B. von RAG 1 und -2 oder CD25 korreliert (Kube et al., 1999; Kuhn-Hallek et al., 1995; Srinivas und Sixbey, 1995). Die RAG-Proteine sind an der intergenen Rekombination in der B-Zell-Entwicklung und damit der genetischen Instabilität beteiligt (Zhang et al., 2003). Eine Rolle von EBNA1 in der Onkogenese könnte auch durch antiapoptotische Funktionen des Proteins entstehen (Kennedy et al., 2003). Diese könnten durch Proteine der Bcl2-Protein-Familie vermittelt werden, die mit EBNA1 assoziiert werden (Khabir et al., 2003; Komano et al., 1998; Tsimbouri et al., 2002). Meine Ergebnisse korrelieren allerdings eher mit einer Studie, in der nicht EBNA1 eine Rolle bei der Entstehung von Burkitt-Lymphomen spielt, sondern die EBERs (Kitagawa et al., 2000). Nach meinen Beobachtungen kann der Einfluss von EBNA1 auf die Regulation zellulärer Proteine nicht essentiell für die Wachstumstransformation oder Onkogenese sein. Dies stimmt mit der Beobachtung überein, dass EBNA1 in Gen-Expressions-Analysen keine Induktion zellulärer Gene zeigt (Kang et al., 2001).

Die im Rahmen meiner Doktorarbeit erzielten Ergebnisse bieten genetische Beweise dafür, dass EBNA1 ein für die Infektion und Wachstumstransformation entbehrliches Genprodukt von EBV ist. Im Gegensatz zu Δ LMP1, Δ EBNA2- oder Δ EBNA-LP-Mutanten kann

Δ EBNA1-Maxi-EBV primäre B-Zellen wachstumstransformieren und auch immortalisieren (unpublizierte Ergebnisse W. Hammerschmidt, München; Hammerschmidt und Sugden, 1989; Humme et al., 2003). Der Unterschied zwischen diesen beiden Prozessen besteht u.a. in der Kultivierungsdauer der Zellen. Nach der Etablierung des EBV und initialer Proliferation (Wachstumstransformation) muss die Zelle eine proliferative Krise überstehen. Diese Krise erfolgt in der Regel nach 90 bis 150 Zellteilungen und wird durchschnittlich nur von jeder vierten Zelle überstanden (Counter et al., 1994; Tahara et al., 1997). Erst danach erreichen die Zellen einen immortalen Status. Die Herstellung der Δ EBNA1-LCLs war zwar schwierig, aber nach Etablierung wuchsen alle Zelllinien (mit Ausnahme der Linie, bei der LMP2A ebenfalls nicht gebildet wird) ohne Unterstützung von Fibroblastenzellen für mindestens fünf Monate in Zellkultur. Dabei sind sie phänotypisch nicht von nativen LCLs zu unterscheiden. Die Δ EBNA1-LCLs sind daher als immortal anzusehen. Dies ist anders als bei den wachstumstransformierten, aber nicht immortalisierten Δ LMP1-LCLs, die im SCID-Maus-System nicht onkogen sind und die ohne Fibroblastenzellen nicht *in vitro* proliferieren (Dirmeier et al., 2003). Die Fibroblasten geben parakrine Faktoren in das Medium ab, welche die Proliferation anderer Zellen erleichtern und beschleunigen (Sugden und Mark, 1977).

Eine kürzlich erschienene Publikation des Sugden-Labors steht auf den ersten Blick in offensichtlichem Konflikt zu meinen Ergebnissen (Kennedy et al., 2003). Die Autoren zeigen in EBV-positiven Zelllinien, dass die Überexpression der DNA-Bindedomäne von EBNA1 dominant negativ ist und zur Apoptose der Zellen führt. Diese scheinbar widersprüchlichen Ergebnisse des Sugden-Labors zu meiner Arbeit lassen sich durch die Verwendung unterschiedlicher Systeme erklären (Humme et al., 2003; Kennedy et al., 2003). Die Sugden-Gruppe verwendete vor langer Zeit etablierte Zelllinien wie z.B. 727, Akata und Daudi. Diese Linien wurden zum Teil *in vitro* aus Burkitt-Lymphom-Biopsien isoliert und seit Jahrzehnten in Kultur gehalten. Dies bedeutet, dass das Virusgenom zumindest initial episomal etabliert wurde und meist auch heute noch extrachromosomal vorliegt. Ein Verlust von EBNA1 hat wahrscheinlich schwerwiegende Folgen für die Zelle, da nach Depletion des Proteins das Virus nicht mehr im gleichen Maße repliziert und extrachromosomal erhalten werden kann. Zusätzlich können die zuvor durch EBNA1 am *Cp*-Promotor transaktivierte Gene möglicherweise nicht mehr (in gleichen Mengen) gebildet werden. Es kann daher geschlossen werden, dass die etablierten Zelllinien nach EBNA1-Depletion in eine Krise geraten, wodurch die Zellen apoptotisch werden. Ich nehme an, dass einzelne Zellen nicht abstarben. Eine

Untersuchung solcher Zellen würde vermutlich integrierte Virusgenome zeigen, wie sie in den in dieser Arbeit etablierten Δ EBNA1-LCLs vorliegen.

Im Gegensatz zu den Kennedy-Versuchen wurde von mir das Δ EBNA1-2828-Maxi-EBV zur Herstellung von Δ EBNA1-LCLs verwendet. Dies bedeutet, dass die Linien sich ohne EBNA1 etablieren mussten. Diese Zelllinien entstanden nur unter der Bedingung, dass das Virusgenom integrierte und alle viralen latenten Gene (außer EBNA1) exprimiert wurden. Die wiederholte Erzeugung von Δ EBNA1-LCLs zeigt, dass die Einflüsse von EBNA1 auf den Prozess der Wachstumstransformation von B-Zellen indirekter Natur sind. Im Gegensatz zu den Kennedy-Experimenten gerieten bei meinem Ansatz die Zellen in eine proliferative Krise, bevor sie sich als immortale LCLs etablierten. Durch diesen Versuchsaufbau wurde sehr spezifisch auf überlebende Zellen selektiert.

Aus den beschriebenen Gründen sehe ich die Ergebnisse von G. Kennedy als nicht widersprüchlich zu meinen Befunden an. Ich stimme außerdem mit der Schlussbemerkung der Autoren überein, dass EBNA1 ein geeignetes Ziel für eine Therapie menschlicher EBV-assoziiierter Erkrankungen sein könnte (Kennedy et al., 2003). EBNA1 bietet sich dafür an, da durch Depletion des Proteins in den meisten Zellen die Proliferation nicht mehr gewährleistet wird und die Zellen in Apoptose gehen.

Δ EBNA1-Viren und Δ EBNA1-LCLs: Schlussfolgerungen

Zusammenfassend belegen meine Ergebnisse, dass EBNA1, entgegen der bisherigen Annahme, nicht essentiell für die Wachstumstransformation primärer B-Zellen durch EBV ist. Im Gegensatz zu LMP1 kann EBNA1 nicht als essentielles Onkogen von EBV angesehen werden, da es keine Rolle beim Überleben von SCID-Mäusen nach LCL-Injektion spielt. Das Protein steigert die Effizienz des Wachstumstransformations-Prozesses jedoch um mehr als das 10.000-fache, indem es die latente Replikation und den episomalen Status des viralen Genoms unterstützt. Fehlt EBNA1, geht die virale DNA nach Infektion in den meisten Zellen verloren. Nach Verlust des EBV-Genoms können die Zellen nicht weiter proliferieren, da notwendige Proteine (z.B. LMP1) fehlen. In seltenen Fällen integriert das Virus in das Wirtsgenom. Somit wird EBNA1 entbehrlich für die Replikation und die Erhaltung des Virusgenoms. Die Entstehung der Δ EBNA1-LCLs ist zusätzlich an die Bedingung geknüpft, dass die Integrität des viralen Genoms, und damit die Expression der latenten viralen Gene, gewahrt bleibt. Dies reduziert die Rate der LCL-Etablierung weiter.

Möglicherweise besitzt EBNA1 mehrere Aufgaben, die zur Wachstumstransformation von primären humanen B-Zellen durch EBV beitragen. Durch die Deletion von EBNA1 im Maxi-EBV wurden diese Funktionen alle eliminiert und es wurde auf Zellen selektioniert, in denen Voraussetzungen bestehen, die eine Wachstumstransformation wieder erlauben.

Mit dem Δ EBNA1-System wird eine Möglichkeit eröffnet, die molekularen Mechanismen zu untersuchen, mit denen EBNA1 den episomalen Status des Virusgenoms etabliert. Durch heterologe Proteine, die diesen Status unterstützen, wären vergleichende Studien möglich. Die Etablierung eines solchen Systems mit heterologen Proteinen war ein weiterer Bestandteil meiner Doktorarbeit und wird in den folgenden Kapiteln diskutiert.

2. Fusionen aus HMG-I bzw. Histon H1 mit der C-terminalen EBNA1-Domäne ersetzen die Chromosomen-Assoziation und die Replikation

Es stellte sich die Frage, ob EBNA1 für die Funktion der extrachromosomalen Erhaltung und Replikation durch andere Proteine funktionell ersetzt werden kann. Zunächst tauschte ich die aminoterminalen Chromatin-assoziierte Transaktivierungsdomäne von EBNA1 gegen die offenen Leserahmen der beiden Chromatin-bindenden zellulären Proteine Histon H1 bzw. HMG-I aus. Dazu wurde die cDNA der zellulären Proteine an die DNA-Binde- und Dimerisierungsdomäne von EBNA1 fusioniert.

HMG-I:EBNA1 bzw. H1:EBNA1 ermöglichen die episodale Erhaltung und Replikation von *oriP*-Vektoren und Δ EBNA1-Maxi-EBVs und unterstützen die Virusproduktion

Die Funktionalität der chimären Proteine H1:EBNA1 bzw. HMG-I:EBNA1 bei der extrachromosomalen Replikation zeigte ich über Plasmid-Wiedergewinnungs-Analysen. Kleine *oriP*-basierte Plasmide replizieren über mindestens einen Monat stabil in Zellen, die konstitutiv H1:EBNA1 (Zelllinie 2680.5) bzw. HMG-I:EBNA1 (Zelllinie 2679.7) exprimieren. Es zeigte sich damit, dass die Fusionen aus HMG-I:EBNA1 bzw. H1:EBNA1 in der Lage sind, die EBNA1-Funktionen für die Replikation und die extrachromosomale Erhaltung von *oriP*-Plasmiden vollständig zu ersetzen. Diese Ergebnisse konnte ich auch mit sehr großen Plasmiden, wie dem Δ EBNA1-Maxi-EBV-p2828, bestätigen. Dazu wurde das Δ EBNA1-Virus in H1:EBNA1- bzw. HMG-I:EBNA1-Zellen transfiziert und es wurde mit verschiedenen Methoden der episodale Status des Genoms nachgewiesen. Zusätzlich konnte die Produktion infektiöser Viren in ähnlichen Titern wie mit nativem Maxi-EBV (bis zu

1 x 10⁶ GRE/ml) induziert werden. Die so produzierten Δ EBNA1-Viren wurden für Analysen zur Wachstumstransformation verwendet (s. V.1. und VI.1.).

Einen weiteren Hinweis auf die Funktionalität des HMG-I:EBNA1-Proteins in der Replikation geben die Experimente von M.P. Spindler (Abteilung Genvektoren, München). Er analysierte die von mir etablierte HMG-I:EBNA1-Zelllinie (2679.5), in der das Δ EBNA1-2828 stabil propagiert wird, biochemisch über CHIP („*chromatin-immunoprecipitation*“). Er zeigte am *DS*-Element bzw. in seiner Nähe, dass ORC3 bzw. EBNA1 mit einer Spezifität binden, die mit der des nativen EBV vergleichbar ist. Da nachgewiesen ist, dass EBNA1 und die zelluläre Replikationsmaschinerie am *DS*-Element interagieren (Chaudhuri et al., 2001; Ritzi et al., 2003; Schepers et al., 2001), beweisen diese Experimente, dass auch das chimäre HMG-I:EBNA1 die Replikations-initiiierende Funktion übernehmen kann.

Es ist bekannt, dass HMG-I mit Metaphase-Chromosomen assoziiert (Falciola et al., 1997; Saitoh und Laemmli, 1994) und von den Gruppen um E. Kieff und A. Aiyar wurde während dieser Arbeit publiziert, dass das HMG-I:EBNA1-Fusionsprotein in der Lage ist, an Metaphase-Chromosomen zu binden (Hung et al., 2001; Sears et al., 2003). Dieselben Beobachtungen wurden für H1:EBNA1 gemacht (Hung et al., 2001). Die Chromosomen-Assoziation, gemeinsam mit der Bindung des EBNA1-Anteils des Fusionsproteins an die EBNA1-Bindemotive des *oriP*-Plasmids, erklären die episomale Vektor-Erhaltung. Der Vektor wird an das Chromatin geheftet und stabil propagiert, so dass er nicht verloren geht.

Meine Ergebnisse zeigen, dass HMG-I:EBNA1 und H1:EBNA1 an kleinen *oriP*-Vektoren in der Lage sind, die Rolle von EBNA1 für die Replikation, die Chromosomenassoziation und damit die extrachromosomale Erhaltung zu ersetzen. Zusätzlich konnte ich zeigen, dass die Fusionsproteine diese Funktionen auch im Δ EBNA1-Maxi-EBV erfüllen. Ob die chimären Proteine, ähnlich wie EBNA1, auch transkriptionell aktivierende Eigenschaften auf latente virale Promotoren (*Cp*, *Imp1*) besitzen, habe ich nicht untersucht. Kürzlich veröffentlichte Ergebnisse aus der Gruppe von A. Aiyar deuten darauf hin, dass dieser Aspekt keine Rolle bei der DNA-Replikation und der Plasmid-Erhaltung spielt, da die Transaktivierung durch HMG-I nur schwach erlaubt wird (Sears et al., 2003).

HMG-I:EBNA1 und H1:EBNA1 können, wie gezeigt, die meisten Funktionen von EBNA1 ersetzen. Mit diesem System werden daher Türen geöffnet, um die Funktion der N-terminalen EBNA1-Transaktivierungsdomäne näher zu untersuchen. HMG-I besitzt mehrere *AT-hook*-Motive, welche die Bindung in AT-reicher DNA vermitteln. Die Konsensus-Sequenz dieser

Motive ist Arg-Gly-Arg (Reeves, 2001). EBNA1 besitzt in seiner Verknüpfungsdomäne zwei Gly-Arg-Wiederholungen (s. Abb. 2 A), von denen angenommen wird, dass sie ähnlich wie die *AT-hook*-Motive funktionieren (persönliche Mitteilung A. Aiyar, Chicago). Die Ergebnisse von Sears und Kollegen zeigen, dass EBNA1-Fusionen mit einem anderen Mitglied der HMG-Familie (HMG1) keine episomale Vektor-Erhaltung erlauben (Sears et al., 2003). HMG1 besitzt im Gegensatz zu HMG-I keine *AT-hooks*. Es wäre daher sehr interessant zu untersuchen, ob die *AT-hook*-Motive zusammen mit der EBNA1-DNA-Bindedomäne für die DNA-Bindung und damit die episomale Erhaltung und die Replikation des Virus ausreichen. Weitere Fragestellungen ergeben sich aus der Beobachtung, dass Promotoren durch HMG-I:EBNA1 weniger gut transaktiviert werden als durch EBNA1 (Sears et al., 2003).

Bei Deletion der N-terminalen EBNA1-Verknüpfungsdomänen wird nicht nur die Replikation, sondern auch die extrachromosomale Erhaltung und die Transaktivierung des Virus beeinträchtigt. Bisher war daher die Analyse der einzelnen Funktionen der EBNA1-Bereiche praktisch nicht durchführbar (Mackey und Sugden, 1999; Middleton und Sugden, 1994). Durch die HMG-I:EBNA1- und H1:EBNA1-Fusionsproteine wird es zum ersten mal möglich, die molekularen Funktionen von EBNA1 getrennt voneinander zu untersuchen.

3. Konditional regulierte Vektor-Erhaltung durch EBNA1:TetR—*TetO*

EBNA1 ist ein multifunktionales Protein: Es bindet sequenzspezifisch an zwei Elemente innerhalb von *oriP* (Sugden, 2002), wodurch es zum einen die episomale Erhaltung des Virus ermöglicht (Leight und Sugden, 2000) und zum anderen die zelluläre Replikationsmaschinerie (z.B. ORC- und MCM-Proteine) rekrutiert (Ritzi et al., 2003). Es wirkt als transkriptioneller Transaktivator (Gahn und Sugden, 1995) und interagiert mit vielen Proteinen, die in zellulären Prozessen wie Replikation, Chromosomenassoziation, Rekombination, Apoptose oder Transformation eine Rolle spielen (z.B. Rickinson und Kieff, 2001). Um einen tieferen Einblick in die unterschiedlichen Funktionen von EBNA1 zu erhalten, ist es notwendig, die funktionalen Domänen des EBNA1-Proteins getrennt zu untersuchen. In Hinsicht auf dieses Ziel war die dritte Aufgabe meiner Doktorarbeit, ein konditionales, durch Tetrazyklin regulierbares, extrachromosomales Vektorsystem herzustellen. Dazu wurde das EBNA1-*oriP*-System mit dem TetR-*TetO*-System kombiniert.

Für das konditionale Vektorsystem tauschte ich die DNA-Bindedomäne von EBNA1 gegen die des TetR und die zwanzig EBNA1-Motive der *FR* in *oriP* gegen zwanzig *TetO*-Sequenzen

aus (s. Abb. 6). An die zwanzig *TetO*-Motive sollte das EBNA1:TetR-Fusionsprotein binden, wodurch eine Chromatin-Assoziation des *oriP*-Plasmids erreicht werden sollte. Dies sollte eine extrachromosomale Tetrazyklin-regulierbare Erhaltung des Virus vermitteln.

Die Interaktion von EBNA1:TetR mit den 20x *TetO* untersuchte ich in verschiedenen *in vivo*- und *in vitro*-Systemen. Die Doxyzyklin-regulierbare Interaktion von EBNA1:TetR mit *TetO* und den Kerntransport der verschiedenen Fusionsproteine konnte ich sowohl in transienten als auch in stabilen Zell-Systemen zeigen. Die Experimente wurden mit unterschiedlichen Fusionsproteinen durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass die Protein-DNA-Interaktion von EBNA1:TetR und *TetO* unabhängig davon ist, ob die Proteine das EBNA1-NLS enthalten, wie stark das chimäre Protein exprimiert wird, und wie viele Gly-Ala-Wiederholungen das Fusionsprotein besitzt. Der *in vivo*-Nachweis der extrachromosomalen Plasmid-Erhaltung durch das EBNA1:TetR-*TetO*-System wurde durch zwei Methoden erbracht. Unter Selektionsdruck kultivierte Zellen wurden durch Plasmid-Wiedergewinnungs- und Southern-Blot-Analysen untersucht. Die Plasmid-Verlustrate und der episomale DNA-Status wurden in Plasmid-Verlust-Analysen indirekt über Fluoreszenz nachgewiesen.

Über Southern-Blot- und über Plasmid-Wiedergewinnungs-Experimente konnte ich zeigen, dass Zellen, die EBNA1:TetR und EBNA1 exprimieren (2.2.10) in Abhängigkeit von Doxyzyklin in der Lage sind, Vektoren zu erhalten, die 20x *TetO* und das *DS*-Element tragen (p2835, Abbn. 23 und 24). Dabei ist die Menge der in 2.2.10-Zellen extrachromosomal erhaltenen 2835-Plasmide geringer, als die von p2832 (*oriP*) in EBNA1-Zellen. Für diesen Befund gibt es mehrere mögliche Erklärungen. Zum einen ist das natürliche System aus *oriP* und EBNA1 so optimal aufeinander abgestimmt, dass Veränderungen negative Auswirkungen haben. Zum anderen kommt es über die Verknüpfungsdomänen von EBNA1 zu einer Heterodimer-Bildung in den 2.2.10-Zellen. Diese Heterodimere aus EBNA1 und EBNA1:TetR werden weder an den *TetO* effizient binden noch am *DS*-Element. Dadurch werden vermutlich Einbußen in der Wirksamkeit des Systems hervorgerufen. Die Experimente zur Untersuchung des episomalen Vektor-Status wurden durch eine sehr hohe Integrationsrate massiv eingeschränkt. Die Integrationen erlaubten die Durchführung der Versuche nur über eine Selektionsperiode von maximal vier bis fünf Wochen. Nach dieser Zeit war extrachromosomale DNA kaum noch nachweisbar. Zwei Gründen könnten für die massive Integration verantwortlich sein: Zum einen könnte die Verwendung von Puromycin als Selektionsmarker als Erklärung für die Integrationen dienen, zum anderen die auf den Vektoren kodierten LTRs („*long terminal repeat*“). LTR sind retrovirale Insertions-Elemente

(Bushman, 2003). Für zukünftige Analysen wurde eine der LTR aus den Vektoren entfernt und das Puromycin- durch ein Hygromycin-Resistenzgen ersetzt.

Um die Funktionalität des EBNA1:TetR-*TetO*-Systems in einem weiteren Versuchsaufbau zu untermauern, wurden Plasmid-Verlust-Experimente unternommen. In diesen Versuchen analysierte ich die Verlustrate episomaler Vektoren in verschiedenen Zelllinien indirekt über die auf den Vektoren kodierte mRFP-Fluoreszenz (Abb. 25). Es zeigte sich auch hier, dass die EBNA1:TetR- und EBNA1-exprimierende 2.2.10-Zelllinie in der Lage ist, Vektoren, die 20x *TetO* und das *DS*-Element tragen (p2835), episomal zu erhalten. Die Erhaltung ist wie erwartet Doxzyklin-abhängig. Der Verlust rot fluoreszierender Zellen und der damit angezeigte Vektor-Verlust erfolgte innerhalb von zwei Wochen auf Werte unter 10 % des Ausgangswerts. Dies ist insofern verwunderlich, als die publizierte Verlustrate 2-4 % der EBV-Partikel pro Zellteilung beträgt (Hebner et al., 2003; Kirchmaier und Sugden, 1995; Sugden und Warren, 1988). Im Unterschied zu den Versuchen dieser Arbeit wurden die publizierten Experimente an etablierten Zellsystemen durchgeführt. Im Gegensatz dazu selektionierte ich nur für wenige Tage mit Puromycin. Die so erhaltene Zellpopulation hatte den Vektor in der kurzen Zeit noch nicht stabil etabliert. Aus solchen instabilen Systemen ist der Vektor-Verlust wesentlich höher (Leight und Sugden, 2001). Es wäre interessant, die Versuche nach unterschiedlichen Phasen der Selektion zu wiederholen und die Bedeutung der Etablierungsphase systematisch zu evaluieren. Dabei besteht bei den bisherigen Vektoren jedoch eine Unsicherheit durch die hohe Integrationsrate, so dass abgewartet werden muss, ob die neu klonierten Vektoren das Integrationsproblem verringern.

Die Experimente wurden durch eine Reihe variabler Parameter begleitet, die das quantitative Auswerten der Ergebnisse erschweren: Aus nicht ersichtlichen Gründen war die Transfektionseffizienz der Vektoren (p3154, p3155) und der Zellen (293-D, EBNA1, 2.2.10) unterschiedlich hoch. Auch die Fluoreszenzintensität der transfizierten Zellen variierte je nach Zelllinie und Vektor. Damit war eine Abschätzung der Plasmidmenge anhand der Fluoreszenz nicht möglich. Zusätzlich erschwerend für die Auswertung der Versuche war die Feststellung, dass Doxzyklin einen Einfluss auf das Wachstum der Zellen besitzt. Die Zellen proliferieren bei Doxzyklin-Zugabe langsamer. Damit war es zu keinem Zeitpunkt möglich, Zellen gleicher Generationszahl zu vergleichen. Die Anzahl der Zellteilungen war vermutlich entscheidender für den Plasmid-Verlust als die Dauer der Kultivierung. Dies könnte bedeuten, dass bei Doxzyklin-Zugabe die Höhe des Verlusts episomaler Plasmide in Wirklichkeit sogar noch größer war, als die Ergebnisse suggerieren.

Die Funktionalität der *in vivo*-Interaktion von EBNA1:TetR mit den *TetO*-Bindestellen wurde durch vorläufige biochemische Ergebnisse von M.P. Spindler (Abteilung Genvektoren, GSF) weiter bestätigt. Er konnte im ChIP eine TetR-Bindung an den 20x *TetO* nachweisen, als er p2835 (20x *TetO*, *DS*) transfizierte 2.2.10-Zellen (EBNA1:TetR, EBNA1) untersuchte.

Durch die verschiedenen Versuchsansätze konnte damit gezeigt werden, dass es mir im Rahmen dieser Doktorarbeit gelang, ein konditional über Doxyzyklin regulierbares Vektorsystem zu etablieren. Das System arbeitet über eine Interaktion des EBNA1:TetR-Proteins mit dem DNA-Bindemotiv *TetO*.

4. Weitere experimentelle Schritte

Die Fusionsproteine HMG-I:EBNA1, H1:EBNA1 bzw. EBNA1:TetR unterstützen die stabile episomale Erhaltung von *oriP*-Vektoren. HMG-I:EBNA1 bzw. H1:EBNA1 erlauben zusätzlich die Replikation und die Virusproduktion des Δ EBNA1-2828-Maxi-EBV. Es lag daher nahe, ein Fusionsprotein aus HMG-I und TetR darauf hin zu überprüfen, ob es *TetO*-Vektoren konditional episomal erhalten kann. Zu diesem Zweck etablierte ich die Zelllinie 2971, die HMG-I:TetR sowie EBNA1 konstitutiv exprimiert. Mit dieser Linie werden zurzeit Analysen zur Doxyzyklin-regulierbaren extrachromosomalen Erhaltung von *TetO*-Vektoren durchgeführt. Vorläufige Ergebnisse deuten darauf hin, dass das HMG-I:TetR-Fusionsprotein in der Lage ist, eine episomale Vektor-Erhaltung zu vermitteln.

Eine weitere offene Frage ist, ob primäre humane B-Zellen durch Viren mit den verschiedenen Fusionsproteinen wachstumstransformiert werden. Um dies zu klären, führte ich zunächst Koinfektions-Studien mit den Komplementations-Viren 2853 (H1:EBNA1) bzw. 2854 (HMG-I:EBNA1) durch. Die Experimente führten nicht zu LCLs, da die Koinfektion (hier mit Δ EBNA1-2828-Maxi-EBV) ein sehr seltenes Ereignis ist (V.1., VI.1.). Um die Funktionalität der Fusionsproteine bei der Wachstumstransformation dennoch zu untersuchen und um zu analysieren, ob die viralen Genome in den entstandenen LCLs stabil episomal replizieren, stellte ich verschiedene Maxi-EBV-Mutanten her. Zusätzlich sollte die Wachstumstransformationsrate der Mutanten mit der von nativen LCLs verglichen werden. Zumindest für die HMG-I:EBNA1-Maxi-EBV-Mutante wurde die Etablierung von Virusproduzenten erwartet, da das stabil in der Zelllinie 2679 (HMG-I:EBNA1) propagierte Δ EBNA1-p2828-Maxi-EBV effizient Viren produziert (s. V.2.3.). Durch homologe Rekombination mit verschiedenen Maxi-EBVs platzierte ich die Gene *hmg-i:ebna1*, *ebna1:tetr* bzw. *hmg-i:tetr* unter Kontrolle eines CMV-Promotors nacheinander in

unterschiedlicher Orientierung an verschiedene Loci im Maxi-EBV-Genom (p2986, p3084, p3105 p3106, p2988, p3085, p2989 und p3086; Abbn. 18, 26 und Anhang). Dabei wurde für die Klonierung der EBNA1:TetR- bzw. HMG-I:TetR-Mutanten ein Maxi-EBV verwendet, in dem zuvor die *FR* durch 20x *TetO* ersetzt worden waren. Die acht Maxi-EBV-Mutanten wurden in 293-, 293-D-, EBNA1- und HMG-I:EBNA1-Zellen erfolglos auf Virusproduzenten untersucht. Ein negativer Einfluss der inserierten DNA bzw. des Resistenzgens auf Nachbargene kann aufgrund verschiedener Mutanten von Kollegen und mir ausgeschlossen werden. Eine mögliche Erklärung sind die unterschiedlichen Promotoren von nativem *ebna1* und den Fusionsgenen. Natives Maxi-EBV-2089 exprimiert in 293-D-Zellen nur geringe EBNA1-Mengen, während die Expression der EBNA1-Mutanten aufgrund des verwendeten CMV-Promotors und multipler Virus-Episome hoch ist. Möglicherweise wirkt eine zu hohe Proteinmenge der Fusionsproteine toxisch auf die Zellen, wie es von EBNA1, HMG-I bzw. TetR berichtet wird (persönliche Mitteilung C. Berens, Erlangen; Kennedy et al., 2003; Reeves, 2001). Dieses Argument wird durch die Beobachtung unterstützt, dass nur wenige grün fluoreszierende Hygromyzin-resistente Zellklone auswachsen. Um dieses Problem zu lösen, stellte ich kürzlich die Maxi-EBV-Mutanten p3199, p3200 und p3201 her, bei denen *hmg-i:ebna1*, *hmg-i:tetr* bzw. *ebna1:tetr* unter der Kontrolle des endogenen EBNA1-Promotors stehen. Die Experimente zur Virenproduktion dieser mutanten Maxi-EBVs sind bisher nicht abgeschlossen.

5. Ausblick

Mit dem hier erstmals etablierten konditional regulierbaren Maxi-EBV- bzw. Vektor-System eröffnen sich diverse Möglichkeiten. Mit EBV-basierten Vektoren werden bereits Gentherapie-Versuche unternommen (Franken et al., 1996; Wendtner et al., 2003). Solche Vektoren haben den Vorteil, spezifisch B-Zellen zu infizieren. Das angestrebte konditionale System hat den Vorzug, dass der Vektor nach Erfüllung seiner Aufgabe wieder einfach aus den Zellen zu entfernen ist, indem der Patient eines der klinisch gut untersuchten und viel verwendeten Tetrazyklin-Antibiotika verabreicht bekommt. Die Nebenwirkungen der Gentherapie würden damit auf eine individuell wählbare Zeitdauer begrenzt und eine Weitergabe des Genvektors auf Mitmenschen unterbunden werden. Eventuell könnte auch die Anzahl der Vektoren pro Zelle über Tetrazyklingabe gesteuert werden.

EBNA1 wird in der Literatur als Onkogen beschrieben (z.B. Tsimbouri et al., 2002; Wilson und Levine, 1992). Diese Daten werden jedoch kontrovers diskutiert. So sprechen z.B. auch

die Ergebnisse dieser Doktorarbeit gegen eine Funktion von EBNA1 als Onkogen (Humme et al., 2003). Dennoch wäre es für die Verwendung von EBV in der Gentherapie wünschenswert, auf EBNA1 verzichten zu können. Dazu müsste nicht nur die episomale-Erhaltung, sondern auch die latente EBNA1-abhängige Replikation ersetzt werden. Um die Replikation von EBNA1 zu trennen, wird zurzeit von J. Gerhardt (Abteilung Genvektoren, München) das *DS*-Element von *oriP* durch zelluläre Sequenzen ersetzt, die als ARS (autonom replizierende Sequenz) fungieren. Vektoren, die HMG-I:TetR zur konditional regulierbaren episomalen Vektor-Erhaltung verwenden und auch die Replikation EBNA1-unabhängig ermöglichen, können damit als sicherere Vektoren für die Gentherapie dienen.

Das Tet-System ist eine viel verwendete und gut analysierte Methode zur konditionalen Gen-Expression (s. I.4.; zur Übersicht: Berens und Hillen, 2003). Es ist sowohl in pro- als auch in eukaryontischen Zellen aktiv und wird vielseitig eingesetzt, um eine selektive Zielgen-Regulation zu ermöglichen (z.B. Hefe, Pflanzen, Drosophila, transgene Mäuse; Baron et al., 1999). Auch im EBV-Kontext wurde es für die konditionale Expression des EBV-Proteins LMP1 eingesetzt (Kilger et al., 1998). Bei allen bisher verwendeten Einsatzbereichen des Tet-Systems wurde die Transkription eines Zielgens in *trans* durch Zugabe von Tetrazyklin reguliert. Das in dieser Arbeit etablierte System zur konditionalen Vektor-Erhaltung über das *cis*-Element der *TetO* eröffnet daher ein neues Einsatzfeld des Tet-Systems.

Ein regulatorisches Vektorsystem hat für den Laboralltag den Vorteil, dass damit Vektoren in Zellen eingebracht und für eine individuell bestimmbare Zeit extrachromosomal erhalten werden können. Das System wäre eine Alternative zu regulatorischen Systemen wie Cre-LoxP, Flip-Frt, Tetrazyklin/Östrogen/LacR bzw. AraC-regulierten Promotoren, da der gesamte inserierte Vektor aus der Zelle entfernt werden könnte. Bei den bisherigen Systemen werden nur einzelne Gene deletiert oder abgeschaltet und der Vektor mit seinen möglichen Einflüssen verbleibt in der Zelle (Dymecki, 1996; Lutz und Bujard, 1997; Sauer und Henderson, 1988).

Die Untersuchung der viralen EBNA1-vermittelten Replikation an *oriP* ist an den episomal propagierten Vektoren ohne EBNA1 möglich. Eine detaillierte Analyse der EBV-Replikation wird so zum ersten Mal realisierbar, da sie unabhängig von der Frage der extrachromosomalen Erhaltung des Episoms untersucht werden kann. Die Untersuchung der EBV-Replikation ist besonders interessant, da die Verdopplung der viralen Erbinformation durch die zelluläre Replikationsmaschinerie erfolgt. Eventuell könnte mit dem in dieser Arbeit

etablierten besser zugänglichen System ein weiterer Teil des Geheimnisses „Replikation in Eukaryonten“ gelüftet werden.

VII. Zusammenfassung

Das Epstein-Barr Virus (EBV) infiziert primäre humane B-Zellen und kann deren unbegrenzte Proliferation induzieren. Dieser Prozess der Wachstumstransformation von B-Zellen ist ein Modellsystem, das die pathogenen Mechanismen bei der Tumorentstehung widerspiegelt. Das Epstein-Barr Virus nukleäre Antigen 1 (EBNA1) wurde als essentiell für den Prozess der Wachstumstransformation primärer humaner B-Lymphozyten beschrieben, weil es an der latenten Replikation über den viralen Replikations-Ursprung *oriP*, der extrachromosomalen Erhaltung des Virus-Episoms und der transkriptionellen Transaktivierung der latenten Gene beteiligt ist (Rickinson und Kieff, 2001). Dieses Postulat wurde nie experimentell untersucht, da die genetische Analyse mit den bisherigen Methoden nicht möglich war. Das Maxi-EBV-System macht das Genom von EBV einer genetischen Manipulation zugänglich und erlaubt auch die Herstellung von Viren, denen essentielle Gene fehlen (Delecluse et al., 1998).

Ein Ziel meiner Doktorarbeit war die Herstellung und Analyse eines EBNA1-negativen Virus. Entgegen der Lehrmeinung war es mit EBNA1-negativem Maxi-EBV möglich, wachstumstransformierte Zellklone nach Infektion von primären humanen B-Lymphozyten zu etablieren. Das virale Genom war in sämtlichen erhaltenen lymphoblastoiden Zelllinien so integriert, dass alle untersuchten latenten EBV-Proteine exprimiert wurden. Meine Ergebnisse zeigen eindeutig, dass EBNA1 prinzipiell für die Wachstumstransformation entbehrlich ist. Mit EBNA1-positiven Viren werden die primären B-Zellen jedoch mindestens um den Faktor 10.000 besser wachstumstransformiert. Da EBNA1 den episomalen Status des Virusgenoms vermittelt, scheint die Etablierung des EBV-Genoms in infizierten Zellen der limitierende Schritt zu sein. Auch *in vivo* im SCID-Maus-Modell erwies sich EBNA1 als entbehrlich für die Tumorbildung, womit es nicht als essentielles Onkogen von EBV betrachtet werden kann.

Ein weiterer im Rahmen dieser Doktorarbeit untersuchter Aspekt war die Frage, ob EBNA1 für die extrachromosomale Erhaltung und Replikation des EBV-Episoms durch heterologe Genprodukte ersetzt werden kann. Zu diesem Zweck wurden Fusionsproteine aus der DNA-Bindedomäne von EBNA1 mit den zellulären Proteinen Histon H1 bzw. HMG-I (Mitglied der hoch mobilen Protein-Gruppe) hergestellt. Ich konnte zeigen, dass HMG-I:EBNA1- und

H1:EBNA1-Fusionsproteine in der Lage sind, kleine *oriP*-enthaltende Plasmide und Maxi-EBVs episomal zu erhalten und die zelluläre Replikations-Maschinerie zu rekrutieren. Zusätzlich dazu unterstützen die Fusionsproteine im EBNA1-negativen Maxi-EBV die Produktion infektiöser Viren.

Für ein konditional regulierbares Vektorsystem wurden Fusionsproteine aus der EBNA1-Transaktivierungsdomäne und der DNA-Bindedomäne des Tet-Repressors (TetR) hergestellt. Diese Proteine sollten mit *Tet-Operator*-Sequenzen (*TetO*, TetR-Bindemotiv) interagieren, die multimerisiert auf *oriP*-basierte Vektoren kloniert wurden. Dadurch sollte die Erhaltung der *oriP*-basierten Vektoren in der Zelle konditional regulierbar gestaltet werden. Es gelang in dieser Doktorarbeit zum ersten Mal ein System zu etablieren, mit dem Plasmide episomal erhalten werden und bei Zugabe von Doxyzyklin konditional regulierbar verloren gehen.

Dieses erstmals realisierte konditional regulierbare Vektorsystem schafft neue Wege, die virale und zelluläre Replikation genauer zu untersuchen. Außerdem öffnen sich Möglichkeiten für eine sicherere Gentherapie, da die viralen Anteile auf ein Minimum reduziert werden können. Mit einem solchen System könnten EBV-Genvektoren in B-Zellen eingeführt werden und nach Expression des auf dem Vektor kodierten, therapeutischen Gens könnte die Genfahre durch Tetrazyklin-Applikation wieder aus dem Patienten entfernt werden.

VIII. Literatur

- Abdulkadir, S. A., Casolaro, V., Tai, A. K., Thanos, D., and Ono, S. J. (1998). High mobility group I/Y protein functions as a specific cofactor for Oct-2A: mapping of interaction domains. *J. Leukoc. Biol.* *64*, 681-691.
- Adams, A. (1987). Replication of latent Epstein-Barr virus genomes in Raji cells. *J. Virol.* *61*, 1743-1746.
- Aiyar, A., Tyree, C., and Sugden, B. (1998). The plasmid replicon of EBV consists of multiple cis-acting elements that facilitate DNA synthesis by the cell and a viral maintenance element. *EMBO J.* *17*, 6394-6403.
- Ambinder, R. F., Mullen, M. A., Chang, Y. N., Hayward, G. S., and Hayward, S. D. (1991). Functional domains of Epstein-Barr virus nuclear antigen EBNA-1. *J. Virol.* *65*, 1466-1478.
- Aravind, L., and Landsman, D. (1998). AT-hook motifs identified in a wide variety of DNA-binding proteins. *Nucleic Acids Res.* *26*, 4413-4421.
- Avolio-Hunter, T. M., Lewis, P. N., and Frappier, L. (2001). Epstein-Barr nuclear antigen 1 binds and destabilizes nucleosomes at the viral origin of latent DNA replication. *Nucleic Acids Res.* *29*, 3520-3528.
- Babcock, G. J., Decker, L. L., Freeman, R. B., and Thorley-Lawson, D. A. (1999). Epstein-barr virus-infected resting memory B cells, not proliferating lymphoblasts, accumulate in the peripheral blood of immunosuppressed patients. *J. Exp. Med.* *190*, 567-576.
- Babcock, G. J., Decker, L. L., Volk, M., and Thorley-Lawson, D. A. (1998). EBV persistence in memory B cells in vivo. *Immunity* *9*, 395-404.
- Babcock, G. J., Hochberg, D., and Thorley-Lawson, A. D. (2000). The expression pattern of Epstein-Barr virus latent genes in vivo is dependent upon the differentiation stage of the infected B cell. *Immunity* *13*, 497-506.
- Babcock, G. J., and Thorley-Lawson, D. A. (2000). Tonsillar memory B cells, latently infected with Epstein-Barr virus, express the restricted pattern of latent genes previously found only in Epstein-Barr virus-associated tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *97*, 12250-12255.
- Baer, R., Bankier, A. T., Biggin, M. D., Deininger, P. L., Farrell, P. J., Gibson, T. J., Hatfull, G., Hudson, G. S., Satchwell, S. C., Seguin, C., and et al. (1984). DNA sequence and expression of the B95-8 Epstein-Barr virus genome. *Nature* *310*, 207-211.
- Bagga, R., Michalowski, S., Sabnis, R., Griffith, J. D., and Emerson, B. M. (2000). HMG I/Y regulates long-range enhancer-dependent transcription on DNA and chromatin by changes in DNA topology. *Nucleic Acids Res.* *28*, 2541-2550.
- Baron, U., Gossen, M., and Bujard, H. (1997). Tetracycline-controlled transcription in eukaryotes: novel transactivators with graded transactivation potential. *Nucleic Acids Res.* *25*, 2723-2729.

- Baron, U., Schnappinger, D., Helbl, V., Gossen, M., Hillen, W., and Bujard, H. (1999). Generation of conditional mutants in higher eukaryotes by switching between the expression of two genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *96*, 1013-1018.
- Baumforth, K. R., Young, L. S., Flavell, K. J., Constandinou, C., and Murray, P. G. (1999). The Epstein-Barr virus and its association with human cancers. *Mol. Pathol.* *52*, 307-322.
- Berens, C., and Hillen, W. (2003). Gene regulation by tetracyclines. Constraints of resistance regulation in bacteria shape TetR for application in eukaryotes. *Eur. J. Biochem.* *270*, 3109-3121.
- Berens, C., Schnappinger, D., and Hillen, W. (1997). The role of the variable region in Tet repressor for inducibility by tetracycline. *J. Biol. Chem.* *272*, 6936-6942.
- Berens, C., Thain, A., and Schroeder, R. (2001). A tetracycline-binding RNA aptamer. *Bioorg. Med. Chem.* *9*, 2549-2556.
- Berger, S. L., Pina, B., Silverman, N., Marcus, G. A., Agapite, J., Regier, J. L., Triezenberg, S. J., and Guarente, L. (1992). Genetic isolation of ADA2: a potential transcriptional adaptor required for function of certain acidic activation domains. *Cell* *70*, 251-265.
- Bertrand, K. P., Postle, K., Wray, L. V., Jr., and Reznikoff, W. S. (1984). Construction of a single-copy promoter vector and its use in analysis of regulation of the transposon Tn10 tetracycline resistance determinant. *J. Bacteriol.* *158*, 910-919.
- Bielinsky, A. K., and Gerbi, S. A. (2001). Where it all starts: eukaryotic origins of DNA replication. *J. Cell Sci.* *114*, 643-651.
- Bochkarev, A., Barwell, J. A., Pfuetzner, R. A., Bochkareva, E., Frappier, L., and Edwards, A. M. (1996). Crystal structure of the DNA-binding domain of the Epstein-Barr virus origin-binding protein, EBNA1, bound to DNA. *Cell* *84*, 791-800.
- Bochkarev, A., Barwell, J. A., Pfuetzner, R. A., Furey, W., Jr., Edwards, A. M., and Frappier, L. (1995). Crystal structure of the DNA-binding domain of the Epstein-Barr virus origin-binding protein EBNA 1. *Cell* *83*, 39-46.
- Bochkarev, A., Bochkareva, E., Frappier, L., and Edwards, A. M. (1998). The 2.2 Å structure of a permanganate-sensitive DNA site bound by the Epstein-Barr virus origin binding protein, EBNA1. *J. Mol. Biol.* *284*, 1273-1278.
- Bogan, J. A., Natale, D. A., and DePamphilis, M. L. (2000). Initiation of eukaryotic DNA replication: conservative or liberal? *J. Cell Phys.* *184*, 139-150.
- Borestrom, C., Zetterberg, H., Liff, K., and Rymo, L. (2003). Functional interaction of nuclear factor γ and sp1 is required for activation of the Epstein-Barr virus C promoter. *J. Virol.* *77*, 821-829.
- Bornkamm, G. W., and Hammerschmidt, W. (2001). Molecular virology of Epstein-Barr virus. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* *356*, 437-459.

- Bujard, H., and Gossen, M. (2001). Tetracyclines in the control of gene expression in eukaryotes. *Tetracyclines in Biology, Chemistry and Medicine Birkhäuser Verlag, Berlin*, 139-157.
- Bushman, F. D. (2003). Targeting survival: integration site selection by retroviruses and LTR-retrotransposons. *Cell* *115*, 135-138.
- Bussemakers, M. J., van de Ven, W. J., Debruyne, F. M., and Schalken, J. A. (1991). Identification of high mobility group protein I(Y) as potential progression marker for prostate cancer by differential hybridization analysis. *Cancer Res.* *51*, 606-611.
- Bustin, M. (1999). Regulation of DNA-dependent activities by the functional motifs of the high-mobility-group chromosomal proteins. *Mol. Cell. Biol.* *19*, 5237-5246.
- Bustin, M. (2001). Revised nomenclature for high mobility group (HMG) chromosomal proteins. *Trends Biochem. Sci.* *26*, 152-153.
- Bustin, M., and Reeves, R. (1996). High-mobility-group chromosomal proteins: architectural components that facilitate chromatin function. *Prog. Nucleic Acid Res.* *54*, 35-100.
- Campbell, M. E., Palfreyman, J. W., and Preston, C. M. (1984). Identification of herpes simplex virus DNA sequences which encode a trans-acting polypeptide responsible for stimulation of immediate early transcription. *J. Mol. Biol.* *180*, 1-19.
- Campbell, R. E., Tour, O., Palmer, A. E., Steinbach, P. A., Baird, G. S., Zacharias, D. A., and Tsien, R. Y. (2002). A monomeric red fluorescent protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *99*, 7877-7882.
- Chase, M. B., Haga, S. B., Hankins, W. D., Williams, D. M., Bi, Z., Strovel, J. W., Obrieht, C., and Berg, P. E. (1999). Binding of HMG-I(Y) elicits structural changes in a silencer of the human beta-globin gene. *Am. J. Hematol.* *60*, 27-35.
- Chaudhuri, B., Xu, H., Todorov, I., Dutta, A., and Yates, J. L. (2001). Human DNA replication initiation factors, ORC and MCM, associate with oriP of Epstein-Barr virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *98*, 10085-10089.
- Chittenden, T., Lupton, S., and Levine, A. J. (1989). Functional limits of oriP, the Epstein-Barr virus plasmid origin of replication. *J. Virol.* *63*, 3016-3025.
- Chung, C. T., Niemela, S. L., and Miller, R. H. (1989). One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *86*, 2172-2175.
- Church, G. M., and Gilbert, W. (1984). Genomic sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *81*, 1991-1995.
- Counter, C. M., Botelho, F. M., Wang, P., Harley, C. B., and Bacchetti, S. (1994). Stabilization of short telomeres and telomerase activity accompany immortalization of Epstein-Barr virus-transformed human B lymphocytes. *J. Virol.* *68*, 3410-3414.
- Davenport, M. G., and Pagano, J. S. (1999). Expression of EBNA-1 mRNA is regulated by cell cycle during Epstein-Barr virus type I latency. *J. Virol.* *73*, 3154-3161.

- Delecluse, H. J., Bartnizke, S., Hammerschmidt, W., Bullerdiek, J., and Bornkamm, G. W. (1993a). Episomal and integrated copies of Epstein-Barr virus coexist in Burkitt lymphoma cell lines. *J. Virol.* *67*, 1292-1299.
- Delecluse, H. J., and Hammerschmidt, W. (1993). Status of Marek's disease virus in established lymphoma cell lines: herpesvirus integration is common. *J. Virol.* *67*, 82-92.
- 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.
- Delecluse, H. J., Schuller, S., and Hammerschmidt, W. (1993b). Latent Marek's disease virus can be activated from its chromosomally integrated state in herpesvirus-transformed lymphoma cells. *EMBO J.* *12*, 3277-3286.
- Deng, Z., Lezina, L., Chen, C. J., Shtivelband, S., So, W., and Lieberman, P. M. (2002). Telomeric proteins regulate episomal maintenance of Epstein-Barr virus origin of plasmid replication. *Molecular Cell* *9*, 493-503.
- DePamphilis, M. L. (1999). Replication origins in metazoan chromosomes: fact or fiction? *Bioessays* *21*, 5-16.
- Deuschle, U., Meyer, W. K., and Thiesen, H. J. (1995). Tetracycline-reversible silencing of eukaryotic promoters. *Mol. Cell. Biol.* *15*, 1907-1914.
- Dhar, S. K., Yoshida, K., Machida, Y., Khaira, P., Chaudhuri, B., Wohlschlegel, J. A., Leffak, M., Yates, J., and Dutta, A. (2001). Replication from oriP of Epstein-Barr virus requires human ORC and is inhibited by geminin. *Cell* *106*, 287-296.
- Diffley, J. F. X. (1996). Once and only once upon a time: Specifying and regulating origins of DNA replication in eukaryotic cells. *Genes Dev.* *10*, 2819-2830.
- Diffley, J. F. X., and Cocker, J. H. (1992). Protein-DNA interactions at a yeast replication origin. *Nature* *357*, 169-172.
- Diffley, J. F. X., and Stillman, B. (1992). ARS binding factors from *Saccharomyces cerevisiae*. In *DNA replication: the regulatory mechanisms*, P. Hughes, E. Fanning, and M. Kohiyama, eds. (London, Springer-Verlag), pp. 215-223.
- Dirmeier, U., Neuhierl, B., Kilger, E., Reisbach, G., Sandberg, M. L., and Hammerschmidt, W. (2003). Latent membrane protein 1 is critical for efficient growth transformation of human B cells by Epstein-Barr virus. *Cancer Res.* *63*, 2982-2989.
- Disney, J. E., Johnson, K. R., Magnuson, N. S., Sylvester, S. R., and Reeves, R. (1989). High-mobility group protein HMG-I localizes to G/Q- and C-bands of human and mouse chromosomes. *J. Cell. Biol.* *109*, 1975-1982.

- Donovan, S., Harwood, J., Drury, L. S., and Diffley, J. F. X. (1997). Cdc6-Dependent Loading of Mcm Proteins onto Pre-replicative Chromatin in Budding Yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *94*, 5611-5616.
- Dutta, A., and Bell, S. P. (1997). Initiation of DNA replication in eukaryotic cells. *Annual Reviews in Cell and Developmental Biology* *13*, 293-332.
- Dymecki, S. M. (1996). A modular set of Flp, FRT and lacZ fusion vectors for manipulating genes by site-specific recombination. *Gene* *171*, 197-201.
- Eckert, B., and Beck, C. F. (1989). Topology of the transposon Tn10-encoded tetracycline resistance protein within the inner membrane of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* *264*, 11663-11670.
- Elton, T. S., and Reeves, R. (1986). Purification and postsynthetic modifications of Friend erythroleukemic cell high mobility group protein HMG-I. *Anal. Biochem.* *157*, 53-62.
- Epe, B., Woolley, P., and Hornig, H. (1987). Competition between tetracycline and tRNA at both P and A sites of the ribosome of *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* *213*, 443-447.
- Epstein, M. A., Achong, B. G., and Barr, Y. M. (1964). Virus Particles in Cultured Lymphoblasts from Burkitt's Lymphoma. *Lancet* *15*, 702-703.
- Epstein, M. A., Henle, G., Achong, B. G., and Barr, Y. M. (1965). Morphological and Biological Studies on a Virus in Cultured Lymphoblasts from Burkitt's Lymphoma. *J. Exp. Med.* *121*, 761-770.
- Evans, J. N., Zajicek, J., Nissen, M. S., Munske, G., Smith, V., and Reeves, R. (1995). ¹H and ¹³C NMR assignments and molecular modelling of a minor groove DNA-binding peptide from the HMG-I protein. *Int. J. Pept. Protein. Res.* *45*, 554-560.
- Falciola, L., Spada, F., Calogero, S., Langst, G., Voit, R., Grummt, I., and Bianchi, M. E. (1997). High mobility group 1 protein is not stably associated with the chromosomes of somatic cells. *J. Cell. Biol.* *137*, 19-26.
- Falk, K., Gratama, J. W., Rowe, M., Zou, J. Z., Khanim, F., Young, L. S., Oosterveer, M. A., and Ernberg, I. (1995). The role of repetitive DNA sequences in the size variation of Epstein-Barr virus (EBV) nuclear antigens, and the identification of different EBV isolates using RFLP and PCR analysis. *J. Gen. Virol.* *76 (Pt 4)*, 779-790.
- Falvo, J. V., Thanos, D., and Maniatis, T. (1995). Reversal of intrinsic DNA bends in the IFN beta gene enhancer by transcription factors and the architectural protein HMG I(Y). *Cell* *83*, 1101-1111.
- Farrell, P. J. (1995). Epstein-Barr virus immortalizing genes. *Trends Microbiol.* *3*, 105-109.
- Farrell, P. J. (2001). Epstein-Barr virus. The B95-8 strain map. *Methods Mol. Biol.* *174*, 3-12.
- Fedele, M., Pierantoni, G. M., Berlingieri, M. T., Battista, S., Baldassarre, G., Munshi, N., Dentice, M., Thanos, D., Santoro, M., Viglietto, G., and Fusco, A. (2001). Overexpression of proteins HMGA1 induces cell cycle deregulation and apoptosis in normal rat thyroid cells. *Cancer Res.* *61*, 4583-4590.

-
- Feinberg, A. P., and Vogelstein, B. (1983). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* 132, 6-13.
- Fingerroth, J. D., 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.
- Fischer, N., Kremmer, E., Lautscham, G., Mueller-Lantzsch, N., and Grasser, F. A. (1997). Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 forms a complex with the nuclear transporter karyopherin alpha2. *J. Biol. Chem.* 272, 3999-4005.
- Forster, K., Helbl, V., Lederer, T., Urlinger, S., Wittenburg, N., and Hillen, W. (1999). Tetracycline-inducible expression systems with reduced basal activity in mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* 27, 708-710.
- Franken, M., Estabrooks, A., Cavacini, L., Sherburne, B., Wang, F., and Scadden, D. T. (1996). Epstein-Barr virus-driven gene therapy for EBV-related lymphomas. *Nat. Med.* 2, 1379-1382.
- Frappier, L., and O'Donnell, M. (1991). Overproduction, purification, and characterization of EBNA1, the origin binding protein of Epstein-Barr virus. *J. Biol. Chem.* 266, 7819-7826.
- Freundlieb, S., Baron, U., Bonin, A. L., Gossen, M., and Bujard, H. (1997). Use of tetracycline-controlled gene expression systems to study mammalian cell cycle. *Methods Enzymol.* 283, 159-173.
- Fried, M., and Crothers, D. M. (1981). Equilibria and kinetics of lac repressor-operator interactions by polyacrylamide gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res.* 9, 6505-6525.
- Friedmann, M., Holth, L. T., Zoghbi, H. Y., and Reeves, R. (1993). Organization, inducible-expression and chromosome localization of the human HMG-I(Y) nonhistone protein gene. *Nucleic Acids Res.* 21, 4259-4267.
- Fruehling, S., Lee, S. K., Herrold, R., Frech, B., Laux, G., Kremmer, E., Grasser, F. A., and Longnecker, R. (1996). Identification of latent membrane protein 2A (LMP2A) domains essential for the LMP2A dominant-negative effect on B-lymphocyte surface immunoglobulin signal transduction. *J. Virol.* 70, 6216-6226.
- Gahn, T. A., and Schildkraut, C. L. (1989). The Epstein-Barr virus origin of plasmid replication, oriP, contains both the initiation and termination sites of DNA replication. *Cell* 58, 527-535.
- Gahn, T. A., and Sugden, B. (1995). An EBNA-1-dependent enhancer acts from a distance of 10 kilobase pairs to increase expression of the Epstein-Barr virus LMP gene. *J. Virol.* 69, 2633-2636.
- Gardella, T., Medveczky, P., Sairenji, T., and Mulder, C. (1984). Detection of circular and linear herpesvirus DNA molecules in mammalian cells by gel electrophoresis. *J. Virol.* 50, 248-254.

- Garrard, W. T. (1991). Histone H1 and the conformation of transcriptionally active chromatin. *Bioessays* 13, 87-88.
- Gassen, H. G., and Schrimpf, G. (1999). *Gentechnische Methoden. Gentechnische Methoden*, Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag.
- Gavin, K. A., Hidaka, M., and Stillman, B. (1995). Conserved initiator proteins in eukaryotes. *Science* 270, 1667-1671.
- Giancotti, V., Bandiera, A., Buratti, E., Fusco, A., Marzari, R., Coles, B., and Goodwin, G. H. (1991). Comparison of multiple forms of the high mobility group I proteins in rodent and human cells. Identification of the human high mobility group I-C protein. *Eur. J. Biochem.* 198, 211-216.
- Gilbert, D. M. (2001). Making sense of eukaryotic DNA replication origins. *Science* 294, 96-100.
- Gossen, M., and Bujard, H. (1992). Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline- responsive promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 5547-5551.
- Gossen, M., and Bujard, H. (1993). Anhydrotetracycline, a novel effector for tetracycline controlled gene expression systems in eukaryotic cells. *Nucleic Acids Res.* 21, 4411-4412.
- Gossen, M., Freundlieb, S., Bender, G., Muller, G., Hillen, W., and Bujard, H. (1995). Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science* 268, 1766-1769.
- 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.
- Gruffat, H., Batische, J., Pich, D., Neuhierl, B., Manet, E., Hammerschmidt, W., and Sergeant, A. (2002). Epstein-Barr virus mRNA export factor EB2 is essential for production of infectious virus. *J. Virol.* 76, 9635-9644.
- Gruffat, H., Renner, O., Pich, D., and Hammerschmidt, W. (1995). Cellular proteins bind to the downstream component of the lytic origin of DNA replication of Epstein-Barr virus. *J. Virol.* 69, 1878-1886.
- Hacein-Bey-Abina, S., Von Kalle, C., Schmidt, M., McCormack, M. P., Wulffraat, N., Leboulch, P., Lim, A., Osborne, C. S., Pawliuk, R., Morillon, E., *et al.* (2003). LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science* 302, 415-419.
- Hammerschmidt, W., and Sugden, B. (1988). Identification and characterization of oriLyt, a lytic origin of DNA replication of Epstein-Barr virus. *Cell* 55, 427-433.
- Hammerschmidt, W., and Sugden, B. (1989). Genetic analysis of immortalizing functions of Epstein-Barr virus in human B lymphocytes. *Nature* 340, 393-397.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166, 557-580.

- Hansen, L. M., McMurry, L. M., Levy, S. B., and Hirsh, D. C. (1993). A new tetracycline resistance determinant, Tet H, from *Pasteurella multocida* specifying active efflux of tetracycline. *Antimicrob. Agents Chemother.* *37*, 2699-2705.
- Harris, A., Young, B. D., and Griffin, B. E. (1985). Random association of Epstein-Barr virus genomes with host cell metaphase chromosomes in Burkitt's lymphoma-derived cell lines. *J. Virol.* *56*, 328-332.
- Harrison, S., Fisenne, K., and Hearing, J. (1994). Sequence requirements of the Epstein-Barr virus latent origin of DNA replication. *J. Virol.* *68*, 1913-1925.
- Hebner, C., Lasanen, J., Battle, S., and Aiyar, A. (2003). The spacing between adjacent binding sites in the family of repeats affects the functions of Epstein-Barr nuclear antigen 1 in transcription activation and stable plasmid maintenance. *Virology* *311*, 263-274.
- Helbl, V., and Hillen, W. (1998). Stepwise selection of TetR variants recognizing tet operator 4C with high affinity and specificity. *J. Mol. Biol.* *276*, 313-318.
- Henle, W., Henle, G., and Lennette, E. T. (1979). The Epstein-Barr virus. *Sci. Am.* *241*, 48-59.
- Heuer, C., and Hillen, W. (1988). Tet repressor-tet operator contacts probed by operator DNA-modification interference studies. *J. Mol. Biol.* *202*, 407-415.
- Hill, D. A., Pedulla, M. L., and Reeves, R. (1999). Directional binding of HMG-I(Y) on four-way junction DNA and the molecular basis for competitive binding with HMG-1 and histone H1. *Nucleic Acids Res.* *27*, 2135-2144.
- Hillen, W., and Berens, C. (1994). Mechanisms underlying expression of Tn10 encoded tetracycline resistance. *Annu. Rev. Microbiol.* *48*, 345-369.
- Hillen, W., Gatz, C., Altschmied, L., Schollmeier, K., and Meier, I. (1983). Control of expression of the Tn10-encoded tetracycline resistance genes. Equilibrium and kinetic investigation of the regulatory reactions. *J. Mol. Biol.* *169*, 707-721.
- Himes, S. R., Reeves, R., Attema, J., Nissen, M., Li, Y., and Shannon, M. F. (2000). The role of high-mobility group I(Y) proteins in expression of IL-2 and T cell proliferation. *J. Immunol.* *164*, 3157-3168.
- Hinrichs, W., Kisker, C., Duvel, M., Muller, A., Tovar, K., Hillen, W., and Saenger, W. (1994). Structure of the Tet repressor-tetracycline complex and regulation of antibiotic resistance. *Science* *264*, 418-420.
- Hirai, K., and Shirakata, M. (2001). Replication licensing of the EBV oriP minichromosome. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* *258*, 13-33.
- Hochberg, D., Middeldorp, J. M., Catalina, M., Sullivan, J. L., Luzuriaga, K., and Thorley-Lawson, D. A. (2004). Demonstration of the Burkitt's lymphoma Epstein-Barr virus phenotype in dividing latently infected memory cells in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *101*, 239-244.

- Hsieh, D. J., Camiolo, S. M., and Yates, J. L. (1993). Constitutive binding of EBNA1 protein to the Epstein-Barr virus replication origin, oriP, with distortion of DNA structure during latent infection. *EMBO J.* *12*, 4933-4944.
- Humme, S., Reisbach, G., Feederle, R., Delecluse, H. J., Bousset, K., Hammerschmidt, W., and Schepers, A. (2003). The EBV nuclear antigen 1 (EBNA1) enhances B cell immortalization several thousandfold. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *100*, 10989-10994.
- Hung, S. C., Kang, M. S., and Kieff, E. (2001). Maintenance of Epstein-Barr virus (EBV) oriP-based episomes requires EBV-encoded nuclear antigen-1 chromosome-binding domains, which can be replaced by high-mobility group-I or histone H1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *98*, 1865-1870.
- Hurley, E. A., and Thorley-Lawson, D. A. (1988). B cell activation and the establishment of Epstein-Barr virus latency. *J. Exp. Med.* *168*, 2059-2075.
- Huth, J. R., Bewley, C. A., Nissen, M. S., Evans, J. N., Reeves, R., Gronenborn, A. M., and Clore, G. M. (1997). The solution structure of an HMG-I(Y)-DNA complex defines a new architectural minor groove binding motif. *Nat. Struct. Biol.* *4*, 657-665.
- Ito, S., Ikeda, M., Kato, N., Matsumoto, A., Ishikawa, Y., Kumakubo, S., and Yanagi, K. (2000). Epstein-barr virus nuclear antigen-1 binds to nuclear transporter karyopherin alpha1/NPI-1 in addition to karyopherin alpha2/Rch1. *Virology* *266*, 110-119.
- Izaurralde, E., Kas, E., and Laemmli, U. K. (1989). Highly preferential nucleation of histone H1 assembly on scaffold-associated regions. *J. Mol. Biol.* *210*, 573-585.
- Jacob, F., Brenner, S., and Cuzin, F. (1963). On the regulation of DNA replication in bacteria. *Cold Spring Harbor Symposia On Quantitative Biology* *28*, 329-348.
- Jacob, R. J., Morse, L. S., and Roizman, B. (1979). Anatomy of herpes simplex virus DNA. XII. Accumulation of head-to-tail concatemers in nuclei of infected cells and their role in the generation of the four isomeric arrangements of viral DNA. *J. Virol.* *29*, 448-457.
- 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.
- Johannessen, I., and Crawford, D. H. (1999). In vivo models for Epstein-Barr virus (EBV)-associated B cell lymphoproliferative disease (BLPD). *Rev. Med. Virol.* *9*, 263-277.
- Johnson, K. R., Lehn, D. A., and Reeves, R. (1989). Alternative processing of mRNAs encoding mammalian chromosomal high-mobility-group proteins HMG-I and HMG-Y. *Mol. Cell. Biol.* *9*, 2114-2123.
- Kanda, T., Otter, M., and Wahl, G. M. (2001). Coupling of mitotic chromosome tethering and replication competence in epstein-barr virus-based plasmids. *Mol. Cell. Biol.* *21*, 3576-3588.

- Kang, M. S., Hung, S. C., and Kieff, E. (2001). Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 activates transcription from episomal but not integrated DNA and does not alter lymphocyte growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *98*, 15233-15238.
- Kapoor, P., and Frappier, L. (2003). EBNA1 partitions Epstein-Barr virus plasmids in yeast cells by attaching to human EBNA1-binding protein 2 on mitotic chromosomes. *J. Virol.* *77*, 6946-6956.
- Kapoor, P., Shire, K., and Frappier, L. (2001). Reconstitution of Epstein-Barr virus-based plasmid partitioning in budding yeast. *EMBO J.* *20*, 222-230.
- Kaye, K. M., Izumi, K. M., and Kieff, E. (1993). Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 is essential for B-lymphocyte growth transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *90*, 9150-9154.
- Kearsey, S. E., and Cotterill, S. (2003). Enigmatic variations: divergent modes of regulating eukaryotic DNA replication. *Mol. Cell.* *12*, 1067-1075.
- Kelleher, R. J., 3rd, Flanagan, P. M., and Kornberg, R. D. (1990). A novel mediator between activator proteins and the RNA polymerase II transcription apparatus. *Cell* *61*, 1209-1215.
- Kelly, T. J., and Brown, G. W. (2000). Regulation of chromosome replication. *Annu. Rev. Biochem.* *69*, 829-880.
- Kempkes, B., Pich, D., Zeidler, R., and Hammerschmidt, W. (1995). Immortalization of human primary B lymphocytes in vitro with DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *92*, 5875-5879.
- Kennedy, G., Komano, J., and Sugden, B. (2003). Epstein-Barr virus provides a survival factor to Burkitt's lymphomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *100*, 14269-14274.
- Kennedy, G., and Sugden, B. (2003). EBNA-1, a bifunctional transcriptional activator. *Mol. Cell. Biol.* *23*, 6901-6908.
- Khabir, A., Ghorbel, A., Daoud, J., Frikha, M., Drira, M. M., Laplanche, A., Busson, P., and Jlidi, R. (2003). Similar BCL-X but different BCL-2 levels in the two age groups of north African nasopharyngeal carcinomas. *Cancer Detect. Prev.* *27*, 250-255.
- Khan, G., Miyashita, E. M., Yang, B., Babcock, G. J., and Thorley-Lawson, D. A. (1996). Is EBV persistence in vivo a model for B cell homeostasis? *Immunity* *5*, 173-179.
- Kieff, E., and Rickinson, A. B. (2001). Epstein-Barr virus and its replication. In *Virology*, D. M. Knipe, and P. M. Howley, eds. (Philadelphia, Pa, Lippincott), pp. 2511-2573.
- Kilger, E., Kieser, A., Baumann, M., and Hammerschmidt, W. (1998). Epstein-Barr virus-mediated B-cell proliferation is dependent upon latent membrane protein 1, which simulates an activated CD40 receptor. *EMBO J.* *17*, 1700-1709.
- Kim, A. L., Maher, M., Hayman, J. B., Ozer, J., Zerby, D., Yates, J. L., and Lieberman, P. M. (1997). An imperfect correlation between DNA replication activity of Epstein-Barr

- virus nuclear antigen 1 (EBNA1) and binding to the nuclear import receptor, Rch1/importin alpha. *Virology* 239, 340-351.
- Kirchmaier, A. L., and Sugden, B. (1995). Plasmid maintenance of derivatives of oriP of Epstein-Barr virus. *J. Virol.* 69, 1280-1283.
- Kirchmaier, A. L., and Sugden, B. (1998). Rep*: a viral element that can partially replace the origin of plasmid DNA synthesis of Epstein-Barr virus. *J. Virol.* 72, 4657-4666.
- Kisker, C., Hinrichs, W., Tovar, K., Hillen, W., and Saenger, W. (1995). The complex formed between Tet repressor and tetracycline-Mg²⁺ reveals mechanism of antibiotic resistance. *J. Mol. Biol.* 247, 260-280.
- Kitagawa, N., Goto, M., Kurozumi, K., Maruo, S., Fukayama, M., Naoe, T., Yasukawa, M., Hino, K., Suzuki, T., Todo, S., and Takada, K. (2000). Epstein-Barr virus-encoded poly(A)(-) RNA supports Burkitt's lymphoma growth through interleukin-10 induction. *EMBO J.* 19, 6742-6750.
- Komano, J., Sugiura, M., and Takada, K. (1998). Epstein-Barr virus contributes to the malignant phenotype and to apoptosis resistance in Burkitt's lymphoma cell line Akata. *J. Virol.* 72, 9150-9156.
- Koons, M. D., Van Scoy, S., and Hearing, J. (2001). The replicator of the Epstein-Barr virus latent cycle origin of DNA replication, oriP, is composed of multiple functional elements. *J. Virol.* 75, 10582-10592.
- Krafft, C., Hinrichs, W., Orth, P., Saenger, W., and Welfle, H. (1998a). Interaction of Tet repressor with operator DNA and with tetracycline studied by infrared and Raman spectroscopy. *Biophys. J.* 74, 63-71.
- Krafft, C., Hinrichs, W., Orth, P., Saenger, W., and Welfle, H. (1998b). Raman spectroscopic analysis of Tet repressor-operator DNA interaction in deuterium oxide. *Cell. Mol. Biol.* 44, 239-250.
- Krueger, C., Berens, C., Schmidt, A., Schnappinger, D., and Hillen, W. (2003). Single-chain Tet transregulators. *Nucleic Acids Res.* 31, 3050-3056.
- Krysan, P. J., and Calos, M. P. (1993b). Epstein-barr virus-based vectors that replicate in rodent cells. *Gene* 136, 137-143.
- Krysan, P. J., Haase, S. B., and Calos, M. P. (1989). Isolation of human sequences that replicate autonomously in human cells. *Molecular Biology of the Cell* 9, 1026-1033.
- Kube, D., Vockerodt, M., Weber, O., Hell, K., Wolf, J., Haier, B., Grasser, F. A., Muller-Lantzsch, N., Kieff, E., Diehl, V., and Tesch, H. (1999). Expression of Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 is associated with enhanced expression of CD25 in the Hodgkin cell line L428. *J. Virol.* 73, 1630-1636.
- Kuhn-Hallek, I., Sage, D. R., Stein, L., Groelle, H., and Fingerhuth, J. D. (1995). Expression of recombination activating genes (RAG-1 and RAG-2) in Epstein-Barr virus-bearing B cells. *Blood* 85, 1289-1299.

- Labib, K., Kearsley, S. E., and Diffley, J. F. (2001). MCM2-7 proteins are essential components of prereplicative complexes that accumulate cooperatively in the nucleus during G1-phase and are required to establish, but not maintain, the S-phase checkpoint. *Molecular Biology of the Cell* 12, 3658-3667.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Laux, G., Perricaudet, M., and Farrell, P. J. (1988). A spliced Epstein-Barr virus gene expressed in immortalized lymphocytes is created by circularization of the linear viral genome. *EMBO J.* 7, 769-774.
- Laybourn, P. J., and Kadonaga, J. T. (1991). Role of nucleosomal cores and histone H1 in regulation of transcription by RNA polymerase II. *Science* 254, 238-245.
- Lederer, T., Kintrup, M., Takahashi, M., Sum, P. E., Ellestad, G. A., and Hillen, W. (1996). Tetracycline analogs affecting binding to Tn10-Encoded Tet repressor trigger the same mechanism of induction. *Biochemistry* 35, 7439-7446.
- Lee, M. A., Diamond, M. E., and Yates, J. L. (1999). Genetic evidence that EBNA-1 is needed for efficient, stable latent infection by Epstein-Barr virus. *J. Virol.* 73, 2974-2982.
- Lehn, D. A., Elton, T. S., Johnson, K. R., and Reeves, R. (1988). A conformational study of the sequence specific binding of HMG-I (Y) with the bovine interleukin-2 cDNA. *Biochem. Int.* 16, 963-971.
- Leight, E. R., and Sugden, B. (2000). EBNA-1: a protein pivotal to latent infection by Epstein-Barr virus. *Reviews in Medical Virology* 10, 83-100.
- Leight, E. R., and Sugden, B. (2001). Establishment of an oriP replicon is dependent upon an infrequent, epigenetic event. *Mol. Cell. Biol.* 21, 4149-4161.
- Levitskaya, J., Coram, M., Levitsky, V., Imreh, S., Steigerwald-Mullen, P. M., Klein, G., Kurilla, M. G., and Masucci, M. G. (1995). Inhibition of antigen processing by the internal repeat region of the Epstein-Barr virus nuclear antigen-1. *Nature* 375, 685-688.
- Levitskaya, J., Sharipo, A., Leonchiks, A., Ciechanover, A., and Masucci, M. G. (1997). Inhibition of ubiquitin/proteasome-dependent protein degradation by the Gly-Ala repeat domain of the Epstein-Barr virus nuclear antigen 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 12616-12621.
- Lewis, R. T., Andreucci, A., and Nikolajczyk, B. S. (2001). PU.1-mediated transcription is enhanced by HMG-I(Y)-dependent structural mechanisms. *J. Biol. Chem.* 276, 9550-9557.
- Li, L., Yoder, K., Hansen, M. S., Olvera, J., Miller, M. D., and Bushman, F. D. (2000). Retroviral cDNA integration: stimulation by HMG I family proteins. *J. Virol.* 74, 10965-10974.

- Little, R. D., and Schildkraut, C. L. (1995). Initiation of latent DNA replication in the Epstein-Barr virus genome can occur at sites other than the genetically defined origin. *Mol. Cell. Biol.* *15*, 2893-2903.
- Liu, W. M., Guerra-Vladusic, F. K., Kurakata, S., Lupu, R., and Kohwi-Shigematsu, T. (1999). HMG-I(Y) recognizes base-unpairing regions of matrix attachment sequences and its increased expression is directly linked to metastatic breast cancer phenotype. *Cancer Res.* *59*, 5695-5703.
- Lund, T., Holtlund, J., Fredriksen, M., and Laland, S. G. (1983). On the presence of two new high mobility group-like proteins in HeLa S3 cells. *FEBS Lett.* *152*, 163-167.
- Lupton, S., and Levine, A. J. (1985). Mapping genetic elements of Epstein-Barr virus that facilitate extrachromosomal persistence of Epstein-Barr virus-derived plasmids in human cells. *Mol. Cell. Biol.* *5*, 2533-2542.
- Lutz, R., and Bujard, H. (1997). Independent and tight regulation of transcriptional units in *Escherichia coli* via the LacR/O, the TetR/O and AraC/I1-I2 regulatory elements. *Nucleic Acids Res.* *25*, 1203-1210.
- Mackey, D., Middleton, T., and Sugden, B. (1995). Multiple regions within EBNA1 can link DNAs. *J. Virol.* *69*, 6199-6208.
- Mackey, D., and Sugden, B. (1999). The linking regions of EBNA1 are essential for its support of replication and transcription. *Mol. Cell. Biol.* *19*, 3349-3359.
- Marechal, V., Dehee, A., Chikhi-Brachet, R., Piolot, T., Coppey-Moisan, M., and Nicolas, J. C. (1999). Mapping EBNA-1 domains involved in binding to metaphase chromosomes. *J. Virol.* *73*, 4385-4392.
- Martelli, A. M., Riccio, M., Bareggi, R., Manfioletti, G., Tabellini, G., Baldini, G., Narducci, P., and Giancotti, V. (1998). Intranuclear distribution of HMGI/Y proteins. An immunocytochemical study. *J. Histochem. Cytochem.* *46*, 863-864.
- Mason, L. J., Ravirajan, C. T., Latchman, D. S., and Isenberg, D. A. (2001). A human anti-dsDNA monoclonal antibody caused hyaline thrombi formation in kidneys of 'leaky' SCID mice. *Clin. Exp. Immunol.* *126*, 137-142.
- Matsuo, T., Heller, M., Petti, L., O'Shiro, E., and Kieff, E. (1984). Persistence of the entire Epstein-Barr virus genome integrated into human lymphocyte DNA. *Science* *226*, 1322-1325.
- Mattia, E., Ceridono, M., Chichiarelli, S., and D'Erme, M. (1999). Interactions of Epstein-Barr virus origins of replication with nuclear matrix in the latent and in the lytic phases of viral infection. *Virology* *262*, 9-17.
- McMurry, L., Petrucci, R. E., Jr., and Levy, S. B. (1980). Active efflux of tetracycline encoded by four genetically different tetracycline resistance determinants in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *77*, 3974-3977.

- Meier, I., Wray, L. V., and Hillen, W. (1988). Differential regulation of the Tn10-encoded tetracycline resistance genes tetA and tetR by the tandem tet operators O1 and O2. *EMBO J.* 7, 567-572.
- Mendez, B., Tachibana, C., and Levy, S. B. (1980). Heterogeneity of tetracycline resistance determinants. *Plasmid* 3, 99-108.
- Middleton, T., and Sugden, B. (1992). EBNA1 can link the enhancer element to the initiator element of the Epstein-Barr virus plasmid origin of DNA replication. *J. Virol.* 66, 489-495.
- Middleton, T., and Sugden, B. (1994). Retention of plasmid DNA in mammalian cells is enhanced by binding of the Epstein-Barr virus replication protein EBNA1. *J. Virol.* 68, 4067-4071.
- Miller, G., Shope, T., Lisco, H., Stitt, D., and Lipman, M. (1972). Epstein-Barr virus: transformation, cytopathic changes, and viral antigens in squirrel monkey and marmoset leukocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69, 383-387.
- Miyashita, E. M., Yang, B., Babcock, G. J., and Thorley-Lawson, D. A. (1997). Identification of the site of Epstein-Barr virus persistence in vivo as a resting B cell. *J. Virol.* 71, 4882-4891.
- Miyashita, E. M., Yang, B., Lam, K. M., Crawford, D. H., and Thorley-Lawson, D. A. (1995). A novel form of Epstein-Barr virus latency in normal B cells in vivo. *Cell* 80, 593-601.
- Modrow, S., and Falke, D. (1998). *Molekulare Virologie*. Molekulare Virologie, Spektrum Akademischer Verlag.
- Muyrers, J. P., Zhang, Y., and Stewart, A. F. (2001). Techniques: Recombinogenic engineering--new options for cloning and manipulating DNA. *Trends Biochem. Sci.* 26, 325-331.
- Nagpal, S., Ghosn, C., DiSepio, D., Molina, Y., Sutter, M., Klein, E. S., and Chandraratna, R. A. (1999). Retinoid-dependent recruitment of a histone H1 displacement activity by retinoic acid receptor. *J. Biol. Chem.* 274, 22563-22568.
- 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.
- Neuhierl, B., Feederle, R., Hammerschmidt, W., and Delecluse, H. J. (2002). Glycoprotein gp110 of Epstein-Barr virus determines viral tropism and efficiency of infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 15036-15041.
- Nissen, M. S., Langan, T. A., and Reeves, R. (1991). Phosphorylation by cdc2 kinase modulates DNA binding activity of high mobility group I nonhistone chromatin protein. *J. Biol. Chem.* 266, 19945-19952.

- Nissen, M. S., and Reeves, R. (1995). Changes in superhelicity are introduced into closed circular DNA by binding of high mobility group protein I/Y. *J. Biol. Chem.* *270*, 4355-4360.
- Nonoyama, M., and Pagano, J. S. (1973). Homology between Epstein-Barr virus DNA and viral DNA from Burkitt's lymphoma and nasopharyngeal carcinoma determined by DNA-DNA reassociation kinetics. *Nature* *242*, 44-47.
- Norio, P., Schildkraut, C. L., and Yates, J. L. (2000). Initiation of DNA replication within oriP is dispensable for stable replication of the latent Epstein-Barr virus chromosome after infection of established cell lines. *J. Virol.* *74*, 8563-8574.
- Orth, P., Cordes, F., Schnappinger, D., Hillen, W., Saenger, W., and Hinrichs, W. (1998). Conformational changes of the Tet repressor induced by tetracycline trapping. *J. Mol. Biol.* *279*, 439-447.
- Orth, P., Schnappinger, D., Hillen, W., Saenger, W., and Hinrichs, W. (2000). Structural basis of gene regulation by the tetracycline inducible Tet repressor-operator system. *Nat. Struct. Biol.* *7*, 215-219.
- Pfuller, R., and Hammerschmidt, W. (1996). Plasmid-like replicative intermediates of the Epstein-Barr virus lytic origin of DNA replication. *J. Virol.* *70*, 3423-3431.
- Pook, E., Grimm, S., Bonin, A., Winkler, T., and Hillen, W. (1998). Affinities of mAbs to Tet repressor complexed with operator or tetracycline suggest conformational changes associated with induction. *Eur. J. Biochem.* *258*, 915-922.
- Pope, J. H., Horne, M. K., and Scott, W. (1968). Transformation of foetal human leukocytes in vitro by filtrates of a human leukaemic cell line containing herpes-like virus. *Int. J. Cancer* *3*, 857-866.
- Puglielli, M. T., Woisetschlaeger, M., and Speck, S. H. (1996). oriP is essential for EBNA gene promoter activity in Epstein-Barr virus-immortalized lymphoblastoid cell lines. *J. Virol.* *70*, 5758-5768.
- Pulvertaft, R. J. V. (1964). Cytology of Burkitt's tumour (African lymphoma). *Lancet* *i*, 238-240.
- Raghuraman, M. K., Winzeler, E. A., Collingwood, D., Hunt, S., Wodicka, L., Conway, A., Lockhart, D. J., Davis, R. W., Brewer, B. J., and Fangman, W. L. (2001). Replication dynamics of the yeast genome. *Science* *294*, 115-121.
- Rawlins, D. R., Milman, G., Hayward, S. D., and Hayward, G. S. (1985). Sequence-specific DNA binding of the Epstein-Barr virus nuclear antigen (EBNA-1) to clustered sites in the plasmid maintenance region. *Cell* *42*, 859-868.
- Reedman, B. M., and Klein, G. (1973). Cellular localization of an Epstein-Barr virus (EBV)-associated complement-fixing antigen in producer and non-producer lymphoblastoid cell lines. *Int. J. Cancer* *11*, 499-520.
- Reeves, R. (1992). Chromatin changes during the cell cycle. *Curr. Opin. Cell Biol.* *4*, 413-423.

- Reeves, R. (2001). Molecular biology of HMGA proteins: hubs of nuclear function. *Gene* 277, 63-81.
- Reeves, R., and Beckerbauer, L. (2001). HMGI/Y proteins: flexible regulators of transcription and chromatin structure. *Biochem. Biophys. Acta.* 1519, 13-29.
- Reeves, R., Edberg, D. D., and Li, Y. (2001). Architectural transcription factor HMGI(Y) promotes tumor progression and mesenchymal transition of human epithelial cells. *Mol. Cell. Biol.* 21, 575-594.
- Reeves, R., Elton, T. S., Nissen, M. S., Lehn, D., and Johnson, K. R. (1987). Posttranscriptional gene regulation and specific binding of the nonhistone protein HMG-I by the 3' untranslated region of bovine interleukin 2 cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 6531-6535.
- Reeves, R., Langan, T. A., and Nissen, M. S. (1991). Phosphorylation of the DNA-binding domain of nonhistone high-mobility group I protein by cdc2 kinase: reduction of binding affinity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 1671-1675.
- Reeves, R., and Nissen, M. S. (1990). The A.T-DNA-binding domain of mammalian high mobility group I chromosomal proteins. A novel peptide motif for recognizing DNA structure. *J. Biol. Chem.* 265, 8573-8582.
- Reeves, R., and Nissen, M. S. (1993). Interaction of high mobility group-I (Y) nonhistone proteins with nucleosome core particles. *J. Biol. Chem.* 268, 21137-21146.
- Reeves, R., and Nissen, M. S. (1995). Cell cycle regulation and functions of HMG-I(Y). *Prog. Cell Cycle Res.* 1, 339-349.
- Reeves, R., and Nissen, M. S. (1999). Purification and assays for high mobility group HMG-I(Y) protein function. *Methods Enzymol.* 304, 155-188.
- Reeves, R., and Wolffe, A. P. (1996). Substrate structure influences binding of the non-histone protein HMG-I(Y) to free nucleosomal DNA. *Biochemistry* 35, 5063-5074.
- Reisman, D., and Sugden, B. (1986). trans activation of an Epstein-Barr viral transcriptional enhancer by the Epstein-Barr viral nuclear antigen 1. *Mol. Cell. Biol.* 6, 3838-3846.
- Reisman, D., Yates, J., and Sugden, B. (1985). A putative origin of replication of plasmids derived from Epstein-Barr virus is composed of two cis-acting components. *Mol. Cell. Biol.* 5, 1822-1832.
- Rickinson, A. B., and Kieff, E. (2001). Epstein-Barr Virus. In *Virology*, D. M. Knipe, and P. M. Howley, eds. (Philadelphia, Pa, Lippincott), pp. 2575-2627.
- Ritzi, M., Tillack, K., Gerhardt, J., Ott, E., Humme, S., Kremmer, E., Hammerschmidt, W., and Schepers, A. (2003). Complex Protein-DNA Dynamics at the Latent Origin of DNA Replication of Epstein-Barr Virus. *J. Cell Sci.* 116, 3971-3984.
- Rossi, F. M., and Blau, H. M. (1998). Recent advances in inducible gene expression systems. *Curr. Opin. Biotechnol.* 9, 451-456.

- Rowe, M., Rowe, D. T., Gregory, C. D., Young, L. S., Farrell, P. J., Rupani, H., and Rickinson, A. B. (1987). Differences in B cell growth phenotype reflect novel patterns of Epstein-Barr virus latent gene expression in Burkitt's lymphoma cells. *EMBO J.* *6*, 2743-2751.
- Rowe, M., Young, L. S., Crocker, J., Stokes, H., Henderson, S., and Rickinson, A. B. (1991). Epstein-Barr virus (EBV)-associated lymphoproliferative disease in the SCID mouse model: implications for the pathogenesis of EBV-positive lymphomas in man. *J. Exp. Med.* *173*, 147-158.
- Saitoh, Y., and Laemmli, U. K. (1994). Metaphase chromosome structure: bands arise from a differential folding path of the highly AT-rich scaffold. *Cell* *76*, 609-622.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning. A laboratory manual.* Molecular Cloning. A laboratory manual, Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sauer, B., and Henderson, N. (1988). Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *85*, 5166-5170.
- Schaefer, B. C., Strominger, J. L., and Speck, S. H. (1995). Redefining the Epstein-Barr virus-encoded nuclear antigen EBNA-1 gene promoter and transcription initiation site in group I Burkitt lymphoma cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *92*, 10565-10569.
- Schepers, A., and Diffley, J. F. X. (2001). Mutational Analysis of Conserved Sequence Motifs of the Budding Yeast Cdc6 protein. *J. Mol. Biol.* *308*, 597-608.
- Schepers, A., Ritzi, M., Bousset, K., Kremmer, E., Yates, J. L., Harwood, J., Diffley, J. F., and Hammerschmidt, W. (2001). Human origin recognition complex binds to the region of the latent origin of DNA replication of Epstein-Barr virus. *EMBO J.* *20*, 4588-4602.
- Schnappinger, D., and Hillen, W. (1996). Tetracyclines: antibiotic action, uptake, and resistance mechanisms. *Arch. Microbiol.* *165*, 359-369.
- Schultze, N., Burki, Y., Lang, Y., Certa, U., and Bluethmann, H. (1996). Efficient control of gene expression by single step integration of the tetracycline system in transgenic mice. *Nat. Biotechnol.* *14*, 499-503.
- Sears, J., Kolman, J., Wahl, G. M., and Aiyar, A. (2003). Metaphase chromosome tethering is necessary for the DNA synthesis and maintenance of oriP plasmids but is insufficient for transcription activation by Epstein-Barr nuclear antigen 1. *J. Virol.* *77*, 11767-11780.
- Sheng, Y., Mancino, V., and Birren, B. (1995). Transformation of *Escherichia coli* with large DNA molecules by electroporation. *Nucleic Acids Res.* *23*, 1990-1996.
- Shire, K., Ceccarelli, D. F., Avolio-Hunter, T. M., and Frappier, L. (1999). EBP2, a human protein that interacts with sequences of the Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 important for plasmid maintenance. *J. Virol.* *73*, 2587-2595.

-
- Sigler, A., Schubert, P., Hillen, W., and Niederweis, M. (2000). Permeation of tetracyclines through membranes of liposomes and *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* 267, 527-534.
- Solomon, M. J., Strauss, F., and Varshavsky, A. (1986). A mammalian high mobility group protein recognizes any stretch of six A.T base pairs in duplex DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 1276-1280.
- Someya, Y., Yamaguchi, A., and Sawai, T. (1995). A novel glycylicycline, 9-(N,N-dimethylglycylamido)-6-demethyl-6-deoxytetracycline, is neither transported nor recognized by the transposon Tn10-encoded metal-tetracycline/H⁺ antiporter. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39, 247-249.
- Southern, E. M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98, 503-517.
- Spahn, C. M., and Prescott, C. D. (1996). Throwing a spanner in the works: antibiotics and the translation apparatus. *J. Mol. Med.* 74, 423-439.
- Speck, S. H., and Strominger, J. L. (1985). Analysis of the transcript encoding the latent Epstein-Barr virus nuclear antigen I: a potentially polycistronic message generated by long-range splicing of several exons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 8305-8309.
- Srinivas, S. K., and Sixbey, J. W. (1995). Epstein-Barr virus induction of recombinase-activating genes RAG1 and RAG2. *J. Virol.* 69, 8155-8158.
- Sternas, L., Middleton, T., and Sugden, B. (1990). The average number of molecules of Epstein-Barr nuclear antigen 1 per cell does not correlate with the average number of Epstein-Barr virus (EBV) DNA molecules per cell among different clones of EBV-immortalized cells. *J. Virol.* 64, 2407-2410.
- Strauss, F., and Varshavsky, A. (1984). A protein binds to a satellite DNA repeat at three specific sites that would be brought into mutual proximity by DNA folding in the nucleosome. *Cell* 37, 889-901.
- Strick, R., and Laemmli, U. K. (1995). SARs are cis DNA elements of chromosome dynamics: synthesis of a SAR repressor protein. *Cell* 83, 1137-1148.
- Sugden, B. (2002). In the beginning: a viral origin exploits the cell. *Trends Biochem. Sci.* 27, 1-3.
- Sugden, B., and Mark, W. (1977). Clonal transformation of adult human leukocytes by Epstein-Barr virus. *J. Virol.* 23, 503-508.
- Sugden, B., Marsh, K., and Yates, J. (1985). A vector that replicates as a plasmid and can be efficiently selected in B-lymphoblasts transformed by Epstein-Barr virus. *Mol. Cell. Biol.* 5, 410-413.
- Sugden, B., and Warren, N. (1988). Plasmid origin of replication of Epstein-Barr virus, oriP, does not limit replication in cis. *Mol. Biol. Med.* 5, 85-94.

- Sung, N. S., Wilson, J., Davenport, M., Sista, N. D., and Pagano, J. S. (1994). Reciprocal regulation of the Epstein-Barr virus BamHI-F promoter by EBNA-1 and an E2F transcription factor. *Mol. Cell. Biol.* *14*, 7144-7152.
- Suzuki, Y., Ohsugi, K., and Ono, Y. (1992). EBV increases phosphoinositide kinase activities in human B cells. *J. Immunol.* *149*, 207-213.
- Tahara, H., Tokutake, Y., Maeda, S., Kataoka, H., Watanabe, T., Satoh, M., Matsumoto, T., Sugawara, M., Ide, T., Goto, M., *et al.* (1997). Abnormal telomere dynamics of B-lymphoblastoid cell strains from Werner's syndrome patients transformed by Epstein-Barr virus. *Oncogene* *15*, 1911-1920.
- Takada, K., Horinouchi, K., Ono, Y., Aya, T., Osato, T., Takahashi, M., and Hayasaka, S. (1991). An Epstein-Barr virus-producer line Akata: establishment of the cell line and analysis of viral DNA. *Virus Genes* *5*, 147-156.
- Takahashi, M., Altschmied, L., and Hillen, W. (1986). Kinetic and equilibrium characterization of the Tet repressor-tetracycline complex by fluorescence measurements. Evidence for divalent metal ion requirement and energy transfer. *J. Mol. Biol.* *187*, 341-348.
- 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.
- Thorley-Lawson, D. A., and Babcock, G. J. (1999). A model for persistent infection with Epstein-Barr virus: the stealth virus of human B cells. *Life Sci.* *65*, 1433-1453.
- Thorley-Lawson, D. A., and Mann, K. P. (1985). Early events in Epstein-Barr virus infection provide a model for B cell activation. *J. Exp. Med.* *162*, 45-59.
- Tomkinson, B., Robertson, E., and Kieff, E. (1993). Epstein-Barr virus nuclear proteins EBNA-3A and EBNA-3C are essential for B-lymphocyte growth transformation. *J. Virol.* *67*, 2014-2025.
- Triezenberg, S. J., Kingsbury, R. C., and McKnight, S. L. (1988). Functional dissection of VP16, the trans-activator of herpes simplex virus immediate early gene expression. *Genes Dev.* *2*, 718-729.
- Tsimbouri, P., Drotar, M. E., Coy, J. L., and Wilson, J. B. (2002). bcl-xL and RAG genes are induced and the response to IL-2 enhanced in EmuEBNA-1 transgenic mouse lymphocytes. *Oncogene* *21*, 5182-5187.
- Urlinger, S., Baron, U., Thellmann, M., Hasan, M. T., Bujard, H., and Hillen, W. (2000). Exploring the sequence space for tetracycline-dependent transcriptional activators: novel mutations yield expanded range and sensitivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *97*, 7963-7968.
- Van Scoy, S., Watakabe, I., Krainer, A. R., and Hearing, J. (2000). Human p32: a coactivator for Epstein-Barr virus nuclear antigen-1-mediated transcriptional activation and possible role in viral latent cycle DNA replication. *Virology* *275*, 145-157.

- Varshavsky, A., Levinger, L., Sundin, O., Barsoum, J., Ozkaynak, E., Swerdlow, P., and Finley, D. (1983). Cellular and SV40 chromatin: replication, segregation, ubiquitination, nuclease-hypersensitive sites, HMG-containing nucleosomes, and heterochromatin-specific protein. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* *47 Pt 1*, 511-528.
- Wang, Y., Finan, J. E., Middeldorp, J. M., and Hayward, S. D. (1997). P32/TAP, a cellular protein that interacts with EBNA-1 of Epstein-Barr virus. *Virology* *236*, 18-29.
- Weintraub, H. (1984). Histone-H1-dependent chromatin superstructures and the suppression of gene activity. *Cell* *38*, 17-27.
- Wendtner, C. M., Kurzeder, C., Theiss, H. D., Kofler, D. M., Baumert, J., Delecluse, H. J., Janz, A., Hammerschmidt, W., and Hallek, M. (2003). High level of transgene expression in primary chronic lymphocytic leukemia cells using helper-virus-free recombinant Epstein-Barr virus vectors. *Exp. Hematol.* *31*, 99-108.
- Wilson, J. B., Bell, J. L., and Levine, A. J. (1996). Expression of Epstein-Barr virus nuclear antigen-1 induces B cell neoplasia in transgenic mice. *EMBO J.* *15*, 3117-3126.
- Wilson, J. B., and Levine, A. J. (1992). The oncogenic potential of Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 in transgenic mice. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* *182*, 375-384.
- Wood, L. J., Maher, J. F., Bunton, T. E., and Resar, L. M. (2000a). The oncogenic properties of the HMG-I gene family. *Cancer Res.* *60*, 4256-4261.
- Wood, L. J., Mukherjee, M., Dolde, C. E., Xu, Y., Maher, J. F., Bunton, T. E., Williams, J. B., and Resar, L. M. (2000b). HMG-I/Y, a new c-Myc target gene and potential oncogene. *Mol. Cell. Biol.* *20*, 5490-5502.
- Wray, L. V., Jr., Jorgensen, R. A., and Reznikoff, W. S. (1981). Identification of the tetracycline resistance promoter and repressor in transposon Tn10. *J. Bacteriol.* *147*, 297-304.
- Wray, L. V., Jr., and Reznikoff, W. S. (1983). Identification of repressor binding sites controlling expression of tetracycline resistance encoded by Tn10. *J. Bacteriol.* *156*, 1188-1191.
- Wu, H., Kapoor, P., and Frappier, L. (2002). Separation of the DNA replication, segregation, and transcriptional activation functions of Epstein-Barr nuclear antigen 1. *J. Virol.* *76*, 2480-2490.
- Wysokenski, D. A., and Yates, J. L. (1989). Multiple EBNA1-binding sites are required to form an EBNA1-dependent enhancer and to activate a minimal replicative origin within oriP of Epstein-Barr virus. *J. Virol.* *63*, 2657-2666.
- Yamaguchi, A., Iwasaki-Ohba, Y., Ono, N., Kaneko-Ohdera, M., and Sawai, T. (1991). Stoichiometry of metal-tetracycline/H⁺ antiport mediated by transposon Tn10-encoded tetracycline resistance protein in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* *282*, 415-418.

- Yamaguchi, A., Ono, N., Akasaka, T., Noumi, T., and Sawai, T. (1990). Metal-tetracycline/H⁺ antiporter of *Escherichia coli* encoded by a transposon, Tn10. The role of the conserved dipeptide, Ser65-Asp66, in tetracycline transport. *J. Biol. Chem.* *265*, 15525-15530.
- Yates, J., Warren, N., Reisman, D., and Sugden, B. (1984). A cis-acting element from the Epstein-Barr viral genome that permits stable replication of recombinant plasmids in latently infected cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *81*, 3806-3810.
- Yates, J. L. (1996). Epstein-Barr Virus DNA Replication. In *DNA Replication in Eukaryotic Cells*, M. L. DePamphilis, ed. (CSH Lab Press), pp. 751-773.
- Yates, J. L., and Guan, N. (1991). Epstein-Barr virus-derived plasmids replicate only once per cell cycle and are not amplified after entry into cells. *J. Virol.* *65*, 483-488.
- Yates, J. L., Warren, N., and Sugden, B. (1985). Stable replication of plasmids derived from Epstein-Barr virus in various mammalian cells. *Nature* *313*, 812-815.
- Yie, J., Liang, S., Merika, M., and Thanos, D. (1997). Intra- and intermolecular cooperative binding of high-mobility-group protein I(Y) to the beta-interferon promoter. *Mol. Cell. Biol.* *17*, 3649-3662.
- Yin, Y., Manoury, B., and Fahraeus, R. (2003). Self-inhibition of synthesis and antigen presentation by Epstein-Barr virus-encoded EBNA1. *Science* *301*, 1371-1374.
- Young, L. S., Dawson, C. W., and Eliopoulos, A. G. (2000). The expression and function of Epstein-Barr virus encoded latent genes. *Mol. Pathol.* *53*, 238-247.
- Young, L. S., and Murray, P. G. (2003). Epstein-Barr virus and oncogenesis: from latent genes to tumours. *Oncogene* *22*, 5108-5121.
- 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.
- Zhang, D., Frappier, L., Gibbs, E., Hurwitz, J., and O'Donnell, M. (1998). Human RPA (hSSB) interacts with EBNA1, the latent origin binding protein of Epstein-Barr virus. *Nucleic Acids Res.* *26*, 631-637.
- Zhang, X. M., and Verdine, G. L. (1999). A small region in HMG I(Y) is critical for cooperation with NF-kappaB on DNA. *J. Biol. Chem.* *274*, 20235-20243.
- Zhang, Z., Wang, Y. H., Zemlin, M., Findley, H. W., Bridges, S. L., Burrows, P. D., and Cooper, M. D. (2003). Molecular mechanism of serial VH gene replacement. *Ann N Y Acad Sci* *987*, 270-273.
- Zhao, K., Kas, E., Gonzalez, E., and Laemmli, U. K. (1993). SAR-dependent mobilization of histone H1 by HMG-I/Y in vitro: HMG-I/Y is enriched in H1-depleted chromatin. *EMBO J.* *12*, 3237-3247.

Danksagungen

Allen, die mir durch ihre Unterstützung bei der Erstellung der vorliegenden Doktorarbeit in der Abteilung Genvektoren der GSF in München geholfen haben, möchte ich ganz herzlich danken.

Herr Prof. Dr. Wolfgang Hammerschmidt gab mir die Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe unter Betreuung von Kristine meine Doktorarbeit zu beginnen. Später war er als direkter Betreuer, Triumviratsvorstand, Freehandbezwinger, „Feuerlöscher“ und Pipettenschwinger stets zur Stelle.

Dr. Kristine Bousset danke ich für die Initiation der Arbeit, die Hilfe beim Einleben in „Weißwurst-Deutschland“ und die Telefonate über EBNA1, *oriP* und das Leben an sich.

Dr. Aloys Schepers sei gedankt für die Übernahme der Betreuung nach dem Chef-Verlust.

Allen drei Chefs danke ich für hervorragende Betreuung, wissenschaftlichen Rat, ständige Diskussionsbereitschaft und das Korrekturlesen.

Herr Prof. Dr. Dirk Eick übernahm die Aufgaben und Pflichten des offiziellen Betreuers der Arbeit und hat mir, über den Rahmen seiner Pflichten hinausgehend, mehrfach hilfreich zur Seite gestanden.

Dr. Gilbert Reisbach verbrachte viele Stunden am FACS-Gerät und im Mausstall und ließ sich nie von Rückschlägen entmutigen, selbst dann nicht, als ich lernte den Freezer zu öffnen.

Dr. Christian Berens aus Erlangen danke ich für alles was materiell und gedanklich mit dem Tet-System zu tun hat. Dank vor allem dafür, dass die Rettung nahte, wenn das Wort „Hiiiiiiiiifeeeeeeee“ kaum im Email-Netz verschwunden war.

Dr. Henri-Jacques Delecluse und Dr. Regina Feederle aus Birmingham danke ich für die FISH-Bildchen, die den tristen Southern- und Western-Blot-Alltag etwas bunter machten.

Dr. Bernhard Neuhierl sei für viele praktische und theoretische Ratschläge gedankt und für das stoische Beantworten der dümmst-möglichen Computerfragen.

Dr. Elisabeth Kremmer, Dr. Bettina Kempkes und Dr. Martin Rowe danke für die Antikörper.

Ein Dankeschön an alle Mitglieder der Abteilung Genvektoren (natürlich inklusive der „Fremdgänger“ von Vaecgene) sowie des Instituts, für freundschaftliche Atmosphäre, gute Zusammenarbeit und Unterstützung in praktischen und theoretischen Fragen.

Den direkten Kollegen der „Hamster-Bay“ Elisabeth, Jeannine, Kristina, Marion und MP sowie der „gruppenexternen“ Dagmar soll dafür und für die Spieleabende besonders gedankt sein.

Dankeschön auch an meine „Leidensgenossen im Dokortitel-erringen“ Annette, Christoph, Eva, Frank, Isabel, Madeleine, Markus, Tine, Uli und Ute, die nicht nur fachlich helfend, unterstützend, rettend und mitfühlend an meiner Seite standen, sondern auch zeigten, dass es ein lustiges Leben im Hämatologikum, beim Mittagessen und danach gibt.

Elisabeth Spitzer (Medienherstellung) und den anderen Serviceeinrichtungen (wie z.B. Mausstall und Spülkuche) danke ich, da ohne sie meine Arbeit sehr viel mühsamer gewesen wäre

Meinen Eltern ein dickes Danke dafür, dass sie mir so Vieles ermöglichten (nicht zuletzt für den erweiterten Infinitiv, die Transskription, den Western-Plott und die Telefon-Rhabarber-Ohren). Oma für viele „freundliche Grüße“, welche die Zeit zwischen der Arbeit angenehmer gestalteten.

Meinem Lebensgefährten Ilja Quadt bin ich für fachlich kompetenten Rat, Kommasetzung und Co., Blitzableiterfunktionen, Ablenken, Antreiben, moralische und kulinarische Unterstützung und vor allem fürs direkte und telefonische Dasein dankbar.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Sibille Humme
Geburtsdatum	27.7.1975
Geburtsort	Leverkusen
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch

Schulischer Werdegang

1981 – 1985	Grundschule Odenthal
1985 – 1994	Gymnasium im Schulzentrum Schlebusch, Leverkusen
Juni 1994	Abitur

Studium

1994 – 2000	Studium der Biologie, Universität zu Köln
März 1998 – Februar 2000	Diplomarbeit am Lehrstuhl von Prof. Dr. Klaus Rajewsky, Institut für Genetik, Universität zu Köln
März 2000	Abschluss des Studiums der Biologie (Diplom)
Juni 2000 – September 2000	Studentische Hilfskraft bei Prof. Rajewsky
Oktober 2000 – Dezember 2003	Promotion in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Wolfgang Hammerschmidt, Abteilung Genvektoren, GSF, München

**Das EBNA1-Protein des Epstein-Barr Virus:
Genetische und funktionelle Analyse**

Anhang

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

von

Sibille Humme

München, März 2004

Anhang

(A-K) Überprüfung und Identitätskontrolle von Maxi-EBV-Mutanten

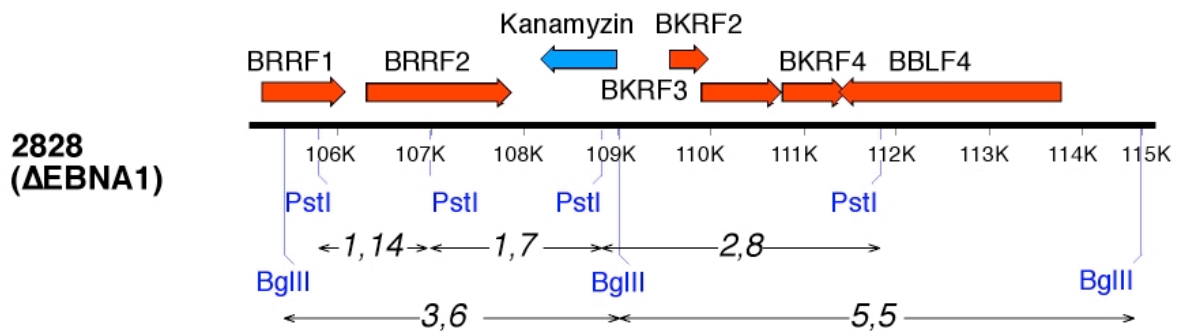
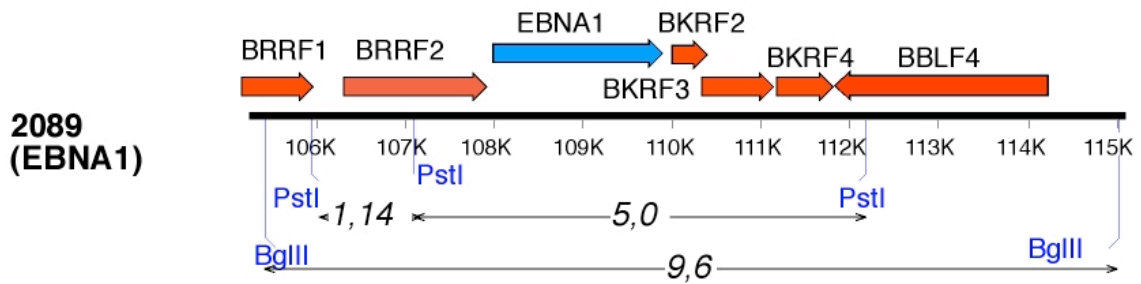
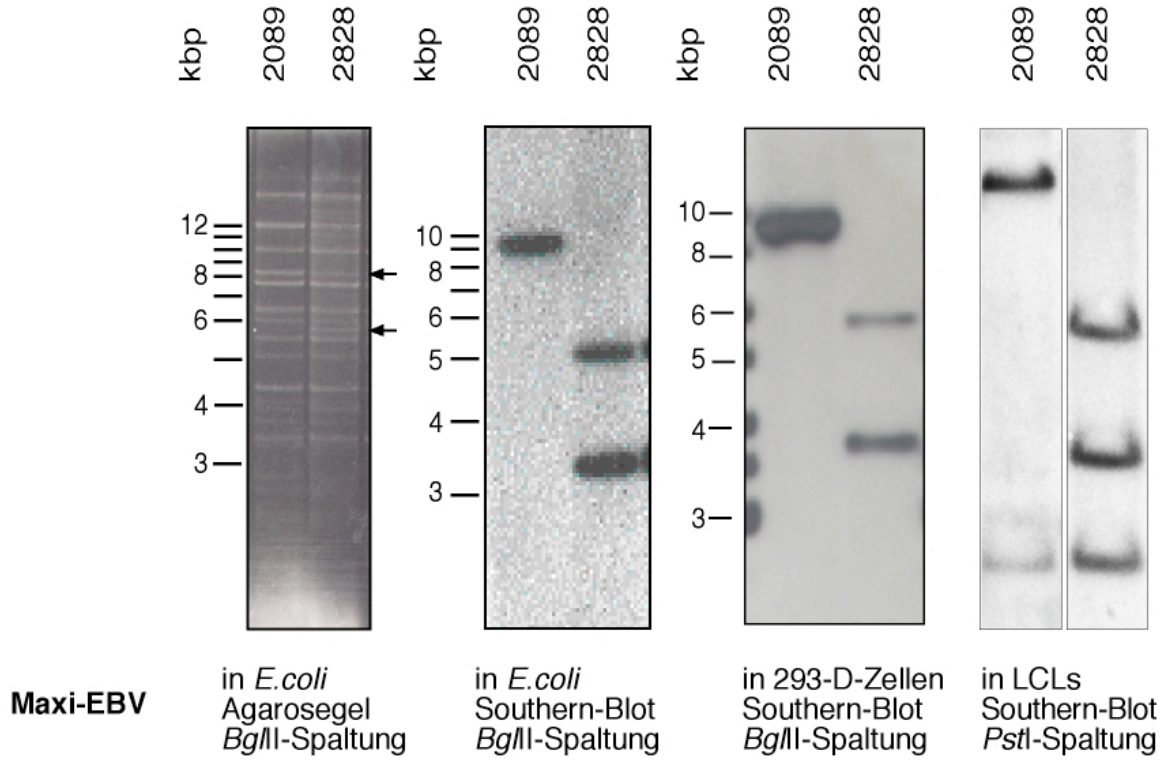
Abb. 7 zeigt schematisch die verschiedenen Prozessschritte zur Herstellung mutanter Maxi-EBVs auf der Grundlage des prototypen 2089. Sie umfassen die homologe Rekombination in *E.coli*, die stabile Selektion der Mutanten in 293-D-Zellen und die Wachstumstransformation von primären humanen B-Zellen zur Etablierung von LCLs. Die Prozessschritte wurden, soweit erreicht, bei allen Maxi-EBV-Mutanten zur Qualitäts- und Identitätskontrolle verfolgt. Welcher der Prozessschritte dargestellt ist, wird in der Legende direkt unter dem jeweiligen Agarosegel oder Southern-Blot gezeigt. Die Überprüfung erfolgte anhand von Restriktionsfragment-Mustern des Maxi-EBV-Plasmids (jeweils im oberen linken Teil der Abbildung gezeigt) und Southern-Blot-Hybridisierungen des mutierten Genortes mit geeigneten spezifischen radioaktiven Sonden. Die Kontrollen wurden mit Plasmidpräparationen aus *E.coli* und, soweit diese Schritte erreicht wurden, mit gesamtzellulärer DNA aus 293-D-Zellen bzw. LCLs durchgeführt. Zur besseren Übersichtlichkeit werden nur die entscheidenden Ausschnitte der Agarosegele und der Southern-Blots gezeigt. Da zum Teil unterschiedliche Mutanten auf einem Gel analysiert wurden, findet sich dieselbe p2089-Kontrolle in mehreren Abbildungen wieder. (z.B. C-D).

Für die Restriktions-Analysen wurden ca. 1 μg CsCl-gereinigte Plasmid-DNA aus *E.coli* und für die Southern-Blot-Analysen ca. 15 μg gesamtzelluläre DNA aus 293-D-Zellen oder LCLs eingesetzt. Die Spaltung erfolgte mit den angegebenen Restriktionsenzymen. Die auftretenden Fragmente wurden mit denen des Ausgangs-Plasmids (p2089, p2828 oder p2978) verglichen. Banden, welche die Mutante vom Ausgangs-EBV-Genom differenzieren, sind durch Pfeile gekennzeichnet. Die entstandenen unterschiedlichen Fragmente sind in einem Schema im unteren Teil der Abbildungen dargestellt. Die DNA des photographierten Agarosegels wurde auf eine Nylonmembran transferiert und mit radioaktiv markierten Sonden hybridisiert. In allen untersuchten Prozessstadien konnte die Identität der Klone bestätigt werden. Die mit (*) bezeichneten Banden einiger Abbildungen zeigen unspezifische Signale.

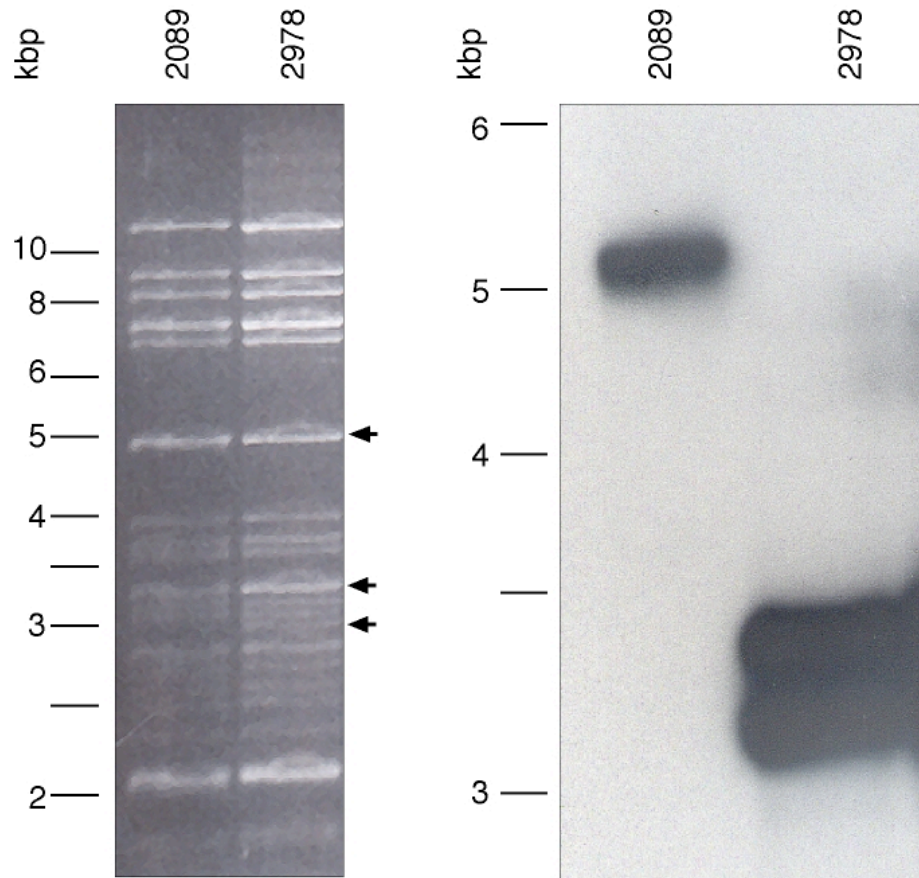
(C-K) Die hier abgebildeten mutanten Maxi-EBV-Genome erlaubten es aus ungeklärten Gründen nicht, Virusproduzenten in 293-D-Zellen zu etablieren.

(D, E) Das Bandenmuster im Agarosegel von p2988 und p2989 ist anders als erwartet, da in diesen Mutanten die *TR* rekombinierten, wodurch ein verändertes Bandenmuster entstand.

A: ΔEBNA1 Maxi-EBV (2828)



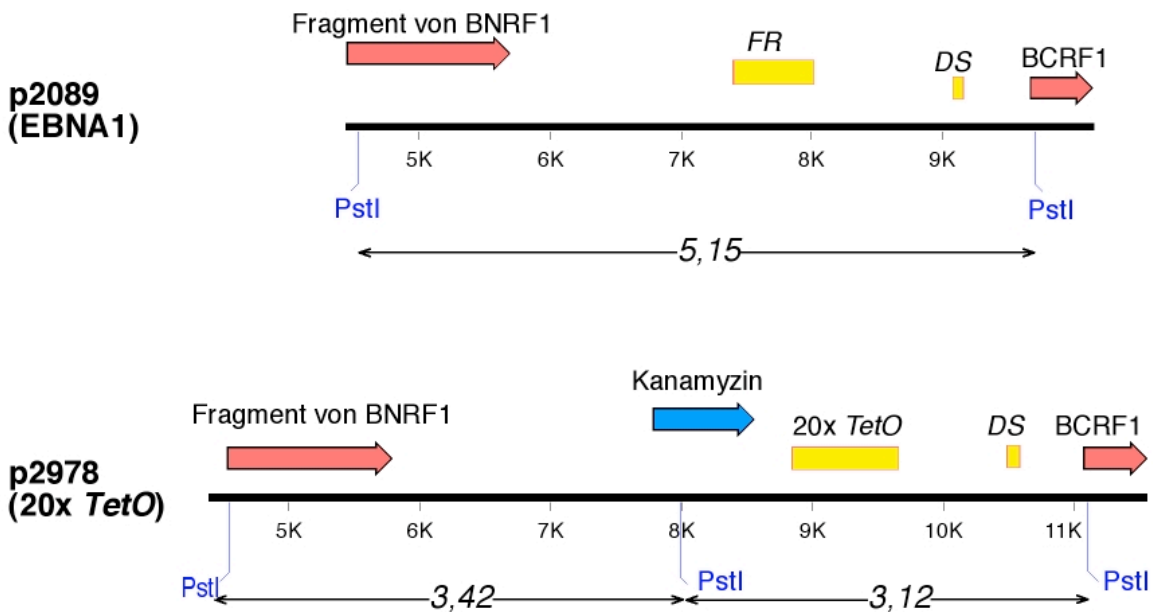
B: Maxi-EBV mit 20x *TetO* statt *FR* (p2978)



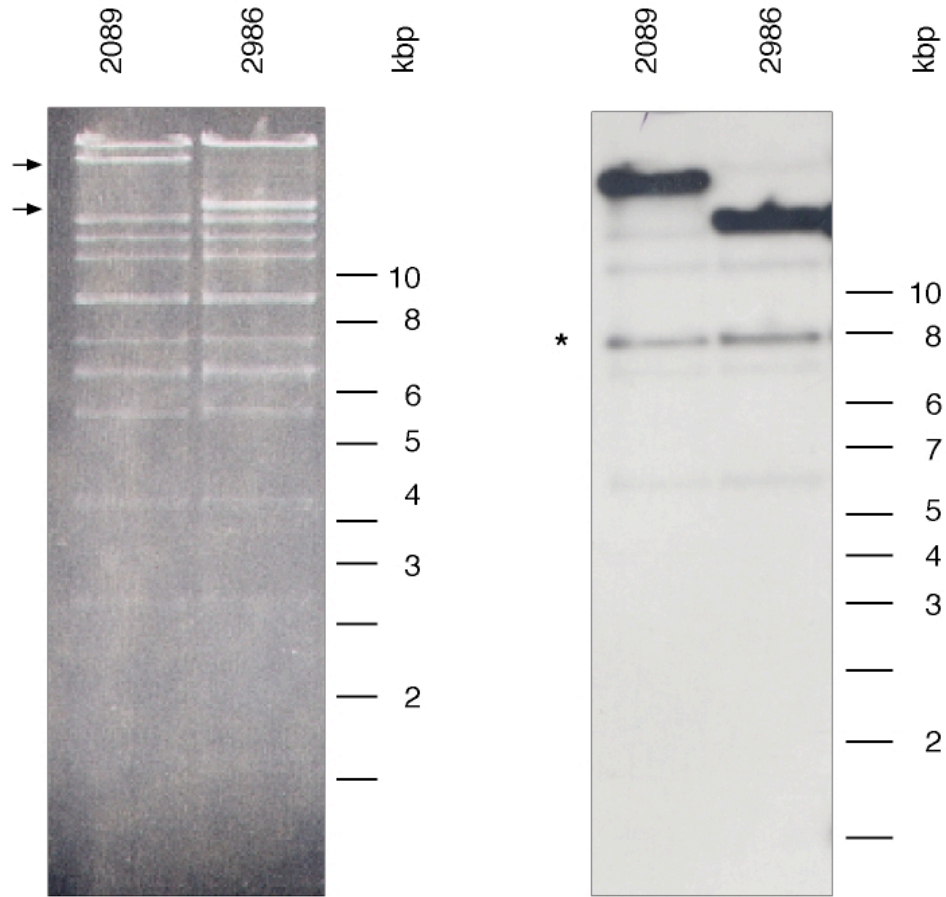
Maxi-EBV

in *E.coli*
Agarosegel
PstI-Spaltung

in *E.coli*
Southern-Blot
PstI-Spaltung



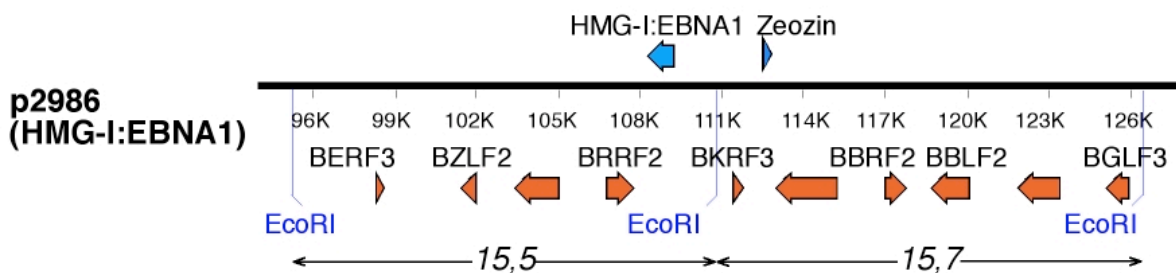
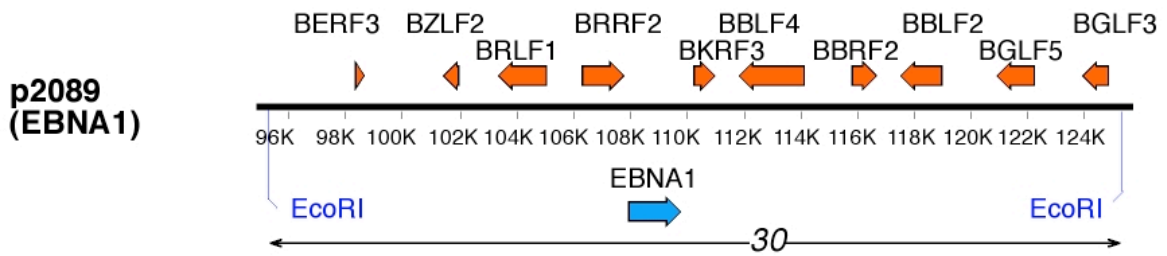
C: Maxi-EBV mit HMG-I:EBNA1 im EBNA1 Lokus (p2986)



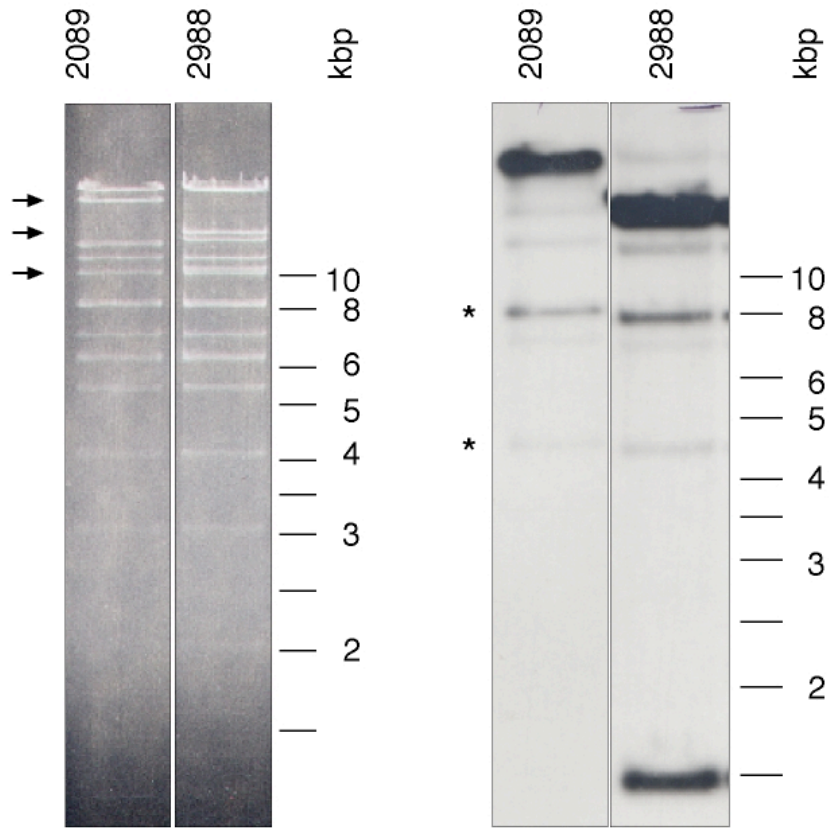
Maxi-EBV

in *E.coli*
Agarosegel
EcoRI-Spaltung

in *E.coli*
Southern-Blot
EcoRI-Spaltung



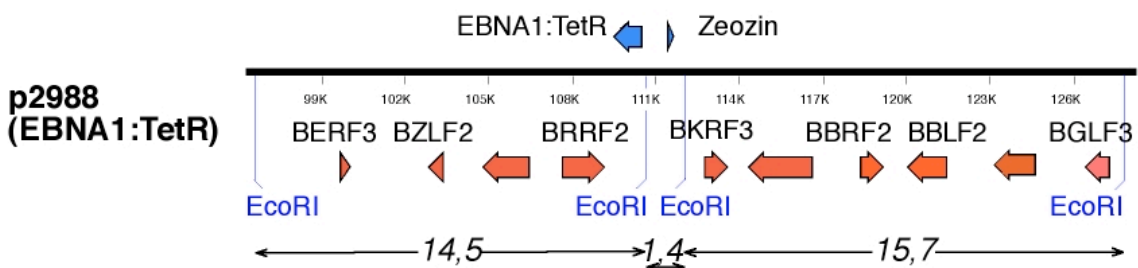
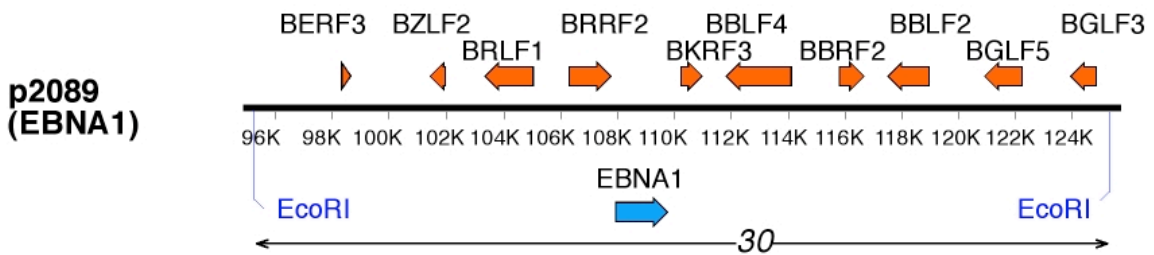
D: Maxi-EBV mit EBNA1:TetR im EBNA1-Lokus (p2988)



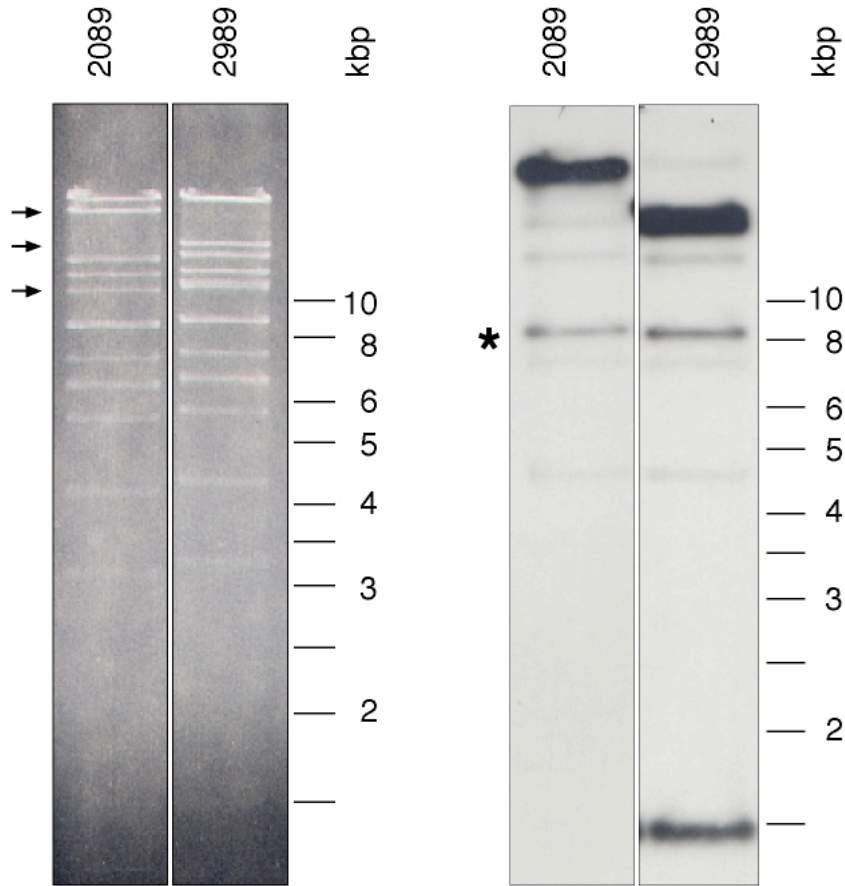
Maxi-EBV

in *E.coli*
Agarosegel
EcoRI-Spaltung

in *E.coli*
Southern-Blot
EcoRI-Spaltung



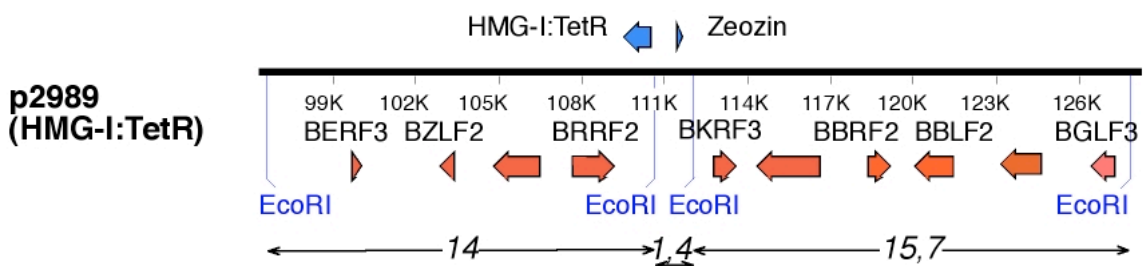
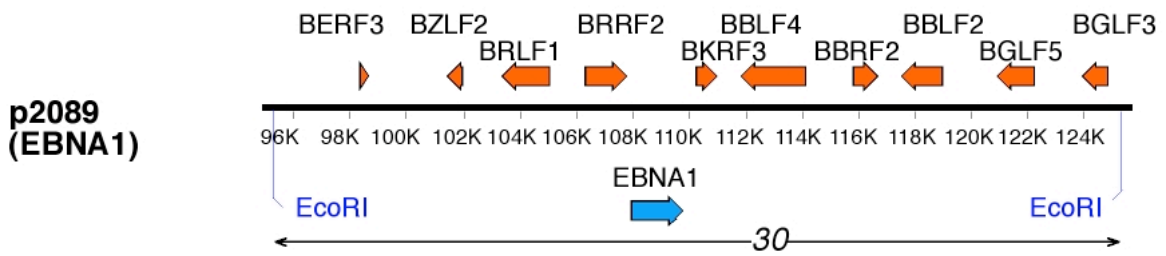
E: Maxi-EBV mit HMG-I:TetR im EBNA1-Lokus (p2989)



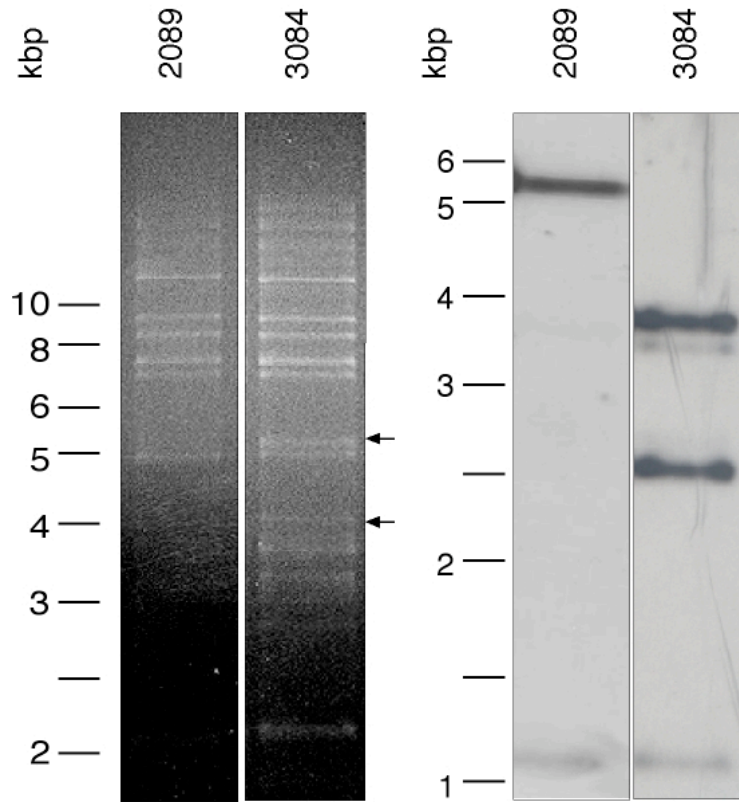
Maxi-EBV

in *E.coli*
Agarosegel
EcoRI-Spaltung

in *E.coli*
Southern-Blot
EcoRI-Spaltung



F: Maxi-EBV mit HMG-I:EBNA1 im EBNA1-Lokus (p3084)

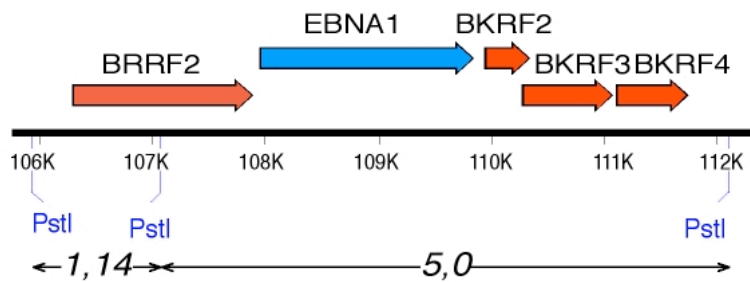


Maxi-EBV

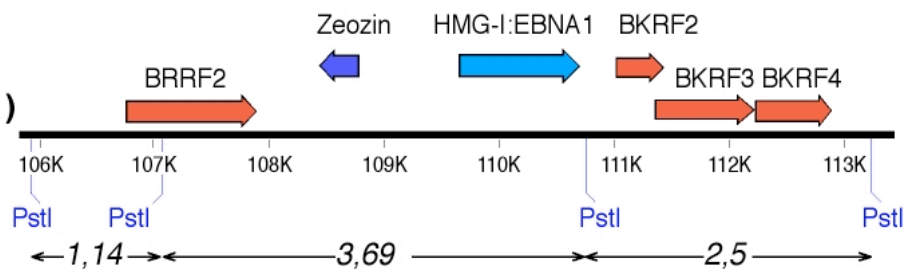
in *E.coli*
Agarosegel
PstI-Spaltung

in *E.coli*
Southern-Blot
PstI-Spaltung

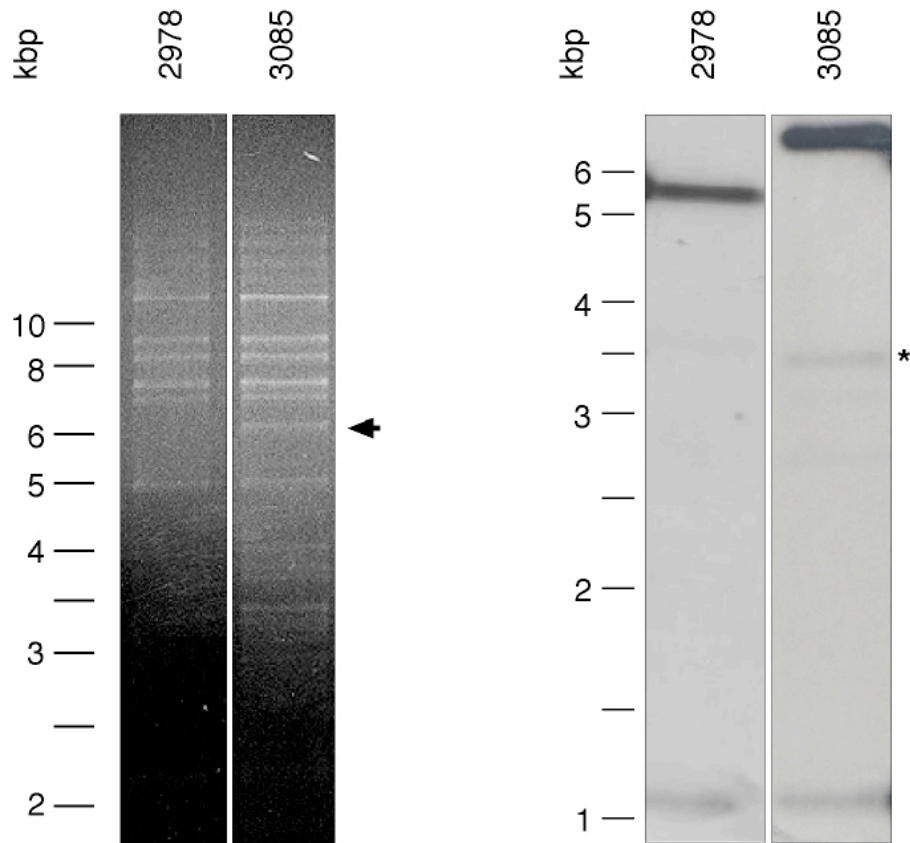
**p2089
(EBNA1)**



**p3084
(HMG-I:EBNA1)**



G: Maxi-EBV mit EBNA1:TetR im EBNA1-Lokus (p3085)

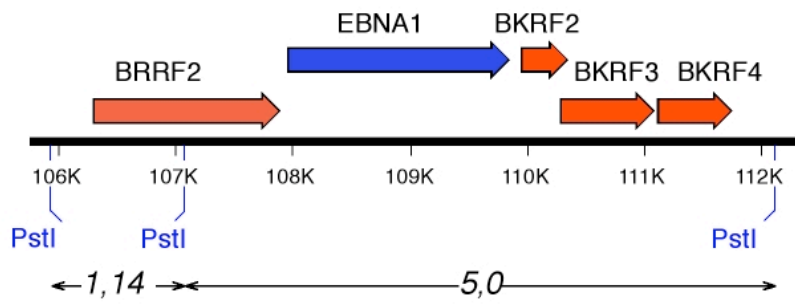


Maxi-EBV

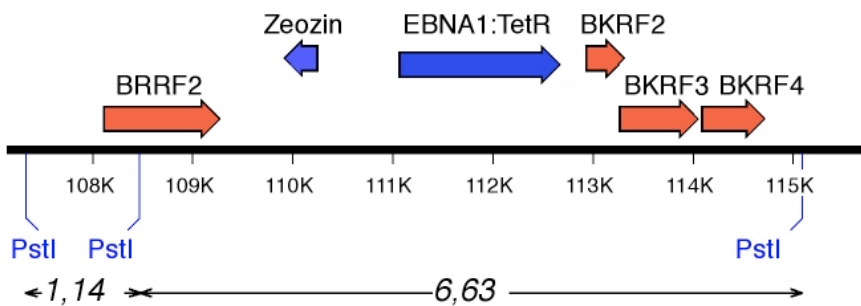
in *E.coli*
Agarosegel
PstI-Spaltung

in *E.coli*
Southern-Blot
PstI-Spaltung

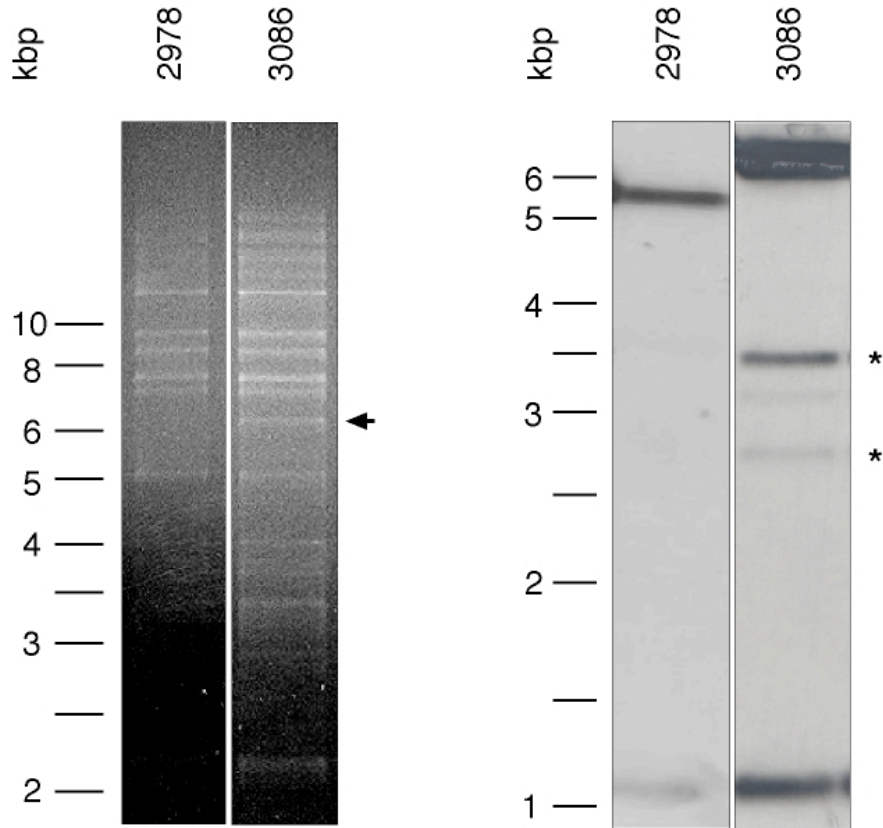
**p2089
(EBNA1)**



**p3085
(EBNA1:TetR)**



H: Maxi-EBV mit HMG-I:TetR im EBNA1-Lokus (p3086)

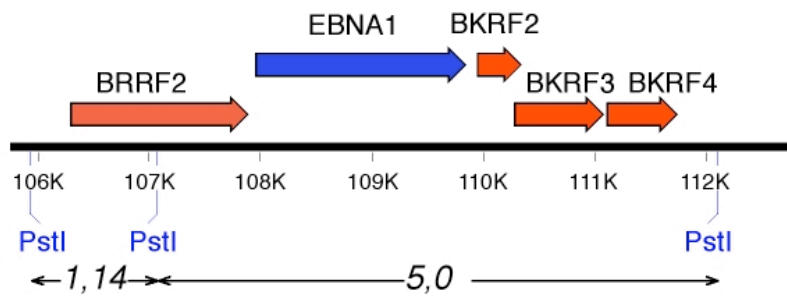


Maxi-EBV

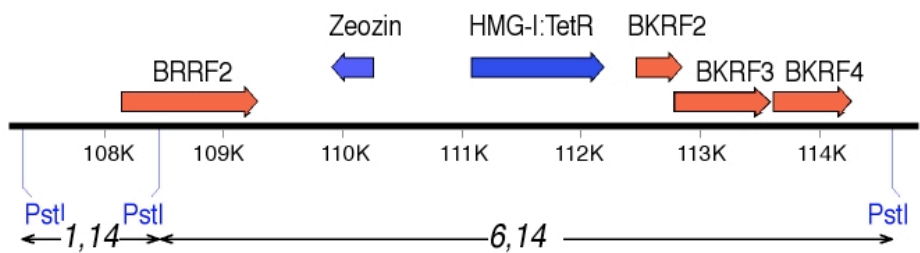
in *E.coli*
Agarosegel
PstI-Spaltung

in *E.coli*
Southern-Blot
PstI-Spaltung

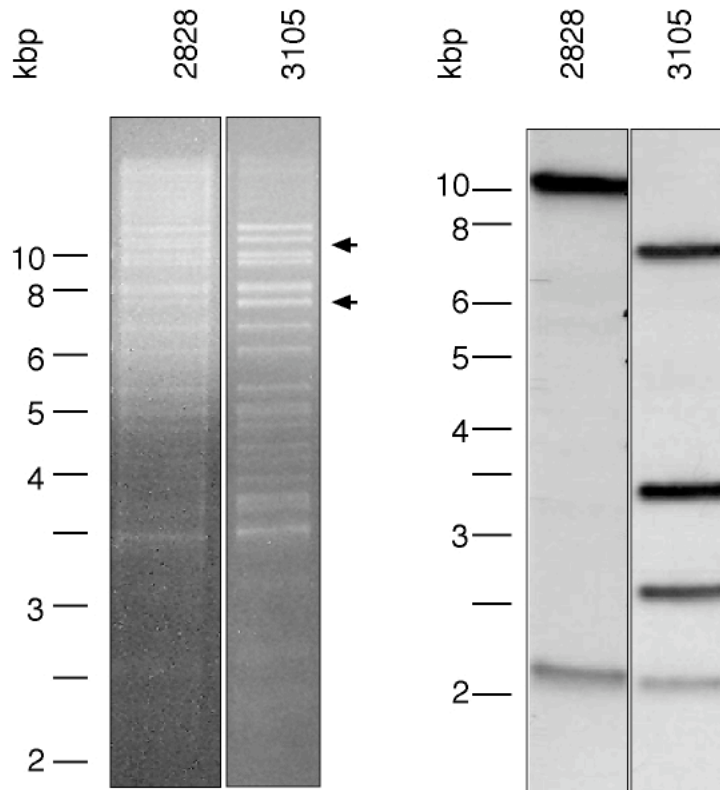
p2089
(EBNA1)



p3086
(HMG-I:TetR)



I: Maxi-EBV mit HMG-I:EBNA1 im F-Faktor-Lokus (p3105)

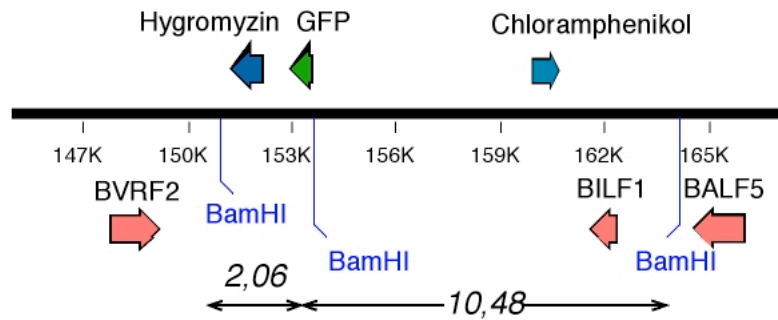


Maxi-EBV

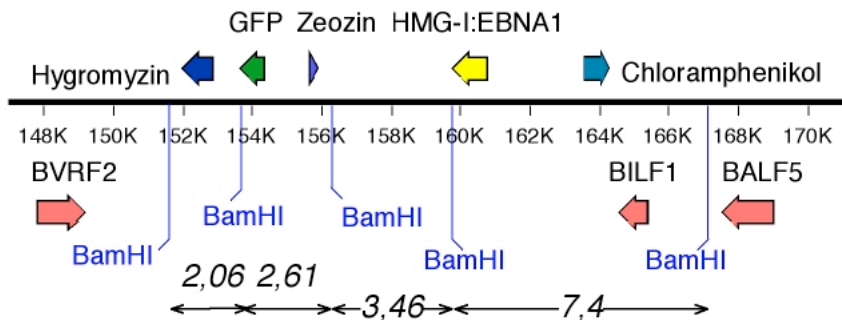
in *E.coli*
Agarosegel
*Bam*HI-Spaltung

in *E.coli*
Southern-Blot
*Bam*HI-Spaltung

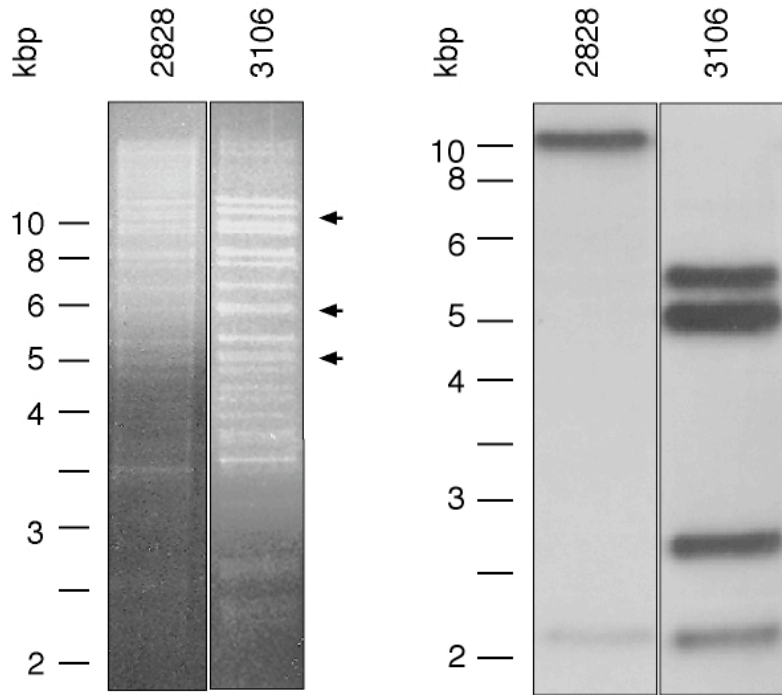
**p2828
(Δ EBNA1)**



**p3105
(HMG-I:EBNA1)**



K: Maxi-EBV mit HMG-I:EBNA1 im F-Faktor-Lokus (p3106)

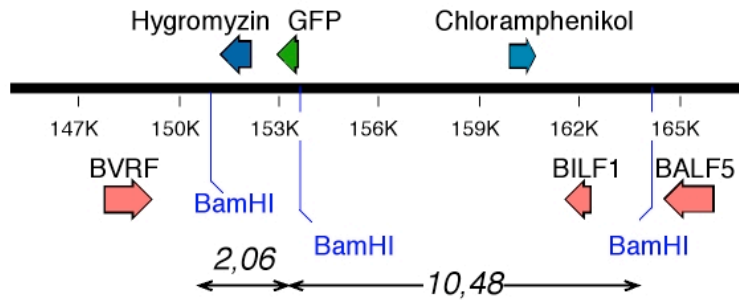


Maxi-EBV

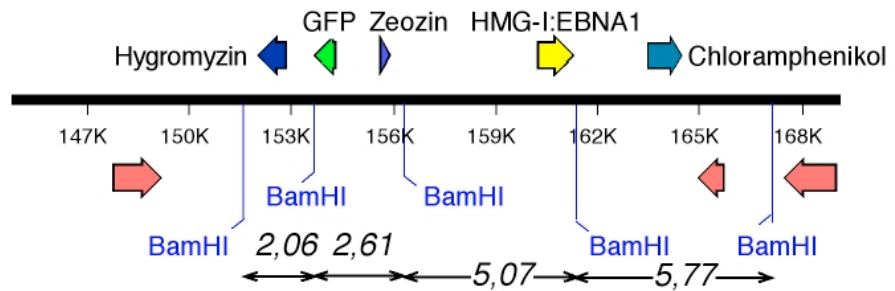
in *E.coli*
Agarosegel
*Bam*HI-Spaltung

in *E.coli*
Southern-Blot
*Bam*HI-Spaltung

**p2828
(Δ EBNA1)**



**p3106
(HMG-I:EBNA1)**



(L) Die folgende Auflistung gibt alle von mir hergestellten und verwendeten Plasmide dieser Doktorarbeit als Auszug aus der Datenbank der Abteilung Genvektoren wieder. Ein Teil der Plasmide war bereits in der Arbeitsgruppe vorhanden oder wurde von anderen Arbeitsgruppen zur Verfügung gestellt. Die mit einem Stern (*) markierten Plasmide wurden von mir im Rahmen dieser Doktorarbeit hergestellt. Bei ihnen ist angegeben, wie ich sie kloniert habe.

pBluescriptIIISK⁻: allgemeiner Klonierungsvektor (Stratagene)

- pCP15 FRT-flankiertes Kanamycin-Gen mit einer multiplen Klonierungsstelle
- pCP20 FLIP-Rekombinase
- pCR2.1 TA-Klonierungsvektor (Life Technologies)
- PINCO Retroviraler Vektor mit Puromycin-Resistenzgen und GFP
- pKD46 Temperatur-sensitives Rekombinations-Plasmid (Red α , Red β , Red γ)
- pRK5-myc-TRADD: humane TRADD cDNA in dem pRK5 Expressions-Vektor mit einem aminoterminalen myc-Epitop
- pSV40Zeo2 kommerzieller Vektor mit dem Zeozin-Resistenzgen (Stratagene)
- pUHC13-3 Luziferase-Reporterplasmid für Reporter-Analysen (Gossen und Bujard, 1992)
- pUC19 kommerzieller Klonierungsvektor (Pharmacia)
- pWHE120 Einzelketten TetR Dimer unter Kontrolle des CMV-Promotors in einem eukaryotischen Expressions-Vektor (Krueger et al., 2003)
- p135.16 Plasmid, das B95.8 EBV-DNA von #7315 bis #56086 (*EcoRI/SalI*) enthält (B. Sugden, Madison)
- p509 pCMV-BZLF1 (Hammerschmidt und Sugden, 1988)
- p1327 *oriP*-Vektor mit CMV-kontrolliertem EBNA1 und Hygromycin-Resistenzgen (p294.8, Madison)
- p1897 Hygromycin-Resistenzgen in pBluescriptIIISK⁻
- p2523 Vektor mit CMV-kontrolliertem destabilisiertem eGFP mit PEST Sequenz (pd2EGFP-N1, Clontech)
- p2545 Vektor mit minimalem *oriP* in pBluescriptIIISK⁻
- p2650 Temperatur-sensitives Rekombinations-Plasmid (*recA*, *red γ*)
- p2677* pRK5-myc-TRADD in dem TRADD entfernt wurde; (*HindIII* ; Religation)
- p2670 pCMV-BALF4
- p2679* HMG-I:EBNA1 Fusion (ab nt 1135 von EBNA1); PCR-Produkte (cDNA Bank: *SacII-XhoI*, p1327: *XhoI-BamHI*) in p2677 (*SacII-BamHI*)

- p2680* Fusion aus Histon H1 mit EBNA1 (ab nt 1135 von EBNA1); PCR-Produkte (cDNA Bank: *SacII-XhoI*, p1327: *XhoI-BamHI*) in p2677 (*SacII-BamHI*)
- p2691* pWHE120scB+sB mit zerstörter *BamHI* Schnittstelle an Position133; (*BamHI* Partialsplaltung; Religation)
- p2727 Plasmid mit Neomycin- / Kanamycin-Resistenzgen
- p2729.1* CMV-kontrollierte Fusion aus der N-terminalen EBNA1-Region (bis nt 1134
- p2729.2* von EBNA1)mit einem singulären TetR; PCR Produkt (p1327: *EcoRI-BamHI*) in p2691 (*BamHI-EcoRI*); Es ist wegen der hoch repetitive Sequenz der Gly-Ala-Wiederholungen sehr problematisch EBNA1 zu amplifizieren,. Daher erfolgte DNA der etwa richtigen Größe aus dem Agarosegel ausgeschnitten und in p2691 kloniert. Danach wurde sequenziert. Es existieren daher mehrere Vektoren mit unterschiedlicher Länge der EBNA1 Gly-Ala-Wiederholungen
- p2733 allgemeiner Klonierungs-Vektor mit einer vergrößerten multiplen Klonierungsstelle (pSL1193; S. Casola, Köln)
- p2738* p2733 mit *TetO*-Monomer; komplementäre singuläre *TetO*-Oligonukleotide doppelsträngig gemacht (*XhoI-SalI*) in p2733 (*XhoI-SalI*)
- p2752* Intermediärvektor zur Klonierung von p2828; p2397 (PCR Produkt) in pCR2.1
- p2757* p2733 mit *TetO*-Pentamer; multimerisiertes *TetO*-Oligonukleotid (*XhoI-SalI*) in p2733 (*XhoI-SalI*)
- p2758* p2733 mit *TetO*-Decamer; p2757 (*XhoI-DraIII*) in p2757 (*SalI-DraIII*)
- p2759.5* Intermediärer Vektor (UA1) zur Klonierung von p2828; PCR-Produkte Primer 1 mit Primer 2 und Primer 3 mit 4 (über *SacI* ligieren), auf Agarosegel reinigen und (*BstEII-SexAI*) in p2397 (*BstEII-SexAI*)
- p2760* p2733 mit *TetO*-Zwanzigmer; *TetO*-Decamer aus p2758 (*XhoI-DraIII*) in p2758 (*SalI-DraIII*)
- p2761* vollständige EBNA1 Deletion mit Insertion einer Kanamycin-Resistenzkassette zur Etablierung von p2828; pCP15 (*HindIII-SmaI*, Klenow) in p2759.5 (*EclI36II*, dephosphoryliert)
- p2762* p2760 (20x *TetO*) mit destabilisiertem eGFP; eGFP aus p2523 (*SspI-AflIII*) in p2760 (*PmlI-AflIII*)
- p2774 EBNA1 mit wenigen Gly-Ala-Wiederholungen in pIRESHyg Vektor
- p2798* p2762 ohne 20x *TetO*; p2762 (*AscI* religiert)
- p2806(DsRed2-N1): Expressions-Plasmid des roten Fluoreszenzfarbstoffs DsRed2 (Clontech)

p2816*	CMV-kontrolliertes EBNA1 ohne Hygromyzin-Resistenzgen, zur Etablierung der Zelllinie EBNA1; p1327 (<i>NruI-EcoRV</i> , religiert)
p2822*	Vektor mit <i>oriP</i> und 20x <i>TetO</i> aus p2760 direkt 5' der <i>FR</i> ; p2760 (<i>XhoI – SalI</i>) in p2545 (<i>XhoI</i>)
p2823	<i>oriP/oriLyt/TR/DsRed2/hyg</i> (EBV basiertes Verpackungs-Plasmid)
p2832*	Vektor mit <i>oriP</i> , Puromyzin und eGFP; PINCO (<i>AvrII-XmnI</i>) in p2545 (<i>Ecl136II-XbaI</i>)
p2833*	Vektor mit <i>oriP</i> , 20x <i>TetO</i> , Puromyzin und eGFP; PINCO (<i>AvrII-XmnI</i>) in p2822 (<i>Ecl136II-XbaI</i>)
p2834*	<i>FR</i> durch 20x <i>TetO</i> ersetzt, eGFP; p2822 (<i>MluI-HindIII</i> , Klenow, religiert)
p2835*	<i>FR</i> durch 20x <i>TetO</i> ersetzt, Puromyzin-Resistenzgen, eGFP; PINCO (<i>AvrII-XmnI</i>) in p2834 (<i>Ecl136II-XbaI</i>)
p2852*	Komplementations-Virus-Vektor mit dem ORF von EBNA1 zur Verpackung in TR2-Zellen; p1327 (<i>BamHI-DraI</i>) in p2823 (<i>BglII-Bst1107I</i>)
p2853*	Komplementations-Virus-Vektor mit H1: EBNA1 zur Verpackung in TR2-Zellen; p2680 (<i>BamHI-PvuII</i>) in p2823 (<i>BglII-Bst1107I</i>)
p2854*	Komplementations-Virus-Vektor mit HMG-I:EBNA1 zur Verpackung in TR2-Zellen; p2679 (<i>BamHI-PvuII</i>) in p2823 (<i>BglII-Bst1107I</i>)
p2855*	Komplementations-Virus-Vektor mit dem ORF von EBNA1 zur Verpackung in TR2-Zellen; p1327 (<i>BamHI-DraI</i>) in p2823 (<i>BamHI-Eco47III</i>)
p2856*	Komplementations-Virus-Vektor mit H1: EBNA1 zur Verpackung in TR2-Zellen; p2680 (<i>BamHI-PvuII</i>) in p2823 (<i>BamHI-Eco47III</i>)
p2857*	Komplementations-Virus-Vektor mit HMG-I:EBNA1 zur Verpackung in TR2-Zellen; p2679 (<i>BamHI-PvuII</i>) in p2823 (<i>BamHI-Eco47III</i>)
p2891	loxP flankiertes <i>oriP</i> Fragment im pBluescriptIIISK
p2903*	Kontrollvektor mit eGFP und Puromyzin-Resistenzgen für Transfektionen mit p2832, p2833, p2835, p2835; (<i>ApaI</i> religiert)
p2969.A*	HMG-(I):EBNA1-Fusionsprotein in pRK5 mit Zeozin-Resistenzgen; pSV40Zeo2 (<i>AvrII-XbaI</i>) in p2679 (<i>SpeI</i>)
p2970.1*	Vektor zur Rekombination mit Maxi-EBV in dem die <i>FR</i> gegen 20x <i>TetO</i> ausgetauscht wurden; p2891(<i>Asp718I-Asp718I</i>) in p2834 (<i>Asp718I</i>)
p2971.3*	HMG-I:TetR-Fusionsprotein im pRK5 Expressions-Vektor; PCR-Produkt an p2679 (<i>EcoRI-BamHI</i>) in p2691 (<i>EcoRI-BamHI</i>)

- p2972.4* EBNA1:TetR-Fusionsprotein in pRK5 mit Zeozin; pSV40Zeo2 (*AvrII-XbaI*) in p2729.1 (*SpeI*)
- p2973.1* HMG-I:TetR-Fusionsprotein in pRK5 mit Zeozin; pSV40Zeo2 (*AvrII-XbaI*) in p2971.3 (*SpeI*)
- p2981.12* Vektor zur Rekombination mit Maxi-EBV zum Austausch von EBNA1 gegen HMG-I:EBNA1; p2969.A (*PvuII*) in p2759.5 (*EclI36II*); Orientierung umgekehrt wie EBNA1 (OR 2)
- p2981.1* Vektor zur Rekombination mit Maxi-EBV zum Austausch von EBNA1 gegen HMG-I:EBNA1; p2969.A (*PvuII*) in p2759.5 (*EclI36II*); OR wie EBNA1
- p2982.1* Vektor zur Rekombination mit Maxi-EBV zum Austausch von EBNA1 gegen EBNA1:TetR; p2972.4 (*SspI-HpaI*) in p2759.5 (*EclI36II*); OR 2
- p2982.3* Vektor zur Rekombination mit Maxi-EBV zum Austausch von EBNA1 gegen EBNA1:TetR; p2972.4 (*SspI-HpaI*) in p2759.5 (*EclI36II*); OR wie EBNA1
- p2983.2* Vektor zur Rekombination mit Maxi-EBV zum Austausch von EBNA1 gegen HMG-I:TetR; p2973.1 (*SspI-HpaI*) in p2759.5 (*EclI36II*); OR 2
- p2983.3 * Vektor zur Rekombination mit Maxi-EBV zum Austausch von EBNA1 gegen HMG-I:TetR; p2973.1 (*SspI-HpaI*) in p2759.5 (*EclI36II*); OR wie EBNA1
- p2985.2 Vektor mit Zeozin-Resistenzgen zur Rekombination mit dem F-Faktor-Hintergrund des Maxi-EBV
- p3056 eukaryontischer Expressions-Vektor mit CMV-kontrolliertem modifiziertem monomeren rot fluoreszierendem Protein (mRFP, Campbell et al., 2002)
- p3097.2 * Vektor zur Rekombination mit Maxi-EBV zum Einführen von HMG-I:EBNA1 im F-Faktor-Hintergrund; p2969.A (*XmnI*) in p2985.2 (*EcoRV*); Orientierung 1
- p3097.3 * Vektor zur Rekombination mit Maxi-EBV zum Einführen von HMG-I:EBNA1 im F-Faktor-Hintergrund; p2969.A (*XmnI*) in p2985.2 (*EcoRV*); Orientierung 2
- p3140.21* HMG:EBNA1 Maxi-EBV-Rekombinations-Vektor („*chromosomal building*“) unter Verwendung des endogenen EBNA1-Promotors; p2679 (partielle Spaltung *XbaI-SacII*, T4-Polymerase) in p2759.1 (*EclI36II*, dephosphoryliert)
- p3151* EBNA1:TetR Maxi-EBV-Rekombinations-Vektor („*chromosomal building*“) unter Verwendung des endogenen EBNA1-Promotors; p2729.2 (*ApoI*, Klenow) in p2759.1 (*EclI36II*, dephosphoryliert)
- p3152* HMG-I:TetR Maxi-EBV-Rekombinations-Vektor Vektor („*chromosomal building*“)unter Verwendung des endogenen EBNA1-Promotors; p2729.2 (*ApoI*, Klenow) in p2759.1 (*EclI36II*, dephosphoryliert)

- p3154* Vektor mit *oriP*, Puromycin-Resistenzgen und mRFP; p3056 (*NaeI-NotI*) in p2835 (*NotII-PmlI*)
- p3155* *FR* durch 20x *TetO* ersetzt, Puromycin-Resistenzgen und mRFP; p3056 (*NaeI-NotI*) in p2832 (*NotII-PmlI*)

Maxi-EBV-Plasmide

- p2089 ursprüngliches Maxi-EBV: F-Faktor-Plasmid (pMBO131) mit eGFP Gen und Hygromycin-Resistenzgen in B95.8 DNA (Delecluse et al., 1998)
- p2828* vollständige EBNA1-Deletion; homologe Rekombination von p2089 mit p2761 (*MluI-SspI*)
- p2978.5* *FR* ersetzt durch 20x *TetO*; homologe Rekombination von p2089 mit p2970.1 (*EcoRV-AvrII*)
- p2986.4* EBNA1 ersetzt durch HMG-I:EBNA1, OR 1; homologe Rekombination von p2089 mit p2981.12, (*MluI-AvrII*)
- p2988.D* EBNA1 ersetzt durch EBNA1:TetR in Maxi-EBV mit 20x *TetO* statt *FR*, OR 1; homologe Rekombination von p2978.5 mit p2982.1, (*MluI-AflIII*)
- p2989.6 * EBNA1 ersetzt durch HMG-I:TetR in Maxi-EBV mit 20x *TetO* statt *FR*, OR 1; homologe Rekombination von p2978.5 mit p2983.2, (*MluI-AvrII*)
- p3084* EBNA1 ersetzt durch HMG-I:EBNA1, OR 2; homologe Rekombination von p2089 mit p2981.1, (*MluI-AvrII*)
- p3085* EBNA1 ersetzt durch EBNA1:TetR in Maxi-EBV mit 20x *TetO* statt *FR*; homologe Rekombination von p2978.5 mit p2982.3, OR 2 (*MluI-AflIII*)
- p3086* EBNA1 ersetzt durch HMG-I:TetR in Maxi-EBV mit 20x *TetO* statt *FR*, OR 2; homologe Rekombination von p2978.5 mit p2983.3, (*MluI-AvrII*)
- p3105.C* Δ EBNA1-p2828 komplementiert durch HMG-I:EBNA1 im F-Faktor Hintergrund, OR 1; homologe Rekomb. von p2828 mit p3097.3, (*HpaI-PacI*)
- p3106.B* Δ EBNA1-p2828 komplementiert durch HMG-I:EBNA1 im F-Faktor Hintergrund, OR 2; homologe Rekomb. von p2828 mit p3097.2 (*HpaI-PacI*)
- p3176* HMG-I:EBNA1 „*chromosomal-building-Intermediat*“ zur Expression vom endogenen EBNA1-Promotor; Rekombination von p2089 mit p3140.21
- p3177.G* EBNA1:TetR „*chromosomal-building-Intermediat*“ zur Expression vom endogenen EBNA1-Promotor; Rekombination von p2978 mit p3151.Q

-
- p3178.T* HMG-I:TetR „*chromosomal-building-Intermediat*“ zur Expression vom endogenen EBNA1-Promotor; Rekombination von p2978 mit p3152.N
- p3199.4* Maxi-EBV mit HMG-I:EBNA1, unter Kontrolle des endogenen EBNA1-Promotors (p3176 aufgelöst)
- p3200* Maxi-EBV mit HMG-I:TetR, unter Kontrolle des endogenen EBNA1-Promotors (p3178.T aufgelöst)
- p3201.41* Maxi-EBV mit EBNA1:TetR, unter Kontrolle des endogenen EBNA1-Promotors (p3177.G aufgelöst)