

DIE ROLLE DER EPSTEIN-BARR VIRUS NUKLEÄREN  
ANTIGENE 3A UND 3C IN DER B-ZELL-  
IMMORTALISIERUNG

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

von

CLAUDIA POPP

München, August 2006

GSF-Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt GmbH  
Institut für Klinische Molekularbiologie und Tumorgenetik, München

## **Ehrenwörtliche Versicherung**

Diese Arbeit wurde selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt.  
Ich habe mich anderweitig einer Doktorprüfung ohne Erfolg nicht unterzogen.

München, 03.08.2006

(Claudia Popp)

Dissertation eingereicht am 08.08.2006

1. Gutachter: PD Dr. Bettina Kempkes

2. Gutachter: Prof. Dr. Elisabeth Weiß

Tag der mündlichen Prüfung: 06.07.2007

Für meine Mama

Der Zweifel ist der Beginn der Wissenschaft. Wer nichts anzweifelt, prüft nichts. Wer nichts prüft, entdeckt nichts. Wer nichts entdeckt, ist blind und bleibt blind.

Teilhard de Chardin (1881-1955), frz. Theologe, Paläontologe u. Philosoph

---

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Das Epstein-Barr Virus.....</b>	<b>2</b>
1.1.1	Latenz und lytische Phase von EBV.....	3
1.1.2	Die latenten Proteine von EBV.....	3
1.1.3	EBV-assoziierte B-Zell-Lymphome.....	6
<b>1.2</b>	<b>Die Epstein-Barr Virus nukleären Antigene 3 (EBNA-3).....</b>	<b>8</b>
1.2.1	Strukturmerkmale und funktionell charakterisierte Regionen der EBNA-3 Proteine.....	8
1.2.2	Funktion der EBNA-3 Proteine in der B-Zellimmortalisierung.....	10
1.2.2.1	Transkriptionelle Aktivierung von Zielgenen.....	12
1.2.2.2	Transkriptionelle Repression von Zielgenen.....	13
1.2.2.3	Zellzykluskontrolle.....	14
1.2.2.4	Metastasierung.....	15
1.2.3	Techniken der molekularen EBV Genetik.....	16
1.2.3.1	Eukaryontische Replikationssysteme zur Herstellung von rekombinantem EBV.....	16
1.2.3.2	Bakterielle Systeme zur Produktion von rekombinanten EBV Genomen.....	17
<b>1.3</b>	<b>Ziel des Projektes.....</b>	<b>18</b>
<b>2</b>	<b>Material.....</b>	<b>20</b>
<b>2.1</b>	<b>Plasmide und BACs.....</b>	<b>20</b>
<b>2.2</b>	<b>Bakterienstämme.....</b>	<b>21</b>
<b>2.3</b>	<b>Zelllinien.....</b>	<b>21</b>
2.3.1	Allgemeine Zelllinien.....	21
2.3.2	Virus produzierende HEK293 Zelllinien.....	21
2.3.3	Lymphoblastoide Zelllinien, immortalisiert mit den angegebenen Maxi-EBVs aus den jeweiligen HEK293-Zelllinien.....	22
2.3.4	Konditionale EBNA-3C Zelllinien.....	23
<b>2.4</b>	<b>Antikörper.....</b>	<b>23</b>
<b>2.5</b>	<b>Enzyme.....</b>	<b>24</b>
<b>2.6</b>	<b>Radioaktive Isotope.....</b>	<b>24</b>
<b>2.7</b>	<b>Primer und Oligonukleotide.....</b>	<b>24</b>
<b>2.8</b>	<b>DNA-Molekulargewichtsstandards.....</b>	<b>25</b>
<b>2.9</b>	<b>Nukleinsäuren.....</b>	<b>25</b>
<b>2.10</b>	<b>Reagenziensysteme (Kits).....</b>	<b>25</b>
<b>2.11</b>	<b>Material für die Zellkultur.....</b>	<b>26</b>
<b>2.12</b>	<b>Chemikalien und weitere Materialien.....</b>	<b>27</b>

<b>3 Methoden.....</b>	<b>29</b>
<b>3.1 Arbeiten mit Bakterien.....</b>	<b>29</b>
3.1.1 Vermehrung und Aufbewahrung von Bakterien.....	29
3.1.2 Herstellung kompetenter Bakterien.....	29
3.1.2.1 chemisch kompetente Bakterien.....	29
3.1.2.2 elektrokompente Bakterien.....	30
3.1.3 Transformation und Elektroporation von <i>E. coli</i> .....	30
3.1.3.1 Hitzeschocktransformation chemisch kompetenter Bakterien.....	30
3.1.3.2 Elektroporation und homologe Rekombination in DH10B.....	30
<b>3.2 Arbeiten mit Zellen.....</b>	<b>31</b>
3.2.1 Kultivierung von Suspensions- und adhärenen Zellen.....	31
3.2.1.1 Suspensionszelllinien.....	31
3.2.1.2 Adhärenente Zelllinien.....	31
3.2.2 Bestimmung der Zellzahl.....	31
3.2.3 Aufbewahrung von Zellen.....	32
3.2.4 Transfektion von HEK293-Zellen und Selektion stabiler Zellklone in Gegenwart von Hygromycin.....	32
3.2.5 Produktion infektiöser Viruspartikel und Titerquantifizierung.....	33
3.2.6 Konzentration von Virusüberständen.....	33
3.2.7 Präparation primärer B-Zellen.....	34
3.2.8 Infektion von primären B-Zellen mit Maxi-EBVs zur Bestimmung der Immortalisierungseffizienz.....	34
3.2.9 Thymidineinbau zur Messung der zellulären DNA-Replikation.....	35
3.2.10 Bestimmung der Viabilität von Zellen.....	35
3.2.11 Bestimmung der Zellteilungsrate von Zellen.....	36
3.2.12 Nukleofektion von B-Zellen mit anschließender Infektion durch Maxi-EBVs.....	36
<b>3.3 Arbeiten mit Nukleinsäuren.....</b>	<b>37</b>
3.3.1 Isolierung von Nukleinsäuren.....	37
3.3.1.1 Isolierung genomischer DNA eukaryontischer Zellen nach der Aussalzmethode.....	37
3.3.1.2 Präparation von Plasmid-DNA.....	37
3.3.1.3 Isolierung und Reinigung rekombinanter EBV DNA aus Bakterien.....	38
3.3.1.3.1 Schnellaufarbeitung.....	38
3.3.1.3.2 Großaufarbeitung.....	38
3.3.1.4 Isolierung von RNA aus eukaryontischen Zellen.....	39
3.3.2 Enzymatische Reaktionen mit Nukleinsäuren.....	40
3.3.2.1 Restriktionsverdau von DNA.....	40
3.3.2.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	40
3.3.2.3 Herstellung von Digoxigenin-markierten Sonden mittels PCR.....	41
3.3.2.4 Homologe Rekombination in <i>E. coli</i> zur Konstruktion von Maxi-EBV Mutanten.....	41
3.3.3 Southern-Blot-Analyse.....	42
3.3.4 Northern-Blot-Analyse.....	43
3.3.5 Hybridisierung von Southern-Blot- und Northern-Blot-Analysen mit digoxigenin-markierten Sonden und Detektion.....	43
3.3.6 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	44
3.3.7 DNase-Verdau von RNA.....	44
3.3.8 Reverse Transkription.....	44
3.3.9 Real-Time PCR.....	44
3.3.9.1 Prinzip der Real-Time PCR.....	44
3.3.9.1.1 Unterschied zur konventionellen PCR.....	45
3.3.9.1.2 SYBR Green.....	45
3.3.9.2 Quantifizierung.....	46
3.3.9.2.1 Kreuzungspunkt.....	46
3.3.9.2.2 Kalibrator - Fixpunkt für die relative Quantifizierung verschiedener cDNA-Proben.....	46
3.3.9.2.3 Normalisierung.....	46
3.3.9.2.4 Effizienzkorrektur mittels Standardkurve.....	47

3.3.9.3	Schmelzkurvenanalyse .....	48
3.3.9.4	Durchführung .....	48
<b>3.4</b>	<b>Arbeiten mit Proteinen .....</b>	<b>49</b>
3.4.1	Herstellung von Zelllysaten .....	49
3.4.2	Konzentrationsbestimmung von Proteinen .....	49
3.4.3	Denaturierende und reduzierende SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese .....	50
3.4.4	Übertragung von Proteinen auf PVDF (Westernblot) und Immundetektion des Western-Blots .....	50
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>51</b>
<b>4.1</b>	<b>Herstellung und Analyse von EBNA-3A negativen Epstein-Barr Viren .....</b>	<b>53</b>
4.1.1	Herstellung von zwei rekombinanten Maxi-EBV Genomen mit partieller bzw. vollständiger Deletion des EBNA-3A Gens .....	53
4.1.2	Etablierung virusproduzierender, EBV-positiver HEK293- Zelllinien .....	55
4.1.3	Induktion des lytischen Zyklus und Bestimmung der Virustiter .....	56
4.1.4	Infektion von primären B-Lymphozyten mit EBNA-3A $\Delta$ 127-944 und $\Delta$ EBNA-3A Maxi-EBV Partikeln .....	58
4.1.5	B-Zellen treten nach Infektion mit EBNA-3A $\Delta$ 127-944 Virus in den Zellzyklus ein .....	59
4.1.6	Western-Blot-, Southern-Blot- und PCR-Analysen von LCLs, die mit $\Delta$ EBNA-3A oder EBNA-3A $\Delta$ 127-944 Virus infiziert wurden .....	61
4.1.6.1	Western-Blot-Analysen der EBNA-Proteine .....	64
4.1.6.2	Western-Blot- und Northern-Blot-Analyse der LMP-1 Expression .....	66
4.1.6.3	Generierung von EBNA-3A negativen LCLs, die ein LMP-1 Protein vom Typ B95.8 exprimieren .....	69
4.1.6.4	Bestimmung der Immortalisierungseffizienzen der EBNA-3A negativen Viren durch Grenzverdünnungsanalysen .....	71
4.1.6.5	Einfluss der EBNA-3A Deletion auf die Expression von LMP-2A/B und c-myc .....	74
4.1.6.6	Zellteilungsrate und Viabilität der EBNA-3A negativen LCLs .....	75
4.1.7	Identifizierung von EBNA-3A regulierten Genen mit der Affymetrix Chip-Technologie .....	78
<b>4.2</b>	<b>Die Rolle von EBNA-3C in der B-Zellimmortalisierung .....</b>	<b>83</b>
4.2.1	Mit $\Delta$ EBNA-3C Virus infizierte B-Zellen replizieren für einen begrenzten Zeitraum ihre intrazelluläre DNA .....	83
4.2.2	Western- und Southern-Blot-Analysen von LCLs, die mit $\Delta$ EBNA-3C Virus infiziert wurden .....	85
4.2.3	Bestimmung der Immortalisierungseffizienzen der $\Delta$ EBNA-3C Viren durch Grenzverdünnungsanalysen .....	86
4.2.4	Analyse der latenten EBV-Proteine in $\Delta$ EBNA-3C LCLs .....	89
4.2.4.1	Die latente EBNA-Genexpression in $\Delta$ EBNA-3C LCLs zeigt keine Veränderung im Vergleich zu Wildtyp 2089 LCLs .....	89
4.2.4.2	Keine drastische Reduktion der LMP-1 Expression in $\Delta$ EBNA-3C LCLs .....	89
4.2.5	Zellteilungsrate und Viabilität der EBNA-3C negativen LCLs .....	90
4.2.6	Begrenzte Verdopplungszeiten der $\Delta$ EBNA-3C Zellpopulationen .....	93
<b>4.3</b>	<b>Generierung eines induzierbaren EBNA-3C Systems .....</b>	<b>96</b>
4.3.1	Konditionale Expression von EBNA-3C in EBV infizierten B-Zellen .....	96
4.3.2	Vergleich der DNA-Replikation und der Viabilität von Tetrazyklin-induzierbaren EBNA-3C LCLs in An- und Abwesenheit von Tetrazyklin .....	98
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>101</b>
<b>5.1</b>	<b>Die Funktion von EBNA-3A und EBNA-3C in EBV-infizierten B-Zellen bei der Initiation und Aufrechterhaltung von wachstumstransformierten B-Zellen .....</b>	<b>101</b>
5.1.1	Etablierung von EBNA-3A negativen LCLs .....	102
5.1.2	Etablierung von EBNA-3C negativen LCLs .....	103
5.1.3	Charakterisierung der EBNA-3A und EBNA-3C negativen LCLs .....	104
5.1.4	Das EBNA-3A Zielgen MMP-7 .....	106

---

5.1.5	EBNA-3A reprimierte Zielgene .....	108
<b>5.2</b>	<b>Ein konditionales EBNA-3C System .....</b>	<b>108</b>
5.2.1	Etablierung konditionaler EBNA-3C LCLs .....	109
5.2.2	Charakterisierung der konditionalen EBNA-3C LCLs in An- und Abwesenheit von Tetrazyklin	109
<b>5.3</b>	<b>Offene Fragen und Ausblick .....</b>	<b>111</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>114</b>
<b>7</b>	<b>Abkürzungen .....</b>	<b>115</b>
<b>8</b>	<b>Literatur .....</b>	<b>117</b>



Abbildungsverzeichnis

ABB. 1: PRIMÄRSTRUKTUR UND FUNKTIONAL CHARAKTERISIERTE REGIONEN DER PROTEINE EBNA-3A UND -3C ..... 10

ABB. 2: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER EBNA-3 ASSOZIIERTEN PROTEINE ..... 11

ABB. 3: MUTAGENESE DES MAXI-EBV GENOMS IN *E. COLI* DH10B DURCH HOMOLOGE REKOMBINATION ..... 42

ABB. 4: DIE HERSTELLUNG VON REKOMBINANTEN LYMPHOBLASTOIDEN ZELLINIEN (LCLS) ..... 52

ABB. 5: ÜBERPRÜFUNG DER EBNA-3A SPEZIFISCHEN MUTATIONEN IN DEN REKOMBINANTEN EBV KONSTRUKTEN ... 54

ABB. 6: BESTÄTIGUNG DES KORREKTEN VIRUS-GENOTYPS DER VIRUSPRODUZIERENDEN HEK293-ZELLINIEN ..... 56

ABB. 7: PHÄNOTYP DER LYMPHOCYTENPOPULATION NACH REINIGUNG ÜBER FICOLLGRADIENTEN UND ROSETTIERUNG 58

ABB. 8: EINTRITT IN DEN ZELLYKLUS NACH INFESTION VON B-ZELLEN MIT WILD TYP-VIRUS 2089,  
EBNA-3A $\Delta$ 127-944 VIRUS UND  $\Delta$ EBNA-2 VIRUS 2491 ..... 60

ABB. 9: ÜBERPRÜFUNG DER EXPRESSION VON EBNA-3A IN POTENTIELL EBNA-3A NEGATIVEN LCLS ..... 61

ABB. 10: SOUTHERN-BLOT-ANALYSE DES EBNA-3A GENS IN VERSCHIEDENEN LCLS ..... 62

ABB. 11: BESTÄTIGUNG DES KORREKTEN VIRUS-GENOTYPS DER EBNA-3A NEGATIVEN LCLS DURCH PCR-ANALYSE 64

ABB. 12: EXPRESSION DER EBNAS IN EBNA-3A NEGATIVEN LCLS ..... 65

ABB. 13: LMP-1 EXPRESSION IN EBNA-3A NEGATIVEN LCLS (E3A $\Delta$ 127-944 UND  $\Delta$ E3A) ..... 67

ABB. 14: ERGEBNIS DER SEQUENZIERUNGSANALYSE DES LMP-1 GENS ..... 68

ABB. 15: ANALYSE DER EXPRESSION LATENTER GENE DER  $\Delta$ EBNA-3A LCL CP655-1 IM WESTERN-BLOT ..... 71

ABB. 16: IMMORTALISIERUNGSEFFIZIENZEN DER REKOMBINANTEN VIREN WILD TYP 2089, EBNA-3A $\Delta$ 127-944  
UND 2319 ..... 72

ABB. 17: NORTHERN-BLOT ZUM NACHWEIS DER LMP-2A/B UND C-MYC EXPRESSION IN EBNA-3A NEGATIVEN  
LCLS ..... 75

ABB. 18: BESTIMMUNG DER TEILUNGSRATE DER  $\Delta$ EBNA-3A LCL ..... 76

ABB. 19: BESTIMMUNG DER VIABILITÄT DER EBNA-3A $\Delta$ 127-944 BZW.  $\Delta$ EBNA-3A LCLS ..... 78

ABB. 20: GEGENÜBERSTELLUNG DER RELATIVEN TRANSKRIPTMENGEN DES GENS MMP-7 AUS DEN AFFYMETRIX-  
DATEN UND DEN REAL-TIME PCRS ..... 81

ABB. 21: VERGLEICH DER THYMIDINEINBAURATE IN B-ZELLEN NACH INFESTION MIT WILD TYP-VIRUS 2089 ODER  
 $\Delta$ EBNA-3C VIRUS ..... 84

ABB. 22: BESTÄTIGUNG DER ABWESENHEIT VON EBNA-3C IN DEN POTENTIELL EBNA-3C NEGATIVEN LCLS ..... 85

ABB. 23: BESTÄTIGUNG DES KORREKTEN VIRUS-GENOTYPS IN DEN EBNA-3C NEGATIVEN LCLS ..... 86

ABB. 24: IMMORTALISIERUNGSEFFIZIENZEN DER REKOMBINANTEN VIREN WILD TYP 2089 UND  $\Delta$ EBNA-3C ..... 88

ABB. 25: EXPRESSION DER EBNAS IN EBNA-3C NEGATIVEN LCLS ..... 89

ABB. 26: LMP-1 EXPRESSION IN  $\Delta$ EBNA-3C LCLS ..... 90

ABB. 27: BESTIMMUNG DER ZELLTEILUNGSRATE DER EBNA-3C NEGATIVEN LCLS IM VERGLEICH ZU LCLS, DIE MIT  
WILD TYP-VIRUS 2089 INFESTIERT WORDEN SIND ..... 91

ABB. 28: BESTIMMUNG DER VIABILITÄT DER EBNA-3C NEGATIVEN LCLS IM VERGLEICH ZU LCLS, DIE MIT  
WILD TYP-VIRUS 2089 INFESTIERT WURDEN ..... 92

ABB. 29: VERGLEICH DER VIABILITÄT VON  $\Delta$ EBNA-3C LCLS, DIE UNTERSCHIEDLICHE LANGE NACH INFESTION IN  
KULTUR WAREN ..... 93

ABB. 30:  $\Delta$ EBNA-3C-LCLS HABEN EINE BEGRENZTE LEBENSSPANNE ..... 94

ABB. 31: ETABLIERUNG VON KONDITIONALEN EBNA-3C LCLS ..... 96

ABB. 32: FACS-FÄRBUNG DER TETRAZYKLIN-INDUZIERBAREN EBNA-3C KLONE ..... 97

ABB. 33: EXPRESSION DER LATENTEN EBV-PROTEINE IN TETRAZYKLIN INDUZIERBAREN EBNA-3C LCLS IN AN-  
UND ABWESENHEIT VON TETRAZYKLIN ..... 98

ABB. 34: VERGLEICH DER DNA-REPLIKATION UND DER VIABILITÄT DER EBNA-3C INDUZIERBAREN LCLS IN AN-  
UND ABWESENHEIT VON TETRAZYKLIN ..... 99

---

**TABELLENVERZEICHNIS**

TABELLE 1: ÜBERSICHT DER VERSCHIEDENEN TRANSKRIPTIONSPROGRAMME .....	7
TABELLE 2: DIE BESTIMMUNG DER VIRUSTITER VERSCHIEDENER REKOMBINANTER EBV MUTANTEN NACH INFESTION VON RAJI-ZELLEN.....	57
TABELLE 3: NOMENKLATUR DER IN DIESER DISSERTATION VERWENDETEN MAXI-EBV PLASMIDE .....	70
TABELLE 4: ÜBERSICHT DER GRENZVERDÜNNUNGSANALYSEN UNTER VERWENDUNG VON WILDTYP-VIRUS 2089, 2319 (LMP-1 $\Delta$ 33BP) VIRUS, BE714 (EBNA-3A $\Delta$ 127-944) VIRUS UND CP482 ( $\Delta$ EBNA-3A) VIRUS .....	73
TABELLE 5: ZUSAMMENFASSUNG DER X-FACHEN INDUKTIONEN FÜR DAS EBNA-3A ZIELGEN MMP-7 AUS DEM AFFYMETRIX-SCREEN UND AUS DEN REAL-TIME PCRS.....	82
TABELLE 6: ÜBERSICHT DER BENÖTIGTEN GRE DES WILDTYP-VIRUS 2089 UND DES $\Delta$ EBNA-3C VIRUS FÜR DAS AUSWACHSEN EINES ZELKLONS .....	88
TABELLE 7: ZUSAMMENFASSUNG DER PROLIFERATIONSZEITEN VON B-ZELLEN, DIE MIT $\Delta$ EBNA-3C VIRUS INFIZIERT WORDEN SIND, IM VERGLEICH ZU B-ZELLEN, DIE MIT WILDTYP-VIRUS 2089 INFIZIERT WORDEN SIND ..	95

## 1 EINLEITUNG

Krebsentstehung wird verursacht durch die Akkumulation von Mutationen des zellulären Erbgutes. Diese Mutationen führen häufig zu Änderungen der intrazellulären Konzentration oder Funktion von Proteinen, die eine Rolle in der Kontrolle des Zellwachstums, der Zellteilung, des programmierten Zelltodes oder in DNA-Reparaturprozessen spielen. Tumorstoffe sind Karzinogene, die Krebs verursachen, indem sie diese Prozesse entweder durch genetische Veränderungen des zellulären Genoms oder durch die Produktion von viralen Faktoren indirekt beeinflussen.

1958 beschrieb der Chirurg Denis Burkitt erstmals eine Krebserkrankung bei Kindern in Äquatorialafrika, das so genannte Burkitt-Lymphom (BL) (Burkitt, 1958). Er beschrieb, dass das Auftreten dieses Burkitt-Lymphoms von den klimatischen und geographischen Bedingungen abhängig ist, so dass die Beteiligung eines infektiösen Agens in Erwägung gezogen wurde (Burkitt, 1962). 1964 konnten Epstein, Achong und Barr in einer von einer BL-Biopsie stammenden Zelllinie im Elektronenmikroskop herpesvirusähnliche Partikel identifizieren (Epstein et al., 1964).

Nachdem der Nachweis erbracht war, dass es sich bei diesen Viren um das Epstein-Barr Virus handelte, war erstmal die Assoziation von Viren mit der Entstehung von Tumorerkrankungen beschrieben. EBV wird heute von der Weltgesundheitsorganisation als Gruppe 1 Karzinogen eingestuft.

Nachdem EBV spezifische Antikörper im Blut einer Patientin mit Infektiöser Mononukleose (IM) nachgewiesen worden waren, gelang erstmals auch der Nachweis, dass EBV IM verursacht (Henle et al., 1968). Serologische Testsysteme zeigten später auch, dass die EBV Infektion zu 100% mit dem Nasopharynxkarzinom assoziiert ist (Henle and Henle, 1967; zur Hausen et al., 1970). Ungefähr zur gleichen Zeit konnte die Transformationskapazität des EBV bestätigt werden, da EBV ruhende B-Zellen *in vitro* effizient transformieren kann und Tumore in Primaten verursacht (Henle et al., 1967; Pope et al., 1968; Miller et al., 1974). Darauf folgende Studien zeigten, dass EBV auch mit einer Vielzahl anderer Tumore assoziiert ist, wie mit dem Hodgkin-Lymphom und den lymphoproliferativen Erkrankungen in immunsupprimierten Patienten, die zu den B-Zell-Lymphomen zählen. Eine EBV-Assoziation liegt aber auch bei einigen T-Zell-Lymphomen und epithelialen Tumoren, wie dem Magenkarzinom vor. In all diesen Tumoren ist EBV in multiplen extrachromosomalen

---

Kopien in den Tumorzellen vorhanden und die EBV kodierten latenten Gene werden in tumorspezifischer Konstellation exprimiert.

## 1.1 Das Epstein-Barr Virus

Das Epstein-Barr Virus (EBV) gehört, wie auch das Kaposi-Sarkom assoziierte Herpesvirus (KSHV), zur Gruppe der Gammaherpesviren. Herpesviren sind DNA-Viren mit einem icosahedrischen Nucleocapsid, einem Tegument, einem doppelsträngigen linearen DNA-Genom und einer Hülle, die aus Membran und Glykoproteinen besteht.

EBV wird auch humanes Herpesvirus 4 genannt und besitzt ein 172kb großes DNA-Genom, das für ca. 90 offene Leserahmen kodiert. Mehr als 95% aller Erwachsenen sind EBV positiv. Das Virus infiziert B-Zellen und persistiert lebenslang in den B-Gedächtniszellen des Wirts. Unter bestimmten Umständen können aber auch andere Zellen, wie T-Zellen und Epithelzellen, infiziert werden. Die Primärinfektion erfolgt in der Regel im Kindesalter ohne Symptome, die Erstinfektion von Jugendlichen oder Erwachsenen kann jedoch in ungefähr der Hälfte der Fälle infektiöse Mononukleose (IM), die auch Pfeiffersches Drüsenfieber genannt wird, verursachen. Die IM ist eine nicht maligne selbstlimitierende, lymphoproliferative Erkrankung, die mit einer massiven Proliferation der B-Lymphocyten einhergeht und dadurch eine massive zytotoxische T-Zellantwort auslöst. Während im gesunden Wirt die Frequenz der EBV infizierten B-Zellen bei einer in  $10^4$  bis  $10^5$  liegt, steigt in der infektiösen Mononukleose die Frequenz der infizierten B-Zellen auf bis zu 1% an (Kuppers, 2003).

*In vitro* führt die EBV-Infektion von primären B-Lymphocyten zu permanent proliferierenden lymphoblastoiden Zelllinien (LCL). Der Prozess wird auch als B-Zellimmortalisierung oder B-Zelltransformation bezeichnet und stellt ein Modellsystem dar, in dem der Beitrag des Virus zur B-Zellimmortalisierung exemplarisch untersucht werden kann. Im gesunden Organismus etabliert EBV eine Balance zwischen viraler Replikation im Lymphoepithelium der Tonsillen und latenter Infektion ruhender B-Gedächtniszellen in der Peripherie (Babcock et al., 1998). Jedoch in Fällen von Immunschwäche, sei es genetisch bedingt, durch Unterdrückung des Immunsystems nach Transplantation oder durch HIV-Infektion, kann EBV an der Entstehung von Tumoren beteiligt sein (Thorley-Lawson, 2001).

### 1.1.1 Latenz und lytische Phase von EBV

Der einzige natürliche Wirt von EBV ist der Mensch und die latente Infektion, die in der Virus-Wirts-Beziehung vorherrscht, wird nur zeitweilig von einer lytischen Phase unterbrochen. Diese Reaktivierung führt zur Produktion neuer Viren und Freisetzung der Viruspartikel. Die EBV Infektion von B-Zellen beginnt mit der Anlagerung des viralen Membranglykoproteins gp350/220 an das CD21 Molekül der B-Lymphocyten. Die virale DNA wird in den Zellkern eingeschleust und repliziert dort in episomaler Form. Dadurch wird die ruhende B-Zelle in den Zellzyklus entlassen und ähnelt einer B-Zelle, die durch Antigen aktiviert wurde. Nach der Erstinfektion persistiert EBV in ruhenden B-Gedächtniszellen, die im peripheren Blut zirkulieren, mit einer Frequenz von ca. 0,5-50 in  $1 \times 10^6$  B-Zellen. Die transkriptionelle Aktivität des Virus ist in den latent infizierten B-Gedächtniszellen auf einige wenige virale Transkripte reduziert (Babcock et al., 1998; Kuppers, 2003; Miyashita et al., 1997).

### 1.1.2 Die latenten Proteine von EBV

EBV codiert neun mit der Latenz assoziierte Proteine. Sechs davon sind im Kern lokalisiert und werden deswegen als EBV nukleäre Antigene (EBNA) bezeichnet, während drei der neun Proteine in der Membran lokalisiert sind und als latente Membranproteine (LMP) bezeichnet werden.

**EBNA-1** ist das einzige virale Protein, das sequenzspezifisch direkt an DNA bindet. EBNA-1 ist notwendig für die Replikation des viralen Genoms und die Verteilung auf die Tochterzellen (Thorley-Lawson, 2001).

**EBNA-LP** ist mit EBNA-2 eines der ersten viralen Gene, das nach Infektion von primären B-Zellen durch EBV exprimiert wird. EBNA-LP kooperiert mit EBNA-2 bei der transkriptionellen Regulation und verstärkt das Transaktivierungspotential von EBNA-2 auf die Zielgene (Bornkamm and Hammerschmidt, 2001).

**EBNA-2** transaktiviert die Expression zahlreicher viraler und zellulärer Gene, kann aber DNA nicht direkt binden, sondern interagiert mit dem sequenzspezifischen DNA-Bindeprotein CBF-1. CBF-1 wird auch RBP-J $\kappa$  (J kappa recombination signal sequence binding protein) genannt und gehört zur Familie der CSL-Proteine. Es handelt sich dabei um ein 60kDa Protein, das während der Evolution hoch konserviert wurde und Homologe in *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans* und der Maus hat (CBF-1 = C-promoter binding factor 1 beim Menschen; Su(H) =

---

Suppressor of Hairless bei *D. melanogaster*; Lag-1 bei *C. elegans* und RBP-J $\kappa$  bei der Maus) (Bornkamm and Hammerschmidt, 2001).

CBF-1 ist ein DNA-bindender Transkriptionsfaktor und erkennt die DNA-Konsensussequenz GTGGGAA (Ling et al., 1994; Tun et al., 1994). DNA gebundenes CBF-1 agiert als Transkriptionsrepressor, indem ein Korepressorkomplex an den Promotor rekrutiert wird. Bekannte Komponenten dieses Komplexes sind SMRT, SKIP, SAP30, Sin3A, CIR, HDAC1 und HDAC2 (Hsieh et al., 1999a; Zhou et al., 2000a). EBNA-2 verdrängt den Korepressorkomplex, rekrutiert die Koaktivatoren p300, PCAF, CBP und SKIP (Hsieh and Hayward, 1995; Wang et al., 2000; Zhou et al., 2000a; Zhou et al., 2000b) und dereprimiert dadurch die Transkription.

**LMP-1**, **LMP-2A** und **LMP-2B** sind integrale Membranproteine und dienen als ligandenunabhängige Zelloberflächen-Signalmoleküle. LMP-1 ähnelt dem CD40-Rezeptor und kann CD40 *in vivo* teilweise ersetzen. LMP-1 aktiviert die NF- $\kappa$ B, JNK- und STAT-Signalwege, um sowohl Überlebens-, als auch Wachstumssignale zu liefern. LMP-2A ersetzt das Überlebenssignal, das normalerweise von einem intakten B-Zellrezeptor gesendet wird. LMP-2B formt Aggregate mit LMP-2A und reduziert damit die Aktivität von LMP-2A (Bornkamm and Hammerschmidt, 2001; Thorley-Lawson, 2001)

**EBNA-3A**, **EBNA-3B** und **EBNA-3C** werden in einem eigenen Kapitel beschrieben, da sie ein wesentlicher Bestandteil dieser Arbeit sind.

Zusätzlich zu den neun latenten Proteinen exprimieren EBV infizierte B-Zellen **EBER-1** und **EBER-2**. EBERs sind kleine nicht polyadenylierte nukleäre RNAs. Bisher gibt es keine guten Hinweise, dass EBERs eine Rolle in der Wachstumstransformation spielen (Young and Murray, 2003).

Außerdem werden Transkripte, die vom Bam A Fragment des Genoms stammen, exprimiert. Diese werden **BARF0** oder **BART** genannt. Die Funktion dieser Gene ist unklar (Young and Murray, 2003).

Die Bedeutung der latenten Proteine für die B-Zellimmortalisierung gliedert diese in Proteine, die absolut notwendig, d.h. essentiell sind und solche die verzichtbar, d.h. nichtessentiell sind. Um die Bedeutung zu untersuchen, wird ein Assay verwendet, in dem *in vitro* primäre humane B-Zellen mit verschiedenen Virusmutanten infiziert werden.

Als Standardbedingungen für die klonale Infektion von primären B-Zellen mit EBV wurden von Kieff *et al.* vorgeschlagen, dass  $10^7$  T-Zell-depletierte Lymphocyten mit

---

weniger als 50 transformierenden EBV-Partikeln infiziert werden und in einem Volumen von 100-150 $\mu$ l Kompletmedium mit 10% bzw. 20% FKS in 96-well Platten ausplattiert werden. Nach 5 Wochen kann die Anzahl der Mikroklulturen mit proliferierenden Zellen gezählt und somit die Immortalisierungseffizienz verschiedener Viren bestimmt werden (Kieff, 2001). Die Bestimmung der Immortalisierungseffizienz auf diese Art und Weise, lässt allerdings Unterschiede, die zu einem früheren oder späteren Zeitpunkt als 5 Wochen auftreten, außer Acht. Deswegen sollen in dieser Arbeit die Unterschiede in der Immortalisierungseffizienz zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion bestimmt werden, um mögliche zeithabhängige Abweichungen zu erkennen.

Außerdem wurden in dieser Arbeit im Unterschied zu den Arbeiten der Kieff-Gruppe die Virusüberstände titriert, um somit die Anzahl für das Auswachsen von B-Zellkulturen benötigter infektiöser Viruspartikel relativ quantifizieren zu können. Diese Methode zur Quantifizierung wurde von der Arbeitsgruppe Hammerschmidt etabliert. Die Infizierung von primären humanen B-Zellen mit EBV wird von den verschiedenen Arbeitsgruppen entweder als Wachstumstransformation oder Immortalisierung bezeichnet. In dieser Arbeit wird der Begriff Immortalisierung verwendet.

Obwohl die meisten Virologen und Zellbiologen EBV-transformierte LCLs im Allgemeinen als immortalisiert bezeichnen, gibt es eine ganze Reihe an Studien, die belegen, dass die meisten LCLs mortal sind. Drei voneinander unabhängige Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass es eine sehr enge Korrelation zwischen Immortalisierung und Entwicklung einer starken Telomeraseaktivität gibt (Counter et al., 1994; Salk, 1985; Salk et al., 1985; Tahara et al., 1997). Außerdem konnte gezeigt werden, dass chromosomale Rearrangements und die Induktion einer starken Telomeraseaktivität zwei Ereignisse sind, die beim Prozess der Immortalisierung von B-Zellen parallel stattfinden. Dies zeigt, dass EBV-LCLs in zwei Gruppen eingeteilt werden können, in präimmortale Zelllinien, die einen normalen diploiden Karyotyp aufweisen, und postimmortale Zelllinien, die einen abnormalen Karyotyp besitzen (Okubo et al., 2001).

Es wird vorgeschlagen, dass die „Transformation“ durch EBV eine zeitliche Aktivierung der Zellpopulation bis zu 160 Populationsverdopplungen darstellt, während man unter „Immortalisierung“ unbegrenzte Aktivierung mit Populationsverdopplungen über 160 und starker Telomeraseaktivität versteht. Der Begriff „Immortalisierung“ für die Transformation von B-Zellen durch EBV wird in der Literatur nicht einheitlich ver-

---

wendet. Um dieser Verwirrung entgegenzuwirken, wird vorgeschlagen, dass der Begriff „Immortalisierung“ nur für EBV-transformierte LCLs verwendet werden soll, die die Proliferation auch nach 160 Populationsverdopplungen noch fortsetzen (Sugimoto et al., 1999).

EBV infizierte B-Zellen benutzen vier verschiedene Transkriptionsprogramme, um eine persistierende Infektion zu etablieren und aufrechtzuerhalten. Eines der Expressionsmuster wird verwendet, um infektiöses Virus zu produzieren. In diesem lytischen Transkriptionsprogramm werden alle lytischen Gene exprimiert. Die anderen drei Transkriptionsprogramme sind mit der latenten Infektion assoziiert, in der kein infektiöses Virus produziert wird. Dazu gehört die Latenz III (growth programme) in der alle neun latenten Proteine (EBNA-1, -2, -3A, -3B, -3C, -LP, LMP-1, -2A, -2B) exprimiert werden, die Latenz II (default programme) mit Expression von EBNA-1, LMP-1 und LMP-2A und die Latenz I (latency programme), in der nur EBNA-1 exprimiert wird (Thorley-Lawson, 2005).

### **1.1.3 EBV-assoziierte B-Zell-Lymphome**

In seltenen Fällen kann die transformierende Kapazität des Virus zur Entwicklung von B-Zell-Lymphomen führen. EBV ist, wie schon erwähnt, auch mit anderen Tumoren, wie einigen T-Zell-Lymphomen, Nasopharynx-Karzinomen oder Magen-Karzinomen assoziiert, diese werden hier aber nicht näher diskutiert.

Zu den EBV-assoziierten B-Zell-Lymphomen gehören Burkitt-Lymphom, Hodgkin-Lymphom und immunoblastische Lymphome in immunsupprimierten Patienten.

Die Expression der viralen Gene variiert sehr zwischen den verschiedenen Tumoren (Tab. 1). Immunoblastische B-Zell-Lymphome wie Posttransplant-Lymphome (PTLD) exprimieren neun virale latente Gene, also das Expressionsmuster der Latenz III. Die Expression von EBNA-1, der latenten Membranproteine LMP-1, LMP-2A und -2B und zweier kleiner, nichtpolyadenylierter RNAs EBER-1 und -2 entspricht der Latenz II und ist charakteristisch für Magen- und Nasopharynxkarzinome, Hodgkin- und T-Zell-Lymphome. Burkitt-Lymphome exprimieren nur EBNA-1 und EBER-1 und EBER-2. (Young et al., 2000).



Transkriptionsprogramm	exprimierte Gene	Tumor
Latenz III ("growth programme")	EBNA-1, -2, -3A, -3B, -3C, -LP, LMP-1, -2A, -2B	immunoblastische B-Zell- Lymphome
Latenz II ("default programme")	EBNA-1, LMP-1, LMP-2A	Magen-, Nasopharynxkarzinome, Hodgkin-, T-Zell- Lymphome
Latenz I ("latency programme")	EBNA-1, EBER-1, -2	Burkitt-Lymphom

**Tabelle 1: Übersicht der verschiedenen Transkriptionsprogramme**

Zusammengefasst sind die drei Transkriptionsprogramme mit den jeweiligen exprimierten Genen und die Tumoren, für die das jeweilige Transkriptionsprogramm charakteristisch ist.

Das Burkitt-Lymphom zeichnet sich durch eine reziproke Translokation des Proto-onkogens c-myc mit dem Immunglobulinlocus aus, was zu einer konstitutiven Aktivierung des c-myc Gens führt. In der Mehrheit der Fälle findet eine reziproke Translokation zwischen Chromosom 8 in der Nähe des c-myc Locus und der schweren Kette des Immunglobulinlocus auf Chromosom 14 statt. Die endemische Form des Burkitt-Lymphoms in Afrika ist zu mehr als 95% mit EBV assoziiert, während sporadisch auftretende Formen nur zu 15-85% eine Assoziation mit EBV aufweisen (Thorley-Lawson, 2005).

Das Hodgkin-Lymphom ist das in der westlichen Welt häufigste Lymphom. Die charakteristischen Merkmale sind die mononukleären Hodgkin-Zellen und ihre multinukleäre Variante, die Reed-Sternberg-Zellen. EBV wird in ungefähr 40% der Tumore nachgewiesen. Eine vorangegangene Erkrankung an infektiöser Mononukleose gilt als Risikofaktor (Thorley-Lawson, 2001; Thorley-Lawson, 2005).

Immunoblastische Lymphome entstehen besonders häufig bei immunsupprimierten Patienten nach Transplantationen oder HIV-Infektion, da in diesem Fall die Immunabwehr gegen proliferierende EBV-infizierte B-Zellen fehlt. Diese Lymphome sind die einzigen, in denen EBNA-3A und EBNA-3C exprimiert werden. Während im gesunden Individuum ein Gleichgewicht zwischen EBV positiven B-Zellen und EBV spezifischen T-Zellen vorherrscht, ist diese Balance in PTLD-Patienten aufgrund von T-Zelldepletion und Immunsuppression gestört. Die Wiederherstellung des Gleichgewichts kann durch Reduzierung der Immunsuppression, durch adoptiven T-Zelltransfer oder durch Verwendung von Anti-B-Zell-Antikörpern zur Reduktion der EBV positiven B-Zellen erreicht werden. Zur Generierung von EBV-spezifischen zyto-

---

toxischen T-Zellen (CTLs) werden periphere mononukleäre B-Zellen (PBMCs) aus dem Blut des Patienten isoliert, mit EBV infiziert, bestrahlt und mit T-Zellen des Patienten kokultiviert. Dies führt zur Expansion EBV spezifischer T-Zellen, die dann in den Patienten reinfundiert werden. Diese Behandlung wird als adoptive Immuntherapie bezeichnet (Hsieh et al., 1999b). Wichtige, die Immunantwort stimulierende Antigene, die auch von den Tumoren exprimiert werden, sind die EBNA-3 Antigene. Ein zentrales Ziel dieser Arbeit ist es, zu untersuchen ob EBNA-3A und EBNA-3C für die B-Zellimmortalisierung notwendig sind. Diese Frage ist besonders wichtig für die Therapie von Posttransplant-Lymphomen. Im Falle von Mutationen oder Deletionen tumorspezifischer Antigene, ist eine adoptive Immuntherapie erfolglos, wenn der Tumor das spezifische Antigen nicht oder nicht mehr exprimiert und daher von den zytotoxischen T-Zellen nicht erkannt wird (Gottschalk et al., 2001). Deshalb dürfen für die adoptive Immuntherapie nur essentielle Antigene verwendet werden. Zur Definition solcher Antigene leistet diese Arbeit einen sehr wichtigen Beitrag.

## **1.2 Die Epstein-Barr Virus nukleären Antigene 3 (EBNA-3)**

### **1.2.1 Strukturmerkmale und funktionell charakterisierte Regionen der EBNA-3 Proteine**

Die EBNA-3 Gene sind tandemartig im Genom angeordnet und weisen eine ähnliche Exon-Intron-Struktur auf, mit einem kurzen kodierenden 1. Exon und einem größeren kodierenden 2. Exon, getrennt durch ein kurzes Intron. Dies lässt vermuten, dass die EBNA-3 Gene durch Gendublikation entstanden und möglicherweise teilweise redundante Funktionen tragen.

Die EBNA-3 Proteinfamilie besteht aus EBNA-3A, EBNA-3B und EBNA-3C, die eine Größe von 944AS, 937AS und 992AS und ein Molekulargewicht von 145kDa, 165kDa und 155kDa aufweisen (Hennessy et al., 1986; Petti and Kieff, 1988; Petti et al., 1988).

Gemeinsame Merkmale von EBNA-3A und EBNA-3C sind nukleäre Lokalisationssignale, Transaktivierungs- und Repressionsdomänen, sowie eine Binderegion für das CBF-1 Protein. Die Transaktivierungs- und Repressionsdomänen wurden nach Genfusion der entsprechenden Regionen an die DNA-Bindedomäne des Hefe Gal4-Proteins in Reporterstudien kartiert. Eine systematische Suche nach EBNA-3A oder EBNA-3C Zielgenen ist bisher in der Literatur nicht beschrieben. Ein bisher

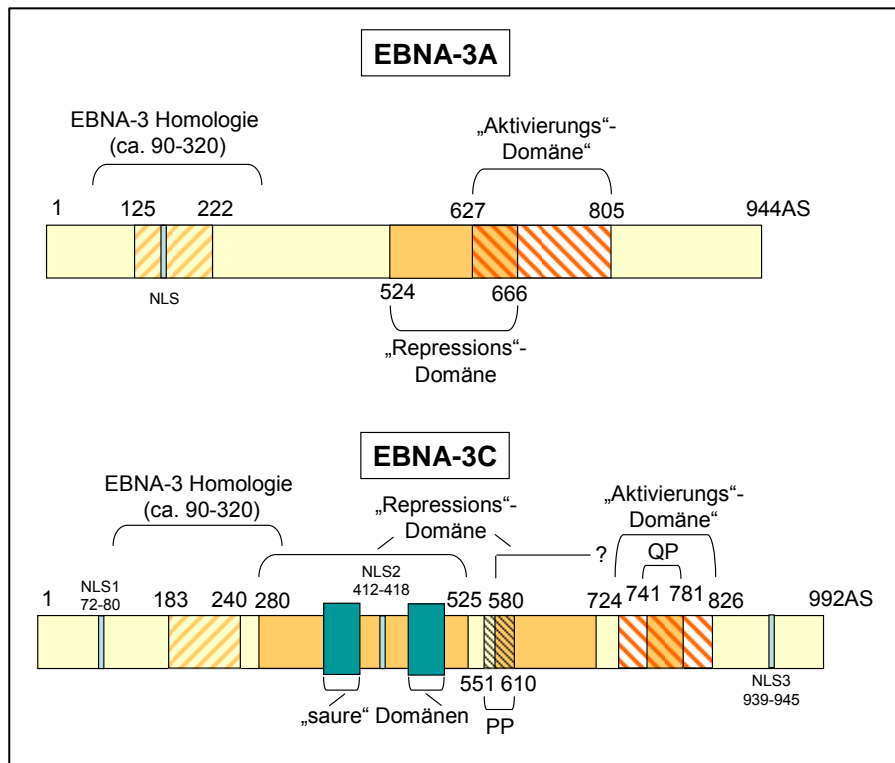
---

beschriebenes EBNA-3C Zielgen ist die Matrix-Metalloproteinase 9 (MMP-9), deren Expression von EBNA-3C zusammen mit Nm23H1 hochreguliert wird. Es ist bekannt, dass Matrix-Metalloproteinasen in aggressiven Lymphomen exprimiert werden und in der Metastasierung eine Rolle spielen (Kuppers et al., 2005). Ein weiteres EBNA-3C Zielgen ist die Cyclo-Oxygenase 2 (COX-2), die von EBNA-3C zusammen mit Nm23-H1 hochreguliert wird. COX-2 ist ein induzierbares Enzym, das bei Entzündungen wichtig ist. Es wurde beobachtet, dass das Level von COX-2 in EBV positiven wesentlich höher ist, als in EBV negativen Zellen (Kaul et al., 2006). Nm23-H1 ist ein zelluläres cytoplasmatisches Protein mit einer Größe von 152AS und gehört zur Familie der Nukleosid-Diphosphat (NDP)-Kinasen (Lacombe et al., 2000)

Auch das Alpha V Integrin wird als EBNA-3C Zielgen diskutiert und die Expression wird von EBNA-3C und Nm23-H1 durch Interaktion mit den Transkriptionsfaktoren GATA-1 und Sp1 moduliert. Alpha V Integrine sind an der Zellmigration und Proliferation beteiligt (Choudhuri et al., 2006).

Die CBF1 bindende Region aller EBNA-3 Proteine liegt vorwiegend im konservierten Aminoterminus der Proteine. Durch die Bindung der EBNA-3 Proteine an CBF1 werden die EBNA-3 Proteine zu Antagonisten des EBNA-2 Proteins. Der molekulare Mechanismus dieses Antagonismus der viralen Proteine ist umstritten. Diskutiert wird entweder eine direkte Konkurrenz um die CBF1 Bindung oder auch ein Einfluss der EBNA-3 Proteine auf die CBF1-DNA-Komplexbildung (Johannsen et al., 1996; Krauer et al., 1996; Le Roux et al., 1994; Marshall and Sample, 1995; Radkov et al., 1997; Robertson et al., 1995; Waltzer et al., 1996; Zhao et al., 1996).

Abbildung 1 zeigt eine detaillierte Darstellung der Strukturmerkmale und funktionell charakterisierten Regionen, unter Angabe der entsprechenden Aminosäurepositionen in der Primärstruktur.



**Abb. 1: Primärstruktur und funktionell charakterisierte Regionen der Proteine EBNA-3A und -3C**

Der N-terminale Bereich weist unter den EBNA-3 Proteinen den Bereich mit größter Homologie auf (ca. AS90-320). In diesem Bereich beinhalten das EBNA-3A und das EBNA-3C Protein eine CBF1 Bindestelle zwischen AS125 und 222 in EBNA-3A und zwischen AS183 und 240 in EBNA-3C. Der Bereich von AS524 bis 666 konnte in EBNA-3A als Repressionsdomäne identifiziert werden, während im EBNA-3C Protein zwei Repressionsdomänen von AS280 bis 525 und von AS580 bis 992 gefunden wurden. Als Aktivierungsdomäne in EBNA-3A gilt der Bereich zwischen AS627 und 805 und in EBNA-3C der Bereich von AS724 bis 826. Im EBNA-3A Protein gibt es eine nukleäre Lokalisierungssequenz (NLS) im N-terminalen Bereich, während im EBNA-3C Protein drei NLS zu finden sind. Im C-terminalen Bereich von EBNA-3C befindet sich, sowohl eine prolinreiche Region (PP) zwischen AS551 und 610, als auch eine glutamin-prolinreiche Region (QP) zwischen AS741 und 781. Außerdem gibt es bei EBNA-3C zwei saure Domänen im N-terminalen Bereich.

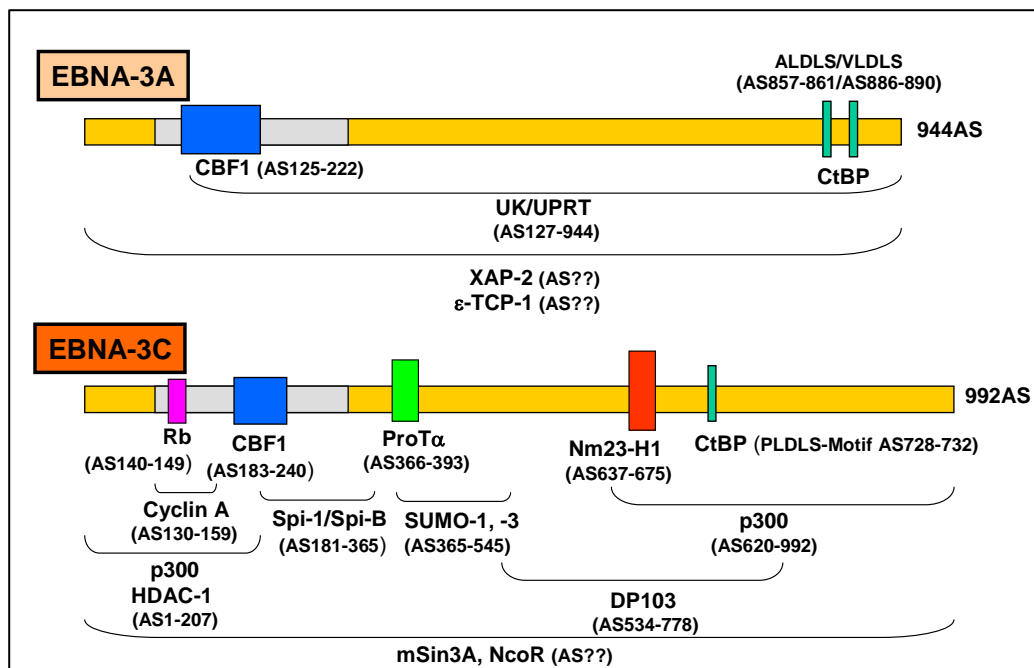
### 1.2.2 Funktion der EBNA-3 Proteine in der B-Zellimmortalisierung

Wie anfangs erwähnt, gehören die EBNA-3 Proteine zum Latenzprogramm III des EBV. Sie werden damit in EBV immortalisierten B-Zellen *in vitro*, sowie in den B-Zell-Lymphomen immunsupprimierter Patienten exprimiert. Sehr wahrscheinlich werden sie auch nach der Erstinfektion von primären B-Zellen *in vivo* exprimiert. Wie auch für alle anderen latenten Proteine wurde die Rolle der EBNA-3 Proteine mit Hilfe von Virusmutanten, in denen spezifisch eines der EBNA-3 Gene inaktiviert war, bereits untersucht. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigten, dass EBNA-3A und EBNA-3C für den B-Zellimmortalisierungsprozess essentiell, EBNA-3B dagegen nicht essentiell, möglicherweise sogar bedeutungslos ist. EBNA-3A nimmt insofern eine Sonderrolle ein, als tatsächlich schon EBNA-3A negative LCLs beschrieben

wurden, diese jedoch möglicherweise erst sekundär nach der Etablierung der LCLs die EBNA-3A Expression verloren hatten. Welche Funktionen die EBNA-3 Proteine ausüben, wurde bis zum Beginn meiner Doktorarbeit ausschließlich in Fibroblasten und etablierten B-Zelllinien untersucht, nicht jedoch in EBV infizierten B-Zelllinien da diese nicht oder nur in Ausnahmefällen zur Verfügung standen. Aus diesen Untersuchungen ergaben sich zahlreiche Hinweise auf eine Rolle der EBNA-3 Proteine in der Transkriptionskontrolle, Zielgenaktivierung und -repression, Zellzykluskontrolle und der Metastasierung. Welche dieser Funktionen tatsächlich wichtig für den Prozess der B-Zellimmortalisierung ist, ist zum derzeitigen Stand des Wissens noch unklar. Denkbar ist, dass einzelne Funktionen erst in der Pathogenese von EBNA-3 assoziierten Tumoren *in vivo* wichtig werden.

Die Funktionen von EBNA-3A und EBNA-3C zeigen Gemeinsamkeiten, aber auch deutliche Unterschiede, die in den folgenden Kapiteln näher beschrieben werden.

Abbildung 2 zeigt eine Übersicht über die EBNA-3 assoziierten Proteine.



**Abb. 2: Schematische Darstellung der EBNA-3 assoziierten Proteine**

Dargestellt sind die Proteine EBNA-3A (944AS) und EBNA-3C (992AS) mit den jeweiligen assoziierten Proteinen (CBF1: C-promotor binding factor; UK/UPRT: humane Uridinkinase/Uracilphosphoribosyltransferase; CtBP: E1A C-terminales Bindeprotein; XAP-2: p38 Untereinheit des Arylhydrocarbon-Rezeptorkomplexes; ε-TCP-1: Epsilon-Untereinheit des T-Komplex Protein 1 Chaperonin-Komplexes; HDAC-1: Histondeacetylase 1; Rb: Retinoblastom; Spi-1/Spi-B: Transkriptionsfaktoren der Ets-Familie; ProTα: Prothymosin α; Nm23-H1: humanes Metastasesuppressorprotein; p300: zelluläre Acetyltransferase; cyclin A; SUMO-1, -3: small ubiquitin-like modifier ; DP103: DEAD Box Protein mit 103kDa; mSin3A; NCoR) unter Angabe der für die Bindung essentiellen Aminosäurepositionen, falls diese bekannt sind. Für das Protein CtBP sind die für die Bindung wichtigen Motive ALDLS/VLDLS für EBNA-3A und PLDLS für EBNA-3C markiert. Die am meisten homologe Region zwischen den EBNA-3 Proteinen ist durch eine graue Box dargestellt.

Für EBNA-3A sind drei spezifische Interaktionspartner bekannt, über deren Funktion in der B-Zellimmortalisierung bisher keine Untersuchungen vorliegen.

Identifiziert wurde die Uracilphosphoribosyltransferase UK/UPRT (Kashuba et al., 2002). Uridinkinasen und UPRTs spielen eine Rolle im „Salvage Pathway“ der RNA-Synthese. In Tumorzellen ist die Uridinkinaseaktivität erhöht. Die nukleäre Anhäufung der UK/UPRT könnte benutzt werden, um ruhende B-Zellen in kontinuierlich proliferierende lymphoblastoide Zellen zu verwandeln (Kashuba et al., 2002).

Der zweite Interaktionspartner von EBNA-3A ist das Protein XAP-2, das die p38 Untereinheit des Arylhydrocarbon-Rezeptorkomplexes darstellt. XAP-2 bindet außerdem an den N-Terminus des Hepatitis B Virus-Antigens X (Meyer et al., 1998). Es wird vermutet, dass der Arylhydrocarbon-Rezeptor (AhR)-Signaltransduktionsweg an der Transformation beteiligt ist, da die transformierenden Proteine EBNA-3A und das Hepatitis B Virus-Antigen X beide an XAP-2 binden (Kashuba et al., 2000). Die Interaktion zwischen EBV- und AhR abhängigen zellulären Signalwegen kontrolliert die Proliferation und das Überleben der Zellen (Kashuba et al., 2006).

Als drittes EBNA-3A assoziiertes Protein wurde die Epsilon-Untereinheit des T-Komplexes Protein 1 Chaperonin-Komplexes ( $\epsilon$ -TCP-1) identifiziert. EBNA-3A erhält wahrscheinlich bei der initialen Faltung Hilfe von Chaperoninkomplexen. Es wird angenommen, dass EBNA-3A den TCP-1 Komplex durch Interaktion mit dessen  $\epsilon$ -Untereinheit erkennt (Kashuba et al., 1999).

### **1.2.2.1 Transkriptionelle Aktivierung von Zielgenen**

Der einzige direkte Effekt von EBNA-3C auf virale oder zelluläre Promotoren, der bisher bekannt ist, ist die schwache Aktivierung des LMP-1 Promotors in bestimmten Zelllinien unter bestimmten Bedingungen (Marshall and Sample, 1995). Die Promotoren der eingangs erwähnten weiteren zellulären Zielgene (Matrix-Metalloproteinase 9, Cyclo-Oxygenase 2 und Alpha V Integrin) sind noch nicht untersucht.

EBNA-3C hat zwei Effekte auf den LMP-1 Promotor. Zum einen inhibiert EBNA-3C die Aktivierung von LMP-1, die normalerweise von EBNA-2 vermittelt wird. Zum anderen aktiviert EBNA-3C den LMP-1 Promotor in Anwesenheit von EBNA-2 (Marshall and Sample, 1995). Diese gegenläufigen Aktivitäten werden von unterschiedlichen Sequenzmotiven des LMP-1 Promotors vermittelt. Zudem sind

---

diese Effekte zellzyklusabhängig und CBF1 unabhängig und damit offensichtlich sehr komplex reguliert (Marshall and Sample, 1995).

In der Region, die kritisch ist für die LMP-1 Promotor-Koaktivierung mit EBNA-2, konnten zwei assoziierte Proteine, die ubiquitinähnlichen Proteine SUMO-1 und SUMO-3 identifiziert werden. SUMO („small ubiquitin-like modifier“) ist ein 97AS großes Protein, strukturell ähnlich zum Ubiquitin und ubiquitär in eukaryontischen Zellen exprimiert (Seeler and Dejean, 2001). Eine zu SUMO homologe Sequenz in EBNA-3C ist notwendig für die Assoziation mit SUMO und die transkriptionelle Aktivierung (Rosendorff et al., 2004).

ProT $\alpha$  und das humane Metastasesuppressorprotein Nm23-H1 stellen Kandidaten dar, die an der Koaktivierung des LMP-1 Promotors durch EBNA-3C und EBNA-2 beteiligt sein könnten, da sie an dieselbe Region in EBNA-3C binden, die für die Koaktivierung notwendig ist (Subramanian et al., 2001).

Die Assoziation von EBNA-3C mit p300, einer zellulären Histonacetyltransferase, legt nahe, dass die Modifikation des Chromatins ein wichtiger Mechanismus der Genregulation durch EBNA-3C ist (Hartzog and Winston, 1997; Imhof et al., 1997; Kouzarides, 1999).

### **1.2.2.2 Transkriptionelle Repression von Zielgenen**

Wie bereits erwähnt, ist allen EBNA-3 Proteinen gemeinsam, dass sie CBF1 binden und damit möglicherweise CBF-1 abhängige Gene regulieren (Kapitel 1.2.1).

Ein weiterer gemeinsamer Assoziationspartner von EBNA-3A und EBNA-3C ist das E1A C-terminale Bindeprotein (CtBP). CtBP, ein 48kDa Phosphoprotein, wurde ursprünglich als zellulärer Faktor, der mit dem adenoviralen E1A Onkoprotein interagiert, beschrieben (Boyd et al., 1993; Schaeper et al., 1995). CtBP kann die Histondeacetylasen 1, 4, 5 und 7 rekrutieren und auch an Sin3 binden und damit die Transkription reprimieren (Koipally and Georgopoulos, 2000; Sundqvist et al., 1998).

Neben dem bereits erwähnten CBF-1 (Kapitel 1.2.1) assoziiert EBNA-3C mit zwei weiteren DNA-bindenden Transkriptionsfaktoren, Spi-1 und Spi-B. Spi-1 und Spi-B gehören zur Ets-Familie der Transkriptionsfaktoren und sind DNA-bindende Proteine, die eine entscheidende Rolle in der Entwicklung von B-Lymphocyten spielen (Kola et al., 1993; McKercher et al., 1996; Rao et al., 1999; Su et al., 1997).

Auch Komponenten von transkriptionellen Korepressor-Komplexen gehören zu den Assoziationspartnern von EBNA-3C. Die Bindung der Histondeacetylase 1 (HDAC-1)

---

an EBNA-3C konnte *in vitro* und, wenn beide Proteine koexprimiert werden, auch *in vivo* gezeigt werden (Radkov et al., 1999). In einem Modell wird vorgeschlagen, dass in einer latent mit EBV infizierten Zelle ein dynamisches Gleichgewicht zwischen CBF1/EBNA-3C/HDAC-1 und CBF1/EBNA-2/hSNF-SWI Komplexen besteht. Durch den EBNA-2 Komplex, der die Transkription aktiviert und den EBNA-3C Komplex, der die Transkription reprimiert, kann die Genexpression so sehr genau reguliert werden (Radkov et al., 1999). EBNA-3C rekrutiert nicht nur HDAC-1, sondern ist auch mit den Korepressoren mSin3A und NCoR assoziiert. Zusätzlich soll ProT $\alpha$  notwendig sein, um den Komplex aus EBNA-3C, den Histondeacetylasen HDAC-1 und HDAC-2, und den Korepressoren mSin3A und NCoR zu stabilisieren (Knight et al., 2003).

Einen weiteren Interaktionspartner von EBNA-3C stellt das DEAD Box Protein DP103 dar. DP103 ist ein neues Mitglied der DEAD Box Familie von ATP-abhängigen RNA-Helikasen, benannt nach seinem apparenten Molekulargewicht von 103kDa. DEAD Box Proteine spielen eine wichtige Rolle in der Entwicklung, Differenzierung und Proliferation von Zellen und stellen wichtige Mediatoren des RNA-Metabolismus dar. Die Rekrutierung von DP103 oder DP103 enthaltenden Komplexen könnte an der Regulation der Genexpression durch EBNA-2 oder EBNA-3C beteiligt sein (Grundhoff et al., 1999).

### 1.2.2.3 Zellzykluskontrolle

Zu den Proteinen, die im Zellzyklus eine Rolle spielen gehört Prothymosin  $\alpha$  (ProT $\alpha$ ). ProT $\alpha$  ist ein 112AS großes stark saures nukleäres Protein, das ubiquitär in den meisten eukaryontischen Zellen exprimiert wird (Gast et al., 1995; Gomez-Marquez and Segade, 1988; Sburlati et al., 1990). Obwohl die spezifische Funktion dieses hochkonservierten Proteins unbekannt ist, wird ProT $\alpha$  als kritischer Faktor in der Zellteilung und Proliferation gesehen (Goodall et al., 1986; Rodriguez et al., 1998; Sburlati et al., 1991; Wu et al., 1997).

Im aktuellen Modell der EBV Zellzyklusregulation wird angenommen, dass das Epstein-Barr Virus die latenten Proteine benutzt, um die Proliferation der B-Zellen einzuleiten und einen Phänotyp induziert, der die antigenabhängige B-Lymphocytenaktivierung und Expansion nachahmt.

Zur Beteiligung von EBNA-3A am Zellzyklus gibt es bisher nur zwei Publikationen. Eine drei- bis fünffache Überexpression von EBNA-3A führt zu einem G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> Arrest



---

mit verlängerter Viabilität (Cooper et al., 2003) und alle drei EBNA-3 Proteine verhindern den Arrest am G2/M Kontrollpunkt (Allday et al., 1995; Krauer et al., 2004). Zellzykluskontrollpunkte werden auch als „Check-Points“ bezeichnet.

EBNA-3C wurde zunächst indirekt durch Experimente der LMP-1 Expression in der lymphoblastoiden Raji-Zelllinie mit dem Zellzyklus in Verbindung gebracht. Das besondere am Raji-Genom ist, dass unter anderem die kodierende Region von EBNA-3C und essentielle lytische Gene fehlen. In diesen Zellen konnte gezeigt werden, dass die LMP-1 Expression abhängig von der Zellzyklusphase der Zelle ist. Wird allerdings EBNA-3C in trans in den Zellen exprimiert, wird LMP-1 in Mengen vergleichbar zum Typ III Latenzmuster exprimiert und in der G1-Phase aufrechterhalten. Dies deutet darauf hin, dass EBNA-3C in der frühen Phase der EBV-Infektion noch vor Eintritt in die S-Phase für die LMP-1 Expression von Bedeutung ist (Allday and Farrell, 1994).

Experimente von Parker und Kollegen konnten EBNA-3C noch näher mit der Zellzyklusregulation in Verbindung bringen. B-myb ist ein zelluläres Gen, das normalerweise in der G1-Phase reprimiert ist und durch Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie aktiviert wird. EBNA-3C aktiviert den B-myb Promotor in Reporter-gen-Assays in DG-75 Zellen. Außerdem bindet Rb *in vitro* an EBNA-3C und darüber hinaus reguliert EBNA-3C den Rb- Pathway in primären Rattenfibroblasten (Parker et al., 1996).

In weiteren Experimenten konnte dieselbe Gruppe zeigen, dass EBNA-3C den Eintritt in die S-Phase trotz Serumentzug fördert und EBNA-3C den Kontrollpunkt für die mitotischen Spindeln aufhebt (Parker et al., 2000).

EBNA-3C bindet an Cyclin A und stimuliert die Cyclin A assoziierte Kinaseaktivität. Außerdem wird die Assoziation zwischen Cyclin A und p27 in BJAB-Zellen gestört und verhindert somit die p27 vermittelte Inhibierung der Cyclin A/Cdk2 Kinaseaktivität (Knight and Robertson, 2004).

Eine weitere Beteiligung von EBNA-3C am Zellzyklus ist die Rekrutierung eines SCF Ubiquitin-Ligase-Komplexes, der die Ubiquitinierung und Degradation des Retinoblastom Proteins (Rb) vermittelt (Knight et al., 2005).

#### **1.2.2.4 Metastasierung**

Ein weiterer Interaktionspartner des EBNA-3C ist das humane Metastasesuppressorprotein Nm23-H1. Die Interaktion zwischen EBNA-3C und Nm23-H1 ist besonders

---

interessant, da zum ersten Mal gezeigt wird, dass ein virales Onkoprotein mit einem zellulären Molekül, welches mit der Suppression von Metastasen assoziiert ist, interagiert. Des Weiteren wurde gezeigt, dass die Expression von EBNA-3C die Fähigkeit von Nm23-H1, Migration von Burkitt-Lymphom- und Brustkarzinom-Zellen zu verhindern, aufhebt (Subramanian et al., 2001).

### 1.2.3 Techniken der molekularen EBV Genetik

#### 1.2.3.1 Eukaryontische Replikationssysteme zur Herstellung von rekombinantem EBV

Als *in vitro*-Modellsystem für die pathogenetischen Mechanismen bei der Entstehung von PTLDs dienen lymphoblastoide Zelllinien. LCLs exprimieren alle viralen Gene, die für die Latenz III beschrieben sind und können durch Infektion primärer B-Zellen mit EBV leicht *in vitro* etabliert werden. In diesem System kann der Einfluss von Virus-Mutanten auf die Wachstumsimmortalisierung von B-Zellen gut untersucht werden.

Durch die genetische Analyse des EBV war es möglich, Gene, die für die B-Zell-immortalisierung unbedingt notwendig sind, zu identifizieren und ihre Funktion molekulargenetisch zu untersuchen. Bis zum Jahr 1998 wurden alle Virusmutanten in eukaryontischen Systemen erzeugt und basierten auf der Burkitt-Lymphom-Zelllinie P3HR-1, die ein EBV Genom trägt, dessen EBNA-2 und EBNA-LP Gene deletiert sind. Wird in der Zelllinie P3HR-1 der lytische Zyklus induziert, entstehen zwar infektiöse P3HR-1 Viruspartikel, die aber B-Zellen nicht immortalisieren können.

1989 konnte von zwei Arbeitsgruppen die erfolgreiche Rekonstitution der immortalisierenden Funktion des P3HR-1 Virus durch EBNA-2 beschrieben werden.

Die Arbeitsgruppe von W. Hammerschmidt stellte so genannte Mini-EBV Plasmide her, die EBNA-2 exprimieren und alle für die lytische und episomale Replikation und Verpackung des Virusgenoms benötigten Strukturelemente tragen. Die EBNA-2 Mini-EBV Plasmide werden in der P3HR-1 Zelllinie lytisch repliziert und in Viruspartikel verpackt. Nach Koinfektion von primären B-Zellen mit P3HR-1 Virus und EBNA-2 Mini-EBV ist eine Immortalisierung der Zellen möglich (Hammerschmidt and Sugden, 1989).

Die Gruppe von E. Kieff transfizierte genomische DNA-Fragmente, die das EBNA-2 Gen und den lytischen Replikationsursprung (*oriLyt*) enthielten in die P3HR-1 Zelllinie und induzierten den lytischen Zyklus. Durch homologe Rekombination zwischen

---

P3HR-1 DNA und viralem DNA-Fragment konnte die Rekonstitution des EBNA-2 Gens und damit die Wiederherstellung der immortalisierenden Eigenschaft des Virus erfolgen (Cohen et al., 1989).

Die Gruppe von E. Kieff hat das P3HR-1 System weiterentwickelt, um rekombinante Viren zu generieren. Transfiziert man P3HR-1 Zellen mit einem DNA-Fragment, das das EBNA-2 Gen und weitere flankierende Gene trägt, so können durch homologe Rekombination Mutanten in das EBV Genom eingeführt werden. Ein Nachteil dieser Methode ist, dass nur ein geringer Teil des EBV Genoms mit dem gesamten Fragment homolog rekombiniert. Dabei entsteht eine Mischung aus P3HR1-Virus und rekombinantem Virus, mit der primäre B-Zellen infiziert werden. Diese Methode ist sehr zeitaufwendig, mühselig und sie beruht auf spontan stattfindenden Rekombinationen (Marchini et al., 1993).

Andere Arbeitsgruppen benutzen das so genannte Akata-Zellsystem. Dabei werden EBV negative Akata-Zellklone mit EBV reinfiziert. Durch Cross-linking von Zelloberflächen-Immunglobulinen mit anti-Ig-Antikörpern kann die Produktion von EBV induziert werden (Shimizu, 1996). Auf dieses System wird hier aber nicht näher eingegangen.

### **1.2.3.2 Bakterielle Systeme zur Produktion von rekombinanten EBV Genomen**

Die Voraussetzung für eine Manipulation beliebiger EBV-Gene wurde durch die Klonierung des gesamten EBV-Genoms in *E. coli* geschaffen. Mit Hilfe der BAC-Technologie ist es möglich, auch sehr große Genome für die Mutagenese zugänglich zu machen. Unter einem BAC versteht man ein DNA-Konstrukt, das auf dem F-Faktor Plasmid basiert ist und zur Transformation und Klonierung in Bakterien, meist *E. coli* dient. Ein prokaryontisches F-Faktor Plasmid wurde in das Genom des EBV-Stamms B95.8 integriert, so dass dieses für jede beliebige genetische Manipulation in *E. coli* zugänglich ist. Darüber hinaus wurde das Gen für die Chloramphenicol-Acetyltransferase zur Selektion in prokaryontischen Zellen eingebracht (Delecluse et al., 1998).

Aus diesem BAC wurde zur Herstellung von rekombinanten Epstein-Barr Viren das Maxi-EBV-System generiert. Das so genannte Maxi-EBV-Plasmid p2089 trägt das Gen für die Hygromycin-Phosphotransferase zur Selektion in eukaryontischen Zellen und das Gen für das „grün fluoreszierende Protein“ (GFP). Dies macht es möglich, erfolgreich transfizierte oder infizierte Zellen durch die GFP vermittelte Fluoreszenz

---

einfach zu identifizieren. Nach Induktion des lytischen Zyklus in den stabil mit p2089 transfizierten HEK293-Zelllinien, ist es möglich infektiöses Maxi-EBV, das 2089 genannt wird, zu produzieren. Mit diesem 2089-Maxi-EBV werden primäre humane B-Zellen effizient wachstumstransformiert. Es konnte gezeigt werden, dass das 2089-Virus alle Eigenschaften von Wildtyp-EBV besitzt. Der Vorteil des Maxi-EBV-Systems ist, dass die Mutation im Kontext des gesamten Virusgenoms untersucht werden kann und erstmals eine genaue Titerbestimmung möglich ist (Delecluse et al., 1998). Das Plasmid p2089 diente als Ausgangsplasmid für die in dieser Doktorarbeit beschriebenen Mutanten, die durch homologe Rekombination in *E. coli* erzeugt wurden.

### 1.3 Ziel des Projektes

Das Epstein-Barr Virus ist ein weltweit verbreitetes humanpathogenes Virus aus der Familie der Herpesviren, das an der Entstehung von Tumoren beteiligt ist. In latent infizierten B-Zellen werden bis zu neun Proteine exprimiert: die nukleären EBV Antigene EBNA-1, -2, -3A, -3B, -3C, -LP und die latenten Membranproteine LMP-1, -2A, -2B. Die viralen Proteine EBNA-1, EBNA-2, LMP-1 und LMP-2A benutzen zelluläre Signalwege. Während des Immortalisierungsprozesses findet eine Kooperation der viralen Kern- und Membranproteine statt. Keines dieser viralen Proteine kann die Immortalisierung der B-Zellen allein verursachen. Da LCLs das Transkriptionsprogramm der Latenz III exprimieren, dienen diese als Modell für PTLDs.

Zu Beginn meiner Doktorarbeit war EBNA-3A als absolut essentiell für die B-Zellimmortalisierung beschrieben. Um den Beitrag verschiedener EBNA-3A assoziierter Proteine zur B-Zellimmortalisierung zu untersuchen, sollten spezifische EBNA-3A Mutanten im Kontext des viralen Genoms etabliert und funktionell untersucht werden. Im ersten Schritt wurden Viren untersucht, die kein EBNA-3A oder ein trunkiertes EBNA-3 exprimierten. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen waren jedoch völlig unerwartet, da nach Infektion mit EBNA-3A negativen Viren ein Auswachsen von B-Zellkulturen beobachtet wurde.

Daraufhin sollten als Kontrolle für die Infektionen mit EBNA-3A negativen Viren, EBNA-3C negative Viren dienen, da man zu Beginn meiner Arbeit davon ausging, dass auch EBNA-3C essentiell für die B-Zellimmortalisierung ist. Überraschenderweise gelang aber auch die Etablierung von B-Zellkulturen nach Infektion mit EBNA-3C negativen Viren.

---

Nach diesen beiden völlig unerwarteten Ergebnissen, war das Ziel der Arbeit die Untersuchung der Phänotypen der B-Zellkulturen, die nach Infektion von humanen primären B-Lymphocyten mit EBNA-3A negativen bzw. EBNA-3C negativen Viren auswachsen.

Zusätzlich wurde geplant ein konditionales System für EBNA-3C zu etablieren. Dafür stand ein Plasmid zur Verfügung, das EBNA-3C von einem bidirektionalen Tetrazyklin-induzierbaren Promotor exprimiert. Durch Transfektion dieses Plasmids in frisch isolierte primäre B-Zellen und anschließender Infektion mit  $\Delta$ EBNA-3C Viren, sollte versucht werden LCLs zu etablieren, in denen die EBNA-3C Expression reguliert werden kann.

## 2 MATERIAL

### 2.1 Plasmide und BACS

Plasmidname	Beschreibung des Plasmids	zur Verfügung gestellt von
pBluescript SK	2961bp Vektor mit multiple cloning site	Stratagene
Bch196	Ausgangskonstrukt für EBNA-3A Rekombination EBNA-3A $\Delta$ 127-944	AG Kempkes
Bch202	Ausgangskonstrukt für EBNA-3A Rekombination $\Delta$ EBNA-3A	AG Kempkes
AJ447.1	Plasmid mit bidirektionalem Promotor: konditionale Expression von EBNA-3C und NGF-R durch Induktion mit Tetrazyklin	AG Kempkes
pKD46	Temperatur-sensitives Rekombinations-Plasmid (Red $\alpha$ , Red $\beta$ , Red $\gamma$ )	(Datsenko, Wanner, 2000)
P2650	recA/red $\gamma$ in pST76-amp (Temperatur-sensitives Rekombinationsplasmid)	AG Hammerschmidt
P509	pCMV:BZLF1 (BZLF1 Expressionsplasmid)	AG Hammerschmidt
P2670	pCMV:BALF4 (BALF4 Expressionsplasmid)	AG Hammerschmidt
p2089	Wildtyp Maxi-EBV: F-Plasmid mit eGFP Gen und Hygromycinresistenzgen in B95.8 DNA	AG Hammerschmidt
p2491	$\Delta$ EBNA-2 Maxi-EBV	AG Hammerschmidt
p2319	$\Delta$ JAK3 LMP-1	AG Hammerschmidt
Be714	EBNA-3A $\Delta$ 127-944 Maxi-EBV (zusätzlich Deletion in 5x33bp repeat Region des LMP-1 Gens)	AG Kempkes
Be715	$\Delta$ EBNA-3A Maxi-EBV (zusätzlich Deletion in 5x33bp repeat Region des LMP-1 Gens)	AG Kempkes
CP481-21	EBNA-3A $\Delta$ 127-944 Maxi-EBV	in dieser Arbeit hergestellt
CP481-24	$\Delta$ EBNA-3A Maxi-EBV	in dieser Arbeit hergestellt
MS121	ORF von LMP-2A in pUC19; Ausgangskonstrukt für Northern-Blot-Sonde	AG Kempkes
p432	ORF von LMP-1 in pUC19; Ausgangskonstrukt für Northern-Blot-Sonde	AG Hammerschmidt
MS2A3	GPC-Klon 21B16 ORF von c-myc in pUC19; Ausgangskonstrukt für Northern-Blot-Sonde	AG Kempkes

## 2.2 Bakterienstämme

Bakterienstamm	Beschreibung des Bakterienstamms
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	$\alpha$ : F <sup>-</sup> , lac1 <sup>-</sup> , recA1, endA1, hsdR17, $\Delta$ (lacZYA-argF), U169, F80dlacZ $\Delta$ M15, supE44, thi-1, gyrA96, relA1
<i>E. coli</i> DH10B	F <sup>-</sup> , mcrA, $\Delta$ (mrr-hsdRMS-mcrBC), $\Phi$ 80dlacZ $\Delta$ M15, $\Delta$ lacX74, deoR, recA1, endA1, araD139, $\Delta$ (ara, leu)7697, galU, galK, $\lambda$ <sup>-</sup> , rpsL, nupG

## 2.3 Zelllinien

### 2.3.1 Allgemeine Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung der Zelllinie
DG75	EBV negative Burkitt-Lymphom-Zelllinie (Ben-Bassat et al., 1977)
721	lymphoblastoide Zelllinie, immortalisiert mit EBV-Stamm B95.8 (Sugden and Mark, 1977)
Raji	humane EBV positive Burkitt-Lymphom-Zelllinie (Pulvertaft, 1964)
WI38	humane Fibroblasten-Zelllinie (ATCC)
HEK293	humane, embryonale Epithelzelle aus einem Nierenkarzinom (Graham et al., 1977)

### 2.3.2 Virus produzierende HEK293 Zelllinien

Zelllinie	Maxi-EBV	Bezeichnung des Maxi-EBV Plasmids	zur Verfügung gestellt von
KG480-2	Wildtyp	p2089	AG Kempkes Kristina Grabusic
KG481-2	$\Delta$ EBNA-2	p2491	AG Kempkes Kristina Grabusic
ML2686.7	$\Delta$ EBNA-3C	p2686	AG Hammerschmidt Madelaine Löfqvist

#### In dieser Arbeit hergestellt:

Zelllinie	Maxi-EBV	Bezeichnung des Plasmids
CP146-2	EBNA-3A $\Delta$ 127-944	Be714
CP146-5	EBNA-3A $\Delta$ 127-944	Be714
CP235-1	EBNA-3A $\Delta$ 127-944	Be714
CP238-1	EBNA-3A $\Delta$ 127-944	Be714
CP236-1	$\Delta$ EBNA-3A	Be715
CP496-1	$\Delta$ EBNA-3A	CP482-24
CP639-2	EBNA-3A $\Delta$ 127-944	CP481-21

CP639-10	EBNA-3A $\Delta$ 127-944	CP481-21
CP640-2	$\Delta$ EBNA-3A	CP482-24
CP640-8	$\Delta$ EBNA-3A	CP482-24
CP640-12	$\Delta$ EBNA-3A	CP482-24
CP640-14	$\Delta$ EBNA-3A	CP482-24
CP640-17	$\Delta$ EBNA-3A	CP482-24

### 2.3.3 Lymphoblastoide Zelllinien, immortalisiert mit den angegebenen Maxi-EBVs aus den jeweiligen HEK293-Zelllinien

Zelllinie	Maxi-EBV zur Immortalisierung
CP342-1	wtEBV
CP342-3	EBNA-3A $\Delta$ 127-944
CP364-1	wtEBV
CP364-2	wtEBV
CP364-14	$\Delta$ EBNA-3A
CP364-17	$\Delta$ EBNA-3A
CP364-20	$\Delta$ EBNA-3A
CP364-21	$\Delta$ EBNA-3A
CP364-42	$\Delta$ EBNA-3A
CP364-44	$\Delta$ EBNA-3A
CP364-45	$\Delta$ EBNA-3A
CP364-48	$\Delta$ EBNA-3A
CP364-51	$\Delta$ EBNA-3A
CP364-52	$\Delta$ EBNA-3A
CP396-1	wtEBV
CP397-1	$\Delta$ EBNA-3A
CP397-3	$\Delta$ EBNA-3A
CP398-3	$\Delta$ EBNA-3A
CP400-2	$\Delta$ EBNA-3A
CP400-3	$\Delta$ EBNA-3A
CP403-2	EBNA-3A $\Delta$ 127-944
CP404-2	EBNA-3A $\Delta$ 127-944
CP541-1	wtEBV
CP543-8	$\Delta$ EBNA-3C
CP544-1	wtEBV
CP546-3	$\Delta$ EBNA-3C
CP654-1	wtEBV
CP655-1	$\Delta$ EBNA-3A



CP1056	wtEBV
CP1058	$\Delta$ JAK3 LMP-1
CP1059	EBNA-3A $\Delta$ 127-944
CP1060	wtEBV
CP1062	$\Delta$ JAK3 LMP-1
CP1063	EBNA-3A $\Delta$ 127-944

### 2.3.4 Konditionale EBNA-3C Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung der Zelllinie
CP692-1	transfiziert mit tet-induzierbarem EBNA-3C und immortalisiert mit $\Delta$ EBNA-3C
CP692-2	transfiziert mit tet-induzierbarem EBNA-3C und immortalisiert mit $\Delta$ EBNA-3C

## 2.4 Antikörper

### monoklonale Antikörper:

anti-EBNA-1 (1H4)	E. Kremmer, GSF
anti-EBNA-2 (R3)	E. Kremmer, GSF
anti-EBNA-3A N-terminal	E. Kremmer, B. Kempkes, GSF
anti-EBNA-3A C-terminal	E. Kremmer, B. Kempkes, GSF
anti-EBNA-3B (5F6; 6C9)	E. Kremmer, B. Kempkes, M. Allday, GSF
anti-LMP-1 (1G3-6)	E. Kremmer, GSF
anti-NGFR	E. Kremmer, GSF

### polyklonales Serum:

anti-EBNA-3A	Zytomed GmbH, Deutschland
anti-EBNA-3C	Zytomed GmbH, Deutschland

### gekoppelte Antikörper:

anti-human CD3, FITC	Diatec, Norwegen
anti-human CD19, PE	Diatec, Norwegen
anti-mouse IgG(H+L)-RPE	Biozol Diagnostica GmbH, Deutschland
anti-Ratte, IgG-HRP; Ziege	Santa Cruz Biotechnology, USA
anti-Schaf, IgG-HRP; Kaninchen	Dianova GmbH, Deutschland
anti-Digoxigenin-AP, Fab Fragmente	Roche Diagnostics GmbH, Deutschland

## 2.5 Enzyme

Klenow-Fragment	Roche Diagnostics GmbH, Deutschland
Proteinase K	Sigma-Aldrich GmbH, Deutschland
Pwo-DNA Polymerase	PeqLab Biotechnologie GmbH, Deutschland
Taq-DNA Polymerase	PeqLab Biotechnologie GmbH, Deutschland
RNase A	Sigma-Aldrich GmbH, Deutschland
T4-DNA Ligase	New England Biolabs, Deutschland
Restriktionsenzyme	New England Biolabs, Deutschland Roche Diagnostics GmbH, Deutschland

## 2.6 Radioaktive Isotope

[<sup>3</sup>H]-Thymidin 1mCi/ml wurde von der Firma Amersham Pharmacia Biotech bezogen.

## 2.7 Primer und Oligonukleotide

Oligonukleotid- und Primersynthesen wurden bei der Firma Metabion in Auftrag gegeben. Die Sequenzen der Oligonukleotide sind in 5'-3'-Orientierung angegeben.

PCR- und Sequenzierungs-Primer zum Nachweis der Deletion in der 5x33bp repeat-Region des LMP-1 Gens:

CP475 for: **GCC TCC ATC ATT TCC AGC AG**

CP476 rev: **CTG ACT CTA ACT CCA ACG AG**

PCR-Primer zur Herstellung der Sonden für die Northern-Blot-Analysen:

M13 for: **GCT ATT ACG CCA GCT GGC GAA AGG GGG ATG TG**

M13 rev: **CCC CAG GCT TTA CAC TTT ATG CTT CCG GCT CG**

PCR-Primer zur Herstellung der Sonden für die Southern-Blot-Analysen:

CP657 for: **GAT GTG CAT GAC CGT GCG TC**

CP658 rev: **GGA GCC TCA ATA TTC ATG GC**

CP697 for: **GCG GTA CCG AAG AAT CTA TG**

CP698 rev: **CGA CAT GGA ACT CAA GTG TG**

PCR-Primer zum Nachweis der EBNA-3A Deletion:

CP1078 for (Primer 1): **TTG TGC AGG AAC AGG TAT CG**

CP1079 rev (Primer 2): **TCC TCC CAG ATT TTC GTG AG**

CP1080 rev (Primer 3): **GTC TGT TGT GCC CAG TCA T**

CP1081 for (Primer 4): **GCG GTG TTG GTG AGT CAC AC**

Primer für RT-PCR (MMP7):

CP1065 for: **AGA AGC CCA GAT GTG GAG TG**

CP1066 rev: **GTG AGC ATC TCC TCC GAG AC**

## 2.8 DNA-Molekulargewichtsstandards

1kb DNA Leiter	Invitrogen Life Technologies/ Gibco BRL, Deutschland
100bp DNA Leiter Plus	New England BioLabs, Deutschland
$\lambda$ DNA/ <i>Hind</i> III Fragments	Invitrogen Life Technologies/ Gibco BRL, Deutschland
$\lambda$ DNA- <i>Bst</i> EII	New England BioLabs, Deutschland

## 2.9 Nukleinsäuren

MS2 RNA	Roche Diagnostics GmbH, Deutschland
---------	-------------------------------------

## 2.10 Reagenziensysteme (Kits)

CellTiter-Glo <sup>®</sup> Luminescent Cell Viability Assay	Promega GmbH, Deutschland
ECL <sup>™</sup> – System für verstärkte Chemilumineszenz	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Deutschland
1 <sup>st</sup> Strand cDNA Synthesis Kit for PCR (AMV)	Roche Diagnostics GmbH, Deutschland
Gel Extraction Kit	Qiagen GmbH, Deutschland
Jet Star 2.0	Genomed GmbH, Deutschland
LightCycler Fast Start DNA Master <sup>PLUS</sup> SYBR Green I	Roche Diagnostics GmbH, Deutschland

---

NucleoSpin Extract II	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Deutschland
PCR Purification Kit	Qiagen GmbH, Deutschland
Trifast™ peqGold	PeqLab Biotechnologie GmbH, Deutschland
RQ1 RNase-Free DNase	Promega GmbH, USA

## 2.11 Material für die Zellkultur

Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck Biosciences GmbH, Deutschland
Einfrierröhrchen 1,8ml	Nunc GmbH, Wiesbaden, Deutschland
Ficoll-Paque™ PLUS	Amersham Biosciences, Deutschland
Filter 0,8µm	Whatman GmbH, Deutschland
Filter 0,2µm; 0,4µm; 1,2µm	Sartorius AG, Deutschland
Fötales Kälberserum	Biochrom AG, Deutschland
L-Glutamin	Invitrogen Life Technologies/Gibco BRL, Deutschland
	PAA Laboratories GmbH, Österreich
Hygromycin B	VWR International GmbH, Deutschland
	Invitrogen Life Technologies/Gibco BRL, Deutschland
Lipofectamine	Invitrogen Life Technologies/Gibco BRL, Deutschland
Metafectene™	Biontex Laboratories GmbH, Deutschland
Optimem 1-Medium	Invitrogen Life Technologies/Gibco BRL, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen Life Technologies/Gibco BRL, Deutschland
	PAA Laboratories GmbH, Österreich
PKH26 Red Fluorescent Cell Linker Kit	Sigma-Aldrich GmbH, Deutschland
Plastikpipetten	BectonDickinson GmbH, Deutschland
	Greiner Bio-One GmbH, Deutschland
Plastikreagenzgefäße 15ml und 50ml	BectonDickinson GmbH, Deutschland
96-, 48-, 24-, 12- und 6-Loch-Platten	BectonDickinson GmbH, Deutschland

RPMI 1640-Medium	Invitrogen Life Technologies/Gibco BRL, Deutschland
Schafblut	PAA Laboratories GmbH, Österreich
Versen	Oxid GmbH, Deutschland
Zellkulturflaschen	Invitrogen Life Technologies/Gibco BRL, Deutschland
	Greiner Bio-One GmbH, Deutschland

## 2.12 Chemikalien, weitere Materialien und Laborgeräte

Acrylamid 30%	Roth Carl GmbH und Co., Deutschland
Agarose	Cambrex Bio Science Rockland, USA
Ammonium Persulfat	MP Biomedicals GmbH, Deutschland
Ampicillin	Sigma-Aldrich GmbH, Deutschland
Blocking Reagent	Roche Diagnostics GmbH, Deutschland
Bromphenolblau	Merck Biosciences GmbH, Deutschland
Cäsiumchlorid	MP Biomedicals GmbH, Deutschland
Chloramphenicol	Sigma-Aldrich GmbH, Deutschland
CSPD ready to use	Roche Diagnostics GmbH, Deutschland
DIG DNA labeling mix	Roche Diagnostics GmbH, Deutschland
Elektroporationsküvetten	Bio-Rad Laboratories, Deutschland
Ethidiumbromid	Merck Biosciences GmbH, Deutschland
FACSCalibur	Becton Dickinson GmbH, Deutschland
Full range Rainbow protein marker	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Deutschland
Gel-Blotting-Papier	Schleicher & Schüll, Deutschland
GeneAmp PCR System 9600	PerkinElmer LAS GmbH, Deutschland
Gene Pulser II	Bio-Rad Laboratories, Deutschland
Glycin	MP Biomedicals GmbH, Deutschland
Hybond N <sup>+</sup> -Nylonmembran	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Deutschland
IGEPAL	MP Biomedicals GmbH, Deutschland
Immobilion P	Millipore GmbH, Deutschland
Kanamycin	Sigma-Aldrich GmbH, Deutschland
Light-Cycler 2.0	Roche, Diagnostics GmbH, Deutschland

---

Metafectene™	Biontex Laboratories GmbH, Deutschland
Nukleotide (dNTP, NTP)	Roche Diagnostics GmbH, Deutschland
Orion Microplate Luminometer	Berthold Technologies GmbH & Co. KG, Deutschland
Prestained Protein Ladder	MBI Fermentas, Deutschland
Protease Inhibitor Cocktail	Roche Diagnostics GmbH, Deutschland
PVDF-Membran	Millipore GmbH, Deutschland
Rinderserumalbumin	New England BioLabs GmbH, Deutschland
RNasin	Promega GmbH, Deutschland
Röntgenfilme	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Deutschland
Roti®-Load1	Roth Carl GmbH und Co., Deutschland
Scintillationslösung	Merck Biosciences GmbH, Deutschland
Ultraschall-Desintegrator	Branson Ultraschall, Deutschland
Sonifier II W-250 D	
Uni-filter 96 GF/C	Packard Biosciences GmbH, Deutschland
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Deutschland
Tween 20®	MP Biomedicals GmbH, Deutschland

Alle hier nicht aufgeführten Chemikalien wurden von den Firmen Merck Biosciences GmbH oder Sigma-Aldrich GmbH bezogen.

## 3 METHODEN

### 3.1 Arbeiten mit Bakterien

#### 3.1.1 Vermehrung und Aufbewahrung von Bakterien

Die Vermehrung von Bakterien erfolgte aus einer Einzelkolonie. Zur Vereinzelnung wurden fraktionierte Ausstriche durchgeführt. Die Bakterien wurden auf LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum ausgestrichen (Ampicillin 50µg/ml; Chloramphenicol 25µg/ml und Kanamycin 30µg/ml) und anschließend in LB-Flüssigmedium mit den entsprechenden Mengen an Antibiotika vermehrt. Zur längerfristigen Aufbewahrung wurden 900µl dichte Bakteriensuspensionskultur mit 100µl DMSO gemischt und bei -80°C eingefroren.

**LB-Flüssigmedium:** 20mM MgSO<sub>4</sub>; 10mM KCl; 10g Trypton; 5g Yeast-Extrakt; 5g NaCl;  
ad 1l H<sub>2</sub>O

**LB-Agarplatten:** LB-Flüssigmedium mit 15g/l Bacto-Agar

#### 3.1.2 Herstellung kompetenter Bakterien

##### 3.1.2.1 chemisch kompetente Bakterien

Von einer Einzelkolonie des *E.coli* Stamms DH5α wurde eine 5ml Übernachtskultur hergestellt und damit anschließend 300ml LB-Flüssigmedium angeimpft. Die Kultur wurde ca. 3 Stunden lang bei 37°C geschüttelt, bis die Bakterien eine optische Dichte von 0,3 bei einer Wellenlänge von 600nm erreicht hatten. Diese Dichte entspricht der exponentiellen Wachstumsphase der Bakterienkultur und sollte deshalb nicht überschritten werden. Alle weiteren Schritte wurden auf Eis und mit gekühlten Gefäßen durchgeführt. Die Zellen wurden pelletiert, in 90ml kalter TFB1 Lösung resuspendiert und für 10min auf Eis gehalten. Das Bakterienpellet wurde erneut abzentrifugiert, in 12ml TFB2 Lösung resuspendiert, aliquotiert und bei -80°C eingefroren.

**TFB1 Lösung:** 30mM KAc; 50mM MnCl<sub>2</sub>; 100mM RbCl; 10mM CaCl<sub>2</sub>; 15% (v/v) Glycerin; mit 0,02N Essigsäure auf pH 5,8 eingestellt

**TFB2 Lösung:** 10mM MOPS/NaOH, pH 7,0; 75mM CaCl<sub>2</sub>; 10mM RbCl; 15% (v/v) Glycerin

### **3.1.2.2 elektrokompetente Bakterien**

Zur Herstellung elektrokompetenter DH10B/2089 Bakterien wurden 200ml LB-Medium, das 25µg/ml Chloramphenicol enthält, mit 2ml einer Übernachtskultur angeimpft. Die Bakterien wurden bei 180rpm und 37°C geschüttelt, bis sie eine OD<sub>600</sub> zwischen 0,3 und 0,5 erreichten. Danach wurden die Bakterien 15min auf Eis inkubiert und bei 9000g und 4°C für 10min zentrifugiert, um die Bakterien zu pelletieren. Bei den folgenden Schritten wurden ausschließlich gekühlte Gefäße und Pipetten verwendet. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in eiskaltem 10% Glycerin resuspendiert, und erneut bei 9000g und 4°C für 10min zentrifugiert. Dieser Waschschritt wurde zweimal wiederholt. Anschließend wurde der Überstand verworfen und die Bakterien in 900µl eiskaltem 10% Glycerin resuspendiert. 60µl Aliquots wurden in vorgekühlte 1,5ml Eppendorfgefäße überführt und bei -80°C gelagert.

Zur Herstellung elektrokompetenter DH10B/2089, die das Plasmid pKD46 enthalten, wurden 200ml LB-Medium, das 25µg/ml Chloramphenicol, 50µg/ml Ampicillin und 0,1% L-Arabinose enthält, zur Induktion des Rekombinaseplasmids mit 2ml Übernachtskultur angeimpft. Alle weiteren Schritte erfolgten wie oben beschrieben.

### **3.1.3 Transformation und Elektroporation von E. coli**

#### **3.1.3.1 Hitzeschocktransformation chemisch kompetenter Bakterien**

50-100µl kompetente Bakterien wurden auf Eis aufgetaut, mit 10-100ng Plasmid-DNA oder 10µl Ligationsansatz gemischt und 20min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen einem Hitzeschock von 42°C für 2min ausgesetzt, sofort mit 900µl LB-Medium versetzt und 1h bei 37°C geschüttelt. 50-300µl Bakteriensuspension wurden anschließend auf LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

#### **3.1.3.2 Elektroporation und homologe Rekombination in DH10B**

50µl elektrokompetente Bakterien (DH10B vortransformiert mit p2089 und pKD46) wurden auf Eis aufgetaut, mit 2µl DNA-Rekombinationsfragment gemischt und in eine vorgekühlte Küvette mit einem Elektrodenabstand von 2mm transferiert. Um die jeweils besten Bedingungen auszutesten, wurden die Bakterien sowohl mit 2kV, 200Ω und 25µF, als auch mit 2kV, 800Ω und 25µF elektroporiert und sofort mit 1ml LB-Medium gemischt. Nach 3h Inkubation bei 30°C, wurden die Bakterien auf LB-



---

Agarplatten mit 25µg/ml Chloramphenicol und 30µg/ml Kanamycin ausplattiert und bei 42°C über Nacht inkubiert.

## **3.2 Arbeiten mit Zellen**

### **3.2.1 Kultivierung von Suspensions- und adhärenenten Zellen**

Alle Zellen wurden unter Standardbedingungen bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Das Kulturmedium RPMI 1640 wurde mit 10% bzw. 20% fetalem Kälberserum (FKS), 2mM Glutamin und 100U/ml Penicillin/Streptomycin versetzt. Bei der Kultur von stabilen Maxi-EBV produzierenden HEK293-Zelllinien wurden 100µg/ml Hygromycin zur Aufrechterhaltung des episomalen Plasmids zugesetzt.

#### **3.2.1.1 Suspensionszelllinien**

Die Zelllinien DG75, 721 und Raji wurden in RPMI-Kulturmedium mit 10% FKS und den angegebenen Zusätzen vermehrt, während für die neu etablierten lymphoblastoiden Zelllinien RPMI Kulturmedium mit 20% FKS verwendet wurde.

Lymphoblastoide Zelllinien mit Tetrazyklin-induzierbarem EBNA-3C wurden zusätzlich mit 1µg/ml Tetrazyklin versetzt.

#### **3.2.1.2 Adhärenente Zelllinien**

Die Fibroblastenzelllinie WI38 wurde in RPMI-Kulturmedium mit 20% FKS und den angegebenen Zusätzen vermehrt und alle 3-4 Tage 1:2 verdünnt. Die Zelllinie HEK293 wurde in 10% RPMI Kulturmedium mit den angegebenen Zusätzen vermehrt und alle 2-4 Tage 1:3 bis 1:20 verdünnt. Zum Ablösen der adhärenenten Zellen wurde zunächst mit Trypsin gewaschen und danach Trypsin zugesetzt, so dass die Zellen gerade vollständig benetzt waren. Nach kurzer Inkubation wurden die Zellen in Kulturmedium aufgenommen und verdünnt.

### **3.2.2 Bestimmung der Zellzahl**

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte in einer Neubauer-Zählkammer. Um tote von lebenden Zellen unterscheiden zu können, wurden die Zellen 1:4 mit Trypanblau gemischt. Tote Zellen nehmen den Farbstoff auf und sind deshalb im Mikroskop durch Blaufärbung zu erkennen.

Die Berechnung der Zellkonzentration erfolgte anhand folgender Formel:

$$c_z = \mu_z \cdot v_z \cdot 10^4$$

$c_z$	Anzahl der Zellen/ml
$\mu_z$	Mittelwert der Zellzahl pro Großquadrat
$v_z$	Verdünnungsfaktor

### 3.2.3 Aufbewahrung von Zellen

Zellen können in Gegenwart von DMSO in flüssigem Stickstoff über längere Zeit gelagert werden. Zum Einfrieren wurden etwa  $10^7$  Zellen abzentrifugiert (300g, 10min, 20°C) und in 1,5ml Einfriermedium resuspendiert und in 1,8ml Gefäße (NUNC-Cryotube™) pipettiert. Um die Zellen schonend abzukühlen wurden sie entweder in mehrere Lagen Papierhandtücher gewickelt oder in ein Kühlmodul von Stratagene gestellt und bei -80°C tiefgefroren.

Um eingefrorene Zellen wieder in Kultur zu nehmen, wurden diese möglichst schnell aufgetaut, mit frischem Medium gewaschen, um DMSO-Reste zu entfernen, und schließlich in Kulturmedium mit 10% FKS aufgenommen.

**Einfriermedium:** RPMI-Medium mit 50% FKS, 10% DMSO

### 3.2.4 Transfektion von HEK293-Zellen und Selektion stabiler Zellklone in Gegenwart von Hygromycin

Die zu transfizierenden HEK293-Zellen wurden in 6-Loch-Platten bis zu einer 70%igen Konfluenz kultiviert. Die Transfektion wurde mit Lipofectamin™ in serumfreiem Medium (Optimem I) durchgeführt (6µl Lipofectamin™-Reagenz bzw. 4µl Polyethylenimin (PEI) pro 1µg transfizierter DNA). Alternativ wurde Metafectene™ (5µl Metafectene/µg DNA) in serumhaltigem, antibiotikafreiem Medium verwendet.

Für die Etablierung EBV-positiver stabiler Zelllinien wurden HEK293-Zellen in 6-Loch-Platten mit 1µg DNA des entsprechenden Maxi-EBV Plasmids transfiziert. Am nächsten Tag wurden die Zellen in Zellkulturschalen (Durchmesser 140mm) überführt und mit 100µg/ml Hygromycin versehen. In den ersten Tagen nach der Transfektion wurde das Kulturmedium täglich vorsichtig gewechselt, um die toten Zellen zu entfernen. Zwei bis drei Wochen später wurden auswachsende Zellklone, die sich bei

---

der Fluoreszenzmikroskopie als positiv für die GFP Expression erwiesen, vereinzelt und klonal expandiert.

### 3.2.5 Produktion infektiöser Viruspartikel und Titerquantifizierung

Stabile HEK293-Maxi-EBV-Zellklone, die lytisch induziert werden sollten, wurden in 6-Loch-Platten bis zu einer 50%igen Konfluenz kultiviert. Danach wurden diese mit den Expressionsplasmiden für BZLF1 (p509; 0,5µg/Loch) und BALF4 (p2670; 0,5µg/Loch) mit 6µl Lipofectamin bzw. 4µl PEI transfiziert, um den lytischen Zyklus zu induzieren. Nach 72h Kultivierung bei 37°C wurden die Überstände geerntet und filtriert, um Zelltrümmer abzutrennen (Porengröße 0,8µm bzw. 1,2µm). Die Quantifizierung verschiedener Virusüberstände erfolgte mit Hilfe der GFP-Expression infizierter Raji-Zellen.  $1,5 \times 10^5$  Raji-Zellen wurden mit unterschiedlichen Verdünnungen an Kulturüberständen für 4 Tage bei 37°C in 24-Loch-Platten inkubiert. Am Tag nach der Infektion wurde das Medium gewechselt. Vier Tage nach Infektion wurden die Zellen in PBS gewaschen und der Prozentsatz GFP-positiver Zellen im FACS bestimmt.

Alternativ wurden  $3 \times 10^5$  Raji-Zellen mit unterschiedlichen Volumina an Kulturüberständen (500µl, 250µl, 100µl) für 4 Tage bei 37°C in 24-Loch-Platten inkubiert. Das Medium wurde am Tag nach der Infektion gewechselt. Vier Tage nach Infektion wurden die Zellen in PBS gewaschen, in 1ml PBS aufgenommen und 10µl in eine Mikrotiterplatte plattiert. Die grünen Zellen wurden im Fluoreszenzmikroskop ausgezählt.

### 3.2.6 Konzentration von Virusüberständen

Um eine höhere Viruskonzentration zu erreichen, wurden die infektiösen Partikel in den Überständen durch 3 bis 4 h Ultrazentrifugation im Ausschwingrotor SW28 bei 17000rpm und 4°C aufkonzentriert. Die präzipitierten Viren wurden in einem zehntel Volumen Zellkulturmedium resuspendiert und über Nacht bei 4°C zur vollständigen Resuspendierung inkubiert.

### 3.2.7 Präparation primärer B-Zellen

Humane primäre B-Zellen wurden aus Routineentnahmen von Nasenpolypen (Adenoiden) kleiner Kinder (0,5 – 4 Jahre) präpariert. Dabei wurde aus den Adenoiden durch mechanisches Zerkleinern und Passage durch ein Metallsieb eine Einzelzellsuspension hergestellt. Die Isolierung der Lymphocyten erfolgte durch einen Ficoll-Gradienten. Dafür wurden 25ml Zellsuspension mit 20ml Ficoll-Paque™ PLUS unterschichtet und es erfolgte eine Zentrifugation für 40min bei 660g, RT ohne Bremse. Danach wurde die Interphase des Gradienten abgenommen, mit PBS/Versen (1:5000) auf 40-50ml aufgefüllt und dreimal gewaschen (660g, 530g, 400g jeweils 10min). Anschließend wurden die Zellen gezählt und auf  $1 \times 10^7$ /ml mit PBS eingestellt.

Zur Entfernung der T-Lymphocyten wurden die Zellen mit Schaferythrocyten rosettiert. Diese Rosettierung entsteht durch die Bindung der Schaferythrocyten an das CD2 Molekül auf den humanen T-Zellen. Da die Dichte der Rosetten der Dichte der Erythrocyten entspricht, gelangen die T-Zellen bei der Zentrifugation ins Pellet und werden somit von den B-Zellen getrennt. Zur Vorbereitung der Schaferythrocyten wurde Schafsblut abzentrifugiert und zweimal mit PBS/Versen bei 900g für 10-15min gewaschen. Je 20 Volumenanteile der Lymphocytensuspension wurden dann mit 1 Volumenanteil Schaferythrocytenpellet gemischt. Die Zentrifugation zur Rosettierung erfolgte in zwei Schritten, 15min bei 50g und 30min bei 660g jeweils ohne Bremse. Dann wird wiederum die Interphase abgenommen, mit PBS/Versen auf 40-50ml aufgefüllt und dreimal gewaschen (660g, 530g, 400g für jeweils 10min). Alternativ wurden Zellen aus Nabelschnurblut isoliert, wobei das Blut mit Ficoll unterschichtet wurde und eine Zentrifugation für 40min bei 660g ohne Bremse erfolgte. Danach wurde die Interphase abgenommen, mit 40-50ml PBS/Versen aufgefüllt und dreimal gewaschen (660g, 530g und 400g für je 10min).

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

Primäre humane B-Lymphocyten aus Adenoiden wurden in Gruppen zu je 48 Mikrokulturen ausgesät und mit einer Verdünnungsreihe angeglicherer Virusüberstände infiziert. Die Infektion erfolgte in 96-Loch-Platten.  $1 \times 10^5$  B-Zellen wurden in einem Volumen von 100 $\mu$ l pro Loch auf WI38-Zellen als Nährschicht ausplattiert. Einmal

---

wöchentlich wurde ein Teil des Kulturmediums durch frisches ersetzt. Zur Bestimmung der Immortalisierungseffizienz wurde nach 6 Wochen die Anzahl der Mikrokulturen mit proliferierenden B-Lymphocyten bestimmt und einzelne Klone weiter expandiert. Zur Auswertung dieser Grenzverdünnungsanalyse wurden nur Verdünnungsstufen miteinbezogen, die die statistische Voraussetzung einer „one hit“ Kinetik erfüllen, d.h. im linearen Bereich lagen. Das ist dann der Fall, wenn bei einer Verdünnungsstufe höchstens 63% (also 30 von 48 Löchern einer halben 96-Loch-Platte) proliferierende Zellen enthalten. Die bewachsenen Löcher jeder Verdünnungsstufe in einem Experiment werden als Kurve in einem Koordinatensystem aufgetragen. Die Immortalisierungseffizienz eines jeden einzelnen Experiments wird durch Fällen des Schnittpunktes der Kurve mit der 63% Linie auf die X-Achse ermittelt.

### 3.2.9 Thymidineinbau zur Messung der zellulären DNA-Replikation

Um die zelluläre DNA Replikation von B-Zellen, die mit verschiedenen Virusmutanten infiziert worden sind, zu messen, wurde die [<sup>3</sup>H]-Thymidineinbaurrate zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion bestimmt. Dazu wurden B-Zellen aus Adenoiden isoliert und in 96 Loch-Platten im Volumen von 100µl pro Kultur ausplattiert. Diese B-Zellen wurden dann mit verschiedenen Virusüberständen infiziert und über verschiedene Zeiträume kultiviert. Die Thymidineinbaurrate wurde nach Zugabe von 0,5µCi [<sup>3</sup>H]-Thymidin pro 100µl Kultur für 4 Stunden und anschließender Zellernte bestimmt.

Dafür wurden nach Ende der Inkubationszeit die [<sup>3</sup>H]-Thymidin-markierten B-Lymphocyten in den 96-Loch-Platten mit Hilfe eines FilterMate<sup>TM</sup> Cell Harvester auf speziell entwickelte UniFilter-Platten transferiert. Die Aufnahme des Thymidins wurde als emittierte β-Strahlung im Liquid-Scintillationsverfahren mit Hilfe eines Packard Topcounters quantifiziert. Als Maß für die Proliferation wurden Zerfälle pro Minute (counts per minute = cpm) angegeben, welche mit der Menge des eingebauten Thymidins korrelieren.

### 3.2.10 Bestimmung der Viabilität von Zellen

Um die Viabilität von LCLs zu bestimmen, wurde der „CellTiter-Glo<sup>®</sup> Luminescent cell viability assay“ verwendet, wobei intrazelluläres ATP, welches ein Zeichen für metabolisch aktive Zellen ist, quantifiziert wird. Die Menge an ATP ist direkt proportional zur Anzahl der lebenden Zellen. Die Durchführung erfolgte nach

---

Angaben des Herstellers. Dabei werden  $2 \times 10^4$  Zellen/Loch bzw.  $1 \times 10^4$  Zellen/Loch in eine 96-Loch-Platte ausplattiert und an den Tagen 0 bis 7 geerntet. Die Messung der Menge an ATP erfolgte jeweils in Triplikaten im Luminometer.

### **3.2.11 Bestimmung der Zellteilungsrate von Zellen**

Zur Bestimmung der Zellteilungsrate von LCLs wurde der „PKH26 fluorescent cell linker“ Kit benutzt. Dabei wird die Membran der Zellen mit einem roten Fluoreszenzfarbstoff gefärbt, wobei sich nach jeder Zellteilung die Anzahl der Farbmoleküle gleichmäßig auf die beiden Tochterzellen verteilt. Es wurden  $2 \times 10^5$  Zellen/ml bzw.  $1 \times 10^5$  Zellen/ml gefärbt und die Auswertung erfolgte in Triplikaten im FACS für die Tage 0 bis 7. Die Färbung der Zellen erfolgte nach Angaben des Herstellers.

### **3.2.12 Nukleofektion von B-Zellen mit anschließender Infektion durch Maxi-EBVs**

Zur Generierung von Tetrazyklin-induzierbaren EBNA-3C LCLs, wurde zunächst ein Vektor mit Tetrazyklin-induzierbarem EBNA-3C in frisch isolierte primäre B-Zellen transfiziert. Dafür wurde die Nukleofektor Technologie von „amaxes biosystems“ verwendet, die speziell für primäre Zellen und Zellen, die schwer zu transfizieren sind, entwickelt wurde. Die DNA tritt direkt in den Zellkern ein, so dass sehr hohe Transfektionseffizienzen erreicht werden. Für jeden primären Zelltyp wurde eine spezielle Nukleofektorlösung entwickelt, leider macht der Hersteller keine Angaben zur Zusammensetzung dieser Lösung. In dieser Arbeit wurde der „Human B Cell Nucleofector™ Kit“ verwendet.  $5 \times 10^6$  Zellen wurden mit  $5 \mu\text{g}$  DNA gemischt, und nach Angaben des Herstellers, mit dem optimierten Nukleofektorprogramm U-15 transfiziert. Auch über die Transfektionsbedingungen macht der Hersteller keine Angaben. Nach Beendigung des Programms wurden die Zellen sofort aus der Küvette entfernt, in Medium aufgenommen, mit  $1 \mu\text{g/ml}$  Tetrazyklin versehen und in eine 96-Loch-Platte ausgesät. Die Infektion erfolgte unmittelbar danach, mit  $50 \mu\text{l}$  Virusüberstand pro Loch. Nach ca. 6 Wochen konnten auswachsende Klone weiter expandiert werden.

### 3.3 Arbeiten mit Nukleinsäuren

#### 3.3.1 Isolierung von Nukleinsäuren

##### 3.3.1.1 Isolierung genomischer DNA eukaryontischer Zellen nach der Aussalzmethode

0.5 bis  $1 \times 10^7$  Zellen wurden direkt aus der Kultur oder aus tiefgefrorenen Zellsedimenten in 3ml Kernlysepuffer resuspendiert, durch Zugabe von 100 $\mu$ l 20% SDS lysiert und anschließend bei 37°C mit 150 $\mu$ l Proteinase K (4mg/ml) und 30 $\mu$ l RNase A (2mg/ml) über Nacht verdaut. Nach Zugabe von 1ml 5M NaCl wurde kräftig gemischt, 30min auf Eis inkubiert und schließlich bei 1700g für 15min zentrifugiert. Der Überstand wurde einer zweiten Zentrifugation unterzogen und die DNA dann mit 0,6 Vol. Isopropanol gefällt. Danach wurde die DNA bei 1700g für 15min abzentrifugiert und das Pellet zweimal mit 70%igem Ethanol gewaschen. Nachdem die DNA kurz luftgetrocknet wurde, wurde sie in ca. 100 $\mu$ l TE gelöst.

**Kernlysepuffer:** 10mM Tris/HCl, pH 8,0; 400mM NaCl; 10mM EDTA

**TE:** 10mM Tris; pH 8,0; 1mM EDTA

##### 3.3.1.2 Präparation von Plasmid-DNA

Zur schnellen Beurteilung der von den Bakterien aufgenommenen Plasmid-DNA wurde eine Plasmidschnellaufarbeitung durchgeführt. Zunächst wurden aus Einzelkolonien 5ml Übernachtskulturen hergestellt. Davon wurden 1,5ml abzentrifugiert und das Zellpellet in 100 $\mu$ l Lösung 1 resuspendiert. Anschließend erfolgte eine alkalische Lyse durch Zugabe von 100 $\mu$ l Lösung 2 für maximal 5 Minuten, worauf die Neutralisierung mit 100 $\mu$ l Lösung 3 folgte. Die Lysate wurden danach abzentrifugiert (20min, 4°C, ca. 21000g). Der Überstand wurde abgenommen und zur Fällung der DNA mit 2,5Vol absolutem Ethanol vermischt und erneut zentrifugiert (30min, 4°C, ca. 21000g). Die so erhaltenen Pellets wurden kurz getrocknet und in 30-50 $\mu$ l H<sub>2</sub>O gelöst. 1 $\mu$ l dieser Aufarbeitung wurde durch Restriktionsenzyme gespalten und anschließend das Spaltnmuster des Restriktionsverdaus nach Agarosegelelektrophorese analysiert.

Von ausgewählten Bakterienklonen wurde anschließend eine präparative Plasmidaufarbeitung aus 300ml Kultur durchgeführt. Dazu wurden nach alkalischer Lyse, die bereits oben beschrieben wurde, Anionen-Austauscher-Säulen (Jetstar) verwendet. Die Präparation erfolgte nach Angaben des Herstellers.

**Lösung 1:** 10mM EDTA

**Lösung 2:** 1% SDS, 0,2M NaOH

**Lösung 3:** 5M KAc

### 3.3.1.3 Isolierung und Reinigung rekombinanter EBV DNA aus Bakterien

#### 3.3.1.3.1 Schnellaufarbeitung

Zur schnellen Beurteilung von Rekombinanten wurde von einigen Klonen eine DNA-Schnellaufarbeitung durchgeführt. Dafür wurden die Klone auf jeweils 1/4 bis 1/3 Agarplatte, die 30µg/ml des entsprechenden Antibiotikums enthält, ausgestrichen. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Bakterien von der Platte in 200µl TE resuspendiert und eine alkalische Lyse durchgeführt. Die Bakteriensuspension wurde durch sehr kräftiges Schütteln mit 200µl 1% SDS/0,2N NaOH gemischt und 5min auf Eis inkubiert. Danach erfolgte die Neutralisation mit 200µl 3M KAc und eine Zentrifugation für 10min bei 4°C und 20000g. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß transferiert und zur DNA-Präzipitation mit 400µl Isopropanol versehen. Es folgte eine erneute Zentrifugation für 10min bei 4°C und 20000g. Das Pellet wurde einmal mit 70%igem EtOH gewaschen und für 5-10min bei RT und 20000g zentrifugiert. Nach Entfernen des Alkohols wurde das Pellet kurz getrocknet und in 20µl TE gelöst. Für einen Testverdau wurden je 10µl der DNA mit *Bam*HI und *Bg*II geschnitten.

**TE:** 10mM Tris/HCl; pH 8,0; 1mM EDTA

#### 3.3.1.3.2 Großaufarbeitung

Einzelne Kolonien mit Maxi-EBV transformierten Bakterien wurden zur Animpfung von 200ml LB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika benutzt, das über Nacht bei 37°C geschüttelt wurde. Am nächsten Tag wurden 3x1l LB-Medium versehen mit Chloramphenicol mit 50ml Vorkultur angeimpft und mit 60ml 5M NaCl pro Liter versehen. Die Bakterien wuchsen über Nacht bei 37°C.

Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 3000g für 30-40min bei 4°C geerntet und das Pellet in 80ml Lösung I resuspendiert. Danach wurden zur alkalischen Lyse 80ml Lösung II zugefügt, vorsichtig durch Schwenken gemischt und 5min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 40ml Lösung III zugefügt und durch Schwenken gemischt. Nach einer 30minütigen Inkubation bei RT mit 500µg RNase pro Ansatz erfolgte eine Zentrifugation bei 11800g für 30min bei RT. Der Überstand wurde über eine Mull-



binde filtriert und mit 200ml Isopropanol gemischt. Nach einer Inkubation von 30min bei RT wurde die DNA durch Zentrifugation bei 11800g für 30min bei RT pelletiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet 10min luftgetrocknet und schließlich in 10ml 5xTE gelöst. Proteinase K wurde in einer Endkonzentration von 25µg/ml zugegeben und über Nacht bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 20g CsCl pro 10ml DNA-Lösung wurde diese in 35ml Ultrazentrifugationsgefäße transferiert. Die Gefäße wurden mit 1,564g/ml CsCl Lösung austariert und mit 400µl Ethidiumbromidlösung (10mg/ml Stocklösung) pro Gefäß versehen. Ein Cäsiumchloridgradient wurde durch Zentrifugation bei 35000rpm im TFT70.38 Rotor bei 20°C für 3 Tage erzeugt. Die DNA-Banden wurden unter UV-Licht (365nm) sichtbar gemacht und die jeweils unteren Banden, die der „supercoiled“ Plasmid-DNA entsprechen, mit einer Einmalkanüle (2,1x38mm, BOVI-VET) abgezogen und das restliche Ethidiumbromid durch Ausschütteln mit Isobutanol extrahiert. Nach Auffüllen auf 5ml mit TE-Puffer und DNA-Präzipitation mit 5ml Isopropanol wurde die EBV-Plasmid-DNA in TE-Puffer gelöst.

**Lösung I:** TE 10mM Tris/HCl; pH 8,0; 1mM EDTA

**Lösung II:** 0,2M NaOH/0,5% SDS

**Lösung III:** 5M Na-Acetat

**5xTE:** 50mM Tris, 5mM EDTA pH 8,5

#### **3.3.1.4 Isolierung von RNA aus eukaryontischen Zellen**

5-10 x 10<sup>6</sup> Zellen wurden in 1ml peqGOLD TriFast<sup>TM</sup> resuspendiert und für 5min bei RT inkubiert. Es folgte die Zugabe von 200µl Chloroform und das Mischen durch kräftiges Schütteln. Zur Trennung der Probe in drei Phasen erfolgte eine Zentrifugation für 5min bei 12000g. Die RNA ist ausschließlich in der oberen farblosen wässrigen Phase angereichert. Diese Phase wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt und zur Präzipitation der RNA mit 500µl Isopropanol gemischt und 5-15min bei RT inkubiert. Im Anschluss erfolgt eine Zentrifugation für 10min bei 12000g und 4°C. Nach zweimaligem Waschen des Pellets mit 1ml 70%igem Ethanol, wird das Pellet kurz an der Luft getrocknet und in 30-50µl RNase freiem Wasser gelöst. Durch Erhitzen der RNA auf 56°C wird die Löslichkeit der RNA verbessert.

### 3.3.2 Enzymatische Reaktionen mit Nukleinsäuren

#### 3.3.2.1 Restriktionsverdau von DNA

Die sequenzspezifische Spaltung von doppelsträngiger DNA durch Restriktionsendonukleasen wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Für Probespaltungen wurden üblicherweise 300ng bis 1µg DNA für 1-2 Stunden inkubiert, präparative Spaltungen erfolgten dagegen über Nacht mit 10µg DNA.

#### 3.3.2.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Das Prinzip der PCR ist die enzymatische Amplifizierung eines DNA-Abschnitts zwischen zwei gegenläufig an die komplementären Stränge gebundenen Oligonukleotid-Primern. Zunächst werden die Oligonukleotid-Primer im Überschuss unter Hybridisierungsbedingungen zu einer DNA-Präparation gegeben. Danach synthetisiert die DNA-Polymerase den komplementären Strang, indem sie Nukleotide an die 3'-OH Enden der Primer heftet. Dieses DNA-Synthese-Produkt wird anschließend denaturiert und es erfolgt ein neuer Zyklus mit Hybridisierung der Oligonukleotide und anschließender DNA-Strang-Synthese. Der Zyklus aus Denaturierung, Hybridisierung und DNA-Synthese wird 20 bis 50mal wiederholt.

Standard-PCR-Reaktion:

1x	Anfangsdenaturierung	95°C	5min
25-40x	Denaturierung	95°C	30sec
	„Annealing“	Spez. Temp.	30sec
	Extension	72°C	60sec pro 1000bp
1x	Schlußextension	72°C	10min

Als „Annealing“-Temperatur wurde die von Metabion vorgeschlagene Temperatur verwendet, die nach folgender Formel berechnet wurde:

$$T_m = (wA + xT) \cdot 2 + (yG + zC) \cdot 4 - 16,6 \cdot \log_{10}(0,050) + 16,6 \cdot \log_{10}([Na^+])$$

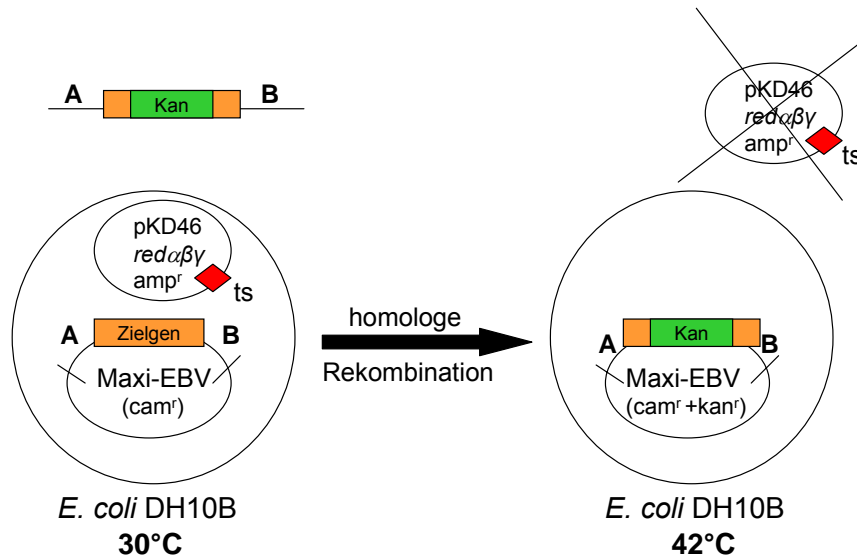
### 3.3.2.3 Herstellung von Digoxigenin-markierten Sonden mittels PCR

Für die Herstellung von Digoxigenin-markierten Sonden wurden im üblichen PCR-Ansatz die normalen dNTP durch die PCR-Dig-dNTP-Mischung [ 2mM dATP, dCTP, dGTP, 1,3mM dTTP, 0,7mM Dig11-dUTP (Digoxigenin-11-2`-deoxy-5`-triphosphat, Alkali-labil) ersetzt.

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

Zur Herstellung von EBV-Mutanten wurden genomische Fragmente des EBV entsprechend verändert und dann durch homologe Rekombination in das Maxi-EBV eingeführt. Substrat für die homologe Rekombination waren lineare DNA-Fragmente, die durch Elektroporation in den rekombinationsinkompetenten recA-negativen DH10B Bakterienstamm eingeführt wurden. Dieser Stamm hat den Vorteil, dass das EBV Genom genetisch stabil ist, da das Rekombinationsprotein recA nicht exprimiert wird. Der Nachteil dieses Stammes ist allerdings, dass er die rec BCD Gene exprimiert, die die Exonuklease V als trimären Komplex bilden und lineare DNA-Fragmente degradieren. Deswegen wurden mit p2089 vortransformierte DH10B mit p2650 oder pkD46 transformiert. Das Plasmid p2650 trägt einen temperatursensitiven Replikationsursprung und kodiert für die Rekombinase RecA und den Exonukleaseinhibitor Red $\gamma$ . Das Plasmid pkD46 ist ein temperatursensitives Rekombinationsplasmid mit Red $\alpha$ , Red $\beta$ , Red $\gamma$ . Der ExonukleaseV-Inhibitor Red $\gamma$  verhindert die Degradation der transfizierten linearen DNA. RecA bzw. red $\alpha$  und red $\beta$  vermitteln die effiziente Rekombination im recA defizienten *E. coli* Stamm DH10B. Außerdem enthalten die Vektoren noch das Ampicillin-Resistenzgen und einen temperatursensitiven Replikationsursprung. Die homologe Rekombination von linearer DNA und Maxi-EBV wurde bei der permissiven Temperatur von 30°C und dreistündiger phänotypischer Expression von RecA und Red $\gamma$  (bei p2650) bzw. Red $\alpha$ , Red $\beta$ , Red $\gamma$  (bei pkD46) durchgeführt. Nach Temperaturerhöhung auf 42°C, sowie Selektion auf Chloramphenicol (Resistenz des Maxi-EBV Plasmids) und die, durch das lineare Fragment eingebrachte, neue Resistenz (Kanamycin), wachsen nur noch Kolonien aus, die beide Resistenzgene tragen und das lineare Fragment über die homologen Bereiche in das Maxi-EBV 2089 integriert haben. Außerdem gehen bei einer Temperatur von 42°C die temperatursensitiven Plasmide p2650 bzw. pkD46

verloren. Dieser Verlust kann leicht durch Replikplattierung auf Ampicillin-LB-Agarplatten bestätigt werden. Abbildung 3 zeigt dieses Vorgehen schematisch.



**Abb. 3: Mutagenese des Maxi-EBV Genoms in *E. coli* DH10B durch homologe Rekombination**

Schematische Darstellung der homologen Rekombination mit Hilfe des *redαβγ*-Systems. Das Plasmid pKD46 trägt ein Ampicillin-Resistenzgen (*amp<sup>r</sup>*), einen temperatursensitiven Replikationsursprung (*ts*) und die Gene für *redαβγ* des Bakteriophagen  $\lambda$ . Das Maxi-EBV Plasmid in DH10B enthält ein Chloramphenicol-Resistenzgen (*cam<sup>r</sup>*) und das Wildtyp-Allel des zu mutierenden Zielgens. Ein lineares Fragment mit dem mutierten Gen, flankiert von den homologen Sequenzen A und B wird in den *E. coli* Stamm DH10B transformiert, wo die homologe Rekombination durch die Enzyme Red $\alpha$  und Red $\beta$  katalysiert wird. Die Degradation des linearen Fragments wird durch die Expression des Exonukleaseinhibitors Red $\gamma$  verhindert. Nach 2-3h Kultur bei 30°C ist der Rekombinationsschritt abgeschlossen. In der anschließenden Inkubation über Nacht bei 42°C in Anwesenheit von Chloramphenicol und Kanamycin wachsen nur die Bakterien, in denen die homologe Rekombination zwischen linearem Fragment und Maxi-EBV stattgefunden hat. Das temperatursensitive Rekombinationsplasmid pKD46 geht bei 42°C verloren.

### 3.3.3 Southern-Blot-Analyse

10 $\mu$ g genomische DNA wurden mit Restriktionsenzymen verdaut und auf einem 0,7% Agarosegel in 1x TBE bei 40V über Nacht aufgetrennt. Im Anschluss an die Elektrophorese wurde das Gel für den Transfer auf eine positiv geladene Nylonmembran vorbereitet. Dafür wurde die DNA bei Fragmenten >5kb 10-20min depuriert. Danach wurde das Gel 30-60min denaturiert und 30-60min neutralisiert.

Der Transfer auf die Membran erfolgte mittels Kapillarblot über Nacht in 20xSSC. Anschließend wurde die Membran in 2xSSC gewaschen und 1-2h bei 80°C gebacken.

**10xTBE:** 890mM Tris; 890mM Borsäure; 0,02M Na<sub>2</sub>EDTA x 2H<sub>2</sub>O

**Depurinierungslösung:** 0,25N HCl

**Denaturierungspuffer:** 1,5M NaCl; 0,5N NaOH

**Neutralisierungspuffer:** 0,5M Tris/HCl pH 7,2; 3M NaCl: pH mit HCl auf 7,2 eingestellt

**20xSSC:** 3M NaCl; 300mM Na<sub>3</sub>-Citrat x 2H<sub>2</sub>O; pH mit NaOH auf 7,0 eingestellt

### 3.3.4 Northern-Blot-Analyse

Die RNA wurde in 1,2%igen Agarosegelen aufgetrennt, die 1x MOPS und 2,2 M Formaldehyd zur Denaturierung der RNA enthielten. Als Laufpuffer wurde 1x MOPS verwendet. Auf Eis wurden 5µg RNA mit 2µl 5x MOPS, 3,5µl Formaldehyd und 10µl deionisiertem Formamid gemischt, 15min bei 56°C zur Auflösung von Sekundärstrukturen denaturiert, anschließend sofort 5min auf Eis gekühlt, mit 1µl Auftragspuffer versetzt und aufgetragen.

Nach dem Gellauf wurde das Gel 10min mit 20xSSC gewaschen. Der Transfer auf eine positiv geladene Nylonmembran (Hybond N<sup>+</sup>, Amersham) erfolgte mittels Kapillarblot mit 20xSSC über Nacht. Nach dem Transfer wurde die Membran in 2x SSC geschwenkt, luftgetrocknet und 2h zur Fixierung der RNA bei 80°C gebacken.

Die Northern-Blot-Analysen wurden von Frau Dr. Sabine Maier durchgeführt.

**Laufpuffer:** 1x MOPS (40mM MOPS, 10mM Na-Acetat, 1mM EDTA)

**Auftragspuffer:** 50% Ficoll, 1mM EDTA, pH 8, 0,4% Bromphenolblau

**20xSSC:** 3M NaCl, 0,3M Na<sub>3</sub>-Citrat, pH 7,0)

### 3.3.5 Hybridisierung von Southern-Blot- und Northern-Blot-Analysen mit Digoxigenin-markierten Sonden und Detektion

Die gebackene Membran wurde kurz mit 2x SSC angefeuchtet, mit 68°C heißer Prähybridisierungslösung in eine Folie eingeschweißt und für eine Stunde im Wasserbad bei 68°C äquilibriert. Danach wurde die Prähybridisierungslösung durch die Hybridisierungslösung (pro 100cm<sup>2</sup> Membran 10ml Prähybridisierungslösung mit 2,5ng/ml denaturierter Sonde für Southern-Blots, 10ng/ml denaturierte Sonde für Northern-Blots) ersetzt und bei 68°C im Wasserbad über Nacht inkubiert. Nach 3x 20-minütigem stringentem Waschen mit Hybridisierungswaschlösung bei 65°C zum Entfernen überschüssiger Sonde und 5minütigem Schwenken in Waschpuffer, erfolgte die Blockierung unspezifischer Bindung durch Schwenken in Blockpuffer bei RT für 1h. Anschließend wurde die Membran für 30min in Konjugatpuffer inkubiert, 4x10min in Waschpuffer geschwenkt, 5min in Substratpuffer äquilibriert und dann für 5min mit Substratlösung CSPD bedeckt. Danach wurde die Membran in Folie eingeschweißt und ein Röntgenfilm aufgelegt.

**Prähybridisierungsmix:** 0,25M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 7,2; 1mM EDTA; 20%SDS; 0,5% Blocking-Reagens

**Hybridisierungswaschlösung:** 20mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1mM EDTA; 1%SDS

**10x Blocking:** 0,1M Maleinsäure pH 8,0; 0,15M NaCl

**Waschpuffer:** 0,1M Maleinsäure; 3M NaCl; 0,3% Tween 20

**Blockpuffer:** 0,5% Blocking in Waschpuffer

**Konjugatpuffer:** Blockpuffer;  $\alpha$ -DIG-AP conjugate (1:15000)

**Substratpuffer:** 0,1M Tris-HCl; 0,1M NaCl

### 3.3.6 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Präparation einzelner DNA-Fragmente wurden 10 $\mu$ g Plasmid-DNA in einem Ansatzvolumen von 80 $\mu$ l gespalten und in mehrere Taschen eines ethidiumbromidhaltigen Agarosegels aufgetragen. Nach Auftrennung wurden die Fragmente zum Schutz der DNA bei langwelligem UV-Licht (360nm) sichtbar gemacht. Die Fragmente wurden so knapp wie möglich aus dem Gel ausgeschnitten und mit dem Qiaex-Kit (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers gereinigt.

### 3.3.7 DNase-Verdau von RNA

Um eventuelle Kontaminationen der RNA mit genomischer DNA zu entfernen, wurde die RNA mit 1 U RQ1 RNase-Free DNase (Promega) pro 10 $\mu$ g RNA behandelt. Außerdem wurden 2 U RNAsin pro  $\mu$ l Reaktionsvolumen zugesetzt. Des Weiteren erfolgte der DNase-Verdau gemäß dem Herstellerprotokoll. Anschließend wurde erneut die Konzentration der RNA spektrometrisch bestimmt.

### 3.3.8 Reverse Transkription

Die Reverse Transkription von 1 $\mu$ g Gesamt-RNA erfolgte mit dem 1<sup>st</sup> Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV) von Roche Diagnostics GmbH gemäß des Herstellerprotokolls unter Benutzung der Zufalls-p(dN)<sub>6</sub>-Primer. Als Negativkontrolle wurde parallel ein Ansatz hergestellt, in dem die Reverse Transkriptase durch Wasser ersetzt wurde (mock). Jeweils 1/20 des Reaktionsvolumens der Reversen Transkription wurde für die Real-Time PCR eingesetzt.

### 3.3.9 Real-Time PCR

#### 3.3.9.1 Prinzip der Real-Time PCR

Die Real-Time PCR ist ein hochsensitives und sehr selektives Verfahren zur Quantifizierung von RNA, im Gegensatz zur konventionellen PCR, die nur semiquantitative Ergebnisse liefert.

### 3.3.9.1.1 Unterschied zur konventionellen PCR

Eine PCR-Reaktion gliedert sich in drei Phasen:

#### Exponentielle Phase

Zu Beginn der Reaktion sind ausreichend Reagenzien vorhanden. Die Amplifikation erfolgt mit einer Verdopplung pro Zyklus, 100% Reaktionseffizienz vorausgesetzt. Die Reaktionskinetik ist in jeder Probe gleich.

#### Lineare Phase

Da weniger Reagenzien zur Verfügung stehen, verlangsamt sich die Reaktion auf weniger als eine Verdopplung pro Zyklus und die Reaktionsprodukte beginnen zu degradieren. Die Reaktionskinetik kann dabei in den einzelnen Proben leicht unterschiedlich sein.

#### Plateau-Phase

Die Reagenzien sind vollständig verbraucht. Es findet keine Amplifikation mehr statt.

Bei der konventionellen PCR kann nur das Endprodukt der Reaktion betrachtet werden. Dessen Menge liefert jedoch nur eine ungenaue Aussage über die Menge an Template zu Beginn der Reaktion. Die Real-Time PCR dagegen ermöglicht die Aufzeichnung der Amplifikation „in Echtzeit“ während der gesamten Reaktion, also auch bereits während der exponentiellen Phase, in der die Menge des Amplifikats noch repräsentativ ist für die Menge an Template, das in die Reaktion eingesetzt wurde.

### 3.3.9.1.2 SYBR Green

Die Beobachtung der Amplifikationsreaktion wird durch Zugabe eines Fluoreszenzfarbstoffs ermöglicht. SYBR Green bindet sequenzunspezifisch in die kleine Furche doppelsträngiger DNA und kann mit blauem Licht ( $\lambda = 530\text{nm}$ ) zur Fluoreszenz angeregt werden. Freies SYBR Green fluoresziert dagegen kaum. Zu Beginn der Reaktion liegen Primer und Template-DNA denaturiert und der Farbstoff in Lösung vor, wodurch ein schwaches Hintergrund-Fluoreszenzsignal entsteht. Durch die Amplifikation entstehen mehr und mehr doppelsträngige DNA-Fragmente, an die SYBR Green binden kann. Die Fluoreszenz-Emission wird nach jedem Zyklus am Ende der Elongationsphase gemessen und steigt mit wachsender Zahl der Amplifikate an.

### 3.3.9.2 Quantifizierung

#### 3.3.9.2.1 Kreuzungspunkt

Für die Quantifizierung der PCR-Produkte wird ermittelt, nach wie vielen Zyklen das Fluoreszenzsignal aus dem Hintergrund tritt, denn je mehr Template in einer Probe enthalten ist, desto früher ist dies der Fall. Die Fluoreszenz wird graphisch dargestellt, wobei die Zyklenzahl auf der Abszisse und die Fluoreszenzintensität auf der Ordinate aufgetragen wird. Es wird eine zur x-Achse parallel liegende so genannte „Kreuzungslinie“ von der log-linearen Region jeder Kurve definiert, die signifikant über der Hintergrund-Fluoreszenz liegt. Die Kreuzungslinie ist für alle Proben, die in einem Lauf analysiert werden, gleich. Der Punkt, an dem die Kreuzungslinie die jeweilige Fluoreszenzkurve schneidet, ist der so genannte „Kreuzungspunkt“ ( $C_p$ ), anhand dessen die Konzentration des PCR-Produktes berechnet wird. Er wird von der Software nach der „*Second Derivative Maximum*“ – Methode ermittelt, die das Maximum der zweiten Ableitung einer Kurve bestimmt, an dem sich die Probenfluoreszenz am deutlichsten von der Hintergrundfluoreszenz absetzt.

#### 3.3.9.2.2 Kalibrator - Fixpunkt für die relative Quantifizierung verschiedener cDNA-Proben

Bei der relativen Quantifizierung wird die Menge an Template nicht absolut ermittelt sondern im Verhältnis zu einer Standardprobe, die als Kalibrator bezeichnet wird. Der Kalibrator wurde bei jedem Lauf im Duplikat mit amplifiziert. Die Software gibt die Menge an Template in jeder Probe im Verhältnis zur Menge des Kalibrators an. Ein Konzentrationsverhältnis von 1,4 bedeutet also, dass die Probe 1,4-mal so viel Template enthält wie der Kalibrator. Als Kalibrator diente eine der Proben aus der Verdünnungsreihe zur Herstellung der Standardkurve (siehe Kap. 3.3.9.2.4). Da die untersuchten Zielgene im nicht induzierten Zustand relativ schwach exprimiert werden, wurden die Werte der Zielgene mit dem Faktor  $10^6$  multipliziert, um besser handhabbare Zahlen zu erhalten.

#### 3.3.9.2.3 Normalisierung

Leichte Unterschiede in der Menge der eingesetzten Gesamt-cDNA, bedingt durch unterschiedliche Effizienz der cDNA-Synthese wurden durch Normalisierung korrigiert. Hierfür eignet sich prinzipiell jedes Gen, das unter den Versuchsbedingungen nicht reguliert ist. Im Idealfall hat das Referenzgen ein ähnliches Ex-



pressionsniveau wie die zu analysierenden Gene. Verwendet wurde hier die 18S rRNA, da in den verwendeten Zelllinien unter den Versuchsbedingungen auch typische Haushaltsgene wie GAPDH reguliert werden und somit nicht geeignet sind. Außerdem beruht die Messung der RNA-Konzentration im Photometer hauptsächlich auf der Messung von rRNA, und auf diese Weise wurde bestimmt, wie viel RNA für die cDNA-Synthese eingesetzt wird.

Für jede cDNA wurden die relativen Mengen des Referenzgens und der einzelnen Zielgene bestimmt. Die Ergebnisse wurden als Verhältnis von Probe zu Kalibrator wie folgt ausgedrückt:

$$\text{Relative Transkriptmenge} = (M_{ZP} / M_{RP}) / (M_{ZK} / M_{RK}) \times 10^6$$

$M_{ZP}$	Menge des Zielgens in der Probe
$M_{RP}$	Menge des Referenzgens in der Probe
$M_{ZK}$	Menge des Zielgen-Kalibrators
$M_{RK}$	Menge des Referenzgen-Kalibrators

#### 3.3.9.2.4 Effizienzkorrektur mittels Standardkurve

Die Menge an Template in einer Probe wird nach folgender Formel berechnet:

$$N_n = N_0 \cdot E^{C_p}$$

$N_n$	Anzahl der Moleküle im PCR-Zyklus n
$N_0$	Anzahl der Moleküle zu Beginn der Reaktion
E	Amplifikationseffizienz
$C_p$	Zyklus, bei dem das Signal aus dem Hintergrund tritt (Kreuzungspunkt)

Im Idealfall findet eine Verdopplung pro Zyklus statt ( $E = 2$ ). Die Amplifikationseffizienz ist jedoch abhängig von Faktoren wie Sequenz, Fragmentlänge und Reinheit der Nukleinsäure und ist damit für jedes Gen und sein PCR-Produkt unterschiedlich. Um die Effizienz der jeweiligen PCR-Reaktion zu berücksichtigen, wurde für jedes Gen eine Standardkurve erstellt.

Dazu wurde zunächst das PCR-Produkt des jeweiligen Gens generiert und seine Menge mit Hilfe eines Agarose-Gels abgeschätzt (ca. 100ng/μl; außerdem war die Fluoreszenzintensität in der Plateau-Phase für alle PCR-Produkte ähnlich). Mit ca. 50ng des PCR-Produkts wurde eine Verdünnungsreihe hergestellt mit den Verdün-

nungsstufen  $10^{-2}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-8}$  und  $10^{-10}$ , die ersten drei Verdünnungsstufen in 10ng/ $\mu$ l MS2 RNA (Roche Diagnostics GmbH), die letzten beiden in Wasser. Die Phagen-RNA hat die Funktion eines Carriers und erlaubt ein vielfaches Einfrieren und Auftauen der Verdünnungen. 2 $\mu$ l jeder Verdünnung wurden im LightCycler amplifiziert. Die Proben wurden als „Standard“ spezifiziert und die relativen Konzentrationen eingetragen. Durch Auftragen der Kreuzungspunkte gegen den dekadischen Logarithmus der relativen Konzentration entstand eine Standardkurve, aus deren Steigung die Amplifikationseffizienz ermittelt wurde.

### 3.3.9.3 Schmelzkurvenanalyse

Um die Qualität der PCR-Produkte zu überprüfen, wurde nach der PCR eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Diese Methode basiert darauf, dass doppelsträngige DNA in Abhängigkeit von Sequenz, GC-Gehalt und Länge einen charakteristischen Schmelzpunkt aufweist. Das erwünschte PCR-Produkt weist somit einen anderen Schmelzpunkt auf als eventuelle Nebenprodukte oder Primer-Dimere. Durch kontinuierliches Erhitzen der PCR-Produkte in der Kapillare wird die dsDNA langsam denaturiert und die Fluoreszenz sinkt mit zunehmender Temperatur. Die Schmelztemperatur  $T_m$  eines Produkts ist definiert als die Temperatur, bei der nur noch die Hälfte der ursprünglichen Fluoreszenz vorhanden ist. Als zusätzliche Kontrolle wurden die PCR-Produkte anschließend auf einem 1,5%igen Agarose-Gel analysiert.

### 3.3.9.4 Durchführung

Für die Real-Time PCR wurde der LightCycler 2.0 und der Kit LightCycler Fast Start DNA Master<sup>PLUS</sup> SYBR Green I (Roche Diagnostics GmbH) gemäß des Herstellerprotokolls verwendet. 1/20 der aus 1 $\mu$ g Gesamt-RNA synthetisierten cDNA (siehe Kap. 3.3.8) wurde als Template für die Amplifikation eingesetzt. Die Amplifikation erfolgte in speziellen Glaskapillaren (LightCycler Capillaries (20 $\mu$ l), Roche Diagnostics GmbH) mit je 0,5 $\mu$ M der Primer in einem Volumen von 20 $\mu$ l. Als Kontaminationskontrolle wurde in einem Ansatz pro Lauf und Zielgen statt cDNA Wasser verwendet. Für die relative Quantifizierung wurde außerdem in zwei Ansätzen pro Lauf und Zielgen der jeweilige Kalibrator amplifiziert (siehe Kap. 3.3.9.2.2). Der Ablauf der gesamten Reaktion ist in folgender Tabelle dargestellt.

### PCR-Programm für die Real-Time PCR

Zyklen	Programm	Analysis mode	Temperatur	Haltezeit	Acquisition mode
1	Denaturierung	None	95°C	10min	None
38	Amplifikation	Quantification	95°C 60°C 72 C	0s 10s 20s	None None Single
1	Schmelzkurve	Melting curve	95°C 65°C 99°C	0s 10s 0s	None None cont. (slope 0.2°C/s)
1	Kühlen	None	40°C	30s	None

## 3.4 Arbeiten mit Proteinen

### 3.4.1 Herstellung von Zelllysaten

$1 \times 10^7$  Zellen wurden 10min bei 1200rpm abzentrifugiert, mit PBS gewaschen und in 200-400 $\mu$ l Lysepuffer resuspendiert. Nach einer Inkubation von 1h auf Eis, wurde das Lysat im Branson Digital Sonifier W-250 D für 10-20sec mit einer Amplitude von 10% beschallt. Benutzt wurden dafür eine 3mm konische Mikrospritze. Die Zellen wurden danach bei 4°C und 20000g abzentrifugiert und der Überstand bei -80°C gelagert.

Zum Nachweis von LMP1 wurde Lysepuffer 1 verwendet, für die EBNA-3 Proteine Lysepuffer 2 und für alle anderen Proteine RIPA-Puffer.

**Lysepuffer 1:** 20mM Tris pH 7,4; 150mM NaCl; 1mM EDTA; 1% Triton X 100

**Lysepuffer 2:** 20mM Tris pH 8,0; 120mM NaCl; 1mM EDTA; 0,5% IGEPAL

**RIPA-Puffer:** 50mM Tris HCl pH 7,5; 150mM NaCl; 1% IGEPAL; 0,5% DOC; 0,1% SDS

### 3.4.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Der Proteingehalt der Lysate wurde mit der Bradford-Lösung bestimmt. Der Nachweis beruht auf der Beobachtung von Bradford (1976), dass das Absorptionsmaximum einer sauren Lösung von Coomassie Brilliant Blue durch Ausbildung von Proteinkomplexen von 495nm nach 595nm verschoben wird.

Zuerst wurde eine Eichkurve mit 1 $\mu$ g bis 9 $\mu$ g Rinder-Serumalbumin erstellt. Dazu wurde das Protein in einer Küvette mit 1ml 1:5 mit H<sub>2</sub>O verdünnter Bradford-Lösung gemischt. Die optische Dichte wurde bei 595nm gegen den Leerwert (verdünnte Lösung ohne Protein) gemessen. Aus der Eichkurve, welche die optische Dichte

gegen die Konzentration anzeigt, geht die Proteinkonzentration einer unbekanntenen Lösung anhand der gemessenen optischen Dichte direkt hervor.

**Bradford-Lösung:** 0,01% Coomassie Brilliant Blue G-250; 4,7% Ethanol; 8,5% Phosphorsäure

### 3.4.3 Denaturierende und reduzierende SDS-Polyacrylamidgелеlektrophorese

Proteine wurden mit der diskontinuierlichen Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit SDS als denaturierendem Detergenz aufgetrennt (Laemmli, 1970). Die Bindung des negativ geladenen SDS an das Protein ist proportional zum Molekulargewicht der Proteine. Gleichzeitig werden die Proteine denaturiert, so dass ihre Wanderung im elektrischen Feld von der Größe abhängt. Da das Laufverhalten der Proteine jedoch auch durch die Aminosäurezusammensetzung der Proteine beeinflusst wird, wird mit dieser Methode nur das apparente Molekulargewicht bestimmt.

**SDS-Denaturierungspuffer:** 200mM Tris pH 6,8; 8% SDS; 40% (v/v) Glycerin; 0,4% Bromphenolblau; 400mM DTT; 0,2mM EDTA

**Elektrophorese-Laufpuffer:** 25mM Tris; 0,2M Glycin; 0,1% SDS

### 3.4.4 Übertragung von Proteinen auf PVDF (Western-Blot) und Immundetektion des Western-Blots

Die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden aus dem Trenngel auf die PVDF Membran übertragen. Der elektrophoretische Transfer erfolgte in einer mit Transferpuffer gefüllten Kammer bei 400mA für 1 Stunde. Die Membran wurde anschließend entweder 30min oder über Nacht in Blockpuffer inkubiert. Es folgte eine Inkubation mit dem in Blockpuffer verdünnten Primäantikörper für 1 Stunde oder über Nacht bei 4°C. Nach mehrfachem Waschen in PBS/Tween wurde die Membran 30-60min mit einem in Blockpuffer verdünnten Peroxidase-gekoppelten, gegen den Isotyp des Primäantikörpers gerichteten, Zweitantikörper inkubiert. Der Nachweis gebundener Antikörper erfolgte mit Hilfe des „Enhanced Chemoluminescence“ Systems (ECL™) von Amersham. Dabei wird bei der Oxidation des Substrats Luminol durch die Peroxidase Licht freigesetzt. Diese Lichtemission kann durch Exposition von Röntgenfilmen auf der Membran sichtbar gemacht werden.

**Transferpuffer:** 25% Methanol; 25mM Tris; 0,2M Glycin; 0,1% SDS

**Blockpuffer:** 5mM Tris/HCl pH 7,5; 150mM NaCl; 5% Milchpulver

**PBS/Tween:** PBS + 0,05% Tween

## 4 ERGEBNISSE

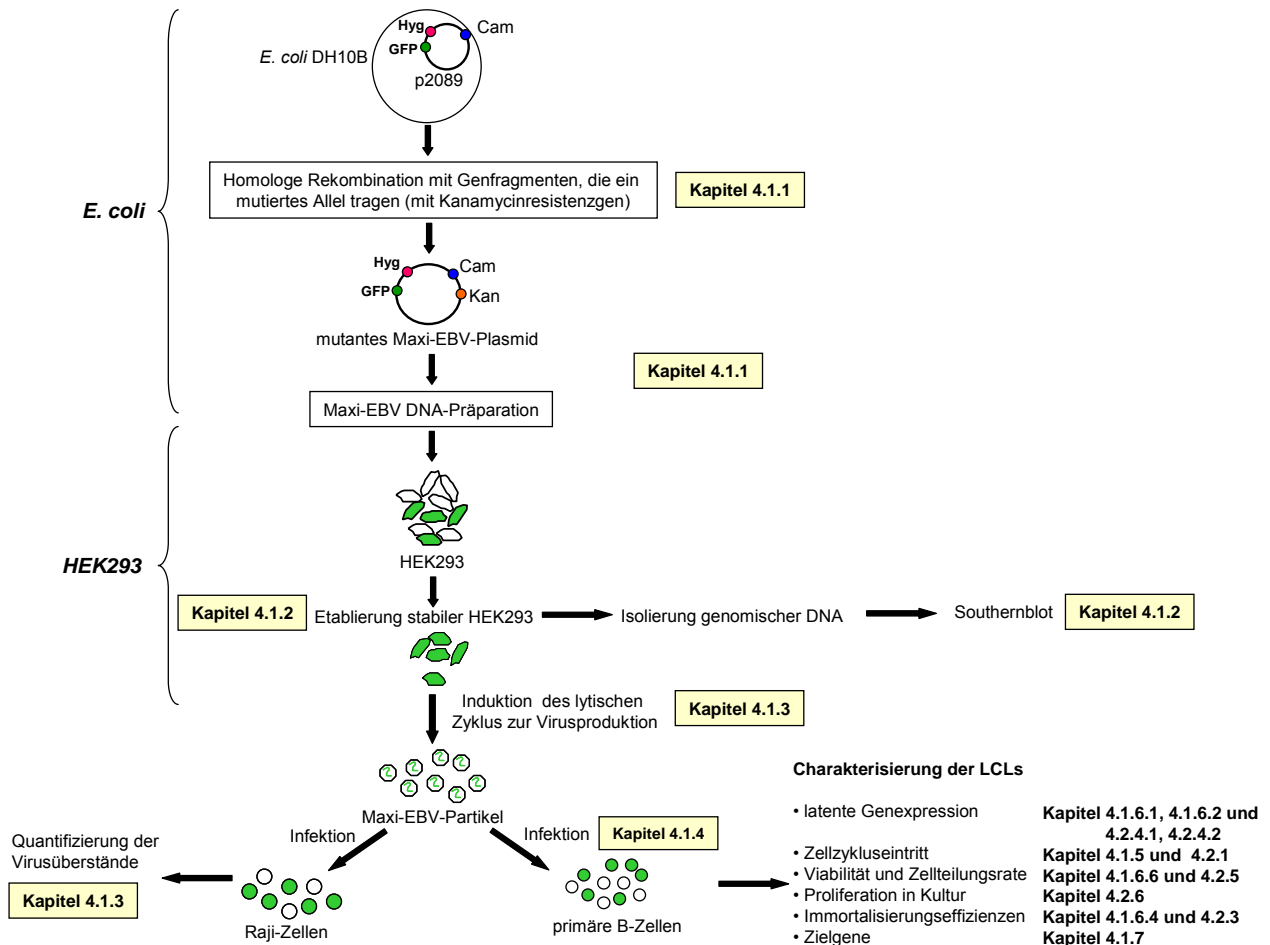
Die Darstellung meiner Untersuchungen zur Funktion der Epstein-Barr Virus nukleären Antigene 3A (EBNA-3A) und 3C (EBNA-3C) in der B-Zellimmortalisierung gliedert sich in drei Teile.

Der **erste Teil** der Arbeit beschreibt die Herstellung zweier rekombinanter EBNA-3A negativer Epstein-Barr Viren und deren funktionelle Analyse. In einem dieser EBNA-3A negativen Viren war der offene Leserahmen für das EBNA-3A Gen vollständig deletiert ( $\Delta$ EBNA-3A). In einem weiteren rekombinanten Virus war der offene Leserahmen des EBNA-3A Gens nach dem Kodon für Aminosäure 126 trunziert (EBNA-3A $\Delta$ 127-944). Beschrieben wird die homologe Rekombination der DNA in *E. coli*, die Herstellung stabiler virusproduzierender HEK293-Zelllinien, sowie die Induktion des lytischen Zyklus zur Herstellung infektiöser Partikel. Mit diesem Virus wurden primäre humane B-Lymphocyten infiziert und die Immortalisierungseffizienz der Viren bestimmt. Beschrieben wird der Eintritt der ruhenden B-Zellen in den Zellzyklus, die Expression der latenten Proteine sowie Viabilität und Teilungsfrequenz der Zellen.

Im **zweiten Teil** der Arbeit wurde eine virusproduzierende HEK293-Zelllinie verwendet, die nach Induktion des lytischen Zyklus EBNA-3C negative ( $\Delta$ EBNA-3C) Viren produziert. Mit diesen  $\Delta$ EBNA-3C Viren wurden primäre humane B-Zellen infiziert und ebenfalls die Immortalisierungseffizienz der Viren bestimmt. Die Charakterisierung der wachstumstransformierten B-Zellen erfolgte wie schon für EBNA-3A beschrieben.

Der **dritte Teil** der Arbeit beschäftigt sich mit der Generierung eines konditionalen Systems, um Zelllinien zu etablieren, in denen EBNA-3C von einem Tetrazyklin-induzierbaren Promotor konditional exprimiert werden kann.

Abbildung 4 zeigt eine Übersicht über die einzelnen Arbeitsschritte, die notwendig sind, um mutante rekombinante Epstein-Barr Viren zu gewinnen und damit lymphoblastoide Zelllinien zu generieren und weiter zu charakterisieren.



**Abb. 4: Die Herstellung von rekombinanten lymphoblastoiden Zelllinien (LCLs)**

Dargestellt ist eine schematische Übersicht der einzelnen Arbeitsschritte zur Herstellung von rekombinanten lymphoblastoiden Zelllinien (LCLs). Ausgehend von einem *E. coli* Stamm, der mit dem Maxi-EBV p2089 vortransformiert ist und ein Resistenzgen für Chloramphenicol (Cam) und Hygromycin (Hyg) trägt, werden rekombinante Maxi-EBV Mutanten durch homologe Rekombination hergestellt. Die Selektion von mutierten Viren wird durch Koinsertion einer Expressionskassette für ein Kanamycinresistenzgen ermöglicht. Anschließend erfolgen die Isolierung der DNA und die Transfektion in HEK293-Zellen, um unter Hygromycinselektion stabil transfizierte HEK293-Einzelzellklone zu expandieren. Zur Beurteilung der genomischen Integrität des Virus wird genomische DNA isoliert, die zur Southern-Blot-Analyse verwendet wird. Nach Induktion des lytischen Zyklus durch Expression des viralen Transaktivators BZLF1 und des viralen Glycoproteins BALF4 in den stabilen HEK293-Zelllinien, werden Viren produziert und der virale Titer anhand der GFP-Expression durch Raji-Infektion bestimmt. Die Virusüberstände werden benutzt, um primäre B-Zellen zu infizieren und die daraus entstehenden LCLs zu charakterisieren.

Ausgehend von einem *E. coli* Stamm, der mit p2089 vortransformiert ist, werden zunächst rekombinante Maxi-EBVs mit spezifischen Mutationen durch homologe Rekombination hergestellt. Die mutierte Maxi-EBV DNA wird in *E. coli* amplifiziert und isoliert. Anschließend erfolgt die Transfektion dieser DNA in HEK293-Zellen, um unter Hygromycinselektion stabile HEK293-Einzelzellklone zu erzeugen. Nach der Etablierung dieser stabilen Zellklone ist es zunächst notwendig die genomische

Integrität der Virus-DNA durch Southern-Blot-Analysen zu überprüfen. Des Weiteren wird die Infektiosität der Virusüberstände, die durch Induktion des lytischen Zyklus erzeugt werden, bestimmt. Dafür werden Raji-Zellen infiziert und die Titer anhand der GFP (grün fluoreszierendes Protein) Expression quantifiziert. Raji ist eine humane EBV positive Burkitt-Lymphom-Zelllinie, die keine Viruspartikel produzieren kann. Schließlich können die generierten Überstände benutzt werden, um primäre B-Zellen zu infizieren und lymphoblastoide Zelllinien zu generieren.

## 4.1 Herstellung und Analyse von EBNA-3A negativen Epstein-Barr Viren

### 4.1.1 Herstellung von zwei rekombinanten Maxi-EBV Genomen mit partieller bzw. vollständiger Deletion des EBNA-3A Gens

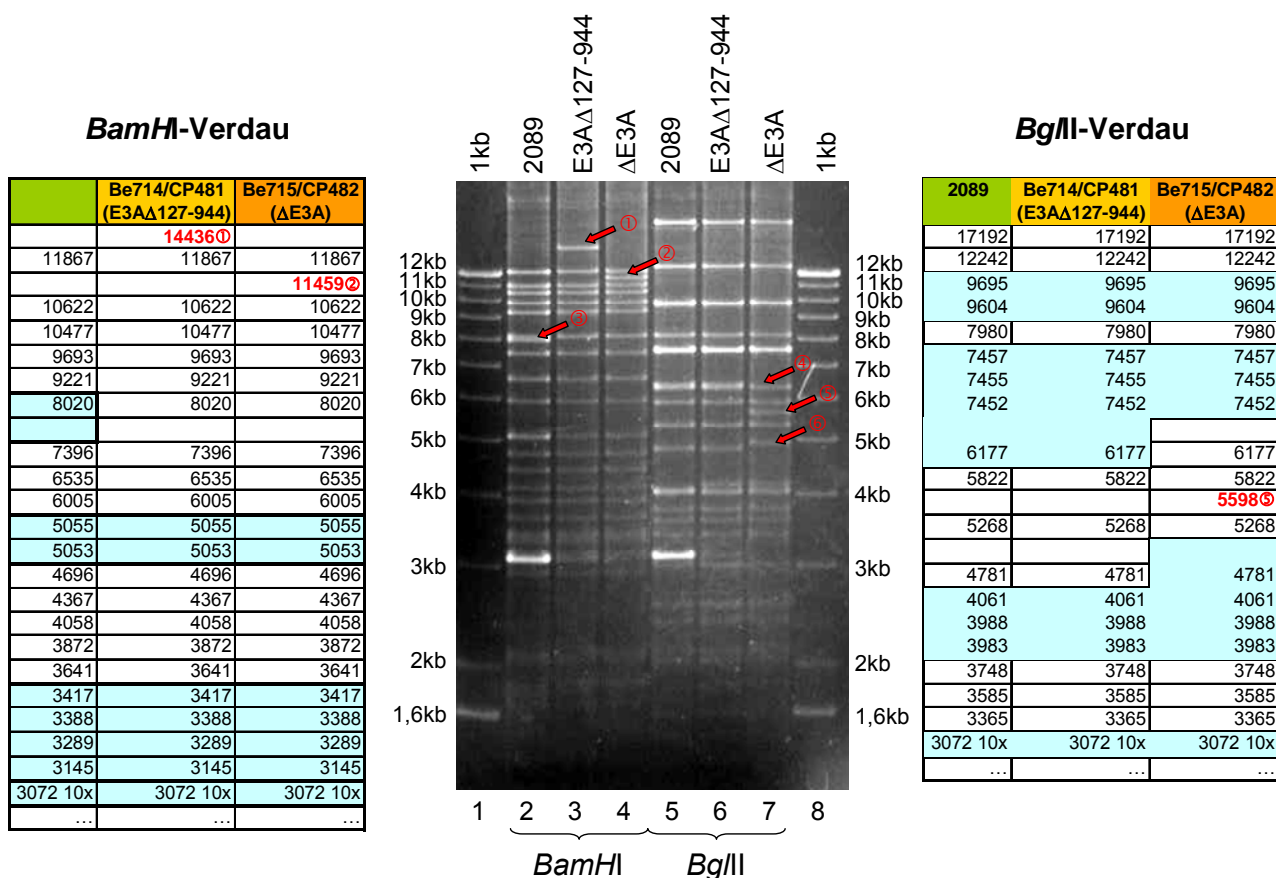
In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Maxi-EBV Mutanten, die auf der Basis des rekombinanten Wildtyp-EBVs 2089 hergestellt wurden, benutzt. Die genetische Modifikation des Genoms von EBV war durch homologe Rekombination in *E. coli* mit linearen Fragmenten erfolgt, die den mutierten Genort im Kontext von flankierenden EBV Abschnitten trugen. In der ersten Mutante wurde eine Kanamycinkassette in das zweite Exon von EBNA-3A inseriert, wodurch der offene Leserahmen (ORF) von AS1-944 auf AS1-126 reduziert wird. In der zweiten Mutante ist das EBNA-3A Gen durch eine Kanamycinkassette ersetzt worden, so dass das EBNA-3A Gen vollständig deletiert war.

Die korrekte Integration des mutierten Fragments an der richtigen Stelle wurde durch Restriktionslängenanalyse nach Isolierung der Maxi-EBV DNA aus *E. coli* überprüft. Je eine der *E. coli* Kolonien mit korrekt rekombiniertem Maxi-EBV Plasmid wurde expandiert und die DNA nach Aufreinigung über einen CsCl-Gradienten isoliert. In Abb. 5 sind Restriktionsfragmentanalysen der beiden EBNA-3A Mutanten dem Wildtyp 2089 gegenübergestellt. Betrachtet werden sowohl ein *Bam*HI- als auch ein *Bgl*II-Verdau.

Für den *Bam*HI-Verdau von 2089 ist ein 7910bp großes Fragment (Abb. 5: Spur 2, ③) charakteristisch, das sowohl in EBNA-3A $\Delta$ 127-944 (Be714/CP481), als auch in  $\Delta$ EBNA-3A (Be715/CP482) (Abb. 5: Spur 3 und 4) verloren geht. Der Verdau von EBNA-3A $\Delta$ 127-944 (Be714/CP481) mit *Bam*HI liefert ein nur für diese Mutante charakteristisches Fragment von 14436bp (Abb. 5: Spur 3, ①). Wird  $\Delta$ EBNA-3A

(Be715/CP482) mit *Bam*HI verdaut, ergibt sich ein 11459bp großes Fragment (Abb. 5: Spur 4,Ⓜ), das im Wildtyp 2089 nicht vorkommt.

Für den *Bg*II-Verdau von ΔEBNA-3A ergibt sich der Verlust des 6337bp großen Fragments (Abb. 5: Spur 7,Ⓞ), welches sowohl im Wildtyp 2089, als auch in der Mutante EBNA-3AΔ127-944 (Be714/CP481) vorhanden ist. Außerdem liefert ein *Bg*II-Verdau von ΔEBNA-3A (Be715/CP482) zwei zusätzliche Banden von 5598bp (Abb. 5: Spur 7,Ⓟ) und 4899bp (Abb. 5: Spur 7,Ⓠ), die im Wildtyp 2089 nicht vorkommen.



**Abb. 5: Überprüfung der EBNA-3A spezifischen Mutationen in den rekombinanten EBV Konstrukten**

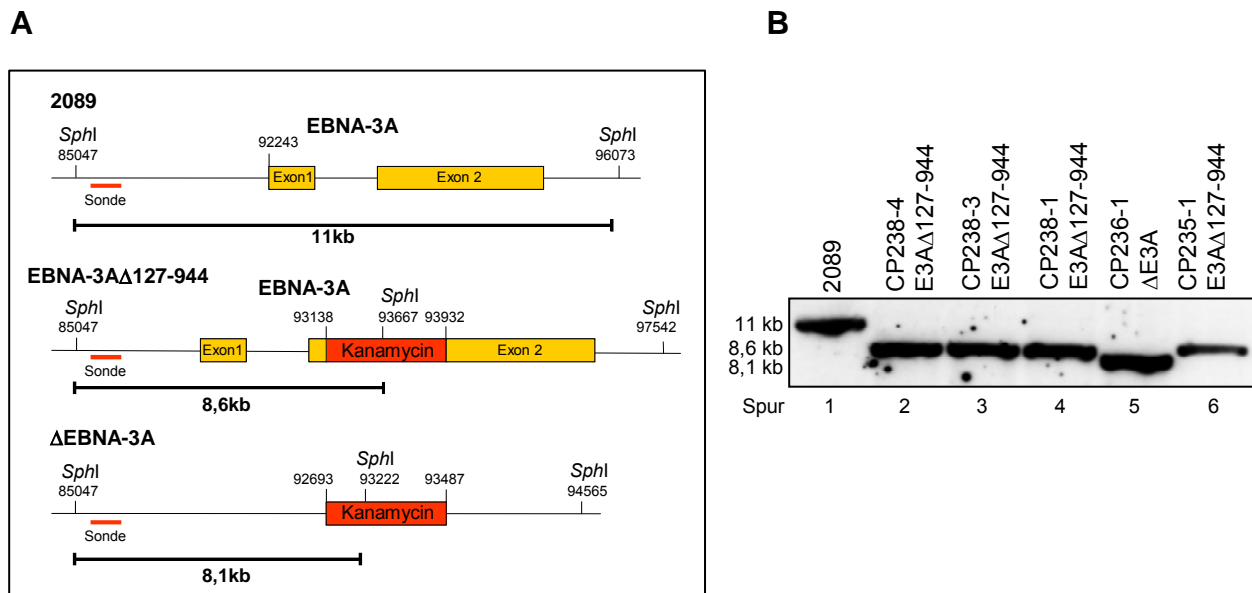
1-2µg einer hochreinen DNA-Präparation des rekombinanten 2089 Wildtyps, der EBNA-3AΔ127-944 (Be714/CP481) Mutante und der ΔEBNA-3A (Be715/CP482) Mutante wurden mit *Bam*HI bzw. *Bg*II verdaut. Die DNA-Fragmente wurden in einem 0,7%igem Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid angefärbt. In den nebenstehenden Tabellen sind die DNA-Fragmente aufgelistet, die für den jeweiligen Restriktionsverdau zu erwarten sind. DNA-Fragmente, die charakteristisch für die verschiedenen rekombinanten Maxi-EBV-Plasmide sind, werden im Gel durch nummerierte rote Pfeile gekennzeichnet und in den Tabellen rot gedruckt. Fragmente, die im Gel als eine Bande erscheinen, sind hellblau hinterlegt. Aufgelistet sind nur Fragmente, die 3072bp oder größer sind, da im Gel nur diese zu erkennen sind.



#### 4.1.2 Etablierung virusproduzierender, EBV-positiver HEK293- Zelllinien

Zur Erzeugung von Virusüberständen, die die verschiedenen EBV-Mutanten enthalten, mussten im ersten Schritt für jede Mutante mehrere stabile HEK293-Zelllinien etabliert werden, welche die Maxi-EBV-Plasmide als extrachromosomale Kopien in latenter Form enthalten und an die Tochterzellen weitergeben. Im zweiten Schritt musste untersucht werden, ob diese Zelllinien den lytischen Zyklus von EBV nach Induktion des lytischen Programms unterstützen.

Nach erfolgter homologer Rekombination in *E. coli* wurde die Maxi-EBV DNA präpariert, über einen CsCl-Ethidiumbromid-Gradienten gereinigt und in HEK293-Zellen transfiziert. Nach 2-4 Wochen unter Selektion mit Hygromycin (100µg/ml Endkonzentration) konnten GFP positive Einzelzellklone expandiert werden. Durch Analyse der genomischen DNA im Southern-Blot wurde der korrekte Genotyp der jeweiligen Maxi-EBV Plasmide überprüft. Mit Hilfe einer 660bp großen Sonde kann zwischen Wildtyp 2089 und den beiden EBNA-3A Mutanten unterschieden werden. Nach einem *SphI*-Verdau ist nach Hybridisierung mit dieser Sonde für den Wildtyp 2089 ein 11kb Fragment zu erwarten, für EBNA-3A $\Delta$ 127-944 ein 8,6kb Fragment und für  $\Delta$ EBNA-3A ein 8,1kb Fragment (Abb.: 6A). Untersucht wurden eine Wildtyp 2089 produzierende HEK293-Zelllinie (Abb.: 6B Spur 1), vier EBNA-3A $\Delta$ 127-944 produzierende HEK293-Zelllinien (Abb.: 6B Spuren 2, 3, 4, 6) und eine  $\Delta$ EBNA-3A produzierende HEK293-Zelllinie (Abb.: 6B Spur 5). In allen Zelllinien konnten die erwarteten Fragmente detektiert werden.



**Abb. 6: Bestätigung des korrekten Virus-Genotyps der virusproduzierenden HEK293-Zelllinien**

(A) Für diese Arbeit wurden zwei EBNA-3A Mutanten hergestellt. In der ersten Mutante (EBNA-3AΔ127-944) ist eine Kanamycinkassette (rot) in das zweite Exon des EBNA-3A Gens inseriert. In der zweiten Mutante (ΔEBNA-3A) wurde das gesamte EBNA-3A Gen durch eine Kanamycinkassette (rot) ersetzt. Eingezeichnet ist die 660bp große Sonde und die mit dieser Sonde zu erwartenden detektierbaren Genfragmente nach *SphI*-Verdau. Die rekombinante DNA wurde aus HEK293-Zellen isoliert, mit dem Restriktionsenzym *SphI* verdaut und mit der Wildtyp produzierenden HEK293-Zelllinie 2089 verglichen.

(B) Untersucht wurden vier HEK293-Zelllinien mit EBNA-3AΔ127-944 (CP238-4, -3, -1, CP235-1) und eine HEK293-Zelllinie mit ΔEBNA-3A (CP236-1). Gezeigt wird das erwartete 11kb Fragment für 2089 (Spur 1), das erwartete 8,6kb Fragment für die Zelllinien mit EBNA-3AΔ127-944 (Spur 2, 3, 4, 6) und das erwartete 8,1kb Fragment (Spur 5) für die Zelllinie mit ΔEBNA-3A.

### 4.1.3 Induktion des lytischen Zyklus und Bestimmung der Virustiter

In den stabil transfizierten HEK293-Zellen replizieren Maxi-EBV Plasmide extra-chromosomal, produzieren jedoch spontan keine Viruspartikel. Durch die transiente Expression des viralen Transaktivatorgens BZLF1 kann der lytische Zyklus eingeleitet werden. Durch zusätzliche Kotransfektion des viralen Glycoproteins BALF4 kann die Menge der produzierten infektiösen Partikel deutlich gesteigert werden (Neuhierl et al., 2002). Zur Bestimmung des Virustiters wurde der Kulturüberstand der induzierten HEK293-Zellen nach Induktion geerntet und zur Infektion von Raji-Zellen, einer humanen EBV positiven Burkitt-Lymphom-Zelllinie, eingesetzt. Da das rekombinante Virus das Markergen GFP trägt, können infizierte Raji-Zellen anhand der grünen Fluoreszenz erkannt und deren Anteil an der Gesamtpopulation im FACS bestimmt werden. Eine grüne Raji-Zelle wurde dabei als „Grüne-Raji-Einheit“ (GRE), dem Äquivalent eines infektiösen Partikels, definiert. Anhand dieser Einheiten war es möglich die Titer sehr unterschiedlich produzierender Maxi-EBV Mutanten anzu-

gleichen, um für die Immortalisierung primärer B-Zellen gleiche Mengen infektiöser Partikel einsetzen zu können. Tabelle 2 zeigt die Titer, die für EBNA-3A $\Delta$ 127-944 und  $\Delta$ EBNA-3A im Vergleich zum Wildtyp 2089 erzielt wurden. Mit zwei der EBNA-3A $\Delta$ 127-944 HEK293 Zelllinien (CP235-1 und CP238-1) konnten Titer von  $3 \times 10^5$  GRE/ml, die dem Wildtyp 2089 entsprechen, erreicht werden.

virusproduzierende HEK293 Zelllinie	Maxi-EBV	lytischer Zyklus	% grüne Rajis	infektiöse Partikel (GRE/ml)
KG480-2	2089	induziert	52	$3 \times 10^5$
CP235-1	EBNA-3A $\Delta$ 127-944		49	$3 \times 10^5$
CP238-1	EBNA-3A $\Delta$ 127-944		52	$3 \times 10^5$
CP238-3	EBNA-3A $\Delta$ 127-944		17	$1 \times 10^5$
CP238-4	EBNA-3A $\Delta$ 127-944		11	$0,6 \times 10^5$
CP236-1	$\Delta$ EBNA-3A		10	$0,6 \times 10^5$
KG480-2	2089	nicht induziert	2,9	$1,7 \times 10^4$
CP235-1	EBNA-3A $\Delta$ 127-944		7,9	$4,7 \times 10^4$
CP238-1	EBNA-3A $\Delta$ 127-944		0,3	$1,8 \times 10^3$
CP238-3	EBNA-3A $\Delta$ 127-944		0,3	$1,8 \times 10^3$
CP238-4	EBNA-3A $\Delta$ 127-944		0,01	60
CP236-1	$\Delta$ EBNA-3A		n.d.	n.d.

**Tabelle 2: Die Bestimmung der Virustiter verschiedener rekombinanter EBV Mutanten nach Infektion von Raji-Zellen**

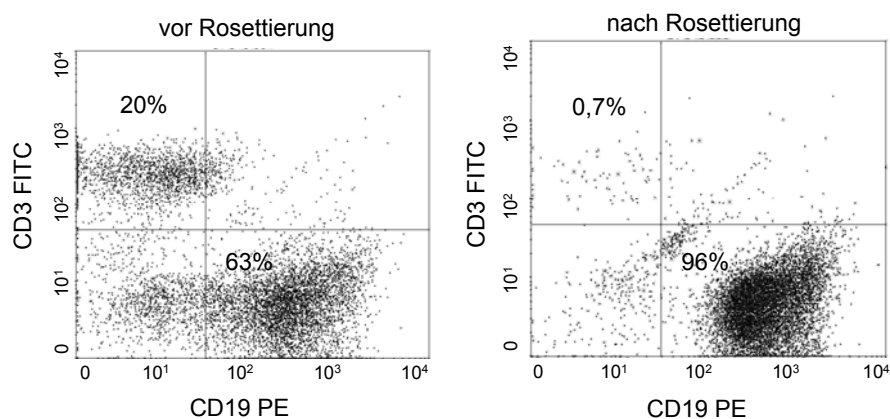
Raji-Zellen wurden mit verschiedenen Virusüberständen (aus vier verschiedenen EBNA-3A $\Delta$ 127-944 HEK293-Zelllinien und einer  $\Delta$ EBNA-3A HEK293-Zelllinie) infiziert und nach 4 Tagen wurde der Anteil GFP exprimierender Zellen im FACS ermittelt. Angegeben sind die Ergebnisse der FACS-Analyse in % und die sich daraus rechnerisch ergebenden Konzentrationen der infektiösen Partikel als grüne Raji-Einheit (GRE). Als Negativkontrolle dienten virusproduzierende HEK293-Zelllinien, die nicht induziert wurden. Experimente, die nicht durchgeführt wurden, sind mit n.d. bezeichnet.

#### 4.1.4 Infektion von primären B-Lymphozyten mit EBNA-3A $\Delta$ 127-944 und $\Delta$ EBNA-3A Maxi-EBV Partikeln

Um die Beteiligung von EBNA-3A an der Immortalisierung primärer B-Zellen zu untersuchen, wurden frisch präparierte B-Zellen mit den EBNA-3A $\Delta$ 127-944 bzw.  $\Delta$ EBNA-3A Viren infiziert und die entstehenden lymphoblastoiden Zelllinien (LCLs) analysiert.

Alle bisherigen Veröffentlichungen über die Notwendigkeit von EBNA-3A für die B-Zellimmortalisierung, bezeichnen EBNA-3A als essentiell (Maruo et al., 2003; Tomkinson et al., 1993). Im Gegensatz zu den publizierten Ergebnissen, die auf Arbeiten im P3HR1-System beruhen, wurde in dieser Arbeit erstmals das Maxi-EBV System verwendet.

Die Lymphocyten wurden aus Biopsien von Nasenpolypen (Adenoiden) kleiner Kinder (0-4 Jahre) durch Ficollgradientenzentrifugation angereichert und durch Rosettierung mit Schafblut von T-Zellen depletiert.



**Abb. 7: Phänotyp der Lymphocytenpopulation nach Reinigung über Ficollgradienten und Rosettierung**

Die Lymphocyten wurden aus Adenoiden in einem ersten Ficollgradienten isoliert und die T-Zellen durch Rosettierung mit Schaferythrocyten in einem zweiten Ficollgradienten entfernt. Um das Verhältnis von B-Zellen zu T-Zellen zu bestimmen erfolgte eine Färbung der Lymphocyten mit CD19 spezifischem Antikörper, gekoppelt an PE und CD3 spezifischem Antikörper gekoppelt an FITC. Dabei werden B-Zellen aufgrund des CD19 PE rot gefärbt und T-Zellen aufgrund des CD3 FITC grün markiert. Die gefärbten Lymphocyten wurden im FACS analysiert. Dargestellt ist eine repräsentative Isolation, die Lymphocyten sowohl vor (A), als auch nach (B) der Rosettierung zeigt. Der Anteil an T-Lymphocyten wird durch die Rosettierung von 20% auf 0,7% reduziert, so dass die Lymphocytenpopulation nach der Rosettierung zu 96% aus B-Lymphocyten besteht.

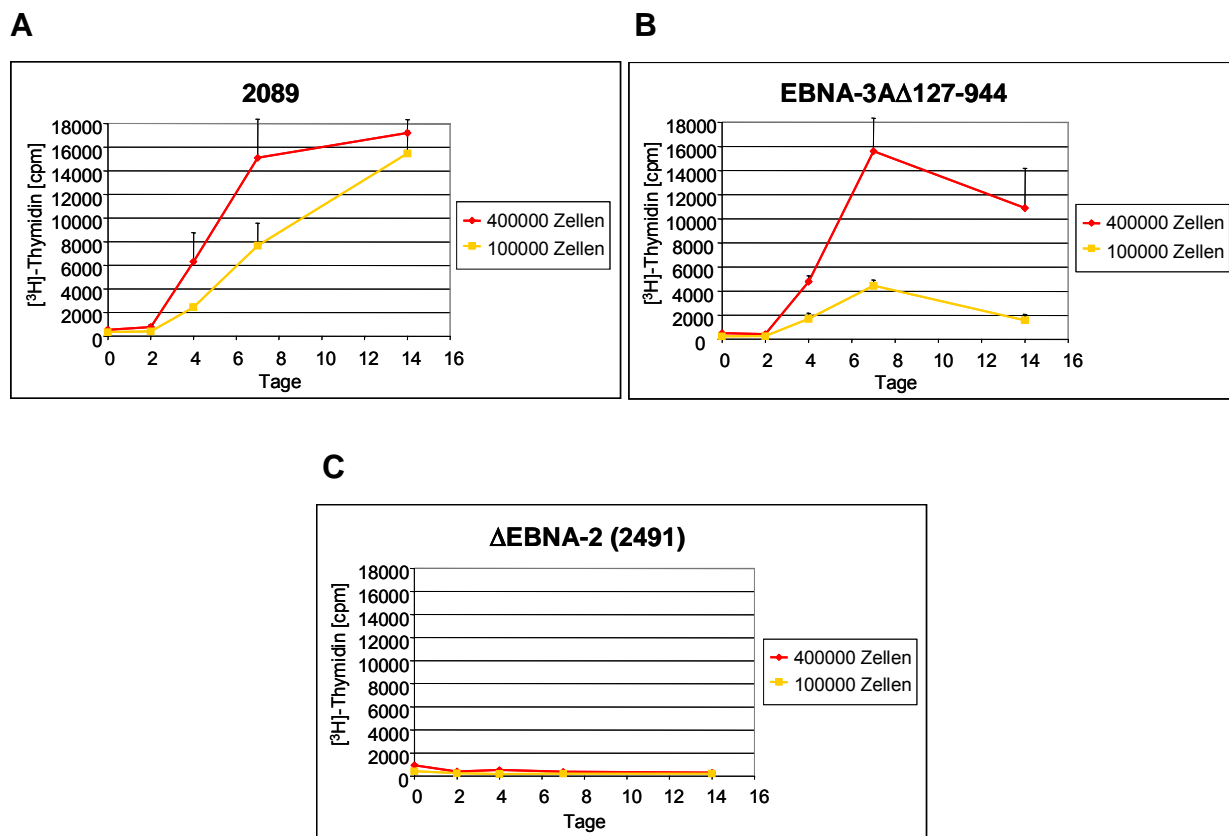
Vor der Anreicherung liegt der B-Zellanteil der Lymphocytenpopulation bei ca. 60%. Abbildung 7 zeigt ein repräsentatives Beispiel einer typischen Lymphocytenpopulation vor und nach der Rosettierung. Die erfolgreiche Trennung von B- und T-Zellen

kann mit Hilfe eines PE gekoppelten CD19 spezifischen Antikörpers und mit Hilfe eines FITC gekoppelten CD3 Antikörpers im FACS dargestellt werden. Der Anteil an T-Zellen konnte durch die Rosettierung auf unter 1% reduziert werden. Der Anteil der B-Zellen betrug nach dem Anreicherungs-schritt in der Regel > 95%.

#### **4.1.5 B-Zellen treten nach Infektion mit EBNA-3A $\Delta$ 127-944 Virus in den Zellzyklus ein**

Lymphocyten, die aus Adenoiden bzw. alternativ aus Nabelschnurblut isoliert worden waren, wurden mit Virusüberständen infiziert. Eine Depletierung von T-Zellen ist bei Verwendung von Nabelschnurblut nicht nötig, da im EBV negativen Nabelschnurblut keine spezifischen, gegen EBV gerichteten, cytotoxischen T-Zellen vorhanden sind. Für die Infektion wurden  $4 \times 10^5$  bzw.  $1 \times 10^5$  B-Zellen in 96-Loch-Platten auf einer Lage aus humanen bestrahlten Fibroblastenzellen ausplattiert und mit 4500 GRE infiziert. Fibroblastenzellen produzieren nicht identifizierte, lösliche Faktoren, die das klonale Wachstum von EBV infizierten lymphoblastoiden Zellen deutlich verbessern.

Im Folgenden wurden die Effekte einer EBV-Infektion auf den Zellzykluseintritt und die Proliferation von B-Zellen untersucht (Abb. 8). Dabei wurde Wildtyp-Virus 2089 mit EBNA-3A $\Delta$ 127-944 Virus verglichen. Als Negativkontrolle diente das nichttransformierende  $\Delta$ EBNA-2 Virus 2491. Der Eintritt der B-Lymphocyten in die S-Phase, nach einer EBV-Infektion, wurde mit Hilfe eines Thymidinincorporationsassays gemessen. Durch die Inkorporation von [ $^3$ H]-Thymidin kann die Menge an neu-synthetisierter DNA und damit indirekt die Proliferationsrate bestimmt werden. Der Thymidineinbau wurde an den Tagen 0, 2, 4, 7 und 14 nach Infektion gemessen. Als Maß für den Thymidineinbau wurden Zerfälle pro Minute angegeben, welche mit der Menge des eingebauten Thymidins korrelieren. Bei Verwendung von  $4 \times 10^5$  Zellen pro Kultur, ist an Tag 7 nach Infektion zwischen Wildtyp 2089 und Mutante EBNA-3A $\Delta$ 127-944 Thymidineinbau in vergleichbarer Intensität zu messen, während nach Infektion mit dem  $\Delta$ EBNA-2 Virus 2491 keine DNA-Synthese messbar ist. An Tag 14 ist allerdings bei EBNA-3A $\Delta$ 127-944 ein deutlicher Rückgang in der Menge der neu-synthetisierten DNA zu erkennen, während beim Wildtyp 2089 die Proliferationsrate nochmals gesteigert wird. Bei Verwendung von nur  $1 \times 10^5$  Zellen pro Kultur ist bereits an Tag 7 ein verminderter Thymidineinbau zu sehen, der an Tag 14 noch deutlicher wird. Offensichtlich sind Kulturen von EBNA-3A negativen LCLs bei niedrigen Zelldichten instabil.



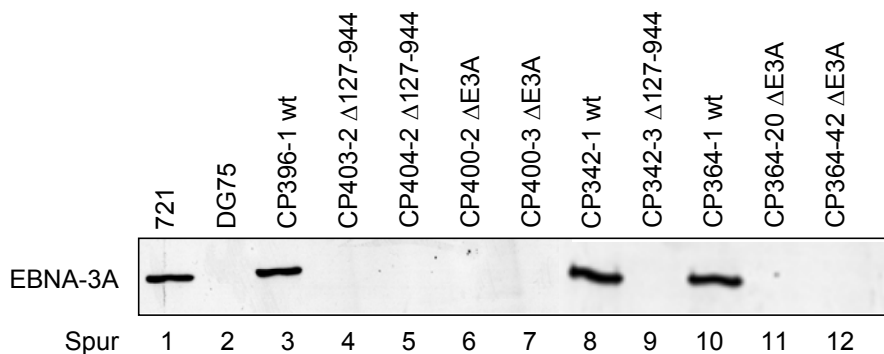
**Abb. 8: Eintritt in den Zellzyklus nach Infektion von B-Zellen mit Wildtyp-Virus 2089, EBNA-3AΔ127-944 Virus und ΔEBNA-2 Virus 2491**

Zur Bestimmung des Zellzykluseintritts wurden  $4 \times 10^5$  bzw.  $1 \times 10^5$  B-Zellen in einem Kulturvolumen von  $150 \mu\text{l}$  mit jeweils 4500 grünen Raji-Einheiten (GRE) an Viruspartikeln infiziert und über einen Zeitraum von 14 Tagen kultiviert. An den Tagen 0, 2, 4, 7 und 14 nach Infektion wurden die Zellen für jeweils 4 Stunden mit  $0,5 \mu\text{Ci}$   $[^3\text{H}]$ -Thymidin pro Ansatz inkubiert. Angegeben sind jeweils die Mittelwerte der gemessenen Zerfälle pro Minute in cpm [counts per minute]. Verglichen werden Infektionen mit dem Wildtyp-Virus 2089 (A), dem ΔEBNA-2 Virus 2491 (C) und dem EBNA-3AΔ127-944 Virus (B).

Zwei bis vier Wochen nach Infektion der primären B-Zellen waren erste auswachsende Klone sichtbar, sowohl bei der Infektion mit Wildtyp-Virus 2089, als auch mit EBNA-3AΔ127-944 bzw. ΔEBNA-3A Virus. Die Infektion mit dem ΔEBNA-2 Virus, das als Negativkontrolle dient, ergab keine Klone. Es war somit ausgeschlossen, dass die Proliferation der Zellen auf endogenem Virus des Primärmaterials beruhte. Entgegen den bisherigen Publikationen war es also überraschenderweise sowohl mit dem EBNA-3AΔ127-944, als auch mit dem ΔEBNA-3A Virus möglich, wachstums-transformierte proliferierende LCLs zu etablieren. Im Folgenden wurden diese EBNA-3A negativen LCLs näher charakterisiert.

#### 4.1.6 Western-Blot-, Southern-Blot- und PCR-Analysen von LCLs, die mit $\Delta$ EBNA-3A oder EBNA-3A $\Delta$ 127-944 Virus infiziert wurden

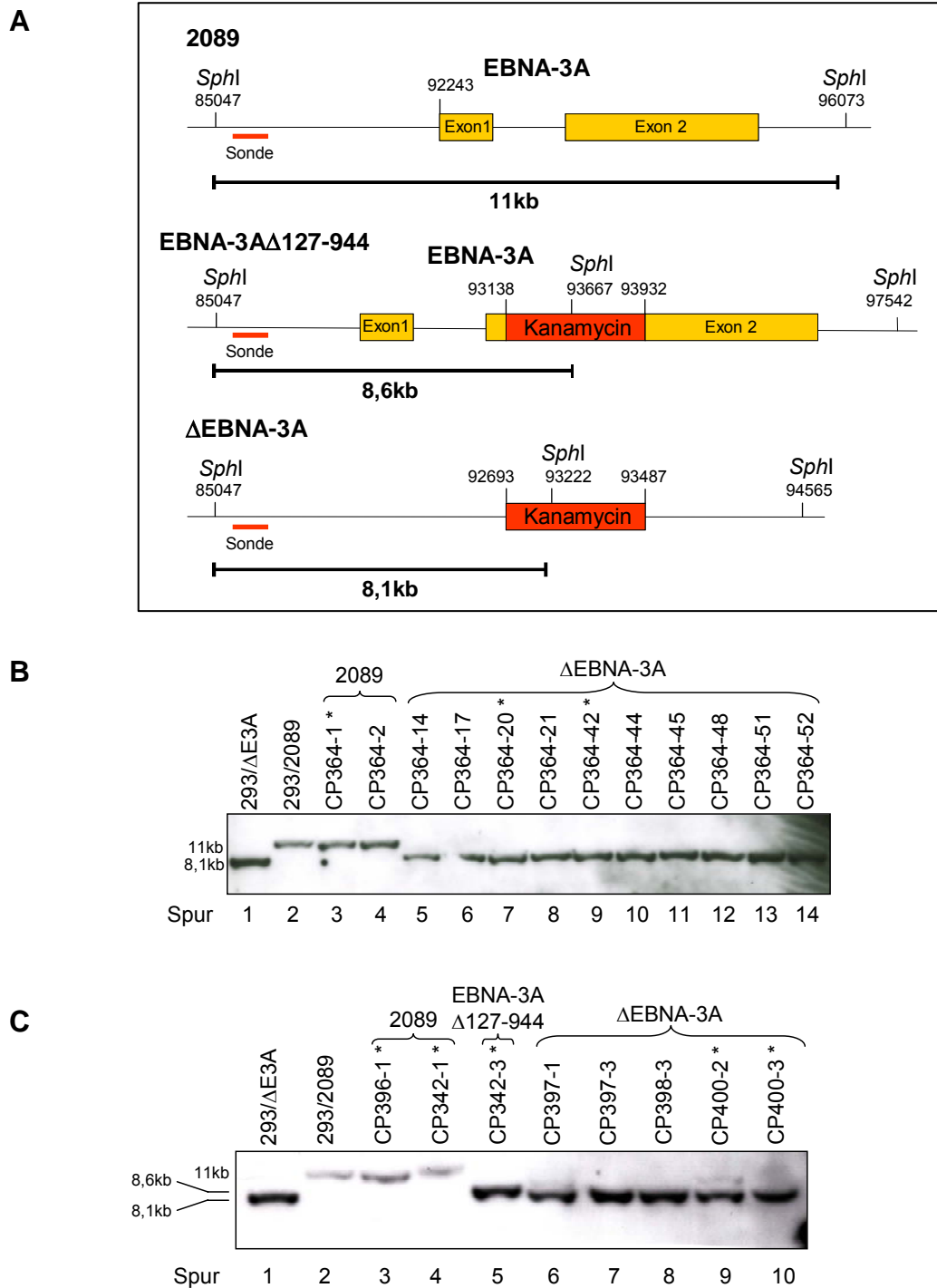
Nachdem wider erwarten nach  $\Delta$ EBNA-3A und EBNA-3A $\Delta$ 127-944 Virusinfektion B-Zelllinien etabliert werden konnten, musste zunächst sichergestellt werden, dass die B-Zellen tatsächlich kein EBNA-3A exprimieren. Western-Blot-Analysen ergaben, dass in Proteinextrakten keiner, der mit EBNA-3A negativen Viren infizierten LCLs, EBNA-3A detektiert werden konnte. Alle potentiell EBNA-3A negativen LCLs (CP403-2, CP404-2, CP400-2, CP400-3, CP342-3, CP364-20, CP364-42) exprimieren tatsächlich kein EBNA-3A (Abb. 9, Spur 4-7; 11,12). Auch ein trunkiertes EBNA-3A mit 126AS, das in den EBNA-3A $\Delta$ AS127-944 LCLs zu erwarten wäre, konnte nicht nachgewiesen werden.



**Abb. 9: Überprüfung der Expression von EBNA-3A in potentiell EBNA-3A negativen LCLs**

Die Expression von EBNA-3A wurde in potentiell EBNA-3A negativen LCLs untersucht. Die Auftrennung von jeweils 50 $\mu$ g Proteinlysate erfolgte in einem 8%igem Polyacrylamidgel. Als Positivkontrolle diente die mit B95.8 transformierte Zelllinie 721 (Spur 1), als Negativkontrolle die EBV negative Zelllinie DG75 (Spur 2). Die Detektion erfolgte mit dem EBNA-3A spezifischen Antikörper von Zytomed. Dabei konnte gezeigt werden, dass in diesen Zelllinien (CP403-2, CP404-2, CP400-2, CP400-3, CP342-3, CP364-20, CP364-42) kein EBNA-3A exprimiert wird (Spur 4, 5, 6, 7, 9, 11, 12).

Das Fehlen des EBNA-3A Gens wurde im Weiteren durch Southern-Blot- und PCR-Analyse bestätigt. Für den Southern-Blot wurde die genomische DNA mit dem Restriktionsenzym *Sph*I geschnitten und mit einer 660bp Sonde hybridisiert, die im 5' Bereich des EBNA-3A-Gens bindet.



**Abb. 10: Southern-Blot-Analyse des EBNA-3A Gens in verschiedenen LCLs**

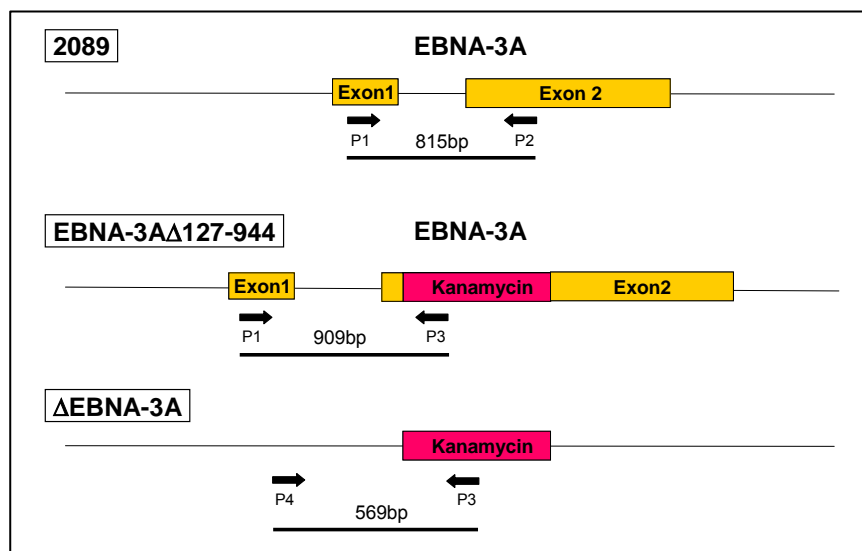
(A) Schematische Darstellung der Southern-Blot-Analyse zur Bestätigung des korrekten Genotyps der potentiell EBNA-3A negativen LCLs. Die genomische DNA wurde mit dem Restriktionsenzym *SphI* geschnitten. Eingezeichnet ist die 660bp große Sonde, die sich im 5' Bereich vor EBNA-3A befindet und die nach der Hybridisierung und Detektion daraus resultierenden Fragmente. Für den Wildtyp 2089 ergibt sich ein 11kb Fragment, für die EBNA-3A $\Delta$ 127-944 Mutante ein 8,6kb Fragment und für die vollständige EBNA-3A Deletion ein 8,1kb Fragment. (B+C) Als zusätzliche Kontrolle wurde genomische DNA aus virusproduzierenden HEK293-Zellen (293/2089 und 293/ $\Delta$ E3A) verwendet (B: Spur 1 und 2, C: Spur 1 und 2). Zelllinien, die im Verlauf dieser Arbeit weiter charakterisiert wurden (CP364-1, CP364-20, CP364-42, CP396-1, CP342-1, CP342-3, CP400-2, CP400-3), sind mit \* gekennzeichnet (B: Spur 1, 5-14; C: Spur 1, 6-10).



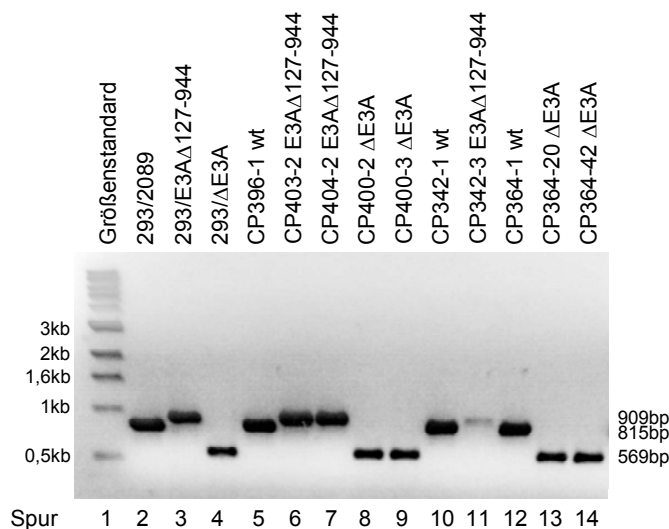
In Abb. 10A ist schematisch dargestellt, welche Fragmente von der 660bp Sonde erkannt werden. Im Wildtyp 2089 wird ein 11kb Fragment erwartet, in der EBNA-3A $\Delta$ 127-944 Mutante ein 8,6kb Fragment und in der  $\Delta$ EBNA-3A Mutante ein 8,1kb Fragment. Abb. 10B zeigt, dass diese Vorhersage in allen LCLs bestätigt werden konnte. Für die LCLs mit Wildtyp 2089 und für die HEK293-Zelllinie mit 2089 konnte eine 11kb Bande detektiert werden (Abb. 10B, Spur 2-4; Abb. 10C, Spur 2-4). Für die LCL mit EBNA-3A $\Delta$ 127-944 ergab sich die erwartete 8,6kb Bande (Abb. 10C, Spur 5) und für die LCLs mit  $\Delta$ EBNA-3A und für die HEK293-Zelllinie mit  $\Delta$ EBNA-3A die erwartete 8,1kb Bande (Abb. 10B, Spur 1, 5-14 und Abb. 10C, Spur 1, 6-10). Zelllinien, die im Laufe dieser Arbeit weiter charakterisiert wurden, sind in Abb. 10B und C mit \* gekennzeichnet. Dabei handelt es sich um CP364-1, CP364-20, CP364-42, CP396-1, CP400-2, CP400-3, CP342-1, CP342-3.

Für die PCR-Analyse wurden vier verschiedene Primer ausgewählt, die in Abb. 11A mit P1, P2, P3 und P4 bezeichnet werden. Zusätzlich sind die Fragmentgrößen, die sich durch Verwendung der verschiedenen Primer ergeben, eingezeichnet. Als Kontrolle wurde genomische DNA aus virusproduzierenden HEK293-Zelllinien, die mit Wildtyp 2089, EBNA-3A $\Delta$ 127-944 oder  $\Delta$ EBNA-3A transfiziert worden sind, verwendet (Abb. 11B, Spur 2-4). Die PCR-Analyse der genomischen DNA der verschiedenen LCLs ergab die vorhergesagten Signale von 815bp für 2089 LCLs (Abb. 11B, Spur 5, 10, 12), von 909bp für EBNA-3A $\Delta$ 127-944 LCLs (Abb. 11B, Spur 6, 7, 11) und 569bp für  $\Delta$ EBNA-3A LCLs (Abb. 11B, Spur 8, 9, 13, 14).

A



B



**Abb. 11: Bestätigung des korrekten Virus-Genotyps der EBNA-3A negativen LCLs durch PCR-Analyse**

Abbildung A zeigt eine schematische Darstellung des untersuchten Genortes von 2089, EBNA-3A $\Delta$ 127-944 und  $\Delta$ EBNA-3A. Die Position der verwendeten Primer ist mit P1 bis P4 bezeichnet. Außerdem sind die zu erwartenden Fragmente mit den jeweiligen Größen eingezeichnet.

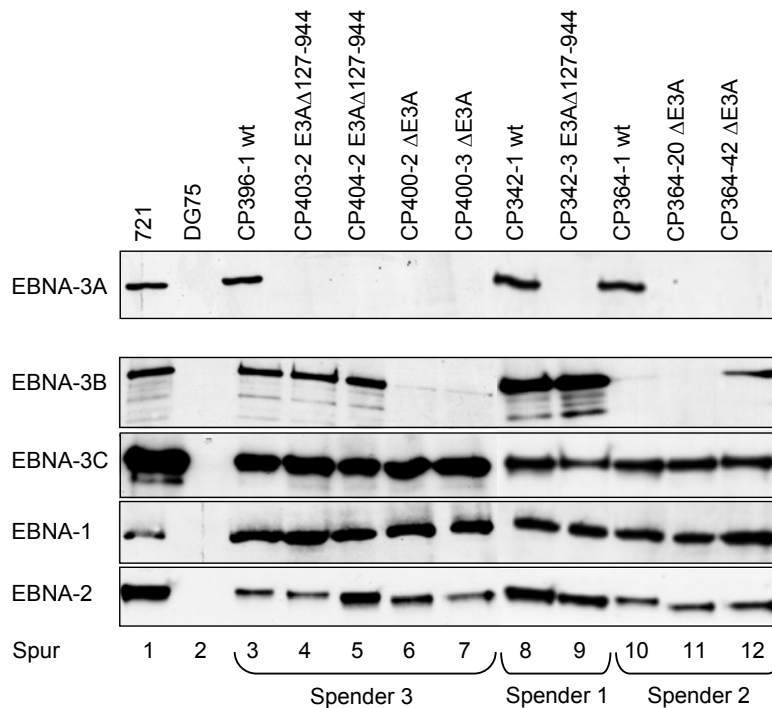
(B) In der PCR-Analyse wurden drei LCLs, die mit Wildtyp-Virus 2089 transformiert wurden (CP396-1, Spur 5; CP342-1, Spur 10; CP364-1, Spur 12), drei LCLs, die mit EBNA-3A $\Delta$ 127-944 Virus infiziert wurden (CP403-2, Spur 6; CP404-2, Spur 7; CP342-3, Spur 11) und vier LCLs, die mit  $\Delta$ EBNA-3A Virus transformiert wurden (CP400-2, Spur 8; CP400-3, Spur 9; CP364-20, Spur 13; CP364-42, Spur 14), untersucht. Als Kontrolle wurde genomische DNA aus virusproduzierenden HEK293-Zelllinien (293/2089, Spur 2; 293/EBNA-3A $\Delta$ 127-944, Spur 3; 293/ $\Delta$ EBNA-3A, Spur 4) zur Amplifikation verwendet. Die PCR-Amplifikate wurden auf einem 1%igem Agarosegel aufgetrennt. Gezeigt wird die invertierte Ethidiumbromidfärbung.

#### 4.1.6.1 Western-Blot-Analysen der EBNA-Proteine

LCLs, die durch Infektion von primären B-Zellen mit 2089 EBV oder B95.8 generiert wurden, exprimieren ein virales Genexpressionsmuster, das auch mit Latenz III bezeichnet wird. Die Expression der EBNAs wird vom C-Promotor kontrolliert, der,

wie in der Einleitung beschrieben, von EBNA-2 über das zelluläre Adapterprotein CBF-1 aktiviert wird. Die EBNA-3 Proteine können wie EBNA-2 CBF-1 binden, reprimieren dann jedoch den C-Promotor. Es war daher nahe liegend zu untersuchen, ob EBNA-3A negative LCLs veränderte EBNA-Expressionsmuster zeigen. Zu diesem Zweck wurden Western-Blot-Analysen mit spezifischen, gegen latente EBV-Proteine gerichteten Antikörpern, durchgeführt (Abb. 12).

**A**



**Abb. 12: Expression der EBNAs in EBNA-3A negativen LCLs**

Die etablierten EBNA-3A negativen LCLs (E3A $\Delta$ 127-944 und  $\Delta$ E3A) wurden auf Expression von EBNA-3A, -3B, -3C, EBNA-1 und EBNA-2 untersucht und mit den LCLs, die mit Wildtyp-Virus 2089 transformiert wurden, verglichen. In einem 8%igen Polyacrylamidgel wurden jeweils 50 $\mu$ g Proteinlysate aufgetrennt und mit den spezifischen Antikörpern EBNA-1 (1H4), EBNA-2 (R3), EBNA-3A (Zytomed), EBNA-3B (6C9) und EBNA-3C (Zytomed) nachgewiesen. Als Positivkontrolle diente die mit B95.8 transformierte Zelllinie 712, als Negativkontrolle die EBV negative Zelllinie DG75.

Es zeigte sich, dass alle EBNA-3A negativen LCLs (EBNA-3A $\Delta$ 127-944 und  $\Delta$ EBNA-3A) alle EBNAs exprimieren und das gleiche Expressionsmuster mit vergleichbaren Mengen zu LCLs, die mit Wildtyp-Virus 2089 transformiert worden waren, aufweisen. Die einzige Ausnahme stellt EBNA-3B dar, das in vier der EBNA-3A negativen LCLs (Abb. 12 Spur 6, 7, 11 und B Spur 4) und in einer der LCLs, die mit Wildtyp-Virus 2089 transformiert wurde (Abb. 12 Spur 10), nicht exprimiert wird. Da EBNA-3B in der Literatur bereits als nicht essentiell beschrieben ist, war dieser Befund nicht völlig unerwartet (Chen et al., 2005). Es besteht allerdings keine Korrelation zwischen der

EBNA-3A Deletion und der EBNA-3B Expression. Auch in natürlich vorkommenden EBV Isolaten sind EBNA-3B Deletionen zu beobachten (Gottschalk et al., 2001). Das gemeinsame Auftreten von EBNA-3A- und EBNA-3B-Deletion, in den hier etablierten LCLs, erfolgte zufällig. Es zeigte aber, dass sogar LCLs mit der Doppeldeletion  $\Delta$ EBNA-3A und  $\Delta$ EBNA-3B lebensfähig sind.

#### 4.1.6.2 Western-Blot- und Northern-Blot-Analyse der LMP-1 Expression

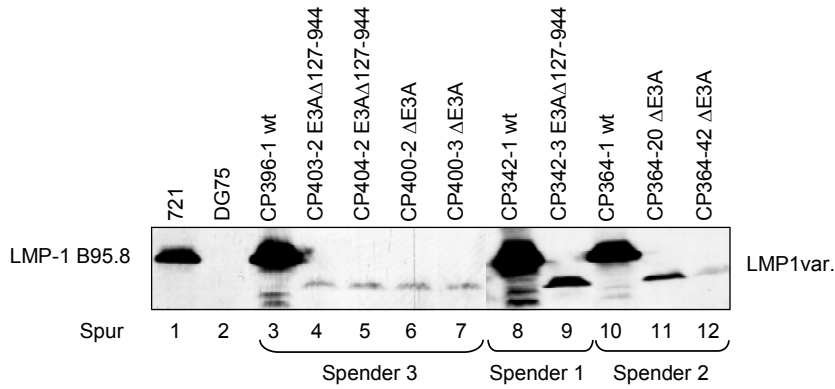
Die Western-Blot-Analyse der LMP-1 Expression in EBNA-3A negativen LCLs führte zu unerwarteten Ergebnissen. Sowohl die  $\Delta$ EBNA-3A, als auch die EBNA-3A $\Delta$ 127-944 LCLs exprimieren ein LMP-1 mit einer höheren Mobilität in der Elektrophorese. Im Vergleich zu mit 2089 transformierten LCLs war dieses variante LMP-1 auch deutlich weniger abundant (Abb. 13A). Die Northern-Blot-Analyse der LMP-1 Transkripte ergab, dass die LMP-1 RNA von EBNA-3A positiven und negativen LCLs vergleichbar stark exprimiert war. Die LMP-1 Transkripte der EBNA-3A negativen LCLs waren jedoch verkürzt (Abb. 13B).

Es war daher nahe liegend anzunehmen, dass das variante LMP-1 der Mutanten eine geringere Stabilität aufweist. Bekannt war, dass das LMP-1 Gen Sequenzwiederholungen aufweist, die instabil sind und auch in Wildtyp-Isolaten zum Teil stark variieren und spontan deletieren können. Da von einer 5x33bp Region bekannt ist, dass sie besonders instabil ist, wurde diese Region in den Maxi-EBV Plasmiden p2089, pBe714 und pBe715 einer PCR-Analyse unterzogen (Abb. 13C). Zudem wurde diese Region sequenziert (Abb. 14). Beide Untersuchungen zeigen übereinstimmend, dass die Maxi-EBV Plasmide pBe714 und pBe715 eine Deletion in der 5x33bp Region aufweisen. Betroffen sind die AS269-307.

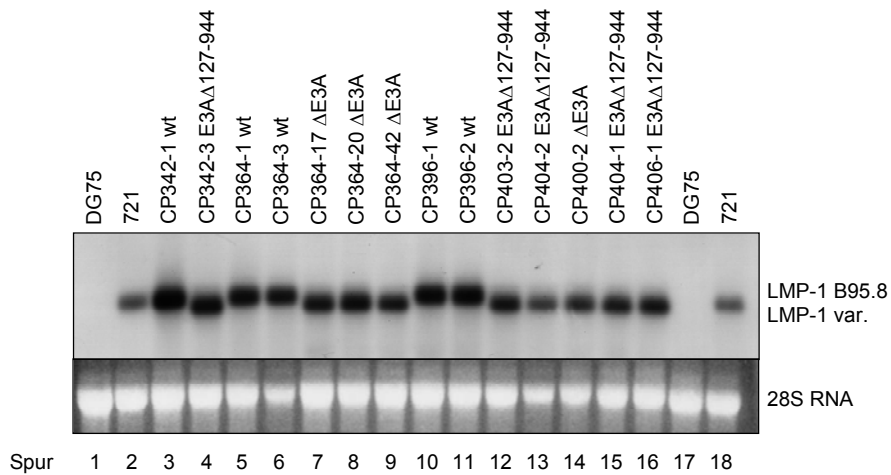
Diese Region des LMP-1 Proteins wurde bereits mehrfach auf ihre Bedeutung für die B-Zellimmortalisierung untersucht ist (Dirmeier et al., 2003; Higuchi et al., 2002). Beide Untersuchungen zeigen übereinstimmend, dass die Deletion dieser Sequenzwiederholungen keinen Einfluss auf die Immortalisierungseffizienz hat.

Die Ergebnisse der Sequenzierung der Maxi-EBV Plasmide pBe714/pBe715 sind in Abb. 14A in einem Alignment der Sequenz von p2089 gegenübergestellt. Abb. 14B fasst diese Ergebnisse zusammen.

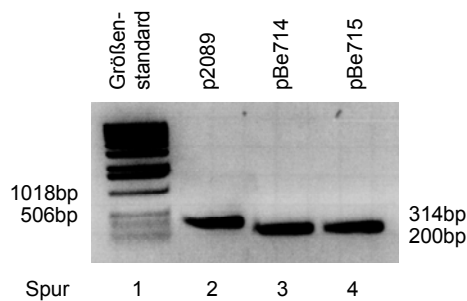
**A**



**B**



**C**

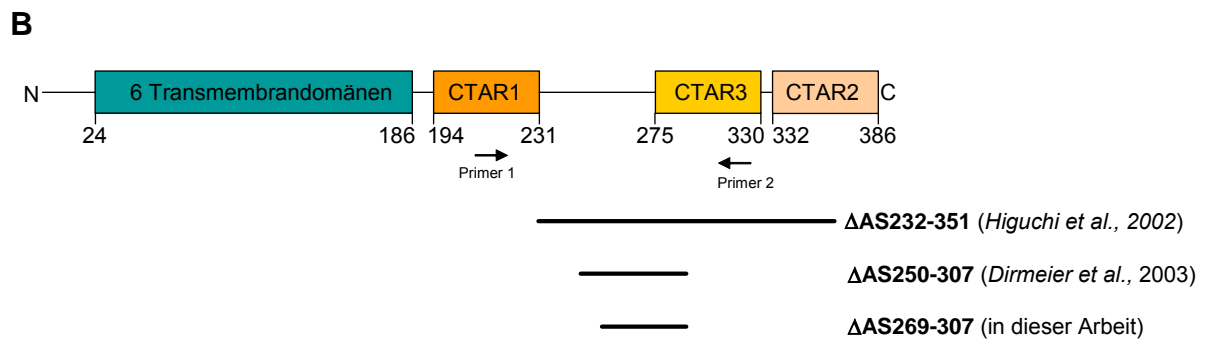
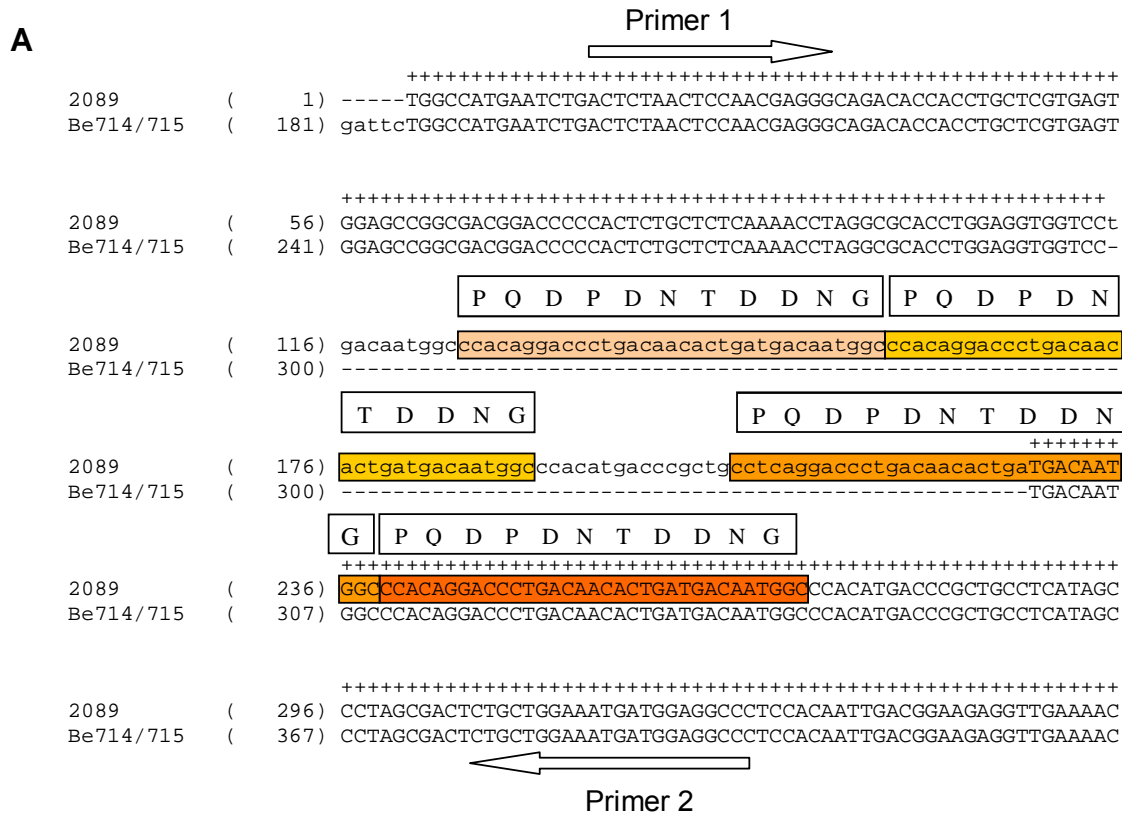


**Abb. 13: LMP-1 Expression in EBNA-3A negativen LCLs (E3AΔ127-944 und ΔE3A)**

(A) In einem 8%igem Polyacrylamidgel wurden jeweils 50µg gesamtzelluläres Proteinlysate aus LCLs von drei verschiedenen Spendern aufgetrennt und LMP-1 mit dem spezifischen Antikörper LMP-1 G3-6 detektiert. Das Molekulargewicht von LMP-1 beträgt 63kD. Als Positivkontrolle diente die mit B95.8 transformierte Zelllinie 721, als Negativkontrolle die EBV negative Zelllinie DG75.

(B) 5µg gesamtzelluläre RNA der mit Wildtypvirus 2089 transformierten LCLs und der etablierten EBNA-3A negativen LCLs wurden im Northern-Blot auf ihre LMP-1 RNA Expression untersucht. Dazu wurde die RNA in einem 1,2%igem Formaldehydgel aufgetrennt, auf Hybond-N<sup>+</sup>-Membran gebロットet und mit der Digoxigenin-markierten LMP-1 Sonde detektiert. Als Sonde zur Detektion der LMP-1 RNA wurde eine LMP-1 cDNA eingesetzt. Die Sonde wurde aus dem Plasmid p432 mit M13 Primern amplifiziert und mit Digoxigenin markiert. Die 28S rRNA diente als Kontrolle für die gleichmäßige Beladung der Spuren mit RNA.

(C) Zur Überprüfung der 5x33bp repeat Region wurde eine PCR-Analyse durchgeführt. Als Template wurde Maxi-EBV DNA der Plasmide p2089, pBe714 und pBe715 verwendet.



**Abb. 14: Ergebnis der Sequenzierungsanalyse des LMP-1 Gens**

(A) Zur genaueren Beurteilung der LMP-1 Deletion wurde eine Sequenzierung der EBNA-3A negativen Maxi-EBV DNAs durchgeführt. In einem Alignment wurden die durch die Sequenzierung ermittelten Sequenzen der LMP-1 Region in pBe714/715 mit den entsprechenden LMP-1 Sequenzen in 2089 und 2319 verglichen. In der Abbildung sind zusätzlich die sich wiederholenden 33bp gekennzeichnet, die für das AS-Motif PQDPDNTDDNG kodieren. Das LMP-1 vom Prototyp B95.8 enthält vier der fünf sich wiederholenden 11AS repeats.

(B) Das LMP-1 Molekül kodiert für einen offenen Leserahmen mit einem N-terminalen Teil (24AS), sechs Transmembrandomänen (161AS) und einem C-terminalen Teil (200AS). Der C-terminale Bereich besteht aus drei C-terminalen Aktivierungsregionen (CTAR). In den EBNA-3A negativen LCLs die mit Be714 oder Be715 generiert wurden, sind die AS269-307 im LMP-1 deletiert. Frühere Publikationen, in denen entweder die AS250-307 (*Dirmeier et al., 2002*) oder die AS232-351 (*Higuchi et al., 2002*) deletiert sind, konnten zeigen, dass die Immortalisierungseffizienz durch LMP-1 Deletion in dieser Region nicht beeinträchtigt ist. In allen drei Mutationen ist die 5x33bp repeat Region betroffen. Die Position der Primer, mit denen die 5x33bp repeat Region in der PCR-Analyse überprüft wurde, ist angegeben.

---

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die  $\Delta$ EBNA-3A LCLs von drei verschiedenen Spendern eine Variante des LMP-1 Gens exprimieren, die verkürzt ist und in der Zelle in sehr viel geringerer Menge vorliegt, als das vom Prototyp B95.8 exprimierte LMP-1.

#### **4.1.6.3 Generierung von EBNA-3A negativen LCLs, die ein LMP-1 Protein vom Typ B95.8 exprimieren**

Wie bereits im vorherigen Kapitel beschrieben, weisen die beiden EBNA-3A Virusmutanten (Be714 und Be715) eine weitere Alteration des viralen Genoms im Vergleich zum Kontrollstamm 2089 auf. Innerhalb des Gens für das virale LMP1 Gen, war es zum Verlust von fast 3 der 4 Sequenzwiederholungssegmenten gekommen. Interne Sequenzwiederholungen gehören zu den charakteristischen Merkmalen aller herpesviralen Genome und Varianten werden auch in natürlich vorkommenden EBV Isolaten gefunden. Sie sind Gegenstand zahlreicher wissenschaftlicher Untersuchungen, stellen aber auch ein immer wiederkehrendes technisches Problem in der molekulargenetischen Analyse der Herpesviren dar. Die in diesem Fall aufgetretene Variation ist eine Deletion, die kleiner ist, als in der Literatur bereits beschriebene Varianten (Li and Chang, 2003). In einigen Fällen ist die 5x33bp repeat Region im LMP-1 Gen von der Deletion betroffen. Die Ergebnisse funktioneller Studien zeigen, dass die Deletion dieser Repetitionseinheit keinen Einfluss auf die Immortalisierungseffizienz der Viren hat (Dirmeier et al., 2003; Higuchi et al., 2002). Um dennoch jeglichen Beitrag der LMP1 Variation auf die Untersuchungen des EBNA-3A Gens auszuschließen, wurde im Verlauf dieser Arbeit noch ein weiteres Paar von EBNA-3A Maxi-EBV Mutanten (CP481 und CP482) hergestellt, die die EBNA-3A Mutation im viralen Kontext des 2089 EBV Genoms tragen, d.h. hier liegt das LMP-1 aus dem B95.8 Stamm vor. Um einen Überblick über die verschiedenen Maxi-EBV Plasmide zu geben ist, die Nomenklatur der in dieser Arbeit verwendeten Maxi-EBV Plasmide in Tabelle 3 erläutert.

Maxi-EBV Plasmid	EBNA-3A	LMP-1
p2319	B95.8	$\Delta$ 33bp
Be 714	$\Delta$ 127-944	$\Delta$ 33bp
Be 715	$\Delta$ E3A	$\Delta$ 33bp
p2089	B95.8	B95.8
CP481	$\Delta$ 127-944	B95.8
CP482	$\Delta$ E3A	B95.8

**Tabelle 3: Nomenklatur der in dieser Dissertation verwendeten Maxi-EBV Plasmide**

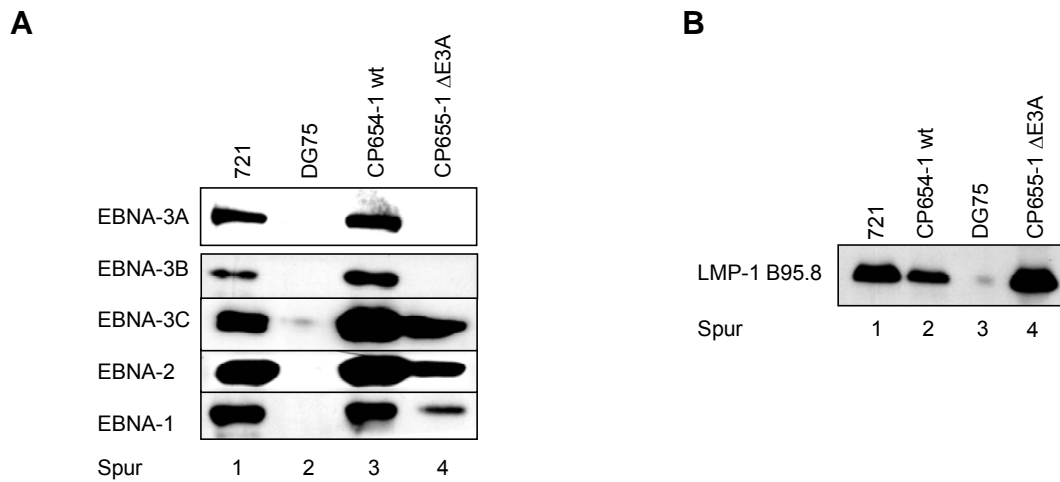
Aufgelistet ist der jeweilige Name der benutzten Maxi-EBV-Plasmide. Außerdem ist erläutert, welches EBNA-3A (B95.8,  $\Delta$ 127-944 oder  $\Delta$ ) und welches LMP-1 (B95.8 oder 33bp Variante) diese Plasmide tragen.

Der Restriktionsverdau der neu generierten Maxi-EBVs CP481 und CP482 unterscheidet sich nicht vom Restriktionsverdau der Maxi-EBVs Be714 und Be715, der bereits in Abbildung 5 auf Seite 4 gezeigt wurde. Da die Variation im LMP-1 Gen keinen Unterschied im Bandenmuster beim Restriktionsverdau mit *Bam*HI bzw. *Bgl*II ergibt, ist der Verdau nicht noch einmal dargestellt. Als Kontrollstamm mit LMP-1 33bp Deletion wurde das Plasmid 2319 (Dirmeier et al., 2003) verwendet.

Im weiteren Verlauf der Arbeit war es möglich eine EBNA-3A negative LCL mit einem LMP-1 vom Typ B95.8 zu generieren (CP655-1). Bei dieser LCL handelt es sich um eine Doppelmutante, die sowohl für EBNA-3A, als auch für EBNA-3B deletiert ist. Dies konnte im Western-Blot nachgewiesen werden (Abb. 15A: Spur 4). Ob es tatsächlich Unterschiede in der Expression der latenten Gene gibt, wie sie in Abb. 15 zu erkennen sind, oder ob diese auf unterschiedlichen geladenen Mengen beruhen, muss erst noch geklärt werden.

Die Expression des B95.8 LMP-1 in dieser neuen EBNA-3A negativen LCL konnte im Western-Blot bestätigt werden. Im Vergleich zur LCL CP654-1, die mit Wildtyp-Virus 2089 transformiert wurde, ist das LMP-1 Expressionsniveau leicht erhöht.





**Abb. 15: Analyse der Expression latenter Gene der  $\Delta$ EBNA-3A LCL CP655-1 im Western-Blot**

Zur Analyse der latenten Genexpression in der EBNA-3A negativen LCL CP655-1 ( $\Delta$ E3A) im Vergleich zur LCL, die mit Wildtypvirus 2089 transformiert wurde, wurden 50 $\mu$ g gesamtzelluläres Proteinlysate in einem 8%igem SDS-PAGE aufgetrennt. Als Positivkontrolle diente die mit B95.8 transformierte Zelllinie 721, als Negativkontrolle die EBV negative Zelllinie DG75.

(A) Die Immundetektion der EBNA-s erfolgte durch die spezifischen Antikörper EBNA-1 1H4, EBNA-2 R3, EBNA-3A von Zytomed, EBNA-3B 6C9 und EBNA-3C von Zytomed.

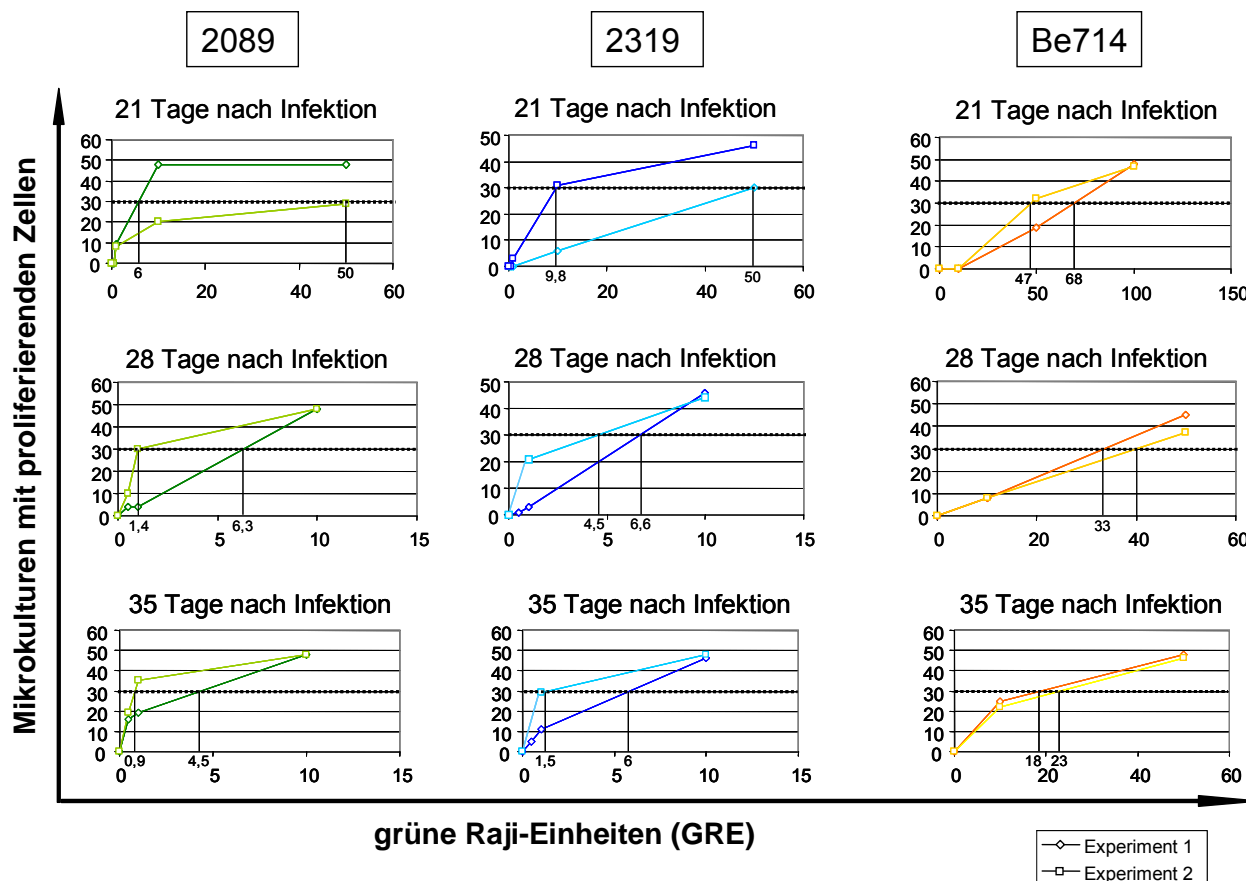
(B) Die Immundetektion von LMP-1 erfolgte durch den spezifischen Antikörper LMP-1 1G3-6.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Etablierung von EBNA-3A negativen LCLs im Kontext der 33bp LMP-1 Variante keine Probleme darstellte. Jedoch bei Verwendung der EBNA-3A negativen Viren im Kontext des B95.8 LMP-1, war es sehr schwierig erneut Klone zu etablieren und es existiert nur eine EBNA-3A negative LCL mit B95.8 LMP-1. Es konnte damit aber gezeigt werden, dass es im Prinzip möglich ist, auch EBNA-3A negative LCLs im Kontext des B95.8 LMP-1 zu etablieren. Aus Zeitgründen konnte diese Konstellation nicht mehr erschöpfend charakterisiert werden.

#### 4.1.6.4 Bestimmung der Immortalisierungseffizienzen der EBNA-3A negativen Viren durch Grenzverdünnungsanalysen

Um die Immortalisierungseffizienz der EBNA-3A negativen Viren quantitativ zu ermitteln, wurden Grenzverdünnungsanalysen durchgeführt. Dazu wurden B-Zellmikrokulturen (100000 Zellen/Mikrokultur) in Gruppen ausgesät und mit sinkenden Konzentrationen von infektiösen Viruspartikeln (GREs) infiziert. Die Auswertung erfolgte, indem nach 21, 28 und 35 Tagen die Frequenz der wachsenden Kulturen pro Gruppe ermittelt wurde. Zur Analyse der EBNA-3A negativen Viren, die ein variantes LMP-1 exprimieren, wurden als Vergleichsstämme zwei rekombinante Viren heran-

gezogen. 2089 mit einem LMP-1 Protein vom Typ B95.8 und 2391 mit einer Deletion in der 33bp-Region. Abbildung 16 zeigt die Ergebnisse der Untersuchungen, Tabelle 4 fasst sie zusammen. Zur Auswertung wurde die Zahl der infektiösen Viruspartikel gegen die Zahl der wachsenden Mikrokulturen aus einer Gruppe von 48 Einzelkulturen aufgetragen.



**Abb. 16: Immortalisierungseffizienzen der rekombinanten Viren Wildtyp 2089, EBNA-3A $\Delta$ 127-944 und 2319**

Die Bestimmung der Immortalisierungseffizienzen erfolgte aus zwei Experimenten, die mit B-Zellen unterschiedlicher Spender durchgeführt wurden. Die bewachsenen Mikrokulturen jeder Verdünnungsstufe in einem Experiment wurden gegen die Zahl der eingesetzten Raji-Einheiten aufgetragen. Die Immortalisierungseffizienz eines jeden einzelnen Experiments wurde durch Fällen des Schnittpunktes der Kurve mit der 30 Mikrokulturen-Linie (entspricht 63% der Kulturen) auf die X-Achse ermittelt. Die Immortalisierungseffizienz der rekombinanten Viren wird als Mittelwert der zwei Einzelexperimente definiert und beträgt für das Wildtyp-Virus 2089 35 Tage nach Infektion 2,7GRE, für das Virus 2319 3,75GRE und für das EBNA-3A $\Delta$ 127-944 21GRE. Die angegebene Anzahl an GRE entspricht der Anzahl, die benötigt wird, um einen lymphoblastoiden Zellklon zu erhalten.

Exp.	Virus	EBNA-3A	LMP-1	Zahl benötigter GRE		
				Tag 21	Tag 28	Tag 35
1	2089	B95.8	B95.8	6	6,3	4,5
2	2089	B95.8	B95.8	50	1,4	0,9
1	2319	B95.8	Δ33bp	9,8	6,6	6
2	2319	B95.8	Δ33bp	50	4,5	1,5
1	Be714	Δ127-944	Δ33bp	68	33	18
2	Be714	Δ127-944	Δ33bp	47	40	23
1	CP482	/	B95.8	0	0	0
2	CP482	/	B95.8	0	0	0

**Tabelle 4: Übersicht der Grenzverdünnungsanalysen unter Verwendung von Wildtyp-Virus 2089, 2319 (LMP-1Δ33bp) Virus, Be714 (EBNA-3AΔ127-944) Virus und CP482 (ΔEBNA-3A) Virus**

Zusammengefasst sind die beiden Grenzverdünnungsanalysen zur Bestimmung der Immortalisierungseffizienzen von EBNA-3AΔ127-944 und ΔEBNA-3A Virus im Vergleich zu Wildtyp-Virus 2089 und 2319 Virus. Aufgelistet sind die jeweils verwendeten Viren und ihre EBNA-3A und LMP-1 Konstellation. Außerdem ist die Anzahl der benötigten GRE, um einen Zellklon zu erhalten, angegeben. Die Auswertung erfolgte an Tag 21, 28 und 35 nach Infektion. Es wurden jeweils die Mittelwerte aus den beiden Einzelexperimenten gebildet.

Die Bestimmung der Immortalisierungseffizienz erfolgte anhand der Zahl von Viruspartikeln, die für die Etablierung eines Einzelklons benötigt wird. Dies ist dann der Fall, wenn bei einer Verdünnungsstufe höchstens 63%, also 60 von 96 Mikrokulturen einer 96-Loch-Platte (bzw. 30 von 48 Mikrokulturen einer halben 96-Loch-Platte) proliferierende Zellen enthalten.

Folgende Ergebnisse wurden erzielt: für das Wildtyp-Virus 2089 ergab sich 35 Tage nach Infektion ein Mittelwert von 2,7GRE, um eine lymphoblastoide Zelllinie zu erhalten, für das Virus 2319 ein Mittelwert von 3,75GRE und für EBNA-3AΔ127-944 ein Wert von 21GRE. In zwei Einzelexperimenten konnten die Ergebnisse reproduziert werden. Vergleicht man das EBNA-3AΔ127-944 Virus mit dem 2319 Virus kann man eine Verringerung der Immortalisierungseffizienz um einen Faktor von 3-15 erkennen, d.h. der Unterschied zwischen EBNA-3A positivem und EBNA-3A negativem Virus ist sehr gering. Verglichen wird hier mit dem Virus 2319, da dieses Virus, wie auch das EBNA-3AΔ127-944 das variante LMP-1 enthält.

---

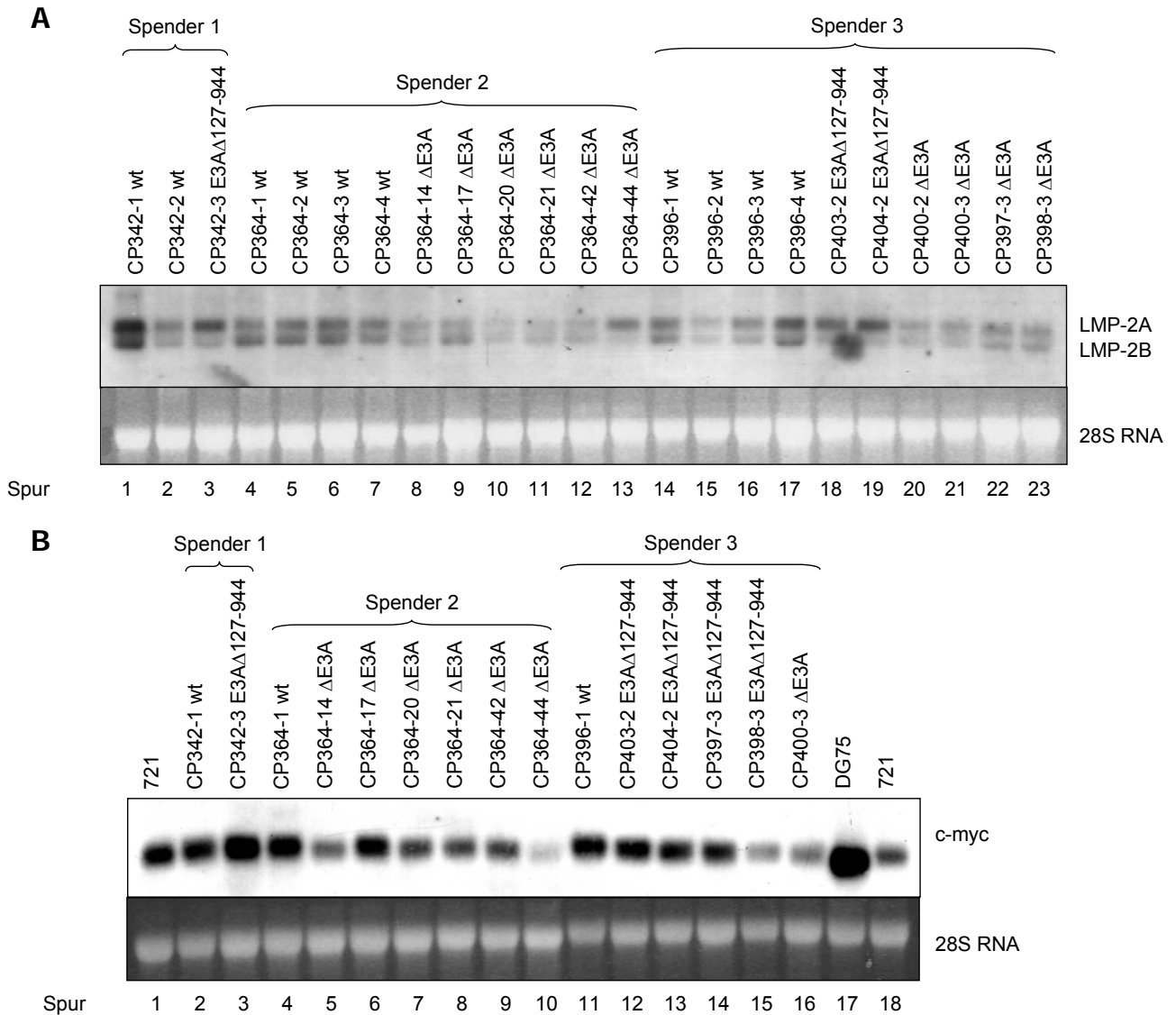
Obwohl es gelungen war eine EBNA-3A negative LCL zu etablieren, die das LMP-1 Protein vom Typ B95.8 exprimieren, verliefen die Analysen zur Immortalisierungseffizienz erfolglos und konnten aus Zeitgründen nicht wiederholt werden.

#### **4.1.6.5 Einfluss der EBNA-3A Deletion auf die Expression von LMP-2A/B und c-myc**

EBNA-2 ist zusammen mit EBNA-LP das erste virale Gen, das nach der Infektion von primären B-Zellen exprimiert wird. Beide Gene koaktivieren zelluläre und virale Promotoren, unter anderem auch die LMP-Promotoren. EBNA-2 assoziiert mit dem sequenzspezifischen DNA Bindeprotein CBF-1 und aktiviert Promotoren, die eine CBF-1 Bindestelle enthalten. Auch die EBNA-3 Proteine assoziieren mit CBF-1, kompetieren jedoch mit EBNA-2. LMP-1 und c-myc sind EBNA-2 Zielgene. Um zu prüfen, ob auch EBNA-3A die Expression von LMP-2 und c-myc reguliert, wurden Northern-Blot-Analysen durchgeführt. Dazu wurden LCLs dreier Spender, die entweder mit dem Wildtyp-Virus 2089 oder den EBNA-3A negativen Viren infiziert wurden, bezüglich ihrer LMP-2A/B und c-myc RNA miteinander verglichen. Zur Detektion von LMP-2A/B wurde eine LMP-2A c-DNA eingesetzt. Diese Sonde erkennt auch LMP-2B, so dass eine Doppelbande detektiert werden kann. Die Signalstärke für beide Transkripte variiert relativ stark (Abb. 17A). Auch das Verhältnis der Signale von LMP-2A zu LMP-2B ist nicht konstant. Weder die absoluten noch relativen Transkriptmengen korrelieren jedoch mit dem EBNA-3A Status der Zellen.

Auch bei der c-myc-Expression lässt sich keine Korrelation von EBNA-3A Status und Veränderung der c-myc Transkriptlevels erkennen. Es gibt sowohl EBNA-3A negative LCLs, die im Vergleich zu mit Wildtyp-Virus 2089 transformierten LCLs gleiche Mengen an c-myc exprimieren (Abb. 17B: Spur 6, 12, 13, 14), als auch EBNA-3A negative LCLs, die geringfügig oder drastisch weniger c-myc exprimieren (Abb. 17B: Spur 5, 7, 8, 9, 10, 15, 16). Eine der EBNA-3A negativen LCLs (CP342-3) exprimiert mehr c-myc im Vergleich zur dazugehörigen vom selben Spender stammenden LCL CP342-1, die mit Wildtyp-Virus 2089 transformiert wurde.

Es lässt sich also weder für die LMP-2A-, noch für die c-myc-Expression, beim Vergleich von LCLs, die mit Wildtyp-Virus 2089 transformiert wurden und EBNA-3A negativen LCLs, eine eindeutige Korrelation von EBNA-3A Status und Expressionsniveau beobachten.



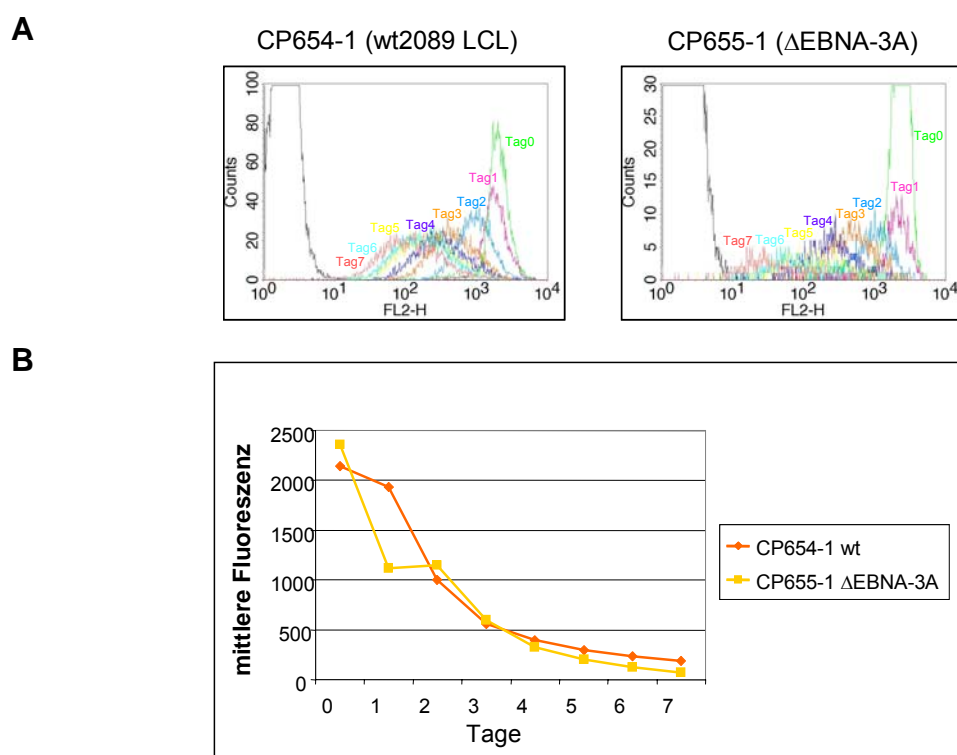
**Abb. 17: Northern-Blot zum Nachweis der LMP-2A/B und c-myc Expression in EBNA-3A negativen LCLs**

In Abbildung A und B wurden jeweils 5 $\mu$ g gesamtzelluläre RNA, der etablierten EBNA-3A negativen LCLs (E3A $\Delta$ 127-944 und  $\Delta$ E3A) und der LCLs, die mit 2089 transformiert wurden, in einem 1,2%igem Formaldehydgel aufgetrennt, auf Hybond-N<sup>+</sup>-Membran geblotet und mit den Digoxigenin-markierten LMP-2A und myc-Sonden detektiert. Die Sonden wurden aus dem Plasmid pUC19, das entweder den ORF von LMP-2A oder c-myc enthält, mit M13 Primern amplifiziert und mit Digoxigenin markiert. Betrachtet werden LCLs aus drei verschiedenen Spendern und verglichen werden jeweils LCLs, die mit Wildtyp-Virus 2089 infiziert wurden, und EBNA-3A negative LCLs. Als Ladekontrolle ist eine Ethidiumbromidfärbung der 28S RNA gezeigt.

#### 4.1.6.6 Zellteilungsrate und Viabilität der EBNA-3A negativen LCLs

Bereits in der Routinezellkultur war deutlich zu erkennen, dass EBNA-3A negative LCLs im Vergleich zu Wildtyp 2089 LCLs schwieriger zu expandieren waren. Für diese Beobachtung gibt es zwei mögliche Ursachen. Zum einen ist es möglich, dass der Zellzyklus verlängert und damit die Zellteilungsrate reduziert ist, zum anderen ist es auch denkbar, dass die Viabilität eingeschränkt ist. Um diese Möglichkeiten zu

untersuchen, wurde zunächst die Zellteilungsrate bestimmt. Mit Hilfe des roten Farbstoffes PKH26, der in die Zellmembran integriert wird, wurden die LCLs an Tag 0 gefärbt und die mittlere Fluoreszenz an den Tagen 0 bis 7 im FACS verfolgt. Da sich nach jeder Zellteilung die Intensität der Fluoreszenz halbiert, kann die Anzahl der Teilungen im FACS verfolgt werden. Verglichen wurde eine mit Wildtyp-Virus 2089 transformierte LCL mit einer EBNA-3A negativen LCL, die das B95.8 LMP-1 trägt. Mit Hilfe dieses Experimentes konnte deutlich gezeigt werden, dass die Zellteilungsrate der EBNA-3A negativen LCL im Vergleich zur LCL, die mit Wildtyp-Virus 2089 transformiert wurde, nicht verändert ist (Abb. 18).



**Abb. 18: Bestimmung der Teilungsrate der ΔEBNA-3A LCL**

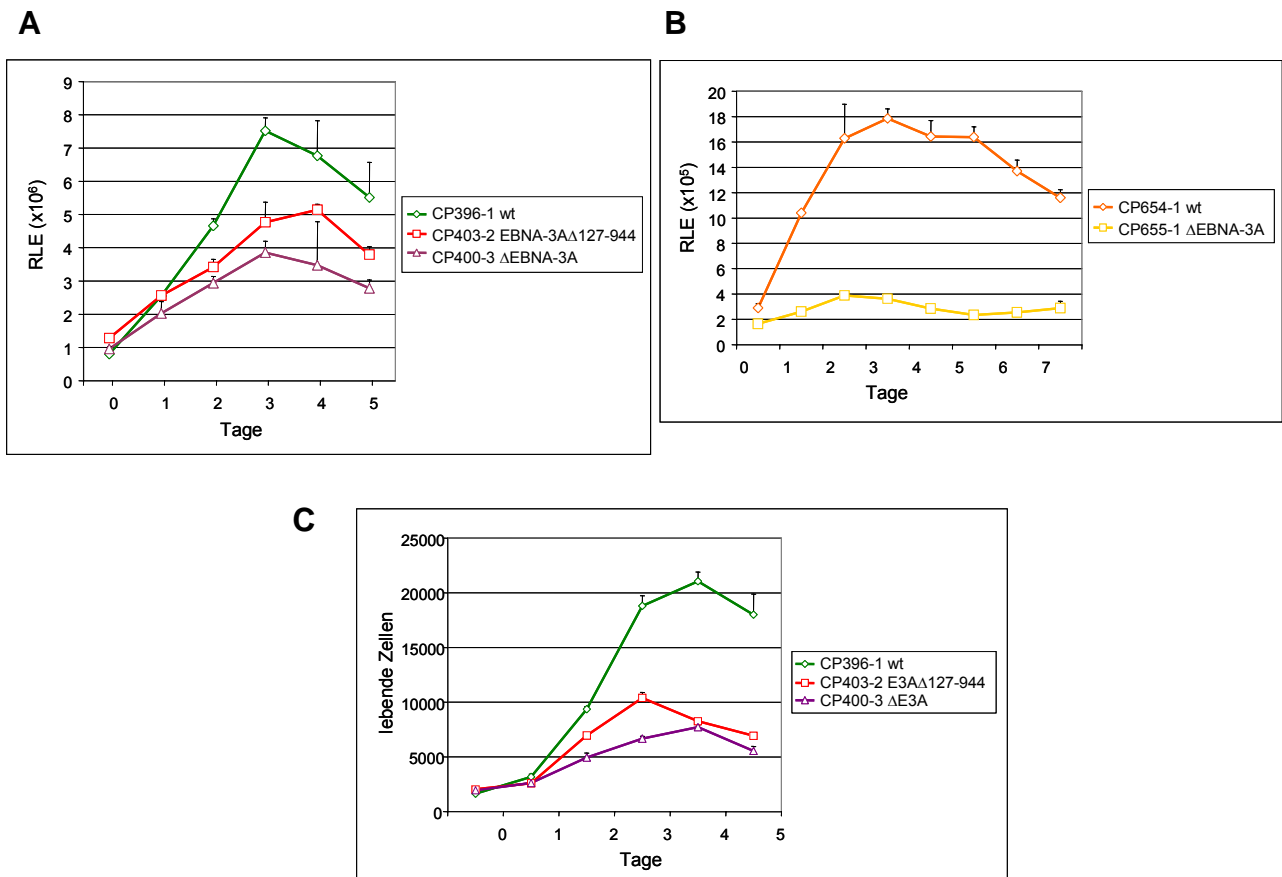
Zur Bestimmung der Teilungsrate der ΔEBNA-3A LCL CP655-1 wurden an Tag 0  $2 \times 10^5$  Zellen/ml mit PKH26 gefärbt und als 100µl Kulturen in einer 96-Loch-Platte ausgesät. Der Farbstoff PKH26 integriert sich in die Membran und wird nach jeder Zellteilung auf die beiden Tochterzellen verteilt, so dass nach jeder Zellteilung nur noch halb soviel Farbstoff in der Membran vorhanden ist. Dieser Verlauf kann im FACS beobachtet werden. Dargestellt ist jeweils ein repräsentatives (A) Histogramm für die mit Wildtyp-Virus 2089 transformierte LCL CP654-1 und die ΔEBNA-3A LCL CP655-1, als auch ein (B) Diagramm, in dem die mittlere Fluoreszenz der Triplikate aufgetragen ist. Die Zellen wurden an den Tagen 0 bis 7 im FACS als Triplikate analysiert.

Zur Beurteilung der Viabilität der EBNA-3A negativen LCLs wurde mit Hilfe des „CellTiter-Glo® Luminescent cell viability assay“ die intrazelluläre Menge an ATP gemessen, da diese mit lebenden metabolisch aktiven Zellen korreliert. Es wurden

---

$2 \times 10^5$  Zellen/ml in einer 96-Loch-Platte als 100 $\mu$ l Kulturen ausplattiert und an den Tagen 0 bis 5 bzw. 7 nach Aussaat geerntet. Verglichen wurde eine LCL, die mit Wildtyp-Virus 2089 transformiert worden ist (CP396-1) mit einer EBNA-3A $\Delta$ 127-944 LCL (CP403-2) und einer  $\Delta$ EBNA-3A LCL (CP400-3), die von einem Spender stammen. Die beiden EBNA-3A negativen LCLs exprimieren das variante LMP-1. Außerdem wurden eine mit Wildtyp-Virus 2089 transformierte LCL (CP654-1) und eine EBNA-3A negative LCL, die beide das B95.8 LMP-1 exprimieren und ebenfalls von einem Spender stammen, miteinander verglichen. Unmittelbar nach Aussaat der Zellen gibt es keinen Unterschied im ATP-Gehalt zwischen EBNA-3A positiven und EBNA-3A negativen LCLs. Nach Expansion der Kulturen über einen Zeitraum von 0 bis 7 Tagen, zeigt sich eine sehr viel geringere Anreicherung an ATP in den EBNA-3A negativen Kulturen, die durch das schlechtere Wachstum der EBNA-3A negativen im Vergleich zu EBNA-3A positiven Kulturen zu erklären ist. Alle EBNA-3A negativen LCLs zeigen im Vergleich zu den jeweiligen mit Wildtyp-Virus 2089 transformierten LCLs eine verminderte Viabilität (Abb. 19A und B).

Da nicht ausgeschlossen werden kann, dass EBNA-3A eventuell den ATP-Stoffwechsel beeinflusst, wurde zur Absicherung des gerade beschriebenen Ergebnisses, auch die Lebendzellzahl im FACS bestimmt. Es wurden  $2 \times 10^5$  Zellen/ml als 100 $\mu$ l Kulturen an Tag 0 ausplattiert und an den Tagen 0 bis 5 zur Auswertung im FACS geerntet. In diesem Experiment konnte das Ergebnis aus dem „CellTiter-Glo<sup>®</sup> Luminescent cell viability assay“ bestätigt werden. Die EBNA-3A negativen LCLs weisen im Vergleich zur mit Wildtyp-Virus 2089 transformierten LCL eine verminderte Viabilität auf (Abb. 19C).



**Abb. 19: Bestimmung der Viabilität der EBNA-3AΔ127-944 bzw. ΔEBNA-3A LCLs**

Zur Bestimmung der Viabilität wurden eine mit Wildtyp-Virus 2089 transformierte LCL (CP396-1) mit einer EBNA-3AΔ127-944-LCL (CP403-2) bzw. einer ΔEBNA-3A-LCL (CP400-3), die ein variantes LMP-1 exprimieren, verglichen und eine mit Wildtyp-Virus 2089 transformierte LCL (CP654-1) wurde mit einer ΔEBNA-3A-LCL, die das B95.8-LMP-1 exprimiert, verglichen. Dabei wurden  $2 \times 10^5$  Zellen/ml in einem Kulturvolumen von 100µl in einer 96-Loch-Platte ausplattiert und jeden Tag geerntet. (A und B) Die intrazelluläre ATP-Konzentration als Maß für metabolisch aktive Zellen wurde an den Tagen 0 bis 7 jeweils in Triplikaten als relative Lichteinheiten (RLE) im Luminometer gemessen. In den Diagrammen sind die Mittelwerte der Triplikate und die dazugehörigen Standardabweichungen dargestellt (Experiment A wurde von Frau Dr. Sabine Maier durchgeführt). (C) Die Lebendzellzahl der EBNA-3AΔ127-944 bzw. ΔEBNA-3A LCLs wurde in Triplikaten im FACS bestimmt. Graphisch dargestellt sind jeweils die Mittelwerte der Triplikate und die dazugehörigen Standardabweichungen (durchgeführt von Frau Dr. Sabine Maier).

#### 4.1.7 Identifizierung von EBNA-3A regulierten Genen mit der Affymetrix Chip-Technologie

Obwohl EBNA-3A in der Literatur sowohl als Transkriptionsaktivator, wie auch als Repressor beschrieben wird, ist bisher noch kein zelluläres Gen beschrieben, dass durch EBNA-3A reguliert wird.

Zur Identifizierung zellulärer EBNA-3A Zielgene war, von Frau Dr. Sabine Maier in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Jörg Mages, ein Affymetrix-Screen mit EBNA-3A



positiven und EBNA-3A negativen Zelllinien, die von mir etabliert worden waren, durchgeführt worden.

Mit dieser Methode ist es möglich die Expression sehr vieler verschiedener Transkripte parallel zu untersuchen. Dafür wird zunächst die isolierte Gesamt-RNA revers zu cDNA und anschließend durch *in vitro* Transkription in cRNA umgeschrieben und mit biotinyliertem UTP markiert. Die markierte Gesamt-cRNA wird auf einen Chip hybridisiert und mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern detektiert. Der Chip enthält Oligonukleotide komplementär zu den verschiedensten Transkripten, so genannte „Probesets“. Je stärker ein bestimmtes Transkript in einer Probe repräsentiert ist, desto stärker ist das Fluoreszenzsignal an der betreffenden Stelle des Chips. Durch Vergleich des Transkriptoms von Zellen mit definierten genetischen Merkmalen kann untersucht werden, welche Gene in diesen Zelllinien exprimiert werden.

Für den Affymetrix-Screen zur Suche nach EBNA-3A Zielgenen wurden Zelllinien von drei verschiedenen Spendern verwendet. Aus Spender 1 die Zelllinien CP342-1 (wt2089) und CP342-3 (EBNA-3A $\Delta$ 127-944), aus Spender 2 die Zelllinien CP364-1 (wt2089), CP364-3 (wt2089), CP364-17 ( $\Delta$ EBNA-3A), CP364-20 ( $\Delta$ EBNA-3A) und CP364-42 ( $\Delta$ EBNA-3A) und aus Spender 3 die Zelllinien CP396-1 (wt2089), CP396-2 (wt2089), CP400-2 ( $\Delta$ EBNA-3A), CP403-2 (EBNA-3A $\Delta$ 127-944), CP404-2 (EBNA-3A $\Delta$ 127-944), CP404-1 (EBNA-3A $\Delta$ 127-944), CP406-1 (EBNA-3A $\Delta$ 127-944). All diesen EBNA-3A negativen LCLs ist gemeinsam, dass sie das variante LMP-1 exprimieren, die mit Wildtyp-Virus 2089 transformierten LCLs exprimieren B95.8 LMP-1. Für die Analyse der Genexpression wurde aus EBNA-3A positiven und negativen Zellen RNA isoliert, mittels Reverser Transkriptase, unter Verwendung von Oligo-(dT)-Primern, in cDNA transkribiert, markiert und auf das Affymetrix-Array U133A 2.0 hybridisiert. Das Array enthält 22.277 Probesets, die 18.400 Transkripte repräsentieren, darunter 14.500 gut charakterisierte humane Gene.

Es konnten Gene gefunden werden, die sowohl in EBNA-3A $\Delta$ 127-944- und  $\Delta$ EBNA-3A-Zelllinien, als auch in allen drei Spendern induziert bzw. reprimiert sind. Im Rahmen dieser Dissertation wurde exemplarisch ein Gen, das in EBNA-3A negativen LCLs herunterreguliert, d.h. durch EBNA-3A induziert ist, aus den Affymetrix-Daten ausgewählt. Diese Daten sollten durch Real-Time PCR bestätigt werden. Die Bestätigung weiterer Datensätze war leider aus Zeitgründen nicht mehr möglich.

Ausgewählt wurde die Matrix-Metalloproteinase 7 (MMP-7), die eine 35-fache Induktion in Spender 1, eine 50-fache Induktion in Spender 2 und eine 95-fache

---

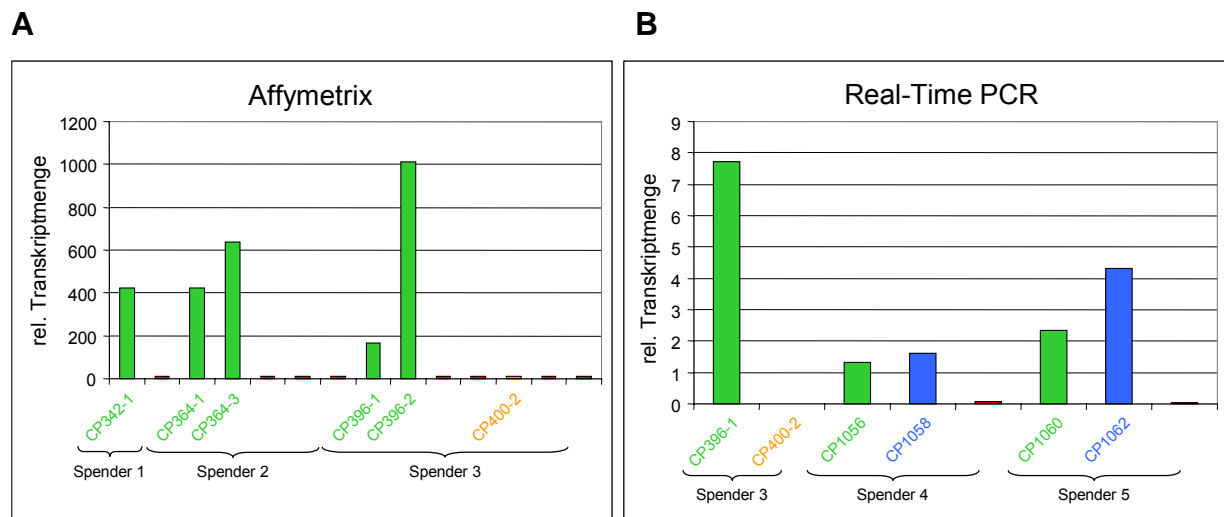
Induktion in Spender 3 aufweisen. Matrix-Metalloproteinasen (MMP) sind eine Genfamilie, die aus 23 verschiedenen Mitgliedern besteht, die je nach Struktur und Substratspezifität in 5 Untergruppen eingeteilt werden. MMPs sind fähig fast alle extrazellulären Matrix-Makromoleküle in den Geweben zu degradieren und sind in den meisten malignen Geweben überexprimiert. Man nimmt an, dass MMPs eine wichtige Rolle im Prozess der Krebsentwicklung und Metastasierung spielen. MMP-7 spielt eine wichtige Rolle in der Metastasierung von Endometrium- und Gastrointestinalen-Karzinomen (Shiomi and Okada, 2003).

Zum Zeitpunkt der Durchführung des Affymetrix-Screen, war noch nicht bekannt, dass die verwendeten EBNA-3A negativen LCLs eine LMP-1 Variante exprimieren. Daher musste nun ausgeschlossen werden, dass es sich bei den untersuchten Genen eventuell um LMP-1 Zielgene handelte. Um dies herauszufinden, wurde von Ulrike Dirmeier aus der AG Hammerschmidt die HEK293-Zelllinie 2319 zur Verfügung gestellt, die nach Induktion des lytischen Zyklus Viren produziert, die im Bereich der 5x33bp repeat Region des LMP-1 Gens eine Deletion der AS250-307 aufweist. Das 2319-Virus wurde benutzt, um zusammen mit dem Wildtyp-Virus 2089 und dem Be714-Virus LCLs aus identischen Spendern zu generieren. Dabei sollten die Zelllinien, die mit dem 2319 Virus etabliert wurden, dazu dienen, eine mögliche Rolle der LMP-1 Variante zu charakterisieren. Zeigt sich zwischen den 2089-LCLs und den 2319-LCLs kein Unterschied in der Real-Time PCR bei der Untersuchung eines potentiellen EBNA-3A Zielgens, kann man davon ausgehen, dass die LMP-1 Variante keinen Einfluss auf die Expression dieses Gens hat und es sich um ein EBNA-3A Zielgen handelt. Im umgekehrten Fall, wenn ein Unterschied zwischen 2089-LCL und 2319-LCL auftritt, muss der Einfluss der LMP-1 Variante zu geschrieben werden.

Um die Affymetrix-Daten in der Real-Time PCR zu bestätigen, wurde RNA von einer mit Wildtyp-Virus 2089 transformierten LCL mit dazugehöriger von einem Spender stammenden EBNA-3A negativen LCL benutzt (CP396-1 und CP400-2), die bereits im Affymetrix-Screen verwendet worden war. Zusätzlich wurde RNA von einer mit Wildtyp-Virus 2089 transformierten LCL 2089, einer 2319-LCL und einer EBNA-3A negativen LCL aus jeweils zwei verschiedenen Spendern benutzt (2089-LCLs: CP1056 und CP1060; 2319-LCLs: CP1058 und CP1062; EBNA-3A $\Delta$ 127-944-LCLs: CP1059 und CP1063), um einen möglichen Einfluss der LMP-1 Variante zu charakterisieren. Vergleicht man die relativen MMP-7 Transkriptmengen der Zell-

linien CP1056 und CP1058 bzw. CP1060 und CP1062, lässt sich kein signifikanter Unterschied erkennen. Daher kann man ausschließen, dass die LMP-1 Variante einen Einfluss auf die Expression von MMP-7 hat. Betrachtet man die relativen Transkriptmengen bei den Zelllinien CP1059 und CP1063, kann man erkennen, dass in Abwesenheit von EBNA-3A kein MMP-7 mehr exprimiert wird.

Die Affymetrix-Daten, für das durch EBNA-3A induzierte Gen MMP-7, konnten in der Real-Time PCR also bestätigt werden. Die relativen Transkriptmengen sind jeweils in Abbildung 20 dargestellt, wobei sowohl in den Affymetrix-Daten, als auch in der Real-Time PCR Schwankungen zwischen den verschiedenen Spendern zu beobachten sind. Eine Zusammenfassung der x-fachen Induktionen ist in Tabelle 5 zu finden.



**Abb. 20: Gegenüberstellung der relativen Transkriptmengen des Gens MMP-7 aus den Affymetrix-Daten und den Real-Time PCRs**

(A) Aus den Zelllinien CP342-1 (2089), CP342-3 (EBNA-3A $\Delta$ 127-944), CP364-1 (2089), CP364-3 (2089), CP364-17 (EBNA-3A $\Delta$ 127-944), CP364-20 (EBNA-3A $\Delta$ 127-944), CP364-42 (EBNA-3A $\Delta$ 127-944), CP396-1 (2089), CP396-2 (2089), CP403-2 (EBNA-3A $\Delta$ 127-944), CP404-3 (EBNA-3A $\Delta$ 127-944), CP400-2 ( $\Delta$ EBNA-3A), CP404-1 (EBNA-3A $\Delta$ 127-944), CP406-1 (EBNA-3A $\Delta$ 127-944) wurde RNA isoliert und unter Verwendung von Oligo-(dT)-Primern in cDNA transkribiert und für den Affymetrix-Screen verwendet.

(B) Aus den Zelllinien CP1056 (2089), CP1058 (2319), CP1059 (EBNA-3A $\Delta$ 127-944), CP1060 (2089), CP1062 (2319), CP1063 (EBNA-3A $\Delta$ 127-944), CP396-1 (2089) und CP400-2 ( $\Delta$ EBNA-3A) wurde RNA isoliert. Die RNA wurde mit DNase behandelt und mit Zufalls-p(dN)<sub>6</sub>-Primern revers transkribiert. Für die Quantifizierung der Transkripte durch Real-Time PCR wurden genspezifische Primer verwendet. Die relative Transkriptmenge wurde im Verhältnis zu einer Kalibrator-Probe bestimmt und gegen die 18S rRNA als Haushaltsgen normalisiert.

Gezeigt sind jeweils die relativen Transkriptmengen, die im Affymetrix-Screen oder durch Real-Time PCR ermittelt wurden. Wildtyp-Zelllinien 2089 sind grün dargestellt, 2319-Zelllinien blau, EBNA-3A $\Delta$ 127-944-Zelllinien rot und  $\Delta$ EBNA-3A-Zelllinien orange.

Spender	zur Infektion verwendete Viren <sup>1)</sup>	RT <sup>2)</sup>	Affymetrix <sup>3)</sup>
1	2089/Be714	n.d. <sup>4)</sup>	35
2	2089/Be714	n.d. <sup>4)</sup>	50
3	2089/Be714+ Be715	7200	95
4	2089/Be714	16,5	n.d. <sup>4)</sup>
	2319/Be714	20	
5	2089/Be714	58,5	n.d. <sup>4)</sup>
	2319/Be714	108	

**Tabelle 5: Zusammenfassung der x-fachen Induktionen für das EBNA-3A Zielgen MMP-7 aus dem Affymetrix-Screen und aus den Real-Time PCRs**

- <sup>1)</sup> Viren, die zur Infektion verwendet wurden
- <sup>2)</sup> x-fache Induktion in der Real-Time PCR: Quotient aus den jeweiligen unter <sup>1)</sup> angegebenen Virusinfektionen
- <sup>3)</sup> x-fache Induktion im Affymetrix-Screen: Quotient aus den jeweiligen unter <sup>1)</sup> angegebenen Virusinfektionen
- <sup>4)</sup> n.d. bedeutet Experiment nicht durchgeführt

## 4.2 Die Rolle von EBNA-3C in der B-Zellimmortalisierung

Wie EBNA-3A ist auch das EBNA-3C Protein in der Literatur als viraler Faktor beschrieben, der essentiell für den Prozess der B-Zellimmortalisierung ist.

Im Laufe dieser Arbeit stellte sich völlig unerwartet heraus, dass die Rolle von EBNA-3A neu bewertet werden muss. Ursprünglich wurde zur Absicherung der EBNA-3A Ergebnisse, EBNA-3C in Parallelexperimenten mit untersucht. Auch diese Untersuchungen führten zu völlig neuen und unerwarteten Ergebnissen, was im Folgenden ausführlich beschrieben wird.

### 4.2.1 Mit $\Delta$ EBNA-3C Virus infizierte B-Zellen replizieren für einen begrenzten Zeitraum ihre intrazelluläre DNA

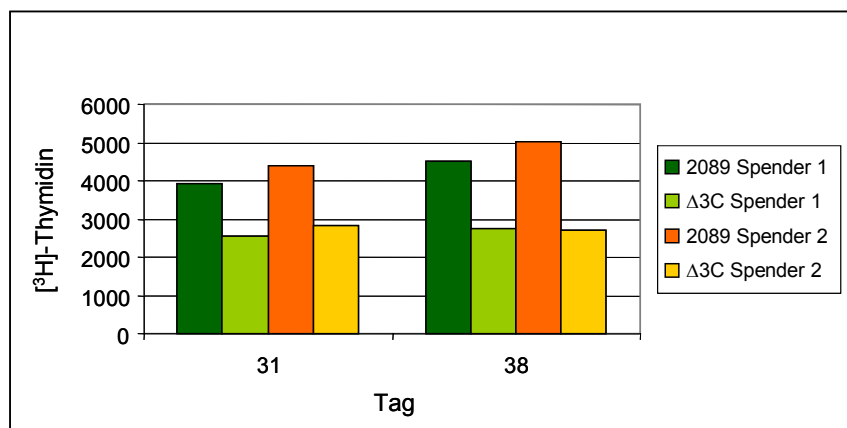
Die  $\Delta$ EBNA-3C Virus produzierende HEK293-Zelllinie wurde von Madelaine Löfqvist aus der AG Hammerschmidt zur Verfügung gestellt. Da diese stabile HEK293-Zelllinie nur schwach infektiöse Virusüberstände produziert, wurden die Überstände zur Anreicherung der infektiösen Partikel durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert. Dadurch konnten Virustiter von bis zu  $2 \times 10^5$  GRE/ml erreicht werden.

Zunächst wurden B-Zellen mit Wildtyp-Virus 2089,  $\Delta$ EBNA-3C Virus oder  $\Delta$ EBNA-2 2491 Virus infiziert. Dabei wurden B-Zellen von zwei verschiedenen Spendern verwendet, um eventuelle spenderspezifische Besonderheiten auszuschließen. Zwei bis vier Wochen nach Infektion der primären B-Zellen waren nach Infektion mit Wildtyp-Virus 2089 erwartungsgemäß erste Kolonien sichtbar, während die Infektion mit  $\Delta$ EBNA-2 Virus nicht zum Auswachsen von B-Zellkolonien führte. Völlig entgegen den Erwartungen waren jedoch, auch nach Infektion mit EBNA-3C negativen Viren, B-Zellkolonien gewachsen

Um zu überprüfen, ob die Zellen in diesen Kolonien sich tatsächlich noch im Zellzyklus befinden, wurden die Thymidineinbauraten bestimmt. Es gibt zwei Möglichkeiten einen Thymidinassay durchzuführen. Entweder wird eine definierte Zahl lebender Zellen in den Versuch eingesetzt und deren Thymidineinbauraten gemessen. Alternativ können die Zellen mit einer bestimmten Zellkonzentration eingesät werden und die Thymidineinbauraten wird an verschiedenen Tagen nach Einsaat gemessen. In diesem Fall kommt es zu einer Steigerung des Einbaus über die Zeit, falls die Zellen proliferieren. Somit kann indirekt die Proliferationsrate bestimmt werden. Diese zweite Möglichkeit wurde bereits für EBNA-3A in Kapitel 4.1.5 beschrieben. In

diesem Kapitel wird die erste, der gerade geschilderten Möglichkeiten, für einen Thymidinassay angewendet, um zu überprüfen, ob Mikrokulturen von LCLs nach längerer Zeit in Kultur noch die S-Phase durchlaufen.

Um zu überprüfen, ob sich die infizierten B-Zellen auch tatsächlich im Zellzyklus befinden und ihre DNA replizieren, wurden an den Tagen 31 und 38 jeweils  $2 \times 10^4$  Zellen als Stichproben entnommen und mit  $0,5 \mu\text{Ci}$   $[^3\text{H}]$ -Thymidin pro Ansatz versetzt und 4h bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Gemessen wurden die Thymidineinbauraten jeweils als sechsfache Werte. Sowohl an Tag 31, als auch an Tag 38 sind deutliche Unterschiede zwischen EBNA-3C positiven und negativen LCLs messbar. Dies gilt sowohl für Spender 1, als auch für Spender 2 (Abb. 21).



**Abb. 21: Vergleich der Thymidineinbaurate in B-Zellen nach Infektion mit Wildtyp-Virus 2089 oder  $\Delta$ EBNA-3C Virus**

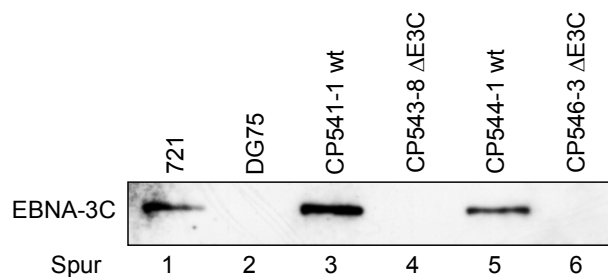
Im ersten Schritt wurden frisch isolierte und gereinigte B-Zellen aus zwei verschiedenen Spendern mit Wildtyp-Virus 2089 oder  $\Delta$ EBNA-3C Virus infiziert. Im zweiten Schritt wurden an den Tagen 26, 31, 33 und 38 jeweils  $1 \times 10^4$  Zellen mit  $0,5 \mu\text{Ci}$   $[^3\text{H}]$ -Thymidin versehen und 4h bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Anschließend wurden die Zellen geerntet und die Thymidineinbaurate, als Maß für replizierende DNA gemessen. Im Diagramm sind jeweils die Mittelwerte aus sechsfachen Werten und die dazugehörigen Standardabweichungen dargestellt.

Es war also nicht nur mit EBNA-3A $\Delta$ 127-944 bzw.  $\Delta$ EBNA-3A, sondern auch mit  $\Delta$ EBNA-3C möglich, wachstumstransformierte proliferierende LCLs zu etablieren. Es zeigte sich jedoch, dass es deutliche Unterschiede gibt, sowohl in der Zeitspanne, die benötigt wird, um erste Klone zu erkennen, als auch in der Fähigkeit diese Klone zu etablieren und über mehrere Monate ohne Unterstützung von Fibroblastenzellen zu kultivieren. Im Folgenden werden die etablierten  $\Delta$ EBNA-3C LCLs, die aus Mikrokulturen etabliert werden konnten, näher charakterisiert.

### 4.2.2 Western- und Southern-Blot-Analysen von LCLs, die mit $\Delta$ EBNA-3C Virus infiziert wurden

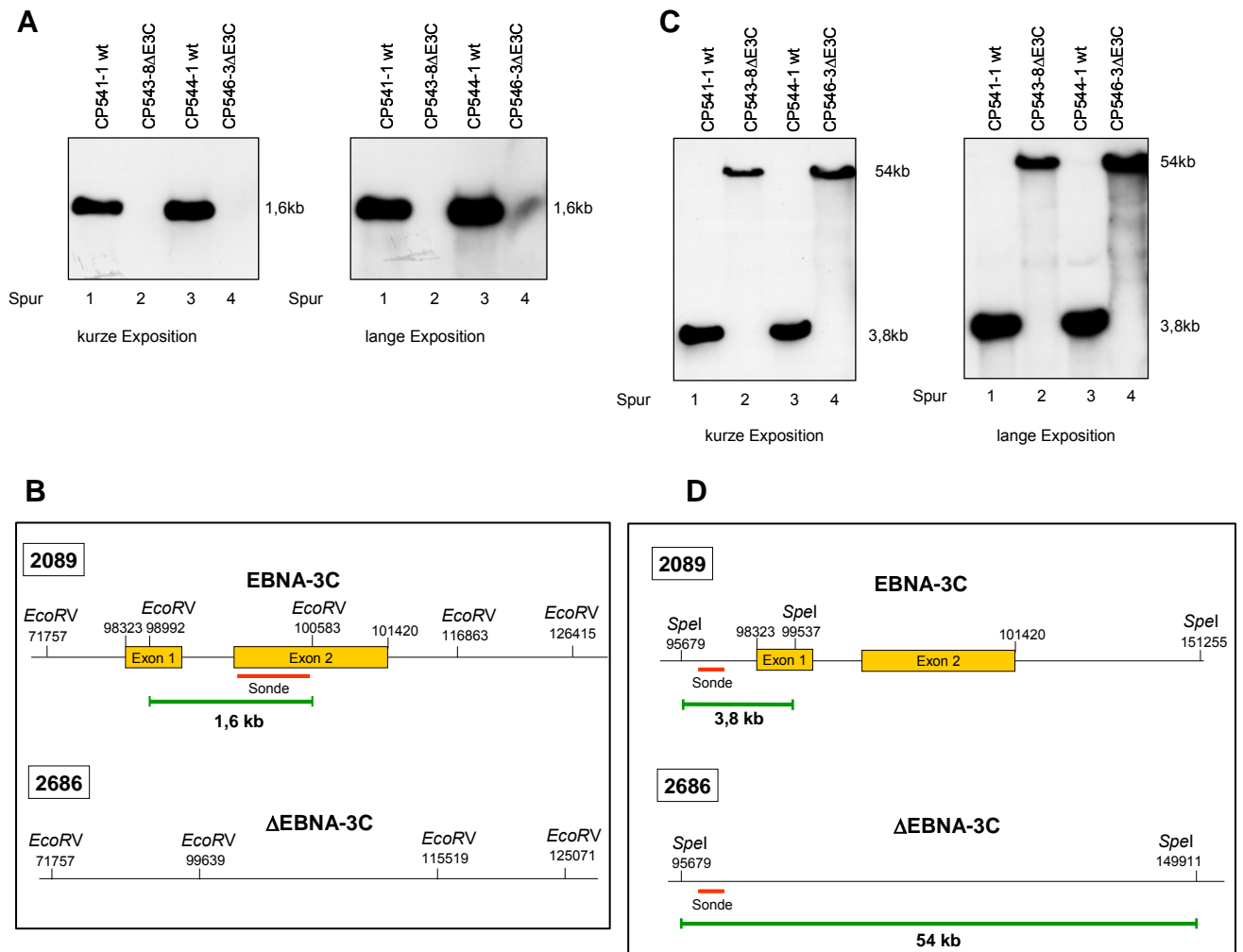
Um zu überprüfen, ob die B-Zellkolonien, die nach Infektion mit  $\Delta$ EBNA-3C Virus generiert worden waren, auch tatsächlich EBNA-3C negativ sind, wurde der EBNA-3C Status in Western-Blot- und Southern-Blot-Analysen untersucht.

Zunächst wurde im Western-Blot die Abwesenheit von EBNA-3C untersucht. Getestet wurden zwei  $\Delta$ EBNA-3C-LCLs (CP543-8 und CP546-3) aus einem Spender. Die Abwesenheit von EBNA-3C konnte in beiden LCLs bestätigt werden (Abb. 22 Spuren 4 und 6). Eine zusätzliche Bestätigung erfolgte in zwei Southern-Blots. Durch Verwendung zweier unterschiedlicher Sonden wurde die genomische DNA, die mit *EcoRV* bzw. *SpeI* verdaut wurde, näher auf die Abwesenheit von EBNA-3C untersucht. In Abbildung 23A ist der Southern-Blot mit dem *EcoRV*-Verdau dargestellt. Für die LCL, die mit Wildtyp-Virus 2089 transformiert wurde, zeigt sich in Abbildung 23A die erwartete 1,6kb Bande. In der  $\Delta$ EBNA-3C LCL ist aufgrund der internen verwendeten EBNA-3C Sonde keine Bande zu erkennen. In Abbildung 23C ist der Southern-Blot mit *SpeI* als Restriktionsenzym abgebildet. Hier wurde eine externe Sonde für den 5' Bereich vor dem EBNA-3C Gen verwendet, so dass in der LCL, die mit Wildtyp-Virus 2089 transformiert wurde, eine 3,8kb Bande und in der  $\Delta$ EBNA-3C LCL eine 54kb Bande nachgewiesen werden konnte (Abbildung 23C). Es konnte also gezeigt werden, dass kein Gen für EBNA-3C vorhanden ist.



**Abb. 22: Bestätigung der Abwesenheit von EBNA-3C in den potentiell EBNA-3C negativen LCLs**

Zum Nachweis der Abwesenheit von EBNA-3C in den potentiell  $\Delta$ EBNA-3C LCLs wurden jeweils 50 $\mu$ g Proteinlysate in einem 8%igem Polyacrylamidgel aufgetrennt und anschließend mit einem EBNA-3C spezifischen Antikörper (Zytomed) detektiert. Die beiden  $\Delta$ EBNA-3C LCLs, CP543-8 und CP546-3 (Spur 4 und 6,) exprimieren kein EBNA-3C, während EBNA-3C in den LCLs, die mit Wildtyp-Virus 2089 transformiert wurden (CP541-1 und CP544-1), nachgewiesen werden kann. Als Positivkontrolle diente die Zelllinie 721, die mit B95.8 Virus transformiert ist (Spur 1), als Negativkontrolle die EBV negative Zelllinie DG75 (Spur 2).



**Abb. 23: Bestätigung des korrekten Virus-Genotyps in den EBNA-3C negativen LCLs**

Southern-Blot-Analysen der beiden  $\Delta$ EBNA-3C LCLs mit zwei unterschiedlichen Sonden. Die rekombinante DNA wurde aus LCLs isoliert. Als Kontrolle wurde eine LCL, die mit Wildtyp-Virus 2089 transformiert wurde benutzt. Die DNAs wurden mit *EcoRV* (A und B) bzw. *SpeI* (C und D) verdaut. Die Fragmente im *EcoRV*-Verdau wurden mit einer internen Sonde sichtbar gemacht, die in der mit Wildtyp-Virus 2089 transformierten LCL ein 1,6kb Fragment liefert, welches in der  $\Delta$ EBNA-3C LCL nicht mehr auftritt (A und B). Beim *SpeI*-Verdau wurden die Fragmente mit einer externen Sonde, die in der mit Wildtyp-Virus 2089 transformierten LCL ein 3,8kb Fragment und in der  $\Delta$ EBNA-3C LCL ein 54kb Fragment erkennt (C und D), detektiert. Gezeigt wird jeweils eine kurze und eine lange Exposition der Southern-Blots und zusätzlich eine schematische Darstellung des EBNA-3C Genortes mit den benutzten Restriktionsschnittstellen *EcoRV* (B) bzw. *SpeI* (D), den jeweiligen benutzten Sonden und den nach Hybridisierung und Detektion daraus resultierenden Fragmenten.

### 4.2.3 Bestimmung der Immortalisierungseffizienzen der $\Delta$ EBNA-3C Viren durch Grenzverdünnungsanalysen

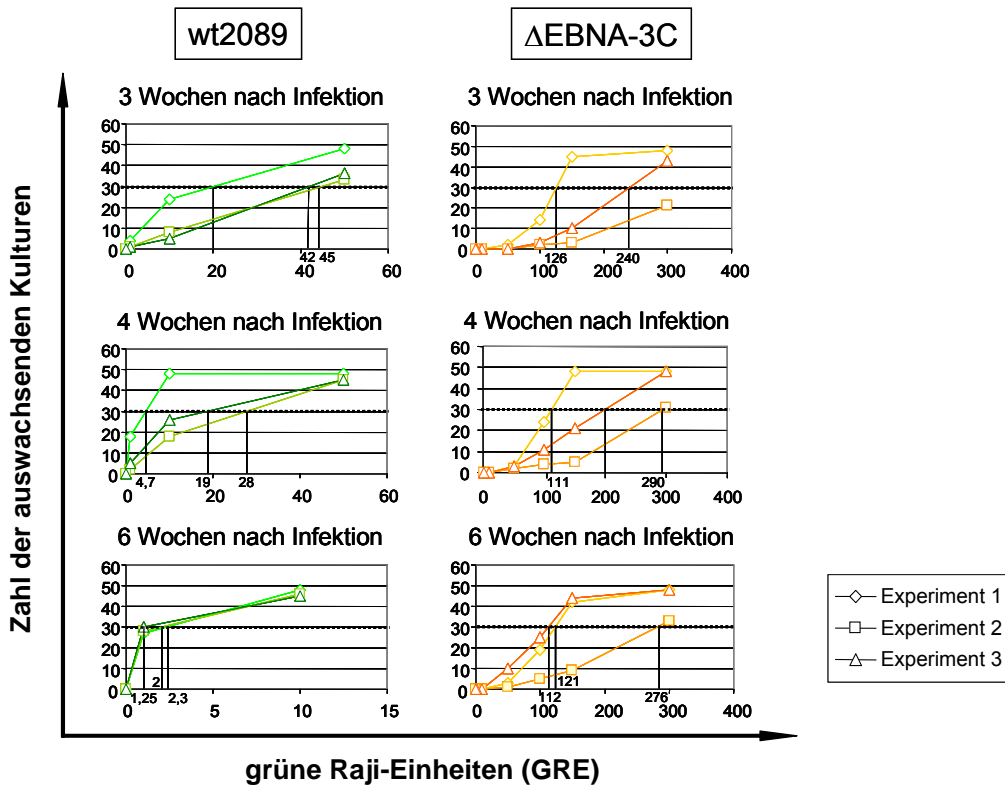
Die Bestimmung der Immortalisierungseffizienz erfolgte, wie schon für EBNA-3A beschrieben, anhand der Anzahl von Viruspartikeln, die für die Etablierung eines Einzelklons benötigt wird, ausgedrückt als grüne Raji-Einheiten (GRE) pro Einzelklon. Dazu wurden B-Zellmikrokulturen (100000 Zellen/Mikrokultur) in Gruppen aus-



---

gesät und mit sinkenden Konzentrationen an infektiösen Viruspartikeln (GREs) infiziert. Zur Auswertung wurde nach 3, 4 und 6 Wochen die Frequenz der wachsenden Kulturen pro Gruppe ermittelt. In die Kalkulation wurden nur Verdünnungsstufen miteinbezogen, die die statistische Voraussetzung einer „single hit“ Kinetik erfüllen. Dies ist der Fall, wenn eine lineare Korrelation zwischen GRE und Anzahl der wachsenden Kulturen beobachtet wird. Wenn bei einer Verdünnungsstufe höchstens 63%, also 60 von 96 Mikrokulturen einer 96-Loch-Platte (bzw. 30 von 48 Mikrokulturen einer halben 96-Loch-Platte) proliferierende Zellen enthalten, dann beruht laut Poissonstatistik, das Auswachsen der Kulturen auf einem Einzelereignis. Die Ergebnisse der Untersuchung sind in Abbildung 24 dargestellt und in Tabelle 6 zusammengefasst. Folgende Ergebnisse wurden erzielt: 3 Wochen nach Infektion waren 36GRE des Wildtyp-Virus 2089 und 239GRE des  $\Delta$ EBNA-3C Virus nötig, um einen auswachsenden Zellklon zu erhalten, 4 Wochen nach Infektion 17GRE des Wildtyp-Virus 2089 und 200GRE des  $\Delta$ EBNA-3C Virus und 6 Wochen nach Infektion 1,85GRE des Wildtyp-Virus 2089 und 170 GRE des Virus  $\Delta$ EBNA-3C.

Das bedeutet, der Unterschied in der Immortalisierungseffizienz zwischen  $\Delta$ EBNA-3C-Virus infizierten und Wildtyp-Virus 2089 infizierten B-Zellen wird im Verlauf der Kultur immer deutlicher. Während nach Infektion mit Wildtyp-Virus 2089 in einem Zeitraum von 6 Wochen auch in der letzten Woche noch zusätzliche Kolonien sichtbar werden, stagniert die Expansion in  $\Delta$ EBNA-3C infizierten Kulturen oder sinkt zum Teil auch deutlich ab. Das Ergebnis der Grenzverdünnung bestätigt, dass die Mehrzahl der Kolonien nur eine begrenzte Zeit in Kultur expandiert werden kann (Abb. 24).



**Abb. 24: Immortalisierungseffizienzen der rekombinanten Viren Wildtyp 2089 und  $\Delta$ EBNA-3C**

Die Bestimmung der Immortalisierungseffizienzen erfolgte aus drei Experimenten, die mit B-Zellen unterschiedlicher Spender durchgeführt wurden. Es wurden  $1 \times 10^5$  B-Zellen mit Grenzverdünnungen an Viruspartikeln infiziert. Die Anzahl der GRE, die benötigt wird, damit ein lymphoblastoider Zellklon auswachsen kann, wird durch Bildung der Mittelwerte aus den drei Einzelexperimenten ermittelt.

Exp.	Virus	EBNA-3C	Zahl benötigter GRE					
			3 Wochen	Mittelwert + Standardabw.	4 Wochen	Mittelwert + Standardabw.	6 Wochen	Mittelwert + Standardabw.
1	2089	B95.8	45	36 +/- 14	28	17 +/- 12	2	1,85 +/- 0,6
2	2089	B95.8	20		4,7		2,3	
3	2089	B95.8	42		19		1,25	
1	ML2686	B95.8	350	239 +/- 112	290	200 +/- 90	276	170 +/- 92
2	ML2686	$\Delta$	126		111		121	
3	ML2686	$\Delta$	240		200		112	

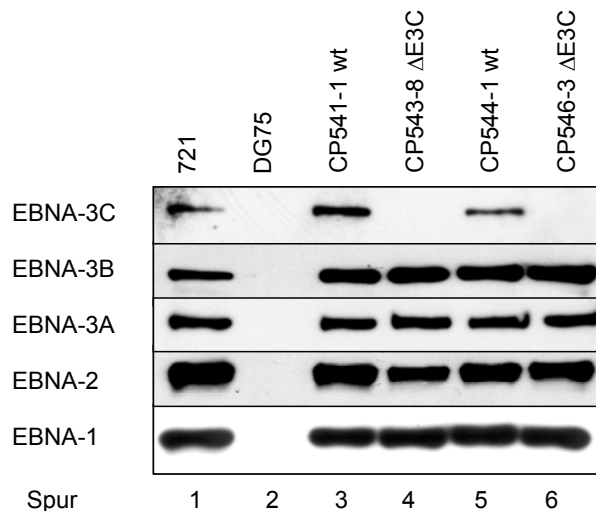
**Tabelle 6: Übersicht der benötigten GRE des Wildtyp-Virus 2089 und des  $\Delta$ EBNA-3C Virus für das Auswachsen eines Zellklons**

Gegenübergestellt sind die drei Grenzverdünnungsanalysen, die zur Bestimmung der Immortalisierungseffizienz des  $\Delta$ EBNA-3C Virus im Vergleich zum Wildtyp-Virus 2089 durchgeführt wurden. Angegeben sind jeweils die für das Auswachsen eines Zellklons notwendigen GRE, 3, 4 und 6 Wochen nach Infektion und die Mittelwerte und Standardabweichungen aus den jeweiligen drei Einzelexperimenten.

#### 4.2.4 Analyse der latenten EBV-Proteine in $\Delta$ EBNA-3C LCLs

##### 4.2.4.1 Die latente EBNA-Genexpression in $\Delta$ EBNA-3C LCLs zeigt keine Veränderung im Vergleich zu Wildtyp 2089 LCLs

Da auch EBNA-3C wie EBNA-3A mit EBNA-2 um die Bindung an CBF-1 kompetiert, wurde auch für die  $\Delta$ EBNA-3C LCLs die Expression der latenten EBV-Proteine untersucht. Zu diesem Zweck wurden Western-Blot-Analysen mit spezifischen, gegen latente EBV-Proteine gerichteten Antikörpern, durchgeführt. Untersucht wurde die Expression von EBNA-3A, -3B, EBNA-1 und EBNA-2. Es zeigte sich, dass beide  $\Delta$ EBNA-3C LCLs (Abb. 25: Spur 4 und 6) alle EBNAs exprimieren. Die Mengen sind vergleichbar zum Wildtyp (Abb. 25: Spur 3 und 5) und zur Positivkontrolle 721 (Abb. 25: Spur 1).



**Abb. 25: Expression der EBNAs in EBNA-3C negativen LCLs**

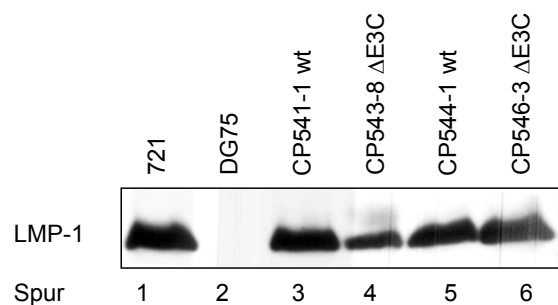
Zur Überprüfung der Expression von EBNA-3A, -3B, EBNA-1 und EBNA-2, wurden jeweils 50 $\mu$ g Proteinlysate in einem 8%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Danach erfolgte die Detektion mit den spezifischen EBNA-3A (Zytomed), -3B (6C9) -3C (Zytomed), EBNA-1 (1H4) und EBNA-2 (R3) Antikörpern. Alle EBNAs werden von den  $\Delta$ EBNA-3C LCLs (Spur 4 und 6), wie von den mit Wildtyp-Virus 2089 transformierten LCLs (Spur 3 und 5) exprimiert. Als Positivkontrolle diente die mit B95.8 Virus transformierte Zelllinie 721 (Spur 1), als Negativkontrolle die EBV negative Zelllinie DG75 (Spur 2).

##### 4.2.4.2 Keine drastische Reduktion der LMP-1 Expression in $\Delta$ EBNA-3C LCLs

Da es Publikationen gibt, die belegen, dass EBNA-3C den LMP-1 Promotor aktiviert, interessierte es besonders, die Expression von LMP-1 in den  $\Delta$ EBNA-3C LCLs zu untersuchen. Zum einen ist publiziert, dass EBNA-3C den LMP-1 Promotor in Anwesenheit von EBNA-2 aktiviert (Zhao and Sample, 2000). Zum anderen, dass

EBNA-3C negative Raji-Zellen reduzierte Mengen an LMP-1 aufweisen, die durch Expression von EBNA-3C erhöht werden können (Allday and Farrell, 1994).

Die Expression von LMP-1 wurde in den beiden  $\Delta$ EBNA-3C LCLs nachgewiesen und es konnte gezeigt werden, dass eine der beiden  $\Delta$ EBNA-3C LCLs (Abb. 26: CP543-8 Spur 4) eine geringere Menge im Vergleich zur mit Wildtyp-Virus 2089 transformierten LCL (Abb. 26: CP541-1 Spur 3) exprimiert. Die zweite  $\Delta$ EBNA-3C LCL (Abb. 26: CP546-3 Spur 6) exprimiert eine zur mit Wildtyp-Virus 2089 transformierten LCL (Abb. 26: CP544-1 Spur 5) vergleichbare Menge an LMP-1. Ein deutlicher Verlust der LMP-1 Expression wird somit durch die EBNA-3C Deletion nicht verursacht.



**Abb. 26: LMP-1 Expression in  $\Delta$ EBNA-3C LCLs**

Die etablierten EBNA-3C negativen LCLs wurden auf LMP-1 Expression untersucht. In einem 8%igen Polyacrylamidgel wurden jeweils 50 $\mu$ g Proteinlysate aufgetrennt und mit dem spezifischen LMP-1 Antikörper 1G3-6 detektiert. Das Molekulargewicht von LMP-1 beträgt 63kd. Als Positivkontrolle wurde die Zelllinie 721, die mit B95.8 Virus transformiert worden ist, verwendet und als Negativkontrolle die EBV negative Zelllinie DG75.

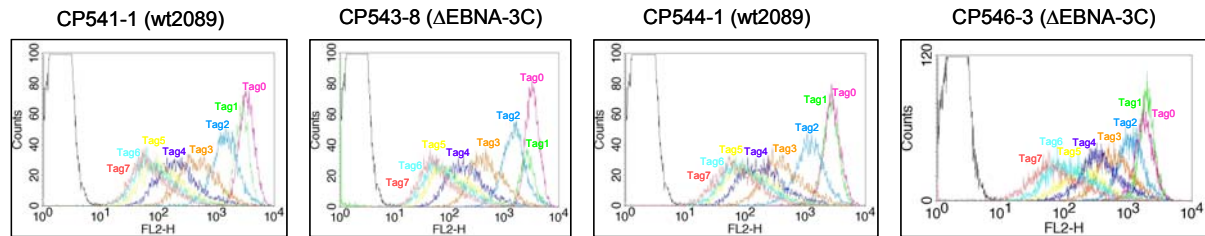
#### 4.2.5 Zellteilungsrate und Viabilität der EBNA-3C negativen LCLs

Es ist sehr schwierig EBNA-3C negative LCLs in Kultur zu halten. Außerdem ist es deutlich schwieriger diese zu expandieren, als LCLs, die mit Wildtyp-Virus 2089 transformiert wurden. Für diese Beobachtung gibt es, wie schon für die EBNA-3A negativen LCLs beschrieben, zwei mögliche Ursachen. Entweder ist der Zellzyklus verlängert und dadurch die Zellteilungsrate verringert oder die Viabilität der Zellen ist eingeschränkt.

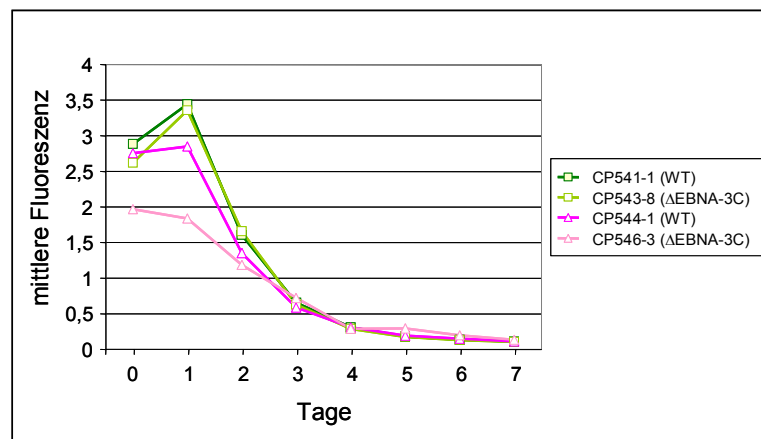
Zunächst wurde die Zellteilungsrate bestimmt. Dafür wurde die Zellmembran mit dem roten Farbstoff PKH26 gefärbt. Die Halbierung der Fluoreszenzintensität als Zeichen für eine Zellteilung konnte im FACS an den Tagen 0 bis 7 bestimmt werden. Tag 0 bezieht sich auf den Tag der Zellmembranfärbung. Verwendet wurden CP541-1 und CP544-1, die mit Wildtyp-Virus 2089 infiziert worden sind und die  $\Delta$ EBNA-3C LCLs CP543-8 und CP546-3. Diese Ergebnisse zeigen, dass es zwischen den mit Wildtyp-

Virus 2089 transformierten LCLs und  $\Delta$ EBNA-3C LCLs keine Unterschiede in der Zellteilungsrate gibt (Abb. 27).

**A**



**B**

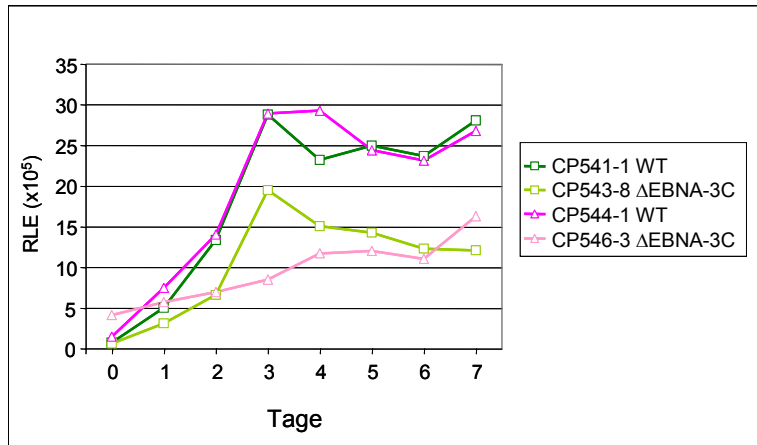


**Abb. 27: Bestimmung der Zellteilungsrate der EBNA-3C negativen LCLs im Vergleich zu LCLs, die mit Wildtyp-Virus 2089 infiziert worden sind**

Zur Bestimmung der Teilungsrate wurden die Zellen an Tag 0 mit PKH26 gefärbt und  $2 \times 10^5$  Zellen/ml in einem Kulturvolumen von 100  $\mu$ l in einer 96-Loch-Platte ausgesät. Die Zellen wurden an den Tagen 0 bis 7 im FACS als Triplikate analysiert. Die obere Darstellung (A) zeigt ein repräsentatives Histogramm der FACS-Auswertung für die LCLs, die mit Wildtyp-Virus 2089 infiziert worden sind, CP541-1 bzw. CP544-1 und die  $\Delta$ EBNA-3C LCLs CP543-8 bzw. CP546-3, wobei die Anzahl der Zellen in Abhängigkeit der Fluoreszenz abgebildet ist. Im unteren Diagramm (B) wird der Mittelwert der jeweiligen mittleren Fluoreszenz der Triplikate von beiden mit Wildtyp-Virus 2089 infizierten LCLs (CP541-1 in dunkelgrün und CP544-1 in pink) und beiden  $\Delta$ EBNA-3C LCLs (CP543-8 in hellgrün und CP546-3 in rosa) an den Tagen 0 bis 7 dargestellt.

Um die Viabilität der EBNA-3C negativen LCLs zu bestimmen, wurde, wie schon ausführlich für die EBNA-3A negativen LCLs beschrieben, die Menge des intrazellulären ATPs gemessen. Die intrazelluläre Menge an ATP korreliert mit der Zahl an lebenden metabolisch aktiven Zellen. Es wurden  $2 \times 10^5$  Zellen/ml in einem Kulturmedium von 100  $\mu$ l ausplattiert. Die Zellen wurden an den Tagen 0 bis 7 nach Aussaat geerntet und die intrazelluläre Menge an ATP gemessen. Betrachtet wurden jeweils zwei LCLs, die mit Wildtyp-Virus 2089 infiziert waren (CP541-1 und CP544-1) und zwei  $\Delta$ EBNA-3C LCLs (CP543-8 und CP546-3), die bereits 6 Monate in Kultur waren. Unmittelbar nach der Aussaat der Zellen war der ATP-Gehalt pro Zelle von EBNA-3C

positiven und EBNA-3C negativen B-Zellen gleich. Wurden die Kulturen über einen Zeitraum von 7 Tagen expandiert, so zeigte sich eine sehr viel höhere Anreicherung an ATP in den EBNA-3C positiven Kulturen, die auf das bessere Wachstum der EBNA-3C positiven im Vergleich zu EBNA-3C negativen Kulturen zurückzuführen ist (Abb. 28).

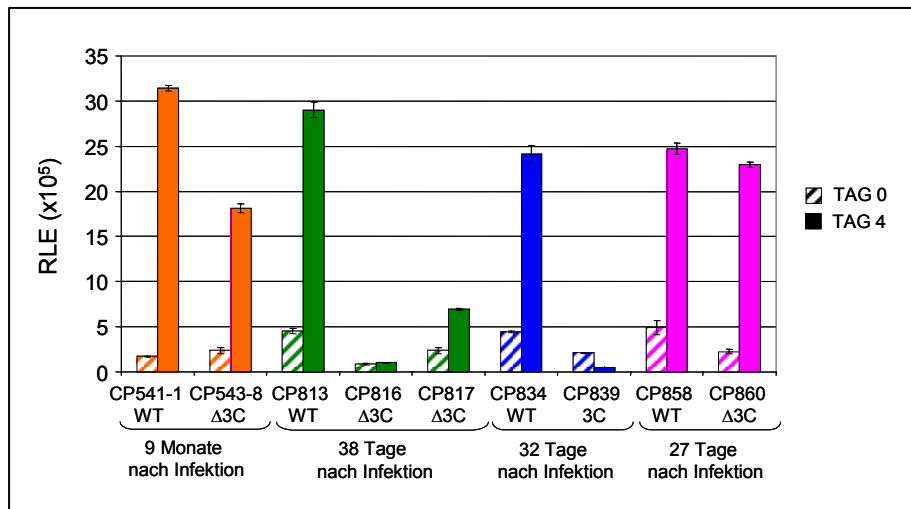


**Abb. 28: Bestimmung der Viabilität der EBNA-3C negativen LCLs im Vergleich zu LCLs, die mit Wildtyp-Virus 2089 infiziert wurden**

Die intrazelluläre Menge an ATP als Zeichen für lebende metabolisch aktive Zellen wurde an den Tagen 0 bis 7 jeweils als Triplikate gemessen. Dabei wurden  $2 \times 10^5$  Zellen/ml als 100µl Kulturen in einer 96-Loch-Platte ausplattiert und jeden Tag geerntet. Verglichen werden jeweils zwei mit Wildtyp-Virus 2089 transformierte LCLs (CP541-1 in dunkelgrün und CP544-1 in pink) mit zwei ΔEBNA-3C LCLs (CP543-8 in hellgrün und CP546-3 in rosa), die alle von einem Spender stammen. Die Menge an intrazellulärem ATP wird als relative Lichteinheiten (RLE) angegeben.

Außerdem wurde die Viabilität von verschiedenen ΔEBNA-3C LCLs mit dazugehöriger vom selben Spender stammender LCL, die mit Wildtyp-Virus 2089 transformiert worden ist, bestimmt. Zum Zeitpunkt des Experiments waren diese Zellen unterschiedlich lange nach Infektion in Kultur. Bei diesen LCLs handelt es sich um CP541-1 und CP543-8, die 9 Monate in Kultur waren und ohne Probleme expandiert werden konnten. Weitere LCLs sind CP813 (wt2089), CP816 (ΔEBNA-3C) und CP817 (ΔEBNA-3C), die zum Zeitpunkt des Experiments 38 Tage nach Infektion in Kultur waren, CP834 (wt 2089) und CP839 (ΔEBNA-3C), die 32 Tage nach Infektion in Kultur waren und CP858 (wt 2089) und CP860 (ΔEBNA-3C), die 27 Tage nach Infektion in Kultur waren. Von diesen LCLs wurden  $2 \times 10^5$  Zellen/ml als 100µl Kulturen in eine 96-Loch-Platte ausplattiert. Nach 4 Tagen wurden die Zellen geerntet und die Menge an intrazellulärem ATP gemessen und mit der Menge an intrazellulärem ATP an Tag 0 verglichen. 27 Tage nach Infektion zeigt sich bei CP858 (wt 2089) und CP860 (ΔEBNA-3C) kein Unterschied in der Viabilität. Jedoch 32 bzw. 38

Tage nach Infektion zeigt sich ein deutlicher Rückgang in der Viabilität, wenn LCLs, transformiert mit Wildtyp-Virus 2089 (CP813 und CP834) mit  $\Delta$ EBNA-3C LCLs (CP816, CP817 und CP839) verglichen werden. Diese  $\Delta$ EBNA-3C LCLs konnten nicht etabliert und dauerhaft in Kultur gehalten werden, ungefähr 40 bis 70 Tage nach Infektion waren die Zellklone nicht mehr lebensfähig (Abb. 29).



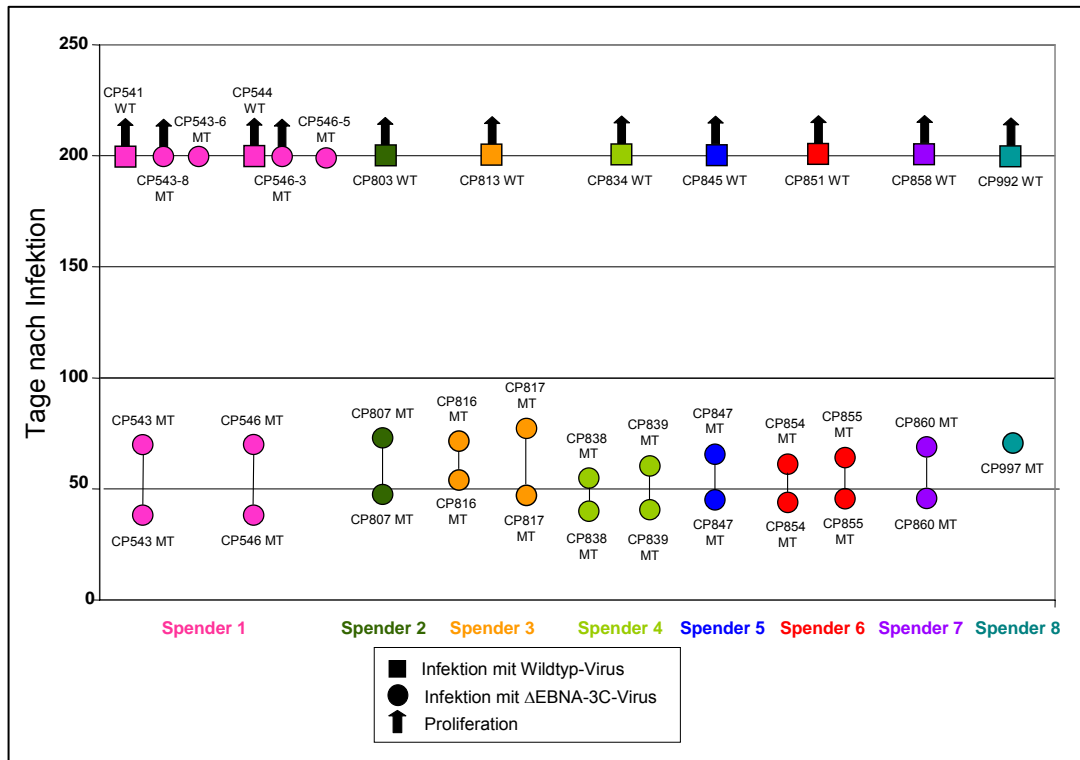
**Abb. 29: Vergleich der Viabilität von  $\Delta$ EBNA-3C LCLs, die unterschiedliche lange nach Infektion in Kultur waren**

Es wurden  $2 \times 10^5$  Zellen/ml als 100 $\mu$ l Kulturen in einer 96-Loch-Platte ausplattiert. Nach 4 Tagen wurden die Zellen geerntet und die Menge an intrazellulärem ATP als Zeichen für metabolisch aktive Zellen gemessen. Verglichen werden  $\Delta$ EBNA-3C LCLs zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Infektion und eine bereits etablierte  $\Delta$ EBNA-3C LCL (CP543-8), die ohne Schwierigkeiten in Kultur proliferiert. Die  $\Delta$ EBNA-3C LCLs CP816 (grün), CP817 (grün), CP839 (blau) und CP860 (pink) konnten nur 40 bis 70 Tage in Kultur gehalten werden. Die Menge an intrazellulärem ATP ist als relative Lichteinheiten (RLE) angegeben. LCLs von unterschiedlichen Spendern sind durch verschiedene Farben gekennzeichnet.

#### 4.2.6 Begrenzte Verdopplungszeiten der $\Delta$ EBNA-3C Zellpopulationen

Es stellte sich als sehr schwierig heraus,  $\Delta$ EBNA-3C LCLs in Kultur zu halten und dauerhaft zu etablieren. In der Anfangsphase der Immortalisierung lässt sich kein Unterschied zu LCLs, die mit Wildtyp-Virus 2089 transformiert wurden, erkennen, sobald aber versucht wird, die Klone zu expandieren, sterben diese zwischen Tag 40 und Tag 70 nach der Infektion. Nur in einer von acht Infektionen mit unterschiedlichen Spendern war es möglich zwei  $\Delta$ EBNA-3C LCLs dauerhaft zu etablieren. Zunächst konnten vier  $\Delta$ EBNA-3C LCLs (CP543-6, -8 und CP546-3 und -5) aus dieser Infektion expandiert werden, allerdings starben zwei (CP543-6 und CP546-5) dieser vier LCLs ca. 200 Tage nach Infektion. In Abbildung 30 ist die Proliferationszeit von

ΔEBNA-3C LCLs aus acht verschiedenen Infektionen, dargestellt (Abb. 30), Tabelle 7 fasst diese zusammen. Dabei zeigt sich ein sehr einheitliches Bild mit begrenzter Verdopplungszeit, wobei die Proliferation in Kultur zwischen Tag 40 und Tag 70 endet. Für die mit Wildtyp-Virus 2089 transformierten LCLs zeigte sich zum Zeitpunkt der Auswertung noch keine Einschränkung in der Proliferation.



**Abb. 30: ΔEBNA-3C-LCLs haben eine begrenzte Lebensspanne**

Es wurden B-Zellen aus acht verschiedenen Spendern isoliert,  $2 \times 10^5$  Zellen/ml als  $100 \mu\text{l}$  Kulturen in 96-Loch-Platten ausplattiert und mit Wildtyp-Virus 2089 oder ΔEBNA-3C Virus infiziert. Es wurde jeweils festgehalten, in welchem Zeitraum die ΔEBNA-3C LCLs aufhören zu proliferieren und sterben. LCLs, die mit Wildtyp-Virus 2089 infiziert wurden, sind als Quadrat (■) eingezeichnet, die dazugehörigen ΔEBNA-3C LCLs sind als Kreise (●) dargestellt. Zum Zeitpunkt der Auswertung gab es noch keine Anzeichen für eine begrenzte Verdopplungszeit der mit Wildtyp-Virus 2089 transformierten LCLs, so dass diese mit einem Pfeil gekennzeichnet sind (↑). Für die ΔEBNA-3C LCLs ergibt sich ein sehr einheitliches Bild von 40 bis 70 Tagen Proliferation in Kultur. Eine Ausnahme stellen vier der ΔEBNA-3C Mutanten dar (CP543-6, CP543-8, CP546-3, CP546-5), die bis zu ca. 200 Tagen nach Infektion noch keine Begrenzung in der Proliferation zeigten, dann allerdings stoppte bei zwei (CP543-6 und CP546-5) dieser vier LCLs das Wachstum, während die anderen beiden (CP543-8 und CP546-3) weiter proliferierten. Diese beiden ΔEBNA-3C LCLs sind mit einem Pfeil (↑) gekennzeichnet. Infektionen aus einem Spender sind in derselben Farbe dargestellt.



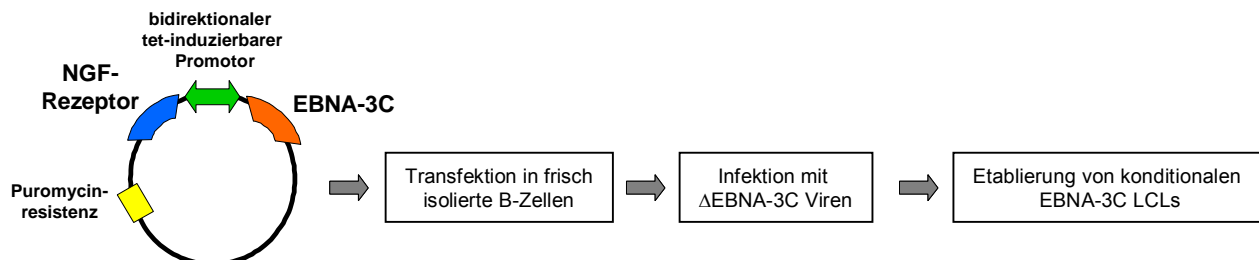
Spender	Infektion	Virus	Proliferation [Tage]
1	CP541	2089	$\infty$
	CP543-6	ML2686	~200
	CP543-8	ML2686	$\infty$
	CP544-1	2089	$\infty$
	CP546-3	ML2686	$\infty$
	CP546-5	ML2686	~200
2	CP803	2089	$\infty$
	CP807	ML2686	49-75
3	CP813	2089	$\infty$
	CP816	ML2686	55-69
	CP817	ML2686	48-77
4	CP834	2089	$\infty$
	CP838	ML2686	38-57
	CP839	ML2686	42-63
5	CP845	2089	$\infty$
	CP847	ML2686	48-67
6	CP851	2089	$\infty$
	CP854	ML2686	45-63
	CP855	ML2686	48-67
7	CP858	2089	$\infty$
	CP860	ML2686	48-73
8	CP992	2089	$\infty$
	CP997	ML2686	~70

**Tabelle 7: Zusammenfassung der Proliferationszeiten von B-Zellen, die mit  $\Delta$ EBNA-3C Virus infiziert worden sind, im Vergleich zu B-Zellen, die mit Wildtyp-Virus 2089 infiziert worden sind**

Aufgelistet sind B-Zellinfektionen aus 8 verschiedenen Spendern, die entweder mit Wildtyp-Virus 2089 oder  $\Delta$ EBNA-3C Virus infiziert worden sind und die Proliferationszeiten in Tagen, die diese LCLs in Kultur waren.

### 4.3 Generierung eines induzierbaren EBNA-3C Systems

Um die Rolle von EBNA-3C in der Anfangsphase und in der Aufrechterhaltung der Immortalisierung besser untersuchen zu können, sollte ein EBNA-3C induzierbares System etabliert werden. Um dieses Ziel zu erreichen, wurde ein Vektor verwendet, der in der AG Bornkamm entwickelt wurde. Dieser Vektor besitzt einen bidirektionalen Promotor, der durch Tetrazyklin regulierbar ist. Von diesem Promotor aus, wird zum einen ein nicht funktioneller, da trunkierter NGF-Rezeptor exprimiert. Zum anderen kann ein gewünschtes Gen inseriert werden, welches ebenfalls exprimiert wird. Der Vorteil dieses Systems ist, dass Zelllinien, die erfolgreich mit diesem Vektor transfiziert wurden, sehr leicht im FACS durch Nachweis der Tetrazyklin-abhängigen Expression des NGF-Rezeptors identifiziert werden können. Zur Generierung des EBNA-3C induzierbaren Systems wurde ein Vektor benutzt, in den das EBNA-3C Gen inseriert worden war. Dieser Vektor sollte in frisch isolierte B-Zellen transfiziert und diese anschließend mit  $\Delta$ EBNA-3C Viren infiziert werden, um konditionale EBNA-3C LCLs zu etablieren (Abb. 31).



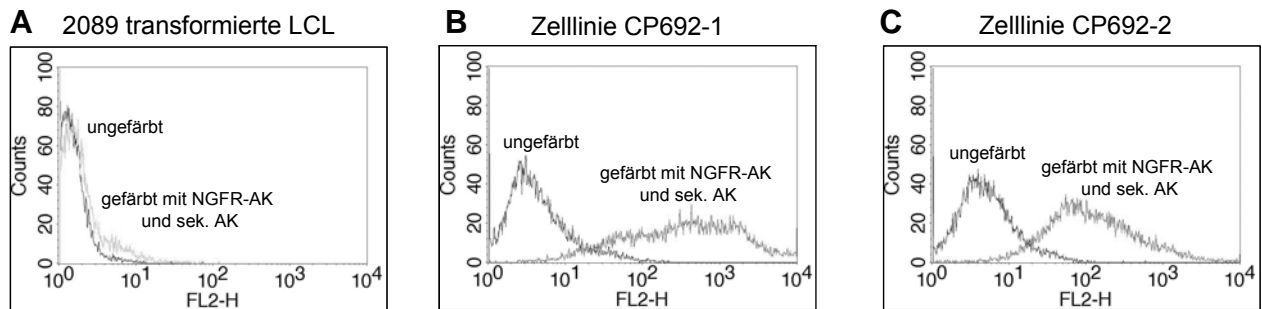
**Abb. 31: Etablierung von konditionalen EBNA-3C LCLs**

Schematische Darstellung der Vorgehensweise zur Generierung von konditionalen EBNA-3C LCLs. Verwendet wurde ein Vektor, in dem das EBNA-3C Gen und ein nichtfunktioneller NGF-Rezeptor unter Kontrolle eines bidirektionalen Tetrazyklin-induzierbaren Promotors gestellt sind. Die Expression des NGF-Rezeptors ermöglicht eine schnelle Untersuchung potentieller Klone im FACS. Außerdem ist zur Selektion ein Puromycinresistenzgen enthalten. Zunächst erfolgte eine Transfektion des Vektors mit Hilfe des hocheffizienten Amaxa-Systems in frisch isolierte B-Zellen, die anschließend mit  $\Delta$ EBNA-3C Viren infiziert wurden.

#### 4.3.1 Konditionale Expression von EBNA-3C in EBV infizierten B-Zellen

Nach der Transfektion des Tetrazyklin-induzierbaren EBNA-3C Vektors in frisch isolierte B-Zellen und anschließender Infektion mit  $\Delta$ EBNA-3C Viren, konnten zwei Zelllinien in Tetrazyklin-haltigem Medium etabliert werden. Wie bereits erwähnt, kann

die Identifizierung von positiven Klonen sehr leicht im FACS durch Nachweis des NGF-Rezeptors erfolgen. Dies wurde für die beiden etablierten Zelllinien CP692-1 und CP692-2 durchgeführt (Abb. 32). In beiden Zelllinien konnte der NGF-Rezeptor nach Tetrazyklininduktion nachgewiesen werden. Als Negativkontrolle diente eine LCL, die mit dem Wildtyp-Virus 2089 wachstumstransformiert worden ist.

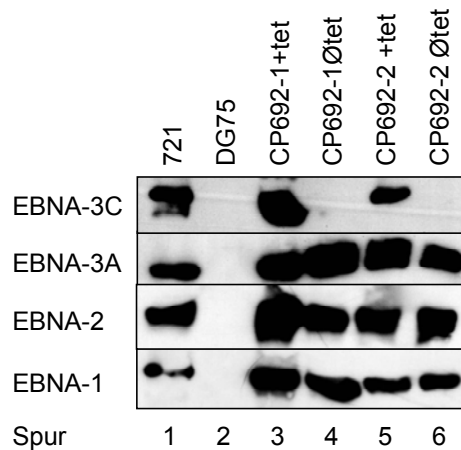


**Abb. 32: FACS-Färbung der Tetrazyklin-induzierbaren EBNA-3C Klone**

Zum Nachweis der Expression des NGF-Rezeptors wurden die Zelllinien CP692-1 und CP692-2 in Tetrazyklin-haltigem Medium gehalten. Der Nachweis des NGF-Rezeptors erfolgte durch Färbung der Zellen mit NGF-Rezeptor spezifischem Antikörper. Der sekundäre Antikörper war Pycoerythrin gekoppelt. Die Analyse erfolgte anschließender im FACS. Als Kontrolle diente eine LCL, die mit dem Wildtyp-Virus 2089 transformiert worden war und keinen Tetrazyklin-induzierbaren Vektor enthält. In den beiden Zelllinien CP692-1 und CP692-2 konnte der NGF-Rezeptor nachgewiesen werden.

Um zu überprüfen, ob die beiden Zelllinien CP692-1 und CP692-2 nicht nur den NGF-Rezeptor, sondern auch EBNA-3C konditional exprimieren, wurde in Western-Blot-Analysen getestet, ob die beiden etablierten Klone nach Tetrazyklinentzug die EBNA-3C Expression verlieren. Der Entzug von Tetrazyklin erfolgte durch viermaliges Waschen der Zellen. Anschließend wurden die Zellen in Tetrazyklin-freiem Medium aufgenommen und für weitere 3 Tage bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Waschschrte wiederholt und die Zellen erneut 3 Tage bei 37°C in Tetrazyklin-freiem Medium inkubiert. Im direkten Anschluss wurden Zelllysate für Western-Blot-Analysen hergestellt. Wie in Abbildung 33 Spur 4 und 6 gezeigt wird, konnte die Abwesenheit von EBNA-3C in den Zelllinien, die ohne Tetrazyklin gehalten worden waren, bestätigt werden.

Da EBNA-3C mit EBNA-2 um die Bindung an CBF1 kompetiert, wurde außerdem die Auswirkung auf die Expression der latenten EBV-Proteine überprüft. Dafür wurden EBNA-1, EBNA-2 und EBNA-3A untersucht, wobei zwischen den Zelllinien, die mit und ohne Tetrazyklin gehalten wurden, kein Unterschied in der Expression der Proteine zu erkennen ist.



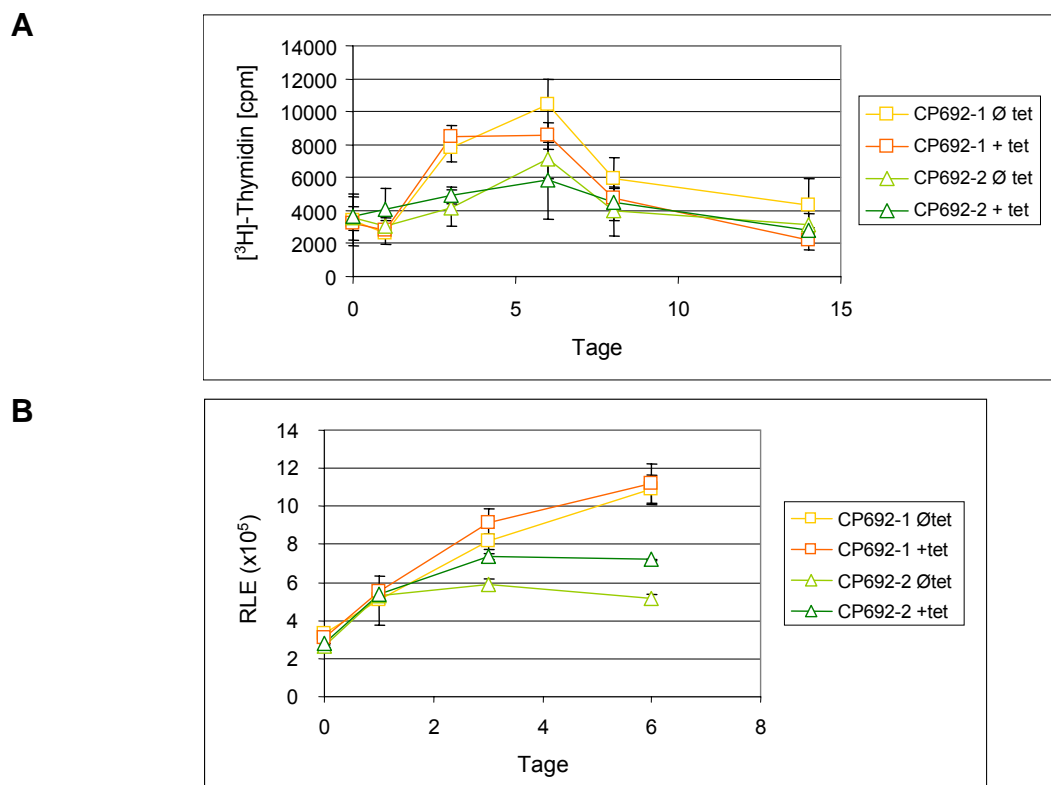
**Abb. 33: Expression der latenten EBV-Proteine in Tetrazyklin-induzierbaren EBNA-3C LCLs, in An- und Abwesenheit von Tetrazyklin**

In einem 8%igem Polyacrylamidgel wurden 30µg Proteinlysate aus zwei Tetrazyklin induzierbaren EBNA-3C Zelllinien (CP692-1 und CP692-2), die mit und ohne Tetrazyklin gehalten wurden, aufgetrennt. Zunächst wurde getestet, ob nach Tetrazyklinentzug tatsächlich kein EBNA-3C mehr exprimiert wird. Anschließend wurde die Expression von EBNA-1, EBNA-2 und EBNA-3A überprüft. Als Positivkontrolle wurde die mit B95.8 transformierte Zelllinie 721 (Spur 1), als Negativkontrolle die EBV negative Zelllinie DG75 (Spur 2) verwendet. Zur Detektion wurden die spezifischen Antikörper EBNA-1 (1H4), EBNA-2 (R3), EBNA-3A (Zytomed) und EBNA-3C (Zytomed) benutzt.

#### 4.3.2 Vergleich der DNA-Replikation und der Viabilität von Tetrazyklin-induzierbaren EBNA-3C LCLs in An- und Abwesenheit von Tetrazyklin

Um zu analysieren, ob EBNA-3C die Zellzykluspassage beeinflusst, wurden die Thymidineinbauraten in An- und Abwesenheit von EBNA-3C bestimmt. Durch die Inkorporation von [<sup>3</sup>H]-Thymidin kann die Menge an neusynthetisierter DNA bestimmt werden. Zunächst wurde den Zellen Tetrazyklin durch viermaliges Waschen entzogen. Es folgte eine Inkubation bei 37°C für 3 Tage in Tetrazyklin-freiem Medium. Anschließend wurde der Waschschrift wiederholt und die Zellen erneut für 3 Tage bei 37°C in Tetrazyklin-freiem Medium inkubiert. Schließlich wurden 2x10<sup>4</sup> Zellen als 100µl Mikrokulturen in 96-Loch-Platten ausplattiert. Die Hälfte der Zellkulturen wurde zur Reinduktion von EBNA-3C mit 1µg Tetrazyklin/ml versehen. Der Thymidineinbau wurde an den Tagen 0, 1, 3, 6, 8 und 14 nach Reinduktion gemessen. Als Maß für die DNA-Replikation wurden Zerfälle pro Minute angegeben, welche mit der Menge des eingebauten Thymidins korrelieren. Zwischen Tag 0 und 14 lässt sich kein Unterschied in den Zellzykluspassagen der EBNA-3C induzierbaren LCLs in An- und Abwesenheit von Tetrazyklin erkennen (Abb. 34A).

Zeitgleich wurde zur Beurteilung von eventuellen Unterschieden in der Viabilität der Tetrazyklin induzierbaren EBNA-3C LCLs in An- und Abwesenheit von Tetrazyklin die Menge an intrazellulärem ATP als Zeichen metabolisch aktiver Zellen bestimmt. Der „CellTiter-Glo® Luminescent cell viability assay“ wurde bereits für EBNA-3A ausführlich erklärt. An den Tagen 0, 1, 3 und 6 nach Reinduktion mit Tetrazyklin wurde die Menge an intrazellulärem ATP bestimmt. Die Zelllinie CP692-1 zeigt bis zum Tag 7 keine Unterschiede bei An- und Abwesenheit von Tetrazyklin. Bei der Zelllinie CP692-2 ist in Abwesenheit von Tetrazyklin ein leichter Rückgang in der Viabilität verglichen zu Zellen, die in Anwesenheit von Tetrazyklin gehalten werden, zu erkennen (Abb. 34B).



**Abb. 34: Vergleich der DNA-Replikation und der Viabilität der EBNA-3C induzierbaren LCLs in An- und Abwesenheit von Tetrazyklin**

Den konditionalen EBNA-3C Zelllinien CP692-1 und CP692-2 wurde Tetrazyklin durch viermaliges Waschen entzogen. Nach 3 Tagen Inkubation bei 37°C in Tetrazyklin-freiem Medium wurde der Waschschrift wiederholt, die Zellen erneut in Tetrazyklin-freiem Medium aufgenommen und 3 Tage bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden  $2 \times 10^4$  Zellen in 100µl Kulturmedium in 96-Loch-Platten ausplattiert und die eine Hälfte der Zellen zur Reinduktion von EBNA-3C mit 1µg/ml Tetrazyklin versehen. (A) An den Tagen 0, 1, 3, 6, 8 und 14 wurden die Zellen mit 0,5µCi [<sup>3</sup>H]-Thymidin versehen und 4h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen geerntet und die Zerfälle pro Minute (cpm) als Maß für die Proliferation gemessen. Im Diagramm sind jeweils die Mittelwerte aus Triplikaten und die dazugehörigen Standardabweichungen dargestellt.

(B) Die Messung des intrazellulären ATPs im Luminometer erfolgte an den Tagen 0, 1, 3 und 6 nach Reinduktion. Das intrazelluläre ATP ist als relative Lichteinheit (RLE) angegeben.

---

Es konnte gezeigt werden, dass die Tetrazyklinregulation der EBNA-3C-Expression funktioniert. Bis jetzt lassen sich jedoch keine phänotypischen Unterschiede in Abhängigkeit von EBNA-3C beschreiben.

## 5 DISKUSSION

Die Fähigkeit des Epstein-Barr Virus, *in vitro* primäre humane B-Lymphocyten zu immortalisieren, wurde vor mehr als 30 Jahren beschrieben (Henle and Henle, 1967). Für den Immortalisierungsprozess ist eine Kooperation der viralen Kern- und Membranproteine notwendig. Keines dieser viralen Proteine kann die Immortalisierung der B-Zellen allein verursachen. Der individuelle Beitrag der einzelnen viralen Proteine wird durch knock-out Mutationen und deren Auswirkung auf den Immortalisierungsprozess untersucht. Proteine, nach deren knock-out keine Immortalisierung von B-Zellen mehr möglich ist, gelten als essentiell für die Immortalisierung, während Proteine, deren Fehlen keine Auswirkung auf den Immortalisierungsprozess zeigen, als nicht essentiell bezeichnet werden.

Zu Beginn meiner Arbeit wurden EBNA-3A und EBNA-3C zu den absolut für die B-Zellimmortalisierung notwendigen Genen gezählt (Maruo et al., 2003; Tomkinson et al., 1993). Da es LCLs gibt, die EBNA-3A sekundär verloren haben, waren die publizierten Daten zur Notwendigkeit von EBNA-3A nicht eindeutig. Die bisherigen Erkenntnisse über die Bedeutsamkeit von EBNA-3A und EBNA-3C beruhen auf dem P3HR1-Zellsystem, mit dem es keine Möglichkeit gibt, Virustiter genau zu bestimmen und diese in hoher Konzentration zu erzeugen. Die vorliegende Arbeit basiert auf dem Maxi-EBV System. Vorteile der Methode des Maxi-EBV Systems sind, dass hohe Virustiter erzielt werden können und genetisch definierte Virusstocks generiert werden, die nicht durch unerwünschte rekombinante oder Wildtyp-EBVs belastet sind. Außerdem kann mit Hilfe des grün fluoreszierenden Proteins (GFP), die Zahl der infektiösen Viruspartikel sehr einfach bestimmt werden.

### 5.1 Die Funktion von EBNA-3A und EBNA-3C in EBV-infizierten B-Zellen bei der Initiation und Aufrechterhaltung von wachstumstransformierten B-Zellen

Die Ergebnisse meiner Untersuchungen zeigen, dass die Rolle sowohl von EBNA-3A, als auch von EBNA-3C in der B-Zellimmortalisierung neu bewertet werden muss. Völlig unerwartet konnten sowohl bei der Verwendung von EBNA-3A negativen, als auch EBNA-3C negativen Viren, nach Infektion von primären humanen B-Zellen auswachsende Kulturen beobachtet werden.

---

Der Unterschied zwischen Wildtyp-Virus 2089 und EBNA-3C negativem Virus prägt sich im Laufe der Kulturzeit immer stärker aus (Tabelle 7). Dies gilt nicht für die EBNA-3A negativen Viren (Tabelle 5). Möglicherweise deutet sich mit diesen Ergebnissen bereits an, dass die EBNA-3C negativen Zelllinien im Unterschied zu EBNA-3A negativen LCLs nur eine begrenzte Lebensspanne aufweisen. Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass das Fehlen von EBNA-3A bzw. EBNA-3C unterschiedliche Effekte auf die auswachsenden Kulturen hat.

### 5.1.1 Etablierung von EBNA-3A negativen LCLs

Wie gerade erwähnt, konnte ich bei der Infektion von primären humanen B-Zellen mit EBNA-3A negativen Viren auswachsende Kulturen beobachten. EBNA-3A negative Kulturen können ohne Probleme expandiert werden. Wachsen diese LCLs einmal, gibt es keine Schwierigkeiten sie auch weiterhin in Kultur zu halten und zu etablieren. Zu Beginn meiner Arbeit wurden mir von Bettina Kempkes zwei Maxi-EBV Plasmide zur Verfügung gestellt, in denen EBNA-3A entweder verkürzt ist (Be714: EBNA-3A $\Delta$ 127-944) oder gar nicht exprimiert wird (B715:  $\Delta$ EBNA-3A). Die verkürzte Form von EBNA-3A kann ebenso, wie die komplette EBNA-3A Deletion, für die Untersuchung der EBNA-3A Funktion verwendet werden, da bisher in der Literatur keine assoziierten Proteine bekannt sind, die im Bereich AS1-126 binden würden. Erst im Laufe dieser Arbeit stellte sich heraus, dass diese Maxi-EBVs nicht das B95.8 LMP-1 exprimieren, sondern eine verkürzte Variante, in der ein Teil des 5x33bp Bereichs deletiert ist. Für Deletionen in diesem Bereich ist publiziert, dass sie keine Auswirkungen auf die B-Zellimmortalisierung haben (Dirmeier et al., 2003; Higuchi et al., 2002). Da eine Beeinflussung des EBNA-3A Phänotyps durch diese LMP-1 Variante nicht hundertprozentig ausgeschlossen werden kann, wurden zur Absicherung zwei neue Maxi-EBV Plasmide im Kontext des B95.8 LMP-1 hergestellt (CP481-21: EBNA-3A $\Delta$ 127-944 und CP482-24:  $\Delta$ EBNA-3A). Als Kontrolle sollten EBNA-3C negative Viren dienen, da man bis dahin annahm, dass diese nicht mehr in der Lage sind, primäre humane B-Zellen zu immortalisieren.

Innerhalb des Zeitraums in der diese Doktorarbeit durchgeführt wurde, war es nur möglich einen einzigen Klon zu etablieren, der kein EBNA-3A und das B95.8 LMP-1 exprimiert. Aufgrund der bisherigen Ergebnisse ist es nicht möglich diesen Unterschied den verschiedenen LMP-1 Varianten zuzuordnen. Eine Bedeutung der LMP-1 Variante ist aufgrund der publizierten Daten, dass Deletionen in der 5x33bp Region



---

keine Auswirkungen auf die Immortalisierungseffizienz haben (Dirmeier et al., 2003; Higuchi et al., 2002), sehr unwahrscheinlich. Formal kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die verwendeten Maxi-EBVs eine weitere Veränderung aufweisen, die für den beobachteten Phänotyp verantwortlich ist. Eine weitere Mutation, die die Immortalisierungsfähigkeit reduziert, ist wesentlich wahrscheinlicher, als eine Rolle der 5x33bp Region. Um dies näher zu charakterisieren, muss in zukünftiger Arbeit das EBNA-3A dieser Maxi-EBVs rekonstituiert werden, um eine weitere Mutation auszuschließen. Falls danach wiederum eine Infektion vergleichbar zum Wildtyp möglich sein sollte, kann man davon ausgehen, dass die in dieser Arbeit beobachteten Unterschiede in der Immortalisierungsfähigkeit auf den verschiedenen LMP-1 Varianten beruhen. Falls aber auch dann nach Infektion keine Klone auswachsen, gibt es eine weitere nicht bekannte Mutation im Maxi-EBV, die verantwortlich ist für die verloren gegangene Fähigkeit primäre humane B-Lymphocyten zu immortalisieren.

Als Kontrolle sollten EBNA-3C negative Viren dienen, da man bis dahin annahm, dass diese nicht mehr in der Lage sind, primäre humane B-Zellen zu immortalisieren. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es überraschend war, überhaupt EBNA-3A negative LCLs etablieren zu können. Ausschlaggebend für diesen Erfolg könnten die relativ hohen Titer sein, die von EBNA-3A negativen Viren im Kontext der 5x33bp Variante erzielt werden konnten.

### 5.1.2 Etablierung von EBNA-3C negativen LCLs

Auch bei der Infektion von primären B-Zellen mit EBNA-3C negativen Viren konnte ich auswachsende Kulturen beobachten. Bei der Etablierung dieser LCLs gibt es aber deutliche Unterschiede zu EBNA-3A negativen Kulturen. EBNA-3C negative Kulturen verhalten sich ganz anders. Zwar kann man zu Beginn der Infektion kaum einen Unterschied zu Infektionen mit dem Wildtyp-Virus 2089 beobachten, versucht man jedoch diese Kulturen zu expandieren, zeigt sich sehr schnell, dass dies nur in seltenen Fällen möglich ist und die Mehrheit der Kulturen zwischen Tag 40 und 70 abstirbt (Abb. 30 und Tabelle 8).

In der Dissertation von Madelaine Löfqvist aus der AG Hammerschmidt ist beschrieben, dass 20 Tage nach Infektion von B-Zellen mit  $\Delta$ EBNA-3C Viren, die Zellen einen ähnlichen Phänotyp der Klumpenbildung zeigen, wie Zellen, die mit Wildtyp-Virus 2089 infiziert wurden. Allerdings weisen die Zellen ein geringeres Wachstum

---

auf. Die ersten kleinen Klumpen wurden bei Infektion mit Wildtyp-Virus 2089 bereits nach 10 Tagen beobachtet.

Weiterhin beschreibt sie, dass die  $\Delta$ EBNA-3C Zellen drei bis sechs Wochen nach Infektion aufhören zu wachsen und sterben. Jeglicher Versuch die Zellen zu expandieren scheiterte.

Meine Beobachtungen unterscheiden sich von den gerade beschriebenen. Das Auftreten erster Klumpen wurde bei Wildtyp-Virus 2089 und  $\Delta$ EBNA-3C Virus zeitgleich beobachtet. Auch kann das geringere Wachstum der  $\Delta$ EBNA-3C Zellen bestätigt werden, die Klumpen sind in den Mikrokulturen weniger dicht vertreten und wachsen langsamer. Die Zeitdauer des Wachstums unterscheidet sich jedoch, ich konnte beobachten, dass die Zellen zwischen Tag 40 und 70 aufhören zu wachsen, bei Madelaine ist eine Lebensdauer von 21 bis 49 Tagen angegeben. Auch das Expandieren von zwei Klonen war in meinem Fall möglich. Die beiden Zelllinien stammen allerdings von einem Spender ab, so dass nicht auszuschließen ist, dass es sich hierbei um ein spenderspezifisches Ereignis handelt. Alle weiteren Versuche aus acht verschiedenen Spendern weitere  $\Delta$ EBNA-3C Langzeitkulturen dauerhaft zu etablieren, scheiterten. Es ist also durchaus denkbar, dass es bestimmter genetischer Prädispositionen seitens der B-Zellen bedarf, um EBNA-3C Klone expandieren zu können.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass ich völlig unerwartet auch EBNA-3C negative LCLs etablieren konnten. Vor allem die relativ hohen Titer, die mit dem Maxi-EBV System erzielt werden können, könnten ausschlaggebend für den Erfolg gewesen sein.

### 5.1.3 Charakterisierung der EBNA-3A und EBNA-3C negativen LCLs

EBNA-3A und EBNA-3C konkurrieren mit EBNA-2 um die Bindung an CBF-1 und könnten dadurch die Expression der EBNA's vom C-Promotor aus, beeinflussen (Le Roux et al., 1994). Daher wurde die Expression der latenten Proteine in den EBNA-3A negativen und EBNA-3C negativen LCLs im Western überprüft. Dabei konnte sehr deutlich gezeigt werden, dass es keinerlei Unterschiede in der Expression der latenten Gene zwischen LCLs, die mit Wildtyp-Virus 2089 transformiert wurden und EBNA-3A negativen LCLs gibt. Diese Ergebnisse stimmen mit der Publikation von *Maruo et al.* überein, die zeigen, dass es in Abwesenheit von 4-HT in den EBNA-3A konditionalen LCLs, die ein EBNA-3A Fusionsprotein mit einer 4-HT-Östrogenbinde-

---

domäne enthalten, keine Veränderung in der Expression von EBNA-1, EBNA-2, EBNA-3B und LMP-1 gibt. Außerdem ist publiziert, dass die Expression von c-myc, nicht durch die Abwesenheit von EBNA-3A beeinflusst ist (Maruo et al., 2003). In dieser Arbeit konnte bestätigt werden, dass es keinen Zusammenhang zwischen c-myc Expression und EBNA-3A Expression gibt (Abb. 17B).

Auch in den EBNA-3C negativen LCLs können, wie auch in den EBNA-3A negativen LCLs, keine Unterschiede in der Expression der latenten Gene beobachtet werden (Abb. 12 und 25). Nach bisherigen Publikationen, die belegen, dass EBNA-3C den LMP-1 Promotor aktiviert, wäre zu erwarten gewesen, dass die Expression von LMP-1 in den EBNA-3C negativen LCLs stark reduziert ist. Jedoch kann in den beiden EBNA-3C negativen LCLs, CP543-8 und CP546-3, keine drastische Reduktion in der Expression beobachtet werden. Es ist lediglich eine geringfügige Reduktion der LMP-1 Expression in der Zelllinie CP543-8 zu erkennen (Abb. 26). Möglicherweise wurde während der Etablierung der Zelllinien auf ein bestimmtes, mit der Expansion der Zellen kompatibles LMP-1 Expressionsniveau selektioniert. Eine mögliche Zellzyklusregulation der LMP-1 Expression wurde nicht untersucht.

In Kultur ist zu beobachten, dass sowohl EBNA-3A negative, als auch EBNA-3C negative LCLs, im Vergleich zu LCLs, die mit Wildtyp-Virus 2089 transformiert wurden, schwieriger zu expandieren sind. Vergleicht man EBNA-3A negative bzw. EBNA-3C negative LCLs mit den jeweiligen vom selben Spender stammenden LCLs, die mit Wildtyp-Virus 2089 transformiert wurden, ist jedoch kein Unterschied in der Zellteilungsrate zu erkennen (Abb. 18 und 27).

Auch die Viabilität der EBNA-3A negativen und EBNA-3C negativen LCLs wurde genauer charakterisiert. Zur Bestimmung wurde intrazelluläres ATP als Zeichen metabolisch aktiver Zellen gemessen. Diese Experimente zeigen, dass die Viabilität der EBNA-3A negativen wie auch EBNA-3C negativen LCLs im Vergleich zu LCLs, die mit Wildtyp-Virus 2089 transformiert wurden, deutlich reduziert ist (Abb. 19 und 28). Zelllinien, die im Kontext des varianten LMP-1 etabliert wurden (CP403-2 und CP400-3), weisen eine zweifach bis dreifach verminderte Viabilität auf, während die EBNA-3A negative Zelllinie im Kontext des B95.8 LMP-1 (CP655-1) eine vierfach verminderte Viabilität zeigt (Abb. 19A und B). Ob es einen Zusammenhang zwischen verminderter Viabilität und B95.8 bzw. variantem LMP-1 gibt, kann erst nach Rekonstitution des Maxi-EBV BACs durch EBNA-3A und der Analyse einer größeren

---

Anzahl von Zelllinien geklärt werden. Ein möglicher direkter Einfluss von EBNA-3A auf den ATP-Stoffwechsel wurde ausgeschlossen, indem in einem parallelen Experiment die Lebendzellzahl im FACS bestimmt wurde und auch hier eine verminderte Viabilität nachweisbar war. Das Ergebnis des „CellTiter-Glo<sup>®</sup> Luminescent cell viability assay“ konnte bestätigt werden (Abb. 19C).

Des Weiteren wurde die Viabilität von B-Zellen, die mit  $\Delta$ EBNA-3C Virus infiziert wurden, zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Infektion bestimmt. Zum Vergleich wurde die bereits etablierte EBNA-3C negative LCL CP543-8 verwendet und zusätzlich vier EBNA-3C negative Zelllinien, die zu drei unterschiedlichen Zeitpunkten infiziert wurden. 27 Tage nach Infektion ist zwischen mit Wildtyp-Virus 2089 transformierter LCL und EBNA-3C negativer LCL kein Unterschied in der Viabilität zu erkennen. Es kommt aber zu einem sehr deutlichen Einbruch in der Viabilität der EBNA-3C negativen LCLs, 32 bzw. 38 Tage nach Infektion. Zellen die diese Krise überwinden, zeigen daraufhin eine zwar verminderte Viabilität im Vergleich zu LCLs, die mit Wildtyp-Virus 2089 transformiert wurden, aber ein deutlich verbessertes Wachstum im Vergleich zu Zellen in der Krise (Abb. 29). Die Zellen scheinen also nach Tag 30 eine Krise zu durchlaufen, die nur von ganz wenigen überwunden wird.

#### 5.1.4 Das EBNA-3A Zielgen MMP-7

Um zelluläre EBNA-3A Zielgene zu identifizieren, ist ein Affymetrix-Screen mit EBNA-3A positiven und negativen LCLs von drei verschiedenen Spendern durchgeführt worden (insgesamt 14 LCLs). Leider war es innerhalb dieser Dissertation nur möglich eines der induzierten Gene durch Real-Time RT-PCR zu bestätigen. Ausgewählt wurde die Matrix-Metalloproteinase 7 (MMP-7), die in Spender 1 eine 35-fache Induktion, in Spender 2 eine 50-fache Induktion und in Spender 3 eine 95-fache Induktion aufweist. Die Quantifizierung der MMP-7 RNA in weiteren Proben mit der RT-PCR ergab eine 20-, 108- bzw. 7200-fache Induktion durch EBNA-3A.

Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) sind eine Genfamilie, die aus 23 verschiedenen Mitgliedern besteht. Diese werden in 5 Untergruppen eingeteilt, je nach ihrer Struktur oder Substratspezifität. So gibt es die Kollagenasen (MMP-1, -3 und -13), die Gelatinasen (MMP-2 und -9), die Stromelysine (MMP-3 und -10), die Membran-Typ MMPs (MT1, 2, 4, 5 und MMP-6) und so genannte andere MMPs (MMP-7, -11, -12, -19, -20, -21, -23, -26, -27 und -28). MMPs sind Zink abhängige Endopeptidasen, die in der

---

Lage sind, fast alle extrazellulären Matrix-Makromoleküle in Geweben zu degradieren. Außerdem sind MMPs in vielen malignen Geweben überexprimiert. Deswegen wird angenommen, dass MMPs eine wichtige Rolle im Prozess der Krebsinvasion und Metastasierung spielen. MMP-7, auch Matrilysin genannt, kommt in Tumoren fast jeden Organs vor. Außerdem wurde MMP-7 mit der Metastasierung von Endometrium- und Gastrointestinalen Tumoren in Verbindung gebracht (Shiomi and Okada, 2003; Wielockx et al., 2004).

Nachdem bekannt ist, dass EBNA-3C zusammen mit Nm23-H1 die Expression von MMP-9 erhöht, war es besonders interessant zu sehen, dass eine weitere Matrix-Metalloproteinase durch ein anderes EBNA-3 Protein induziert wird. MMP-9 wird in aggressiven Formen von Lymphomen exprimiert. Die Fähigkeit von EBNA-3C die Anti-Migrationseffekte von Nm23-H1 aufzuheben, könnte zumindest teilweise auf der Hochregulation von MMP-9 beruhen (Kuppers et al., 2005). Allerdings wurde beschrieben, dass auch LMP-1 die Expression von MMP-9 erhöht (Takeshita et al., 1999). Deshalb war es notwendig eine mögliche Rolle der LMP-1 Variante, die auch bei der Expression von MMP-7 denkbar wäre, zu untersuchen. Parallel zu den LCLs, die mit Wildtyp-Virus 2089 transformiert wurden, und den EBNA-3A negativen LCLs, wurde in LCLs, die mit einem Virus transformiert wurden, das die LMP-1 Variante aufweist, eine Real-Time PCR durchgeführt. Zwischen den mit Wildtyp-Virus 2089 transformierten LCLs und den LCLs mit LMP-1 Variante konnte kein signifikanter Unterschied in der Induktion von MMP-7 festgestellt werden. In den EBNA-3A negativen LCLs ist ein sehr deutlicher Rückgang der Expression zu erkennen (Abb. 20; Tabelle 6). Die Affymetrix-Daten für MMP-7 konnten bestätigt werden und es konnte sehr deutlich gezeigt werden, dass die LMP-1 Variante keinen Einfluss auf den hier beobachteten Rückgang der MMP-7 Expression hat. Es handelt sich bei MMP-7 also eindeutig um ein durch EBNA-3A induziertes Zielgen, das zur hohen Malignität der Posttransplant-Lymphomen beitragen kann. Man könnte annehmen, dass EBNA-3A negative Tumore im Vergleich zu EBNA-3A positiven Tumoren weniger häufig eine Metastasierung zeigen, da kein MMP-7 exprimiert wird. Ob der EBNA-3A Status wirklich mit dem Grad der Malignität von Tumoren korreliert, muss erst noch geklärt werden.

### 5.1.5 EBNA-3A reprimierte Zielgene

EBNA-3A spielt sowohl eine Rolle als Transkriptionsaktivator, als auch als Transkriptionsrepressor (Cludts and Farrell, 1998). Diese Aussage wird durch die Identifizierung des EBNA-3A Zielgens MMP-7 bestätigt. MMP-7 wird durch EBNA-3A induziert. Außerdem konnten in unserer Gruppe von Marie Hertle einige Affymetrix-Daten für reprimierte Gene bestätigt werden. Somit existieren sowohl induzierte als auch reprimierte Zielgene von EBNA-3A.

## 5.2 Ein konditionales EBNA-3C System

Im dritten Teil der Arbeit sollte ein konditionales EBNA-3C System etabliert werden, mit dem es möglich ist in LCLs die EBNA-3C Expression zu regulieren. Fernziel dieser Untersuchungen ist es, zelluläre EBNA-3C Zielgene zu identifizieren. Darüber hinaus kann die Rolle von EBNA-3C in der Anfangs- bzw. Aufrechterhaltungsphase der B-Zellimmortalisierung in einem solchen System besser charakterisiert werden.

Für die Etablierung eines konditionalen Systems gibt es zwei Möglichkeiten. Erstens die Regulation der Proteinfunktion und zweitens die Regulation auf Transkriptionsebene. Für EBNA-2 wurde die Hormonbindedomäne des Östrogenrezeptors an den Amino- bzw. Carboxyterminus fusioniert. In den daraus entstandenen so genannten EREB-Zellen kann EBNA-2 durch Östrogenzugabe bzw. -entzug, an- bzw. ausgeschaltet werden (Kempkes et al., 1995).

Auch für EBNA-3A sind Zelllinien etabliert, die ein konditionales EBNA-3A exprimieren, das an eine 4-Hydroxy-Tamoxifen-Östrogenrezeptorbindedomäne fusioniert ist. Mit Hilfe dieser Zellen wurde gezeigt, dass sich die Zellen in Anwesenheit von 4-Hydroxy-Tamoxifen (4-HT) wie Wildtyp verhalten, bei Entzug von 4-HT jedoch sterben. Auf den ersten Blick scheint dies im Widerspruch zu den Ergebnissen meiner Arbeit zu stehen. Das eingeschränkte Wachstum bezieht sich jedoch nur auf die Zelldichten von  $5 \times 10^4$  bzw.  $1 \times 10^5$ . Bei einer Zelldichte von  $2 \times 10^5$  konnte keine Reduzierung der Wachstumsrate beobachtet werden (Maruo et al., 2003). Tatsächlich sind auch EBNA-3A negative LCLs, die in dieser Arbeit generiert wurden, unter diesen Bedingungen nicht lebensfähig. Das von *Maruo et al.* publizierte Ergebnis muss also im Kontext einer niedrigen Zelldichte gesehen werden und ist nicht allgemeingültig. Daten aus der Dissertation von Madelaine Löfqvist belegen, dass bei EBNA-3C diese Methode mit deutlichen Problemen verbunden war. Mit dem EBNA-3C Fusionsprotein konnte in An- und Abwesenheit von Östrogen kein

---

Unterschied in der Immortalisierungseffizienz beobachtet werden. Getestet wurden drei Konstrukte, die die Östrogenbindedomäne entweder am Aminoterminus, am Carboxyterminus oder an beiden aufweisen. In dieser Arbeit wurde daher ein neuer Weg beschrieben, um EBNA-3C konditionale Zelllinien zu etablieren. Diesmal auf Ebene der transkriptionellen Regulation. Verwendet wurde ein EBNA-3C Expressionsplasmid, das einen bidirektionalen Tetrazyklin-induzierbaren Promotor besitzt und sowohl EBNA-3C, als auch einen nichtfunktionalen NGF-Rezeptor exprimiert. Der NGF-Rezeptor dient zur schnellen Identifizierung positiver Klone im FACS.

Die Tetrazyklin Regulation konnte nicht im Kontext des viralen Genoms untersucht werden, da alle EBNA- Gene in der Latenz III denselben Promotor benutzen.

### **5.2.1 Etablierung konditionaler EBNA-3C LCLs**

Das EBNA-3C Expressionsplasmid wurde zunächst in frisch isolierte B-Lymphocyten transfiziert und diese anschließend mit  $\Delta$ EBNA-3C Viren infiziert. Nach 4 Wochen konnten erste Klone beobachtet werden, von denen zwei expandiert wurden. Ein erstes Screening der Klone im FACS auf die Anwesenheit des NGF-Rezeptors zeigte ein positives Ergebnis. Die Bestätigung erfolgte in Western-Blot Analysen durch die EBNA-3C Expression in An- und Abwesenheit von Tetrazyklin. Es konnte deutlich gezeigt werden, dass EBNA-3C in Abwesenheit von Tetrazyklin nicht mehr exprimiert wird und sechs Tage nach Tetrazyklinentzug kein Protein mehr vorhanden ist. Somit existiert mit diesen beiden konditionalen EBNA-3C LCLs ein Werkzeug mit dem zelluläre EBNA-3C Zielgene auf dem genetischen Hintergrund einer Zelllinie charakterisiert werden können.

Mit diesem dualen neuen System (Transfektion in Kombination mit Infektion der Zelle), das bisher nicht beschrieben wurde, ist es möglich in LCLs konditionale Systeme für jedes beliebige Gen zu etablieren.

### **5.2.2 Charakterisierung der konditionalen EBNA-3C LCLs in An- und Abwesenheit von Tetrazyklin**

In Kultur kann man einen deutlichen Unterschied zwischen konditionalen EBNA-3C LCLs, die in An- oder Abwesenheit von Tetrazyklin gehalten werden, beobachten. In Anwesenheit von Tetrazyklin weisen die LCLs eine starke Zellaggregatbildung auf, was möglicherweise auf starke Wechselwirkungen zwischen Zelloberflächenproteinen zurückzuführen ist.

---

Wird den Zellen Tetrazyklin entzogen, und damit die EBNA-3C Expression abgeschaltet, aggregieren die Zellen deutlich weniger stark.

In dieser Arbeit konnte für EBNA-3C negative LCLs gezeigt werden, dass die Viabilität im Vergleich zu LCLs, die mit Wildtyp-Virus 2089 transformiert wurden, eingeschränkt ist. Wird allerdings die Viabilität der konditionalen EBNA-3C LCLs sechs Tage nach Tetrazyklinentzug bestimmt, weisen die Zellen noch keine deutliche Einschränkung ihrer Viabilität auf. Möglicherweise muss in Zukunft ein längerer Beobachtungszeitraum für die Analyse der Zellen gewählt werden. Dies gilt auch für Untersuchungen zur zellulären DNA Replikation der EBNA-3C negativen LCLs. Bis zu Tag 14 nach Entzug von Tetrazyklin verhalten sich Zellen mit und ohne EBNA-3C gleich und weisen keinen Unterschied im Einbau von [<sup>3</sup>H]-Thymidin und damit in der Proliferation auf. Dies steht im Einklang mit den Beobachtungen, dass EBNA-3C negative LCLs erst nach Tag 30 eine Krise durchlaufen und die Mehrzahl der EBNA-3C negativen LCLs zwischen Tag 40 und 70 nach Infektion absterben.



### 5.3 Offene Fragen und Ausblick

#### EBNA-3A

Im Rahmen dieser Doktorarbeit konnte MMP-7 mit Hilfe eines Affymetrix-Screens als EBNA-3A induziertes Gen identifiziert und in weiteren Zelllinien mit der Real-Time RT-PCR bestätigt werden. Die Bestätigung der MMP-7 Induktion in weiteren Zelllinien, war nicht zuletzt deshalb notwendig, als der Einfluss einer LMP1 Variation in den zunächst verwendeten Virusmutanten ausgeschlossen werden musste.

Die weitere Untersuchung der von EBNA-3A reprimierten Gene, wurde in unserer Arbeitsgruppe von Marie Hertle übernommen, die bereits zahlreiche Kandidaten bestätigen konnte. Um in Zukunft bei der Analyse von EBNA-3A Zielgenen den Einfluss des Spendermaterials und auch möglicher Variationen in der Virusmutante auszuschließen, sollte nun auch für EBNA-3A ein Tetrazyklin-reguliertes EBNA-3A konditionales System etabliert werden. Ein solches System wird es zudem ermöglichen, auch den Zeitverlauf der Regulation genauer zu verfolgen.

Um für EBNA-3A den Mechanismus der EBNA-3A vermittelten Signalwege zu identifizieren, sollten die bestätigten EBNA-3A Zielgene nun auf gemeinsame Merkmale hin untersucht werden. In Chromatinimmunpräzipitationen muss zunächst geprüft werden, ob EBNA-3A direkt und wenn in welchen Regionen an das Chromatin dieser Zielgene bindet. Im zweiten Schritt sollten diese Regionen auf epigenetische Veränderungen, wie DNA- und Histonmodifikationen untersucht werden. In Promotorreporter-Studien und Gelretardationsexperimenten sollte dann eine Feinkartierung der cis-aktiven Elemente der EBNA3A Zielgene vorgenommen werden. Eine wichtige Frage wird sein, ob CBF1 an der Zielgenregulation beteiligt ist.

#### EBNA-3C

Das wichtigste Ergebnis dieser Arbeit hinsichtlich der Funktion von EBNA-3C ist die Beobachtung, dass EBNA-3C negative LCLs eine relativ kurze Lebensspanne von 40-70 Tagen in der Zellkultur haben. Im nächsten Schritt sollte die Ursache für diese begrenzte Lebensspanne untersucht werden. Es ist bekannt, dass EBNA-3C den LMP-1-Promotor aktiviert und zudem diese Regulation Zellzyklus-abhängig ist (Marshall and Sample, 1995). Außerdem ist bekannt, dass LMP1 mit dem Prozess

---

der Zellalterung interferiert (Yang et al., 2000). In den etablierten LCLs zeigte sich keine deutliche Abhängigkeit der LMP1 Expression vom EBNA-3C Status der Zellen. Es wurde allerdings auch in allen bisherigen Untersuchungen dieser Arbeit, die Zellzyklusphase der untersuchten Zellen noch nicht berücksichtigt. Möglicherweise handelte es sich bei den wenigen EBNA-3C negativen LCLs, um eine selektionierte Population, die unabhängig von EBNA-3C ein bestimmtes LMP-1 Expressionslevel erreichen konnte. Dringend notwendig ist daher die Untersuchung der LMP1 Expression in Frühen Phasen nach Infektion, um eine unselektionierte Population von infizierten Zellen betrachten zu können.

Auch unabhängig von LMP1, könnten im Laufe des Immortalisierungsprozesses Zellalterungsprozesse eingeleitet werden und verkürzte Telomere in Abwesenheit von EBNA-3C zum Zellzyklusarrest führen. Die EBNA-3C negativen LCLs würden dann die präimmortale Phase nicht überwinden. Um diese Möglichkeit zu untersuchen, muss in zukünftigen Experimenten in der späten Phase der Infektion die Telomeraseaktivität und Telomerlänge von EBNA-3C negativen LCLs analysiert werden.

EBNA-3C reguliert den Zellzyklus an mehreren Stellen. Es unterstützt die Zellzyklusprogression und interferiert mit so genannten Check-Points, d.h. Kontrollpunkten des Zellzyklus (Allday et al., 1995; Krauer et al., 2004). Falls durch suboptimale Kultivierungsbedingungen Check-Points aktiviert werden, könnten diese in Abwesenheit von EBNA-3C zum Zellzyklusarrest in G1 oder auch G2/M führen und die Lebensspanne der Kulturen verkürzen. Es ist daher wichtig die Zellzyklusphase zu bestimmen, in der EBNA-3C negative LCLs ihre Proliferation einstellen.

EBNA-C interferiert jedoch nicht nur mit der Check-Point Kontrolle, sondern unterstützt auch direkt die Zellzyklusprogression der Zelle. So fördert EBNA-3C den Eintritt in die S-Phase (Parker et al., 2000), bindet Cyclin A, stimuliert die Cyclin A assoziierte Kinaseaktivität und interferiert mit der Funktion des p27 Zellzyklusinhibitors (Knight and Robertson, 2004; Knight et al., 2004). Es ist auch bekannt, dass EBNA-3C die Degradation des Retinoblastomaproteins unterstützt (Knight et al., 2005). Es ist daher wichtig zu prüfen, ob es in EBNA-3C negativen LCLs in der frühen Phase nach Infektion zu einer Anhäufung von Rb oder zur Hypophosphorylierung von Rb kommt, was im Western-Blot untersucht werden kann.

Nicht ausgeschlossen werden sollten auch epigenetische Ereignisse wie Histonmodifizierung oder eventuell auch DNA Modifikation, da eine Assoziation von EBNA-

---

3C mit CtBP und Histondeacetylasen, mSin3A und NCoR beschrieben ist (Knight et al., 2003; Radkov et al., 1999).

Da gezeigt werden konnte, dass die Expression der EBNA-3 Proteine in Burkitt-Lymphom Zelllinien antiapoptotisch wirkt (Kelly et al., 2005), sollte auch geprüft werden, ob die Apoptoserate durch den Verlust von EBNA-3C erhöht wird. Ein weiteres noch ausstehendes Experiment ist es daher, die Apoptoseraten in EBNA-3C positiven und EBNA-3C negativen Zelllinien zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion zu vergleichen.

Mittels der neu etablierten Tetrazyklin-induzierbaren EBNA-3C LCLs ist es nun möglich, auch nach EBNA-3C Zielgenen zu suchen. Mit Hilfe eines Affymetrix-Screen und anschließender Bestätigung der Daten durch Real-Time PCR können so neue EBNA-3C induzierte und reprimierte Gene identifiziert werden. Wie bereits für EBNA-3A beschrieben, sollte die detaillierte Analyse dieser Zielgene die Gewinnung neuer Erkenntnisse über die molekularen Funktionen von EBNA-3C erlauben.

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

Das Epstein-Barr Virus (EBV) infiziert ruhende primäre humane B-Zellen und induziert deren unbegrenzte Proliferation. Dieser Prozess der Wachstumstransformation stellt ein Modellsystem dar, das die pathogenen Mechanismen in der Tumorentstehung widerspiegelt. Die Epstein-Barr Virus nukleären Antigene 3A und 3C (EBNA-3A und EBNA-3C) werden in Publikationen aus dem Zeitraum von 1993 bis 1996 als essentiell für den Prozess der B-Zellimmortalisierung eingestuft. In dieser Arbeit wurde mit einer neuen Technologie, der Maxi-EBV Methode, die Rolle der EBNA-3A und -3C Proteine erneut untersucht.

Sowohl mit  $\Delta$ EBNA-3A als auch mit  $\Delta$ EBNA-3C Viren konnten erstmals Kulturen von infizierten B-Zellen etabliert werden. Während sich aus  $\Delta$ EBNA-3A B-Zellkulturen Langzeitkulturen etablieren ließen, starben  $\Delta$ EBNA-3C B-Zellkulturen in der Regel nach 40-70 Tagen ab. Die Effizienz der B-Zellimmortalisierung von  $\Delta$ EBNA-3A Viren war im Vergleich zur Wildtyp infizierten B-Zellen 24-fach, die der  $\Delta$ EBNA-3C Viren 140-fach erniedrigt. Sowohl  $\Delta$ EBNA-3A-, als auch  $\Delta$ EBNA-3C-LCLs sind in ihrer Viabilität eingeschränkt, weisen jedoch unveränderte Zellteilungsraten auf.

Die weitere Charakterisierung der  $\Delta$ EBNA-3A LCLs ergab, dass diese eine Variante des viralen LMP1-Proteins exprimieren. Offen blieb, ob diese Variante das Auswachsen der  $\Delta$ EBNA-3A B-Zellkulturen begünstigt hat. In der Folge wurden die  $\Delta$ EBNA-3A LCLs zur Identifizierung von EBNA-3A-Zielgenen eingesetzt und zahlreiche aktivierte und reprimierte Kandidatengene identifiziert. Eines dieser Kandidatengene, Matrix-Metalloproteinase 7 (MMP-7), das durch EBNA-3A induziert wird, wurde im Rahmen dieser Arbeit validiert.

Auch mit  $\Delta$ EBNA-3C Viren konnten wider Erwarten LCLs erzeugt werden, die für einen begrenzten Zeitraum in Kultur gehalten werden können. Aus dem Material eines Spenders war es auch möglich,  $\Delta$ EBNA-3C Langzeitkulturen zu etablieren. Die Mehrzahl der  $\Delta$ EBNA-3C infizierten B-Zellkulturen durchlaufen jedoch zwischen Tag 40 und 70 eine Krise und sterben.

Mit der Generierung eines konditionalen EBNA-3C Systems, durch Transfektion eines Tetrazyklin-regulierbaren EBNA-3C Expressionsvektors in frisch isolierte primäre B-Zellen und anschließender Infektion mit  $\Delta$ EBNA-3C Viren, wurde ein neuer Weg geschaffen, um EBNA-3C-Funktionen zu untersuchen. Dieses 2-Schrittssystem kann nun im Prinzip für jede Virusmutante eingesetzt werden.

## 7 ABKÜRZUNGEN

Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin („ <u>b</u> ovine <u>s</u> erum <u>a</u> lbumin“)
bZIP	Basic leucine zipper
CtBP	C-terminal binding protein von E1A
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EBNA	Epstein-Barr Virus nukleäres Antigen
EBV	Epstein-Barr Virus
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FKS	Fötales Kälberserum
HDAC	Histondeacetylase
HRP	gekoppelte Merrettich-Peroxidase
kb	Kilobasenpaar(e)
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	Luria-Bertani
LCL	lymphoblastoide Zelllinien („ <u>l</u> ymphoblastoid <u>c</u> ell <u>l</u> ine“)
LMP	latentes Membranprotein
mA	Milliampere
min	Minute
mRNA	Boten-RNA („messenger RNA“)
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion („polymerase chain reaction“)
RBP-J <sub>κ</sub>	Recombination signal sequence binding protein J
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSC	NaCl-Natriumcitrat-Salzlösung
TE	Tris-EDTA-Puffer

---

TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan
rpm	Umdrehungen (rounds) pro Minute
UV	Ultraviolett
ZU	Ultrazentrifuge
V	Volt
Vol	Volumen

---

## 8 LITERATUR

### A

Allday, M. J., and Farrell, P. J. (1994). Epstein-Barr virus nuclear antigen EBNA3C/6 expression maintains the level of latent membrane protein 1 in G1-arrested cells. *J Virol* 68, 3491-3498.

Allday, M. J., Inman, G. J., Crawford, D. H., and Farrell, P. J. (1995). DNA damage in human B cells can induce apoptosis, proceeding from G1/S when p53 is transactivation competent and G2/M when it is transactivation defective. *Embo J* 14, 4994-5005.

### B

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.

Ben-Bassat, H., Goldblum, N., Mitrani, S., Goldblum, T., Yoffey, J. M., Cohen, M. M., Bentwich, Z., Ramot, B., Klein, E., and Klein, G. (1977). Establishment in continuous culture of a new type of lymphocyte from a "Burkitt like" malignant lymphoma (line D.G.-75). *Int J Cancer* 19, 27-33.

Bornkamm, G. W., and Hammerschmidt, W. (2001). Molecular virology of Epstein-Barr virus. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 356, 437-459.

Boyd, J. M., Subramanian, T., Schaeper, U., La Regina, M., Bayley, S., and Chinnadurai, G. (1993). A region in the C-terminus of adenovirus 2/5 E1a protein is required for association with a cellular phosphoprotein and important for the negative modulation of T24-ras mediated transformation, tumorigenesis and metastasis. *Embo J* 12, 469-478.

Burkitt, D. (1958). A sarcoma involving the jaws in African children. *Br J Surg* 46, 218-223.

Burkitt, D. (1962). A children's cancer dependent on climatic factors. *Nature* 194, 232-234.

### C

Chen, A., Divisconte, M., Jiang, X., Quink, C., and Wang, F. (2005). Epstein-Barr virus with the latent infection nuclear antigen 3B completely deleted is still competent for B-cell growth transformation in vitro. *J Virol* 79, 4506-4509.

Choudhuri, T., Verma, S. C., Lan, K., and Robertson, E. S. (2006). Expression of alpha V integrin is modulated by Epstein-Barr virus nuclear antigen 3C and the metastasis suppressor Nm23-H1 through interaction with the GATA-1 and Sp1 transcription factors. *Virology* 351, 58-72.

Cludts, I., and Farrell, P. J. (1998). Multiple functions within the Epstein-Barr virus EBNA-3A protein. *J Virol* 72, 1862-1869.

---

Cohen, J. I., Wang, F., Mannick, J., and Kieff, E. (1989). Epstein-Barr virus nuclear protein 2 is a key determinant of lymphocyte transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 9558-9562.

Cooper, A., Johannsen, E., Maruo, S., Cahir-McFarland, E., Illanes, D., Davidson, D., and Kieff, E. (2003). EBNA3A association with RBP-Jkappa down-regulates c-myc and Epstein-Barr virus-transformed lymphoblast growth. *J Virol* 77, 999-1010.

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.

#### D

Delecluse, H. J., Hilsendegen, T., Pich, D., Zeidler, R., and Hammerschmidt, W. (1998). Propagation and recovery of intact, infectious Epstein-Barr virus from prokaryotic to human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 8245-8250.

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.

#### E

Epstein, M. A., Achong, B. G., and Barr, Y. M. (1964). Virus Particles in Cultured Lymphoblasts from Burkitt's Lymphoma. *Lancet* 15, 702-703.

#### G

Gast, K., Damaschun, H., Eckert, K., Schulze-Forster, K., Maurer, H. R., Muller-Frohne, M., Zirwer, D., Czarnecki, J., and Damaschun, G. (1995). Prothymosin alpha: a biologically active protein with random coil conformation. *Biochemistry* 34, 13211-13218.

Gomez-Marquez, J., and Segade, F. (1988). Prothymosin alpha is a nuclear protein. *FEBS Lett* 226, 217-219.

Goodall, G. J., Dominguez, F., and Horecker, B. L. (1986). Molecular cloning of cDNA for human prothymosin alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 8926-8928.

Gottschalk, S., Ng, C. Y., Perez, M., Smith, C. A., Sample, C., Brenner, M. K., Heslop, H. E., and Rooney, C. M. (2001). An Epstein-Barr virus deletion mutant associated with fatal lymphoproliferative disease unresponsive to therapy with virus-specific CTLs. *Blood* 97, 835-843.

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.

Grundhoff, A. T., Kremmer, E., Tureci, O., Glieden, A., Gindorf, C., Atz, J., Mueller-Lantsch, N., Schubach, W. H., and Grasser, F. A. (1999). Characterization of



---

DP103, a novel DEAD box protein that binds to the Epstein-Barr virus nuclear proteins EBNA2 and EBNA3C. *J Biol Chem* 274, 19136-19144.

## H

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

Hartzog, G. A., and Winston, F. (1997). Nucleosomes and transcription: recent lessons from genetics. *Curr Opin Genet Dev* 7, 192-198.

Henle, G., and Henle, W. (1967). Immunofluorescence, interference, and complement fixation technics in the detection of the herpes-type virus in Burkitt tumor cell lines. *Cancer Res* 27, 2442-2446.

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

Hennesy, K., Wang, F., Bushman, E. W., and Kieff, E. (1986). Definitive identification of a member of the Epstein-Barr virus nuclear protein 3 family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 5693-5697.

Higuchi, M., Kieff, E., and Izumi, K. M. (2002). The Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 putative Janus kinase 3 (JAK3) binding domain does not mediate JAK3 association or activation in B-lymphoma or lymphoblastoid cell lines. *J Virol* 76, 455-459.

Hsieh, J. J., and Hayward, S. D. (1995). Masking of the CBF1/RBPJ kappa transcriptional repression domain by Epstein-Barr virus EBNA2. *Science* 268, 560-563.

Hsieh, J. J., Zhou, S., Chen, L., Young, D. B., and Hayward, S. D. (1999a). CIR, a corepressor linking the DNA binding factor CBF1 to the histone deacetylase complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 23-28.

Hsieh, W. S., Lemas, M. V., and Ambinder, R. F. (1999b). The biology of Epstein-Barr virus in post-transplant lymphoproliferative disease. *Transpl Infect Dis* 1, 204-212.

## I

Imhof, A., Yang, X. J., Ogryzko, V. V., Nakatani, Y., Wolffe, A. P., and Ge, H. (1997). Acetylation of general transcription factors by histone acetyltransferases. *Curr Biol* 7, 689-692.

## J

Johannsen, E., Miller, C. L., Grossman, S. R., and Kieff, E. (1996). EBNA-2 and EBNA-3C extensively and mutually exclusively associate with RBPJkappa in Epstein-Barr virus-transformed B lymphocytes. *J Virol* 70, 4179-4183.

## K

Kashuba, E., Kashuba, V., Pokrovskaja, K., Klein, G., and Szekely, L. (2000). Epstein-Barr virus encoded nuclear protein EBNA-3 binds XAP-2, a protein associated with Hepatitis B virus X antigen. *Oncogene* 19, 1801-1806.

Kashuba, E., Kashuba, V., Sandalova, T., Klein, G., and Szekely, L. (2002). Epstein-Barr virus encoded nuclear protein EBNA-3 binds a novel human uridine kinase/uracil phosphoribosyltransferase. *BMC Cell Biol* 3, 23.

Kashuba, E., Pokrovskaja, K., Klein, G., and Szekely, L. (1999). Epstein-Barr virus-encoded nuclear protein EBNA-3 interacts with the epsilon-subunit of the T-complex protein 1 chaperonin complex. *J Hum Virol* 2, 33-37.

Kashuba, E. V., Gradin, K., Isaguliants, M., Szekely, L., Poellinger, L., Klein, G., and Kazlauskas, A. (2006). Regulation of transactivation function of the aryl hydrocarbon receptor by the Epstein-Barr virus-encoded EBNA-3 protein. *J Biol Chem* 281, 1215-1223.

Kaul, R., Verma, S. C., Murakami, M., Lan, K., Choudhuri, T., and Robertson, E. S. (2006). Epstein-Barr virus protein can upregulate cyclo-oxygenase-2 expression through association with the suppressor of metastasis Nm23-H1. *J Virol* 80, 1321-1331.

Kelly, G. L., Milner, A. E., Tierney, R. J., Croom-Carter, D. S., Altmann, M., Hammerschmidt, W., Bell, A. I., and Rickinson, A. B. (2005). Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 (EBNA2) gene deletion is consistently linked with EBNA3A, -3B, and -3C expression in Burkitt's lymphoma cells and with increased resistance to apoptosis. *J Virol* 79, 10709-10717.

Kempkes, B., Spitkovsky, D., Jansen-Durr, P., Ellwart, J. W., Kremmer, E., Delecluse, H. J., Rottenberger, C., Bornkamm, G. W., and Hammerschmidt, W. (1995). B-cell proliferation and induction of early G1-regulating proteins by Epstein-Barr virus mutants conditional for EBNA2. *Embo J* 14, 88-96.

Kieff, E. a. R. A. B. (2001). *Epstein-Barr Virus and its replication* (Philadelphia-New York: Lippincott Williams and Wilkins).

Knight, J. S., Lan, K., Subramanian, C., and Robertson, E. S. (2003). Epstein-Barr virus nuclear antigen 3C recruits histone deacetylase activity and associates with the corepressors mSin3A and NCoR in human B-cell lines. *J Virol* 77, 4261-4272.

Knight, J. S., and Robertson, E. S. (2004). Epstein-Barr virus nuclear antigen 3C regulates cyclin A/p27 complexes and enhances cyclin A-dependent kinase activity. *J Virol* 78, 1981-1991.

Knight, J. S., Sharma, N., Kalman, D. E., and Robertson, E. S. (2004). A cyclin-binding motif within the amino-terminal homology domain of EBNA3C binds cyclin A and modulates cyclin A-dependent kinase activity in Epstein-Barr virus-infected cells. *J Virol* 78, 12857-12867.

Knight, J. S., Sharma, N., and Robertson, E. S. (2005). Epstein-Barr virus latent antigen 3C can mediate the degradation of the retinoblastoma protein through an SCF cellular ubiquitin ligase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 18562-18566.

Koipally, J., and Georgopoulos, K. (2000). Ikaros interactions with CtBP reveal a repression mechanism that is independent of histone deacetylase activity. *J Biol Chem* 275, 19594-19602.

Kola, I., Brookes, S., Green, A. R., Garber, R., Tymms, M., Papas, T. S., and Seth, A. (1993). The Ets1 transcription factor is widely expressed during murine embryo development and is associated with mesodermal cells involved in morphogenetic processes such as organ formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 7588-7592.

Kouzarides, T. (1999). Histone acetylases and deacetylases in cell proliferation. *Curr Opin Genet Dev* 9, 40-48.

Krauer, K. G., Burgess, A., Buck, M., Flanagan, J., Sculley, T. B., and Gabrielli, B. (2004). The EBNA-3 gene family proteins disrupt the G2/M checkpoint. *Oncogene* 23, 1342-1353.

Krauer, K. G., Kienzle, N., Young, D. B., and Sculley, T. B. (1996). Epstein-Barr nuclear antigen-3 and -4 interact with RBP-2N, a major isoform of RBP-J kappa in B lymphocytes. *Virology* 226, 346-353.

Kuppers, D. A., Lan, K., Knight, J. S., and Robertson, E. S. (2005). Regulation of matrix metalloproteinase 9 expression by Epstein-Barr virus nuclear antigen 3C and the suppressor of metastasis Nm23-H1. *J Virol* 79, 9714-9724.

Kuppers, R. (2003). B cells under influence: transformation of B cells by Epstein-Barr virus. *Nat Rev Immunol* 3, 801-812.

## L

Lacombe, M. L., Milon, L., Munier, A., Mehus, J. G., and Lambeth, D. O. (2000). The human Nm23/nucleoside diphosphate kinases. *J Bioenerg Biomembr* 32, 247-258.

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

Le Roux, A., Kerdiles, B., Walls, D., Dedieu, J. F., and Perricaudet, M. (1994). The Epstein-Barr virus determined nuclear antigens EBNA-3A, -3B, and -3C repress EBNA-2-mediated transactivation of the viral terminal protein 1 gene promoter. *Virology* 205, 596-602.

Li, H. P., and Chang, Y. S. (2003). Epstein-Barr virus latent membrane protein 1: structure and functions. *J Biomed Sci* 10, 490-504.

Ling, P. D., Hsieh, J. J., Ruf, I. K., Rawlins, D. R., and Hayward, S. D. (1994). EBNA-2 upregulation of Epstein-Barr virus latency promoters and the cellular CD23 promoter utilizes a common targeting intermediate, CBF1. *J Virol* 68, 5375-5383.

## M

Marchini, A., Kieff, E., and Longnecker, R. (1993). Marker rescue of a transformation-negative Epstein-Barr virus recombinant from an infected Burkitt lymphoma cell line: a method useful for analysis of genes essential for transformation. *J Virol* 67, 606-609.

Marshall, D., and Sample, C. (1995). Epstein-Barr virus nuclear antigen 3C is a transcriptional regulator. *J Virol* 69, 3624-3630.

Maruo, S., Johannsen, E., Illanes, D., Cooper, A., and Kieff, E. (2003). Epstein-Barr Virus nuclear protein EBNA3A is critical for maintaining lymphoblastoid cell line growth. *J Virol* 77, 10437-10447.

McKercher, S. R., Torbett, B. E., Anderson, K. L., Henkel, G. W., Vestal, D. J., Baribault, H., Klemsz, M., Feeney, A. J., Wu, G. E., Paige, C. J., and Maki, R. A. (1996). Targeted disruption of the PU.1 gene results in multiple hematopoietic abnormalities. *Embo J* 15, 5647-5658.

Meyer, B. K., Pray-Grant, M. G., Vanden Heuvel, J. P., and Perdew, G. H. (1998). Hepatitis B virus X-associated protein 2 is a subunit of the unliganded aryl hydrocarbon receptor core complex and exhibits transcriptional enhancer activity. *Mol Cell Biol* 18, 978-988.

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.

## N

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 U S A* 99, 15036-15041.

## O

Okubo, M., Tsurukubo, Y., Higaki, T., Kawabe, T., Goto, M., Murase, T., Ide, T., Furuichi, Y., and Sugimoto, M. (2001). Clonal chromosomal aberrations accompanied by strong telomerase activity in immortalization of human B-lymphoblastoid cell lines transformed by Epstein-Barr virus. *Cancer Genet Cytogenet* 129, 30-34.

## P

Parker, G. A., Crook, T., Bain, M., Sara, E. A., Farrell, P. J., and Allday, M. J. (1996). Epstein-Barr virus nuclear antigen (EBNA)3C is an immortalizing oncoprotein with similar properties to adenovirus E1A and papillomavirus E7. *Oncogene* 13, 2541-2549.

Parker, G. A., Touitou, R., and Allday, M. J. (2000). Epstein-Barr virus EBNA3C can disrupt multiple cell cycle checkpoints and induce nuclear division divorced from cytokinesis. *Oncogene* 19, 700-709.

---

Petti, L., and Kieff, E. (1988). A sixth Epstein-Barr virus nuclear protein (EBNA3B) is expressed in latently infected growth-transformed lymphocytes. *J Virol* 62, 2173-2178.

Petti, L., Sample, J., Wang, F., and Kieff, E. (1988). A fifth Epstein-Barr virus nuclear protein (EBNA3C) is expressed in latently infected growth-transformed lymphocytes. *J Virol* 62, 1330-1338.

Pulvertaft, J. V. (1964). Cytology of Burkitt's Tumour (African Lymphoma). *Lancet* 39, 238-240.

## R

Radkov, S. A., Bain, M., Farrell, P. J., West, M., Rowe, M., and Allday, M. J. (1997). Epstein-Barr virus EBNA3C represses Cp, the major promoter for EBNA expression, but has no effect on the promoter of the cell gene CD21. *J Virol* 71, 8552-8562.

Radkov, S. A., Touitou, R., Brehm, A., Rowe, M., West, M., Kouzarides, T., and Allday, M. J. (1999). Epstein-Barr virus nuclear antigen 3C interacts with histone deacetylase to repress transcription. *J Virol* 73, 5688-5697.

Rao, S., Garrett-Sinha, L. A., Yoon, J., and Simon, M. C. (1999). The Ets factors PU.1 and Spi-B regulate the transcription in vivo of P2Y10, a lymphoid restricted heptahelical receptor. *J Biol Chem* 274, 34245-34252.

Robertson, E. S., Grossman, S., Johannsen, E., Miller, C., Lin, J., Tomkinson, B., and Kieff, E. (1995). Epstein-Barr virus nuclear protein 3C modulates transcription through interaction with the sequence-specific DNA-binding protein J kappa. *J Virol* 69, 3108-3116.

Rodriguez, P., Vinuela, J. E., Alvarez-Fernandez, L., Buceta, M., Vidal, A., Dominguez, F., and Gomez-Marquez, J. (1998). Overexpression of prothymosin alpha accelerates proliferation and retards differentiation in HL-60 cells. *Biochem J* 331 ( Pt 3), 753-761.

Rosendorff, A., Illanes, D., David, G., Lin, J., Kieff, E., and Johannsen, E. (2004). EBNA3C coactivation with EBNA2 requires a SUMO homology domain. *J Virol* 78, 367-377.

## S

Salk, D. (1985). In vitro studies of Werner syndrome cells: aberrant growth and chromosome behavior. *Basic Life Sci* 35, 419-426.

Salk, D., Bryant, E., Hoehn, H., Johnston, P., and Martin, G. M. (1985). Growth characteristics of Werner syndrome cells in vitro. *Adv Exp Med Biol* 190, 305-311.

Sburlati, A. R., Manrow, R. E., and Berger, S. L. (1990). Human prothymosin alpha: purification of a highly acidic nuclear protein by means of a phenol extraction. *Protein Expr Purif* 1, 184-190.

---

Sburlati, A. R., Manrow, R. E., and Berger, S. L. (1991). Prothymosin alpha antisense oligomers inhibit myeloma cell division. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 253-257.

Schaeper, U., Boyd, J. M., Verma, S., Uhlmann, E., Subramanian, T., and Chinnadurai, G. (1995). Molecular cloning and characterization of a cellular phosphoprotein that interacts with a conserved C-terminal domain of adenovirus E1A involved in negative modulation of oncogenic transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 10467-10471.

Seeler, J. S., and Dejean, A. (2001). SUMO: of branched proteins and nuclear bodies. *Oncogene* 20, 7243-7249.

Shiomi, T., and Okada, Y. (2003). MT1-MMP and MMP-7 in invasion and metastasis of human cancers. *Cancer Metastasis Rev* 22, 145-152.

Su, G. H., Chen, H. M., Muthusamy, N., Garrett-Sinha, L. A., Baunoch, D., Tenen, D. G., and Simon, M. C. (1997). Defective B cell receptor-mediated responses in mice lacking the Ets protein, Spi-B. *Embo J* 16, 7118-7129.

Subramanian, C., Cotter, M. A., 2nd, and Robertson, E. S. (2001). Epstein-Barr virus nuclear protein EBNA-3C interacts with the human metastatic suppressor Nm23-H1: a molecular link to cancer metastasis. *Nat Med* 7, 350-355.

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

Sugimoto, M., Ide, T., Goto, M., and Furuichi, Y. (1999). Reconsideration of senescence, immortalization and telomere maintenance of Epstein-Barr virus-transformed human B-lymphoblastoid cell lines. *Mech Ageing Dev* 107, 51-60.

Sundqvist, A., Sollerbrant, K., and Svensson, C. (1998). The carboxy-terminal region of adenovirus E1A activates transcription through targeting of a C-terminal binding protein-histone deacetylase complex. *FEBS Lett* 429, 183-188.

## T

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.

Takehita, H., Yoshizaki, T., Miller, W. E., Sato, H., Furukawa, M., Pagano, J. S., and Raab-Traub, N. (1999). Matrix metalloproteinase 9 expression is induced by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 C-terminal activation regions 1 and 2. *J Virol* 73, 5548-5555.

Thorley-Lawson, D. A. (2001). Epstein-Barr virus: exploiting the immune system. *Nat Rev Immunol* 1, 75-82.

Thorley-Lawson, D. A. (2005). EBV Persistence and Latent Infection *In Vivo* (Pennsylvania: Caister Academic Press).

---

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.

Tun, T., Hamaguchi, Y., Matsunami, N., Furukawa, T., Honjo, T., and Kawaichi, M. (1994). Recognition sequence of a highly conserved DNA binding protein RBP-J kappa. *Nucleic Acids Res* 22, 965-971.

#### W

Waltzer, L., Perricaudet, M., Sergeant, A., and Manet, E. (1996). Epstein-Barr virus EBNA3A and EBNA3C proteins both repress RBP-J kappa-EBNA2-activated transcription by inhibiting the binding of RBP-J kappa to DNA. *J Virol* 70, 5909-5915.

Wang, L., Grossman, S. R., and Kieff, E. (2000). Epstein-Barr virus nuclear protein 2 interacts with p300, CBP, and PCAF histone acetyltransferases in activation of the LMP1 promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 430-435.

Wielockx, B., Libert, C., and Wilson, C. (2004). Matrilysin (matrix metalloproteinase-7): a new promising drug target in cancer and inflammation? *Cytokine Growth Factor Rev* 15, 111-115.

Wu, C. L., Shiau, A. L., and Lin, C. S. (1997). Prothymosin alpha promotes cell proliferation in NIH3T3 cells. *Life Sci* 61, 2091-2101.

#### Y

Yang, X., He, Z., Xin, B., and Cao, L. (2000). LMP1 of Epstein-Barr virus suppresses cellular senescence associated with the inhibition of p16INK4a expression. *Oncogene* 19, 2002-2013.

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.

#### Z

Zhao, B., Marshall, D. R., and Sample, C. E. (1996). A conserved domain of the Epstein-Barr virus nuclear antigens 3A and 3C binds to a discrete domain of Jkappa. *J Virol* 70, 4228-4236.

Zhao, B., and Sample, C. E. (2000). Epstein-barr virus nuclear antigen 3C activates the latent membrane protein 1 promoter in the presence of Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 through sequences encompassing an spi-1/Spi-B binding site. *J Virol* 74, 5151-5160.

Zhou, S., Fujimuro, M., Hsieh, J. J., Chen, L., and Hayward, S. D. (2000a). A role for SKIP in EBNA2 activation of CBF1-repressed promoters. *J Virol* 74, 1939-1947.

---

Zhou, S., Fujimuro, M., Hsieh, J. J., Chen, L., Miyamoto, A., Weinmaster, G., and Hayward, S. D. (2000b). SKIP, a CBF1-associated protein, interacts with the ankyrin repeat domain of Notch1C To facilitate Notch1C function. *Mol Cell Biol* 20, 2400-2410.

zur Hausen, H., Schulte-Holthausen, H., Klein, G., Henle, W., Henle, G., Clifford, P., and Santesson, L. (1970). EBV DNA in biopsies of Burkitt tumours and anaplastic carcinomas of the nasopharynx. *Nature* 228, 1056-1058.



---

## DANKSAGUNG

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

PD Dr. Bettina Kempkes für das Überlassen des Themas, die hervorragende wissenschaftliche Betreuung und ständige Diskussionsbereitschaft.

Dr. (!! ) Sabine Maier für das Einweisen in die unergründlichen Tiefen der FACS-Einstellungen, für die vielen Antworten auf fast alle Fragen und Probleme des Laboralltags, für vieles gemeinsames Jammern und nicht zu vergessen für die „power-shop-walking-touren“ zur Frustrationskompensation.

Dr. Markus Altmann für praktische Tipps und für die Hilfe beim Kampf, die kleinen grünen Monster, die nicht mehr grün sein wollten, wieder zum Leuchten zu bringen.

Den Mitgliedern des „knitting clubs“ Sabine, Sarah und Karen für viele „Currys“, neue englische Vokabeln und die Erkenntnis, nach langer Arbeit auch mal ein schönes Ergebnis in den Händen halten zu können.

Meinen (Ex-) Laborkolleginnen Kristina, Maja, Sabine, Anja, Andrea, Konstanze, Julia, Sabine P., Gabi und Marie, ohne euch wäre die stressige Arbeit im Labor bei weitem nicht so gut zu bewältigen gewesen. Danke für das sehr gute Arbeitsklima und die ständige Hilfsbereitschaft.

Meinem Bruder Christopher fürs Korrekturlesen und Kommasetzen, obwohl er nur jedes fünfte Wort versteht.

Meiner Mama, die mir so vieles ermöglicht hat, immer an mich glaubt, mich bei allem unterstützt und immer für mich da ist.

Robert fürs Korrekturlesen, gutes Zureden und dass du mit mir durch Dick und Dünn gehst. Danke Schatz!

---

## Curriculum vitae

### Persönliche Angaben

Name	Claudia Popp
Geburtsdatum	21.02.1977
Geburtsort	Mühldorf/Inn
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch

### Schulischer Werdegang

1983-1987	Grundschule Aschau/Inn
1987-1996	Gymnasium Gars
Juni 1996	Abitur

### Studium

1996-2002	Studium der Biologie an der Ludwig-Maximilian Universität, München
Juli 2001-Juli 2002	Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe von Bettina Kempkes, Institut für Klinische Molekularbiologie und Tumorgenetik, GSF, München
Juli 2002	Abschluss des Studiums der Biologie (Diplom)
Oktober 2002-Juli 2006	Promotion in der Arbeitsgruppe von Bettina Kempkes, Institut für Klinische Molekularbiologie und Tumorgenetik, GSF, München