

---

---

# ***Cis-* und *trans-*wirksame Elemente der latenten Replikation des Epstein-Barr-Virus**

---

---

DISSERTATION  
ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES DER NATURWISSENSCHAFTEN  
(DR. RER. NAT.)  
DER NATURWISSENSCHAFTLICHEN FAKULTÄT III  
- BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN -  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG



vorgelegt von  
**Jörg Uhlig**  
aus Lappersdorf

2001

Promotionsgesuch eingereicht am: 23. November 2001  
Tag der mündlichen Prüfung: 16. Oktober 2002

Diese Arbeit wurde angeleitet von Prof. Dr. H. Wolf am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene am Klinikum Regensburg. Die fakultätsinterne Vertretung übernahm Prof. Dr. A. Kurtz, Lehrstuhl für Physiologie der Universität Regensburg.

Prüfungsausschuss:

Prof. Dr. Ralph Witzgall	(Vorsitzender)
Prof. Dr. Armin Kurtz	(1. Gutachter)
Prof. Dr. Hans Wolf	(2. Gutachter)
Prof. Dr. Will Minuth	(3. Prüfer)

***Meiner Familie***

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>7</b>
<b>2. EINLEITUNG</b>	<b>9</b>
<b>2.1 SYSTEMATIK</b>	<b>9</b>
2.1.1 DIE FAMILIE DER HERPESVIRIDAE	9
2.1.2 EINTEILUNG IN GENERA UND HUMANPATHOGENE VERTRETER	9
<b>2.2 DIE BEDEUTUNG DES EPSTEIN-BARR-VIRUS</b>	<b>10</b>
<b>2.3 EBV-HISTORIE</b>	<b>11</b>
<b>2.4 VIRUS- UND GENOMSTRUKTUR DES EBV</b>	<b>12</b>
2.4.1 STRUKTUR DES EBV-VIRIONS	12
2.4.2 STRUKTUR DES EBV-GENOMS	12
<b>2.5 PATHOGENESE EBV-ASSOZIIERTER ERKRANKUNGEN</b>	<b>14</b>
2.5.1 ÜBERTRAGUNGSWEGE	14
2.5.2 DIE INFEKTIOSE MONONUKLEOSE	15
2.5.2.1 Die normale Infektiöse Mononukleose	15
2.5.2.2 Die tödlich verlaufende IM	15
2.5.2.3 Die Chronische IM	16
2.5.3 DAS BURKITT-LYMPHOM (BL)	16
2.5.4 DAS NASOPHARYNXKARZINOM (NPC)	17
2.5.5 MORBUS HODGKIN	17
2.5.6 EBV UND IMMUNSUPPRIMIERTE PATIENTEN	18
2.5.7 EBV UND AUTOIMMUNERKRANKUNGEN	18
<b>2.6 DIE VERMEHRUNGSSTRATEGIEN DES EBV</b>	<b>19</b>
2.6.1 DIE INFEKTION DER WIRTSZELLEN UND ZELL-ADSORPTION	19
2.6.2 PENETRATION UND UNCOATING	19
<b>2.7 LYSE UND LATENZ</b>	<b>20</b>
2.7.1 DER LYTISCHE VERMEHRUNGSZYKLUS	20
2.7.2 DIE LATENTE VERMEHRUNG UND LATENZTYPEN	22
2.7.3 DIE PROTEINE DER LATENZ	23
2.7.3.1 Die EBNA-Proteine	24

---

2.7.3.2	Die LMP-Proteine	26
2.7.4	DIE EBER-TRANSKRIPTE	29
2.7.5	DER <i>ORIP</i>	30
2.7.6	DAS REP*/VIL-10P-ELEMENT	32
<b>2.8</b>	<b>DIE TELOMERASE</b>	<b>32</b>
<b>2.9</b>	<b>FRAGESTELLUNG UND ZIELSETZUNG DER ARBEIT</b>	<b>34</b>
2.9.1	UNTERSUCHUNG DER FUNKTION DER TELOMER-REPEATS IM <i>ORIP</i>	34
2.9.2	UNTERSUCHUNG DES REP*-ELEMENTS DES <i>ORIP</i>	35
<b>3.</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>36</b>
<b>3.1</b>	<b>AUSGANGSMATERIAL</b>	<b>36</b>
3.1.1	BAKTERIEN UND PLASMIDE	36
3.1.2	EUKARYOTISCHE ZELLINIEN	36
<b>3.2</b>	<b>MOLEKULARBIOLOGISCHE ARBEITSMETHODEN</b>	<b>37</b>
3.2.1	REVERSE TRANSKRIPTION	37
3.2.2	POLYMERASE-KETTENREAKTION (PCR)	37
3.2.3	KLONIERUNG VON PCR-PRODUKTEN	38
3.2.3.1	Reinigung der DNA-Fragmente über Agarosegele	38
3.2.3.2	Ligation	39
3.2.3.3	Herstellung ultrakompetenter Zellen nach Inoue (Inoue et al, 1990):	39
3.2.3.4	Transformation	40
3.2.4	DNA-PRÄPARATIONSTECHNIKEN: PLASMIDISOLIERUNG AUS BAKTERIEN	40
3.2.4.1	Miniprep: Klassische alkalische Lyse	40
3.2.4.2	Maxiprep: Macherey-Nagel	41
3.2.4.3	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Plasmiden – Restriktionsverdau	41
<b>3.3</b>	<b>EXPERIMENTE ZUR ERLANGUNG DER ERGEBNISSE</b>	<b>42</b>
3.3.1	RNASE-PROTECTION-ASSAY:	42
3.3.1.1	RNA-Gewinnung	42
3.3.1.2	RNA in vitro-Transkription	42
3.3.1.3	Hybridisierung	43
3.3.1.4	RNase-Verdau	43
3.3.2	DER TRAP-ASSAY	44
3.3.2.1	Proteinextraktherstellung	44
3.3.2.2	Proteinmengenbestimmung	45
3.3.2.3	TS-Primer-Markierung	45
3.3.2.4	TRAP-Assay	45
3.3.2.5	PCR	45

---

3.3.2.6	Aufreinigung und Konzentration der PCR-Produkte	45
<b>3.4</b>	<b>TRANSFEKTIONEN</b>	<b>46</b>
3.4.1	TRANSFEKTION MITTELS ELEKTROPORATION	46
3.4.2	TRANSFEKTION MIT DER DEAE-DEXTRAN-METHODE	47
3.4.3	TRANSFEKTION MIT SUPERFECT VON QIAGEN	47
<b>3.5</b>	<b>DAS DUALE LUCIFERASE-TEST-SYSTEM</b>	<b>47</b>
3.5.1	CHEMIE DES LUCIFERASE-ASSAYS	48
3.5.2	LUCIFERASE-VEKTORKONSTRUKTE	49
3.5.3	HERSTELLUNG DER ZELLYSATE	50
3.5.4	DURCHFÜHRUNG DER MESSUNGEN	50
<b>3.6</b>	<b>PCR UND SEQUENZIERUNGEN FÜR DIE EBV-PROMOTOR-STUDIEN</b>	<b>50</b>
3.6.1	REP*/MIL-10P-REGION	50
3.6.2	HERSTELLUNG DER KONTROLLSEQUENZEN FÜR ORILYT, CP, RP, ZP, LMPP, QP	51
<b>3.7</b>	<b>DMS IN VIVO FOOTPRINTING</b>	<b>52</b>
3.7.1	G-SEQUENZIERUNG NACH MAXAM & GILBERT (1980)	53
3.7.2	LM-PCR	53
<b>3.8</b>	<b>VERWENDETE COMPUTERPROGRAMME</b>	<b>55</b>
<b>4.</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>56</b>
<b>4.1</b>	<b>GEWINNUNG DER GEN-EXPRESSIONSPLASMIDE</b>	<b>56</b>
<b>4.2</b>	<b>OPTIMIERUNG DES TRANSFEKTIONSPROTOKOLLS</b>	<b>57</b>
<b>4.3</b>	<b>TELOMERASEAKTIVITÄTSNACHWEIS MITTELS TRAP-ASSAY</b>	<b>58</b>
<b>4.4</b>	<b>TELOMERASE-TRANSKRIPTIONSMESSUNG MITTELS RNASE-PROTECTION-ASSAY</b>	<b>62</b>
4.4.1	ÄNDERUNG DER GENAKTIVITÄT BEI FIBROBLASTEN	64
4.4.2	ÄNDERUNG DER GENAKTIVITÄT BEI HELA-ZELLEN	65
4.4.3	ÄNDERUNG DER GENAKTIVITÄT BEI DG75-ZELLEN	66
4.4.4	ÄNDERUNG DER GENAKTIVITÄT BEI RAJI-ZELLEN	67
<b>4.5</b>	<b>TELOMERASE-PROMOTOR-STUDIEN MITTELS LUCIFERASE-ASSAY</b>	<b>67</b>
4.5.1	hTERT-PROMOTOR-AKTIVITÄT IN VERSCHIEDENEN ZELLTYPEN	67
4.5.2	VERÄNDERUNG DER PROMOTORAKTIVITÄT BEI VORHAUT-FIBROBLASTEN	68
4.5.3	VERÄNDERUNG DER PROMOTORAKTIVITÄT BEI HELA-ZELLEN	69
4.5.4	VERÄNDERUNG DER PROMOTORAKTIVITÄT BEI DG75-ZELLEN	70
<b>4.6</b>	<b>FOOTPRINTUNTERSUCHUNG DES REP*/MIL-10P-ELEMENTS</b>	<b>71</b>
<b>5.</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>73</b>
<b>5.1</b>	<b>EBV ALS MODELLSYSTEM FÜR DIE REPLIKATION</b>	<b>73</b>

---

<b>5.2</b>	<b>ZELLIMMORTALISIERUNGSWEGE ANDERER VIREN</b>	<b>74</b>
<b>5.3</b>	<b>ZWECKMÄßIGKEIT DER VERWENDETEN VIRALEN PROTEINE</b>	<b>74</b>
<b>5.4</b>	<b>VON DER PROTEINABHÄNGIGKEIT ALTERNATIVE WEGE DER IMMORTALISIERUNG MIT EBV INFIZIERTER LYMPHOBLASTEN</b>	<b>77</b>
5.4.1	ROLLE DER EBER-TRANSKRIPTE	77
5.4.2	IMMORTALISIERUNG DURCH CHROMOSOMENABERRATIONEN	77
<b>5.5</b>	<b>DISKUSSION DER VORLIEGENDEN ERGEBNISSE</b>	<b>78</b>
5.5.1	TECHNIKEN	78
5.5.2	DIE ERGEBNISSE DER UNTERSUCHUNG DER TELOMER-REPEATS / EINFLUß ZUTRANSFIZIERTER EBV-GENE AUF DIE TELOMERASEAKTIVITÄT UND - TRANSKRIPTION	78
5.5.3	DIE HTERT-PROMOTORAKTIVITÄT	79
<b>5.6</b>	<b>UNTERSUCHUNG DES REP*-ELEMENTS</b>	<b>80</b>
<b>6. LITERATURVERZEICHNIS</b>		<b>82</b>
<b>7. EIGENE ARBEITEN</b>		<b>104</b>

---

## Verzeichnis der Abkürzungen

A	Ampere; Adenin
Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5'-Phosphat
BL	Burkitt-Lymphom
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserum-Albumin (Bovine Serum Albumine)
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
Ci	Curie
CTL	zytotoxische T-Lymphozyten
cm	Centimeter
CMV	Cytomegalievirus
cpm	counts pro Minute
dATP	2'-Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	2'-Desoxycytidintriphosphat
DEAE	Diethylaminoethyl
dGTP	2'-Desoxyguanosintriphosphat
DMS	Dimethylsulfat
DMSO	Dimethylsulfonamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuclease
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
ds	double stranded
DS	dyad symmetry
DTT	Dithiothreitol
dTTP	2'-Desoxythymidintriphosphat
EBER	EBV encoded RNA
EBNA	Epstein-Barr nukleäres Antigen
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiaminetetraacetat
et al.	und andere
FKS	fötales Kälberserum
FR	family of repeats
G	Guanin
g	Gramm; Erdbeschleunigung
h	Stunde
HHV	Humanes Herpesvirus
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HSV	Herpes-Simplex-Virus
IM	Infektiöse Mononukleose
IR	internal repeat
JNK-1	c-jun amino-terminale kinase 1
kBp	Kilobasenpaare
kD	Kilodalton
l	Liter
LB-Medium	Luria Bertani-Medium
LB <sub>Amp</sub> -Medium	LB-Medium mit Ampicillin versetzt

---

## Abkürzungsverzeichnis

---

LCL	Lymphoblastoide Zelllinie
LMP	latent membrane protein
M	Mol/Liter; Molar
m	milli ( $10^{-3}$ )
$\mu$	mikro ( $10^{-6}$ )
mA	Milliampere
MCS	multiple cloning site
MHC	major histocompatibility complex
min	Minute
mM	Millimolar
mol	Mol
mRNA	messenger RNA
MW	Molekulargewicht
n	nano ( $10^{-9}$ )
NaAc	Natriumacetat
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NPC	Nasopharynxcarzinom
OD	optische Dichte
oriP	Replikationsursprung P
p	pico ( $10^{-12}$ )
pmol	picomol
PAA	Polyacrylamid
Page	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polmerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction)
pH	Konzentration der Protonen in einer Lösung
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PNK	Polynukleotidkinase
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
SAP	Shrimp Alkalische Phosphatase
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris/Acetate/EDTA-Puffer
TBE	Tris/Borat/EDTA-Puffer
TBS	Tris/Kochsalz-Puffer
TE	Tris/EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N',-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-Aminomethan
t-RNA	Transfer-RNA
U	Unit
ÜN	über Nacht
V	Volt
W	Watt
z.B.	zum Beispiel

---

# 1. Zusammenfassung

Die Replikation des Epstein-Barr-Virus wird als Modellsystem für die chromosomale Replikation höherer Eukaryonten angesehen. Der Ausgangspunkt der Replikation, der oriP, besteht aus zwei funktionellen Elementen, dem DS- und dem FR-Element, von denen vor allem das DS-Element zur DNA-Replikation benötigt wird. In jüngerer Zeit wurde noch ein weiteres cis-wirkendes Element, das rep\*-Element, als funktionell für die Replikation beschrieben. Neben dem Epstein-Barr Nukleärem Antigen 1, dem EBNA1, binden noch andere, bisher unbekannte Proteine, an die DNA des DS-Elements. Diese scheinen notwendig für den Beginn der Replikation zu sein, da das EBNA1 weder ATPase- noch Gyrase- oder Helicasefunktionen ausüben kann. Lokalisiert sind diese bis dato unbekannt Proteine an drei identischen Nonamersequenzen (5'-TTAGGGTTA-3') des DS-Elements und liegen neben den EBNA1-Bindungsstellen. Da die Sequenz der Nonamere der Sequenz der an den Enden der Chromosomen liegenden Telomeren ( $[(TTAGGG)]_n$ ) homolog ist, wurde untersucht, ob die Telomerase eine Rolle bei der Initiation der Replikation spielen könnte. Die Telomerase ist ein Ribonucleoprotein, dessen Hauptgen, das hTERT, in ausdifferenzierten somatischen Zellen strikt abgeschaltet ist. Lediglich in Stammzellen und in kanzerogenen Zellen ist Telomeraseaktivität nachweisbar und ist dort für die potentiell unendliche Teilungsfähigkeit dieser Zellen verantwortlich. Da das EBV ein Virus ist, das Zellen im latenten Stadium immortalisieren kann, stellte sich die Frage, ob bzw. welche Proteine des latenten Zyklus die Telomerase wieder anschalten könnten.

Um diese Frage zu beantworten, wurden in verschiedenen Zelltypen mittels des sogenannten TRAP-Assays die Aktivität der Telomerase, mit RNase-Protection-Assays deren Gentranskription sowie durch Luciferaseassays die Promotoraktivität ermittelt und versucht, durch Kotransfektion mit Expressionsvektoren verschiedener latenter Proteine des EBV diese Aktivitäten anzuschalten bzw. zu erhöhen. Wie sich herausstellte, ist die Rekonstitution der Telomeraseaktivität in ausdifferenzierten Zellen ein multifaktorieller Vorgang, der nur zum Teil nachvollzogen werden konnte. Allerdings wurden mit der signifikanten Erhöhung der c-myc-Transkription bei Transfektion von EBNA2 in Vorhautfibroblasten, also primärer Zellen, Hinweise auf mögliche Signaltransduktionswege gefunden.

Neben der Untersuchung des DS-Elements wurde auch die Aufklärung des knapp daneben liegenden und vor kurzem als für die Replikation relevant beschriebenen rep\*-Elements vorangetrieben. Um dessen mögliche Rolle als Mitursprung der Replikation aufzuklären, wurden in vivo-Footprints von der fraglichen Region gemacht, um auf diese

---

---

Weise mögliche Protein-DNA-Bindungen zu ermitteln. Die Auswertung der Ergebnisse ergab, daß das rep\*-Element keine starke Proteinbedeckung aufweist, was eine funktionelle Bedeutung des Elements eher unwahrscheinlich macht. Unterstützt wurde das Ergebnis noch durch gleichzeitig im Labor durchgeführte Untersuchungen über den Methylierungsgrad dieser Region. Das hoch-methylierte rep\*-Element kann als für die Initiation der Replikation relevantes Element in zukünftigen Studien wohl außer acht gelassen werden.

---

## **2. Einleitung**

### **2.1 Systematik**

#### **2.1.1 Die Familie der Herpesviridae**

Die über hundert Spezies umfassende Familie der Herpesviren zeichnet sich durch eine gemeinsame Morphologie und einen einheitlichen Replikationszyklus aus. Das Wirtsspektrum der Herpesviren reicht von Primaten über Vögel, Fische, Amphibien, verschiedener Nagetiere, und Katzen bis hin zu niederen Eukaryonten (Honest et al., 1977). Die wesentlichen Gemeinsamkeiten sind ein Genom aus doppelsträngiger DNA, ein ikosaedrisches Nukleokapsid und eine Lipidhülle. Die Lipidhülle besteht aus einer Doppelmembran und dient als Anker für virale und zelluläre Glykoproteine. Die Größe der Herpesviren schwankt zwischen 150 und 200 nm im Durchmesser.

Ein biologisches Charakteristikum der Herpesviren sind die beiden unterschiedlichen Lebenszyklen, die abhängig von Typ und Differenzierungsstadium der Wirtszelle nacheinander oder getrennt durchlaufen werden. In der zweiphasigen Vermehrung kommt es meist zunächst zu einer unterschiedlich langen Latenzphase, während der das virale Genom meist episomal im Kern, seltener integriert ins zelluläre Genom vorliegt. Erfolgt eine Aktivierung, kommt es zu einer lytischen Infektion, die nach einer zeitlich geordneten Kaskade von viralen Genexpressionen in der Zusammen- und Freisetzung reifer Viruspartikel endet. Eine solche Aktivierung kann sich zyklisch wiederholen. Äußere Ursachen können dabei hormonelle und immunologische Veränderungen sein. Die molekulare Basis der Reaktivierung ist jedoch noch nicht völlig verstanden.

#### **2.1.2 Einteilung in Genera und humanpathogene Vertreter**

Die Einteilung der Herpesviren erfolgt nach biologischen Eigenschaften wie Zelltropismus, Neigung zu lytischer Infektion, Persistenz und Tumorigenese. Auf der Grundlage des Spektrums der von einer Spezies infizierbaren Zelltypen und der sich daraus ergebenden pathologischen Veränderungen lassen sich drei Genera unterscheiden:

Die *Alphaherpesviridae* zeichnen sich durch ein breites Wirtsspektrum und schnell ablaufende Replikationszyklen aus. Humanpathogene Vertreter sind Herpes-Simplex-Virus Typ 1 und 2 (HSV1/2) sowie das Varizella-Zoster-Virus (VZV). HSV1 infiziert das Schleimhautepithel des Mundes, HSV2 das des Genitalbereichs. Die Viren gelangen anschließend in das Zentralnervensystem und verbleiben dort in bestimmten Ganglien bis zur Reaktivierung. Dabei wandern die Viren entlang der neuronalen Axone an die

---

Peripherie. Dort verursacht die rasch ablaufende lytische Vermehrung die bekannten Herpesbläschen. Das VZV, der Erreger der Windpocken, überdauert nach der Primärfektion in den Spinal- und Trigeminalganglien. Bei der Reaktivierung kommt es ähnlich wie bei HSV zu einer Wanderung an die Körperoberfläche und es bilden sich die Symptome der *Herpes zoster*, auch bekannt als Gürtelrose, aus.

Ein engeres Wirtsspektrum und langsamer verlaufende lytische Zyklen sind charakteristisch für die *Betaherpesviren*. Sie persistieren oft in lymphoretikulären Zellen und sekretorischen Drüsen. Infizierte Zellen zeigen häufig auffällige Änderungen in ihrer Morphologie und wachsen zu Riesenzellen aus. Ein humanpathogener Vertreter mit hohem Durchseuchungsgrad (betroffen sind über 50% der jungen Erwachsenen in Mitteleuropa) ist das Zytomegalie-Virus (CMV). Nach der inapparenten Erstinfektion verbleibt das Virus latent nach heutigem Kenntnisstand in lymphoiden Zellen. Pathologische Komplikationen sind selten, schwere generalisierte Infektionen treten nur bei immunsupprimierten Patienten oder bei Infektion in utero auf.

*Gammaherpesviren* verhalten sich *in vitro* lymphotrop und immortalisieren ihre Wirtszellen in Zellkultur. Sie werden je nach Art der infizierten Zelle in T-Zell-spezifische Rhadinoviren, deren natürliche Wirte Neuweltaffen sind, und B-Zell-spezifische Lymphocryptoviren unterteilt. Ihr lytischer Zyklus verläuft unter sehr strenger Kontrolle. Unter die Gattung Lymphocryptovirus fällt das Epstein-Barr-Virus (EBV). Es ist in der Lage, spezifisch B-Zellen und *in vivo* auch epitheliale Zellen des Mundschleimhautbereichs zu infizieren.

## 2.2 Die Bedeutung des Epstein-Barr-Virus

Das EBV bildet zusammen mit HSV1 und HSV2, dem VZV, dem CMV und den humanen Herpesviren 6,7 und 8 die Gruppe der humanen Herpesviren. Es ist eines der am häufigsten auftretenden Viren des Menschen mit einer Infektionsrate von 90-95% der Bevölkerung über 25 Jahren. Die Primärfektion mit EBV kann zu Infektiöser Mononukleose (IM, auch Pfeiffersches Drüsenfieber genannt), führen. Es gibt keine Altersgruppe, in der eine Erkrankung nicht auftreten kann, jedoch steigt das Risiko frisch Infizierter, klinisch manifest zu erkranken, mit zunehmendem Alter. EBV ist ebenfalls eng mit der endemischen Form des hauptsächlich in Afrika verbreiteten Burkitt-Lymphoms (BL) (zu 96%) und dem häufigsten Malignom Südostasiens, dem Nasopharynxkarzinom (NPC) (zu 100%) assoziiert. In Südchina gibt es deshalb Reihenuntersuchungen auf NPC. Die geographische Verteilung und die verschiedenen Manifestationen,

insbesondere die beiden Tumorarten, machen das EBV zu einem interessanten Untersuchungsobjekt.

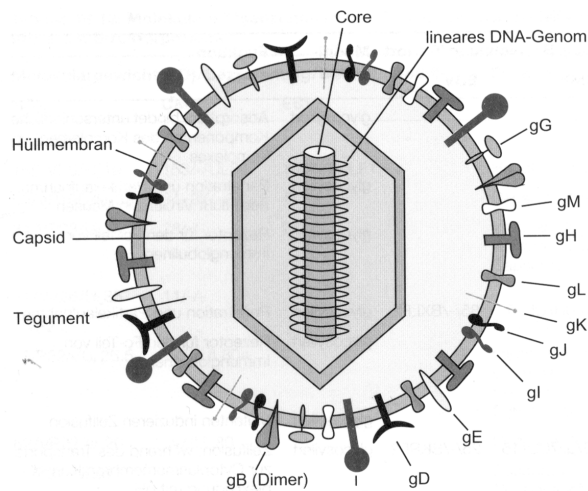
## **2.3 EBV-Historie**

Bereits 1962 legte D. Burkitt die Grundlage für die Identifizierung des EBV als tumorassoziiertes Virus (Burkitt 1962). Er untersuchte eine in Schwarzafrika bei Kindern häufige Form des später nach ihm benannten Lymphoms, das besonders in feuchtwarmen Gebieten auftrat. Aus von ihm zur Verfügung gestelltem Tumormaterial gelang es wenig später Epstein, Achong und Barr gleichzeitig mit Pulvertaft (Pulvertaft, 1964) stabile Zelllinien zu gewinnen. Sie beschrieben unter dem Elektronenmikroskop sichtbare und den Herpesviren ähnliche Partikel (Epstein et al., 1964). Zwei Jahre später konnten Gertrude und Werner Henle EBV eindeutig als neue Herpespezies charakterisieren, da sie zeigten, daß Seren aus Burkitt-Lymphom-Patienten keine Kreuzreaktionen mit Antikörpern gegen die übrigen Vertreter der Herpesviren hervorriefen (Henle & Henle, 1966). Bei weiteren epidemiologischen Studien mit diesen Seren konnte ihre Arbeitsgruppe EBV auch als Erreger der IM identifizieren (Henle et al., 1968). Kurz zuvor wurde von Pope die Immortalisierung von Lymphozyten durch EBV beschrieben (Pope et al., 1967). Seit der Entdeckung von Antikörpern gegen EBV-Antigene in Seren von Patienten mit NPC wurde EBV auch als potentieller Auslöser dieser Tumorerkrankung diskutiert (Old et al., 1968). In diesem Falle betrifft die maligne Entartung jedoch epitheliale Zellen.

---

## 2.4 Virus- und Genomstruktur des EBV

### 2.4.1 Struktur des EBV-Virions



**Abb.1: Aufbau des Partikels eines Herpes-Simplex-Virus**  
(nach Modrow & Falke, 1996)



**Abb.2: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Herpesvirus:** Außen sichtbar die Hüllmembran, der Glykoproteine, genannt Spikes, aufsitzen, innen das Tegument, das das Nucleokapsid einschließt. (nach Linda M. Stannard, 1995;  
<http://www.uct.ac.za/depts/mmi/stannard/hsv2.gif>)

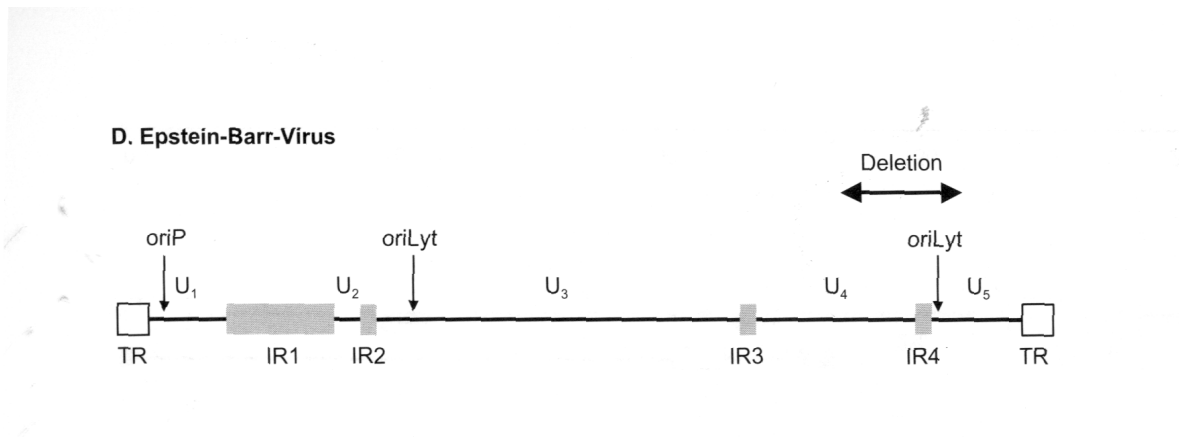
Wie alle anderen Herpesviren hat auch das EBV ein ikosaedrisches Kapsid. Es besteht aus genau 162 Kapsomerproteinen von drei unterschiedlichen Molekulargewichten (150, 47 und 28 kD) (Dolyniuk et al., 1976). Im Inneren befindet sich ein Komplex aus Proteinen und linearem viralem Genom, das sogenannte "core". Dem Kapsid aufgelagert ist das Tegument, eine elektronendichte Matrixschicht von variabler Stärke. Die äußere Begrenzung bildet eine Hülle aus Lipiden in Form einer Doppelmembran, der "envelope". Darin eingelagert sind die Glykoproteine gp350/250 und gp85 (Heinemann et al., 1988). Die Gesamtgröße des Virions schwankt zwischen 150 und 200 nm.

### 2.4.2 Struktur des EBV-Genoms

Das EBV besitzt ein doppelsträngiges DNA-Genom von etwa 170 kb Gesamtlänge, das für annähernd 100 Polypeptide kodiert. Im Virion liegt das Genom in linearer Form, in den Zellkernen infizierter Zellen in zirkulärer und episomaler Form vor. Dort werden über den Zellzyklus hinweg die Genome in konstanter Kopienzahl erhalten. In einzelnen BL-Zelllinien (Gargano et al., 1992; Delecluse et al., 1993) und in Lymphoblastoiden Zelllinien

(LCL) (Matuso et al., 1984; Hurley et al., 1991) wurde aber auch die Integration der viralen DNA in das Wirtsgenom beschrieben. Eine Bedeutung des Integrationsereignisses für den viralen Lebenszyklus oder die maligne Transformation konnte jedoch nicht nachgewiesen werden.

Die gesamte genomische DNA zweier EBV-Stämme, von B95-8 (Baer et al., 1984) und Raji (Hatfull et al., 1988) wurde kloniert und sequenziert. So beträgt z.B. der GC-Gehalt des Virusisolats der gebräuchlichen B95-8 Laborzelllinie 59 Prozent und die Genomgröße dieses Stammes liegt bei 172 kb.



**Abb.3: Die Struktur des EBV-Genoms**  
(nach Modrow & Falke, 1996)

Das lineare EBV-Genom ist an beiden Enden von repetitiven Sequenzen flankiert. Über diese "terminal repeats" (TR) erfolgt nach der Infektion der Wirtszelle die Zirkularisierung des viralen Genoms durch homologe Rekombination (Lindahl et al., 1976). Desweiteren beinhalten diese Sequenzen die Information für die korrekte Verpackung der DNA in die Virionen (Hammerschmidt & Sugden, 1989). Die internen repetitiven Sequenzen unterscheiden sich in verschiedenen Isolaten durch die Häufigkeit der Wiederholung bestimmter Untereinheiten. Daher variiert die Genomgröße von Stamm zu Stamm. Die über 84 Gene (Farrell 1993) sind jedoch hauptsächlich in den Unique-Sequenzen U1 bis U5 enthalten. Auch in den kodierenden Bereichen verschiedener Gene wurden isolatspezifische Unterschiede gefunden (Packham et al., 1993). Aufgrund von Unterschieden vor allem im nukleären Proteine EBNA 2, aber auch in den EBNA's LP, 3A, 3B und 3C und in den Genen für die RNAs EBER 1 und 2 (Dambaugh et al., 1984) wird EBV in Typ-A und Typ-B eingeteilt, wobei ersterer eine höhere Effizienz der Immortalisierung zeigt (Rickinson et al., 1987).

Je nach Vermehrungszyklus des EBV sind verschiedene Startpunkte der DNA-Replikation aktiv. Der *oriP* ist der in der Latenz benutzte, zellulär kontrollierte Replikationsursprung (Yates et al., 1984); in der lytischen Phase der Infektion beginnt die Replikation an beiden Kopien des *oriLyt* (Hammerschmidt & Sugden, 1988).

Die Nomenklatur der EBV-Genprodukte bezieht sich auf die durch BamHI-Restriktionsendonuklease erzeugten 29 Fragmente des viralen Genoms des B95-8 Stammes. Diese Fragmente wurden der Größe nach mit den Buchstaben des Alphabets benannt. Der erste Buchstabe steht für das zur Kartierung verwendete Restriktionsenzym (B für BamHI), der zweite gibt das entsprechende Restriktionsfragment an. Da die einzelnen Gene innerhalb des Genoms in nach links und rechts laufenden Leserahmen angeordnet sind, werden bei nach links orientierten Genen die Buchstaben LF (left frame), bei nach rechts orientierten Genen das Kürzel RF (right frame) angehängt. So bezeichnet beispielsweise das Kürzel BZLF1 den ersten, nach links orientierten Leserahmen im BamHI-Z-Fragment. Den Genen sind entsprechende Promotoren vorgeschaltet, die neben den Erkennungsstellen für die zelluläre RNA-Polymerase zusätzliche Bindungsstellen für zelluläre und virale Transaktivatoren enthalten (Moriuchi et al., 1995).

Nachträglich zeigte sich, daß das B95-8 Isolat im Vergleich mit anderen Stämmen eine Deletion von etwa 14 kb hat. Die entsprechende Sequenz wurde deshalb aus BamHI-fragmentierten Genomen des Stammes Raji gewonnen und den gefundenen Leserahmen in analoger Weise eine Bezeichnung zugeordnet, die sich durch Apostrophe von den B95-8 Fragmenten unterscheidet (Polack et al., 1984; Parker et al., 1990). Von einem Großteil der offenen Leserahmen ist mittlerweile bekannt, in welcher Phase des viralen Vermehrungszyklus die genetische Information exprimiert wird und welche Funktion das entsprechende Protein hat.

## **2.5 Pathogenese EBV-assoziiierter Erkrankungen**

### **2.5.1 Übertragungswege**

Das EBV ist ein weltweit auftretendes Virus mit hoher Durchseuchungsrate von 90 bis 95% im Erwachsenenalter. Die Erstinfektion geschieht in der Regel früh, es bestehen jedoch kulturell bedingte regionale Unterschiede im Erstinfektionsalter. Das EBV befindet sich im Speichel gesunder, seropositiver Personen. Die Übertragung geschieht in der Regel durch Schmierinfektion, aber auch durch Transfusion und Organtransplantationen (Yao et al., 1985). Das EBV infiziert neben B-Lymphozyten der Mundschleimhaut periphere Epithelzellen des Oropharynx (Chang et al., 1973; Gerber et al., 1972; Miller et al., 1973; Wolf et al., 1984).

Man geht davon aus, daß EBV zunächst B-Lymphozyten der Mundschleimhaut im Hals-Rachenraum infiziert, dort vermehrt wird und dann über Zellfusion Epithelzellen infiltriert (Bayliss & Wolf, 1981). Da gegenwärtig noch nicht geklärt ist, welcher Zelltyp im

menschlichen Körper zuerst infiziert wird, wäre es auch denkbar, daß periphere Epithelzellen, z.B. die Tonsillen, das erste Ziel der Infektion darstellen, wo nach lytischer Replikation das Virus in den Blutkreislauf übertritt und dort seine eigentlichen Zielzellen, die B-Lymphozyten, infiziert.

## **2.5.2 Die Infektiöse Mononukleose**

### **2.5.2.1 Die normale Infektiöse Mononukleose**

Die Erstinfektion verläuft im Kleinkindalter zwar meist asymptomatisch oder subklinisch, allerdings häuft sich mit zunehmendem Alter der neuinfizierten Personen das Risiko, klinisch manifest zu erkranken. Nach einer Latenzphase von 2-3 Wochen kann eine Infektiöse Mononukleose (IM) (Henle et al., 1968) ausbrechen. Die Symptome einer IM sind häufig Lymphknotenschwellungen, Entzündung des Hals-/Rachenraumes, Fieber über 39°C, mit mittlerer Häufigkeit Milzvergrößerung, Kopfschmerzen und Müdigkeit (Epstein & Achong, 1986). Auf zellulärer Ebene erfolgt ein starker Anstieg EBV-infizierter B-Lymphozyten. Mit dem Auftreten heterophiler Antikörper geht ein Anstieg von CD8-positiven cytotoxischen T-Zellen (CTL) einher, die zusammen mit entstehenden natural-Killer-Zellen zur Eliminierung befallener B-Lymphozyten beitragen. Die Immunantwort begrenzt die IM im Normalfall auf etwa zwei Wochen.

Als seltene Komplikationen können hämolytische Anämie und Milzruptur auftreten, aber auch Perikarditis und Atemwegobstruktion wurden beobachtet. Manifeste EBV-Erkrankungen werden hauptsächlich in den Industrieländern beobachtet, da hier aufgrund der besseren hygienischen Verhältnisse der Erstkontakt mit EBV oft bis in die Adoleszenz verzögert ist. In den USA ist die IM die zweithäufigste Infektionskrankheit unter den jungen Erwachsenen und Adoleszenten. Das EBV hat für gesunde Personen in Mitteleuropa mit Ausnahme der IM nur geringe Pathogenität. Neben der IM wird das EBV mit den folgenden Erkrankungen in Zusammenhang gebracht:

### **2.5.2.2 Die tödlich verlaufende IM**

Wenn die genetische Veranlagung XLP ("X linked proliferation", mit dem X-Chromosom gekoppeltes lymphoproliferatives Syndrom) vorliegt, verläuft eine Erstinfektion durch EBV bei etwa 70 % aller Männer mit dieser Veranlagung tödlich (Duncan-Syndrom). Diese Erkrankung ist dadurch gekennzeichnet, daß durch einen genetischen Defekt die Kontrolle der EBV-Replikation in den B-Zellen unterbleibt und anschließend eine überschießende Immunantwort, häufig unter Beteiligung von autoimmunen CTLs, stattfindet (Purtilo et al., 1982). Überlebende entwickeln letale polyklonale Lymphome. Es sind keine männlichen Träger dieser Veranlagung bekannt, die älter als 40 Jahre

---

geworden wären. Diese Patienten haben keine oder allenfalls geringe Antikörpertiter gegen EBV-Antigene. Ebenso wie die humorale Immunantwort unterbleibt auch die T-Zell-spezifische Abwehr gegen EBV-Antigene (Schuster et al., 1991). In sehr seltenen Fällen verläuft die IM mit Symptomen, die dem Duncan-Syndrom ähneln, tödlich. In einigen dieser Fälle wurde eine massive Leberinfektion festgestellt (Deutsch et al., 1986).

### **2.5.2.3 Die Chronische IM**

Extreme Müdigkeit, Fieber, Lymphknotenschwellungen, Muskelschmerzen, Nachtschweiß, Pharyngitis, Gelenkschmerzen, Schlafstörungen und Depressionen sind bei dieser Krankheit als Symptome beschrieben. Im Gegensatz zur IM ist die chronische Form nicht selbstlimitierend und kann im Extremfall einige Jahre andauern. Häufig haben die Patienten erhöhte Antikörpertiter gegen das virale Kapsidantigen (VCA), vor allem aber gegen early Antigene (EA) und manchmal gegen das Epstein-Barr-nuclear antigen (EBNA) 2, selten aber Antikörper gegen EBNA 1 (Miller et al., 1987; Henle et al., 1987) und das Membranprotein gp 350/250 (Jilg & Wolf, 1985).

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

Das BL ist als hochgradiges, niedrig differenziertes, monoklonales Non-Hodgkin B-Zell-Lymphom definiert. Es existieren zwei Formen: Die endemische Form in Zentralafrika und Papua-Neuguinea fällt mit dem Ausbreitungsgebiet der holoendemischen Malaria zusammen. Eine kooperative Wirkung beider Erkrankungen ist demnach wahrscheinlich. Plasmodium falciparum, der Erreger der Malaria, supprimiert die Immunantwort von CTL gegen EBV-infizierte Zellen (Whittle et al., 1984). Daraus resultiert eine erhöhte Proliferation von B-Zellen, womit eine Grundlage für die Entartung der Zellen geschaffen sein könnte. Das EBV ist in 96% der Fälle des afrikanischen BL vorhanden. Lange vor dem Ausbruch klinischer Symptome sind erhöhte Antikörpertiter gegen EBNA, VCA und gp 350/250 nachweisbar.

Die sporadische Form des BL tritt in der ganzen Welt auf. EBV wird dabei nur in 10 bis 25% dieser Tumoren gefunden (Lenoir & Bornkamm, 1987). Dies ist ein Hinweis auf die wichtige Rolle des EBV für die Entwicklung des endemischen BL, aber verlangt auch nach anderen Kofaktoren, um die Wirkung des EBV bei der sporadischen Form zu erklären.

Chromosomentranslokationen wurden in allen BL-Fällen gefunden. Das c-myc-Protoonkogen von Chromosom 8 ist dabei auf die Chromosomen 14, 2 oder 22 transloziert (Leder et al., 1983; Hollis et al., 1984), und zwar jeweils in der Nähe von DNA-

Regionen, die für Immunglobulinketten kodieren und stark transkriptionsaktiv sind. Daraus resultiert eine erhöhte, vom Zellzyklus abgekoppelte Überexpression des Onkogens. Die Vorgänge, die zu maligner Entartung führen, sind in ihrer Abfolge nicht klar abzugrenzen. Unterschiedliche Modelle versuchen, das Zusammenwirken zwischen EBV-Infektion, Chromosomentranslokation, c-myc-Fehlregulierung und die Behinderung der T-Zell-Funktion durch *P. falciparum* zu erklären (Wolf & Seibl, 1984). Die Klonalität des Tumors legt nahe, daß die Entwicklung des Lymphoms ein seltenes Ereignis ist, wahrscheinlich unter strikter Kontrolle des Immunsystems. Die Mechanismen, welche die BL-Tumorzellen außerhalb der Immunkontrolle stellen, werden eingehend untersucht. Es wurde beschrieben, daß frisch isolierte BL-Zellen von allen EBV-Genen nur EBNA 1 exprimieren. Die MHC-Klasse1-Genexpression, die für die Antigenpräsentierung benötigt wird, ist in diesen Zellen reduziert (Jilg et al., 1991). Die Abfolge der für die tumoröse Entartung notwendigen Ereignisse ist in den Einzelheiten noch nicht geklärt, in der Summe ist aber die Unterwanderung des Immunsystems durch fehlende Erkennung und Elimination entarteter Zellen als weitere erfolgreiche Strategie der EBV-Vermehrung zu betrachten.

#### **2.5.4 Das Nasopharynxkarzinom (NPC)**

Das NPC und das Leberzellkarzinom sind die am weitesten verbreiteten Malignome in Südostasien und bei Emigranten dieser Regionen. Der Primärtumor liegt in der Fossa Rosenmülleri und besteht aus proliferierenden epithelialen Zellen. In allen Tumorzellen des undifferenzierten NPC ist das EBV nachweisbar (Wolf et al., 1973). Die Ursachen für die hohe Inzidenz dieses Malignoms sind noch nicht geklärt. Da die Häufigkeit von NPC offenbar mit der ethnischen Herkunft zusammenhängt, wurde nach genetischen Faktoren gesucht. Interessant ist der Zusammenhang zwischen dem Vorkommen von HLA-A2 und der Präsentation von LMP2 auf der Zelloberfläche. Homo- und heterozygote Träger dieses HLA-Typs haben wegen der besseren Erkennung entarteter Zellen ein signifikant niedrigeres Risiko für NPC (Burt et al., 1994). Umgekehrt gibt es wiederum genetische Prädispositionen für NPC, wie z.B. die HLA-Typen A33/B58 und A2/BW46 (Lu et al., 1990).

#### **2.5.5 Morbus Hodgkin**

In den letzten Jahren wurde auch über eine mögliche Assoziation des EBV mit der Hodgkinschen Erkrankung diskutiert. Mit Hilfe der PCR und der in situ-Hybridisierung wurden EBV-Nukleinsäuren in den Reed-Sternberg-Zellen, die beim Morbus Hodgkin

normalerweise weniger als 1% der Tumormasse ausmachen, festgestellt. Eine jüngere Studie zeigt das Vorhandensein von EBV-Nukleinsäuren in etwa 60% der Hodgkin-Fälle. Es könnte sich, wie beim BL, um zwei spezifische Subgruppen der Erkrankung handeln, von denen die eine EBV-negativ, die andere EBV-positiv ist.

### **2.5.6 EBV und immunsupprimierte Patienten**

Durch das normal leistungsfähige Immunsystem werden alle EBV-positiven Zellen, die mehr als nur EBNA1 exprimieren, eliminiert. Davon ausgenommen sind für das Immunsystem unzugängliche Zellen, etwa in den Ausführungsgängen der Speicheldrüsen. Ein geschwächtes Immunsystem kann eine vollständige Elimination von mit EBV infizierten Zellen nicht mehr gewährleisten. In diesen Fällen kann das EBV an anderen als den Primärinfektionsorten replizieren. Ein Beispiel ist die Zunge, wo die EBV-Replikation in HIV-positiven Personen und langfristig Immunsupprimierten die Haarleukoplakie (OHL, "oral hairy leukoplakia") hervorrufen können (Greenspan et al., 1985). In AIDS-Patienten sind BL-ähnliche Tumore mit typischen Chromosomentranslokationen beschrieben worden (Ziegler et al., 1982).

Bei den medikamentös immunsupprimierten Transplantationsempfängern kommt es, in ähnlicher Weise wie beim CMV, in etwa einem Drittel aller Fälle zur EBV-Reaktivierung bzw. -Infektion.

### **2.5.7 EBV und Autoimmunerkrankungen**

Das EBV wird auch im Zusammenhang mit anderen Krankheiten diskutiert, die mit Störungen des Immunsystems einhergehen: Rheumatoide Arthritis (Fox et al., 1986) und Systemischer Lupus erythematosus (Scully et al., 1986), Sjögrens Syndrom (Fox et al., 1987), Kawasaki Syndrom (Kikuta & Hirai, 1988) und Multipler Sklerose (Warner & Carp, 1988). Klinische Beobachtungen belegen das Auftreten von Antikörpern gegen DNA, Erythrozyten, Lymphozyten, Immunglobuline, glatte Muskelzellen und Thyroglobulin nach EBV-Infektion (Misra et al., 1989). IM-assoziierte Antikörper treten in mehr als 2/3 aller Fälle auf (Schaffner & Rager-Zisman, 1990) und sind als Bestandteil einiger oben genannter Autoimmun-Syndrome denkbar. Es wurde vorgeschlagen, daß kleinere Homologien zwischen HLA-Molekülen und EBNA1 das Immunsystem veranlassen, die Kontrolle über die EBV-Produktion zu verlieren oder Autoimmunreaktionen auszuführen (Vaughan et al., 1995). Es ist bisher jedoch nicht gelungen, EBV als kausales Agens dieser Krankheiten nachzuweisen. Die weltweite Verteilung, die hohe Durchseuchungsrate der Bevölkerung, die lebenslange Persistenz des Virus und die

---

häufigen Reaktivierungen in gesunden seropositiven Virusträgern tragen zu dieser Schwierigkeit bei.

## 2.6 Die Vermehrungsstrategien des EBV

### 2.6.1 Die Infektion der Wirtszellen und Zell-Adsorption

Die Infektion von B-Lymphozyten und Epithelzellen (Wolf et al., 1984) geschieht durch unterschiedliche Mechanismen. Auf Lymphozyten wurde als zellulärer Rezeptor für EBV der Komplementrezeptor für C3d, CD21 (CR2), beschrieben (Frade et al., 1985; Nemerow et al., 1987). Das Andocken des Virus seinerseits wird vermittelt über das in der Virushülle verankerte Glykoprotein gp350/250 als CD21-bindende Komponente (Nemerow et al., 1987; Tanner et al., 1988). Die Restriktion auf die Bindung an CD21 trägt teilweise zum Zelltropismus des EBV bei. Da CD21 auf der Zytoplasmamembran von Lymphozyten nachgewiesen werden konnte (Young et al., 1989), erscheint es plausibel, daß die ersten infizierten Zellen Lymphozyten im Stratum basale des Oropharynx-Bereichs sind. Die Infektion epithelialer Zellen kann zum einen durch Zellfusion geschehen, da B-Zellen im lytischen Stadium der Virusvermehrung eine Tendenz zur Fusion mit anderen Zellen aufweisen (Bayliss & Wolf, 1980; 1981). Zum anderen können polarisierte Epithelzellen mit IgA opsoniertes EBV über den Poly-IgA-Rezeptor aufnehmen (Sixbey & Yao, 1992)

Frühe Ereignisse bei der Bindung von EBV an CD21 scheinen beteiligt zu sein an der Etablierung einer ausreichenden Transkriptionsrate in der ursprünglich ruhenden infizierten Zelle. CD21 liegt hauptsächlich in komplexierter Form mit dem für B-Zellen charakteristischen Oberflächenantigen CD19 vor. Die Bindung von Komplement an CD21 löst die Assoziierung von CD19 mit Phosphatidylinositol3-Kinase und deren Aktivierung aus (Tuveson et al., 1993). Eine Signaltransduktion über Proteintyrosinkinasen (PTKs), bei der initial Komplement durch EBV ersetzt werden kann und in eine Aktivierung der B-Zelle mündet, wird diskutiert (Farrell 1995; Sinclair & Farrell, 1995). Da das EBV auf die normale zelluläre Transkriptions- und Splicing-Maschinerie angewiesen ist, wäre dies ein nicht zu unterschätzender Beitrag zum Mechanismus der Immortalisierung.

### 2.6.2 Penetration und Uncoating

Bei der Adsorption des Virus über gp350/250 an die Zelle wird eine Quervernetzung der CD21-Moleküle eingeleitet. Dies scheint der Auslöser für die anschließende Endocytose des EBV in glatte Membranvesikel zu sein (Tanner et al., 1987). Die EBV-Hülle fusioniert

mit der Vesikelmembran und entläßt das Virus-Kapsid ins Zytoplasma. Eine entscheidende Rolle bei der Membranfusion spielt das virale, in der Hülle enthaltene gp85. Antikörper gegen dieses Glykoprotein verhindern nicht die Adsorption an die Zelle, sondern nur die Verschmelzung der Membranen (Miller & Hutt-Fletcher, 1988). Die weiteren Vorgänge bis zum Transport des viralen Genoms in den Zellkern sind unklar. Dort wird es durch homologe Rekombination an den terminalen repetitiven Sequenzen zirkularisiert und verbleibt extrachromosomal in multiplen Kopien im Zellkern. Der Phänotyp der Wirtszelle und das spezifische Repertoire an Transkriptionsfaktoren entscheiden darüber, ob es zu einer lytischen Infektion oder zur Latenz und anschließender Immortalisierung kommt (Miller, 1990). Es gibt Hinweise auf die Existenz spezifischer Faktoren, die synergistisch mit EBV-kodierten Faktoren interagieren und den viralen Status mitbestimmen (Kenney et al., 1992)

## 2.7 Lyse und Latenz

Nach der Infektion der Wirtszelle beschreitet das Virus entweder den Weg in die Latenz oder den lytischen Zyklus, der in mehreren Stufen zu einer Synthese zahlreicher viraler Proteine führt und in der Freisetzung reifer Partikel endet. In latent infizierten Zellen wird das virale Genom unter strikter Kontrolle der zellulären Replikationsmaschinerie episomal aufrechterhalten und als quasi-zelluläre DNA mit dem Zellkern vermehrt. Die Entscheidung zwischen den zwei Vermehrungsstrategien ist u.a. abhängig von der Art der infizierten Zielzelle.

Die Infektion epithelialer Zellen ist meist mit der Virusproliferation, also dem lytischen Zyklus, verbunden, dagegen verläuft die Infektion von B-Lymphozyten zum überwiegenden Teil latent. In EBV-positiven Personen ermöglicht die Latenz dem Virus, der Kontrolle des Immunsystems zu entkommen, während eine periodische Reaktivierung latent infizierter B-Zellen ständig infektiöse Viren zur Neuinfektion EBV-negativer Personen und zur Propagierung im epithelialen Gewebe des Wirtsorganismus bereitstellt. Dort läuft nur die lytische Replikation ab und die infektiösen Tochtervirionen werden mit dem Speichel ausgeschieden. Die *in-vivo*-Reaktivierung latent infizierter Zellen spielt in gesunden EBV-positiven Individuen eine untergeordnete Rolle, da derart aktivierte Zellen sofort durch das Immunsystem erkannt und eliminiert werden.

### 2.7.1 Der lytische Vermehrungszyklus

Es ist noch nicht ganz genau geklärt, in welchen Zellen *in vivo* im Organismus der lytische Infektionszyklus abläuft. Früher wurde davon ausgegangen, daß ausschließlich

---

differenzierte Epithelzellen permissiv für die lytische Vermehrung des EBV sind, heute werden die B-Zellen sowohl als Orte der latenten wie auch der lytischen Vermehrung angenommen (Prang et al., 1997; Thorley-Lawson et al., 1996). Man geht davon aus, daß das Umschalten in den lytischen Zyklus *in vivo* als seltenes Ereignis spontan oder als Reaktion auf physiologischen Streß erfolgt. *In vitro* läßt sich der lytische Zyklus in EBV-positiven B-Zelllinien auch durch Chemikalien wie TPA (zur Hausen et al., 1978) oder TGF- $\beta$  (di Renzo et al., 1994) induzieren.

Der lytische Zyklus der Virusreplikation wird aufgrund einer streng regulierten Genexpression in die sehr frühe (immediate early), die frühe (early) und die späte (late) Phase eingeteilt, die strikt hintereinander ablaufen (Bayliss & Wolf, 1981). Bei dieser kaskadenartigen Hintereinanderschaltung fungieren immer einige Produkte der einen Phase als Transaktivatoren für die Genexpression der darauffolgenden Phase. Zwischen der early- und late- Phase der Genexpression findet die Replikation der viralen DNA statt. Die Gene der sehr frühen Phase, die unabhängig von der Neusynthese viraler Proteine aktiviert werden, wirken zum einen als Transaktivatoren für die frühe Genexpression (early-Gene), zum anderen schalten sie teilweise Gene der Latenz ab (Kenney et al., 1989). Das immediate early-Protein BZLF1 steht am Anfang der Aktivierungskaskade des lytischen Zyklus. BZLF1 ist in latent infizierten lymphoiden Zelllinien in der Lage, den lytischen Replikationszyklus allein auszulösen (Countryman et al., 1987; Rooney et al., 1989). Das 38 kD schwere BZLF1-Protein gehört zur AP-1 Familie von Transkriptionsfaktoren. Es ist als Dimer aktiv (Chang et al., 1990; Farrell et al., 1989) und in der Lage, seine eigene Transkription positiv zu regulieren (Sinclair et al., 1991). Aufgrund seiner Homologie zu c-fos (Farrell et al., 1989) besitzt BZLF1 außerdem die Fähigkeit, an AP-1 Konsensussequenzen zu binden und über diese zu transaktivieren (Lieberman et al., 1990; Urier et al., 1989). BZLF1 aktiviert auch die virale DNA-Replikation ausgehend vom *oriLyt* (Scheppers et al., 1993).

In der frühen Phase des lytischen Zyklus werden noch vor der viralen DNA-Replikation mehr als 30 EBV-mRNAs synthetisiert. Aus ihnen werden vor allem Proteine translatiert, die bei der DNA-Replikation eine Rolle spielen. Unter den frühen Proteinen befinden sich unter anderem eine DNA-Polymerase (BALF2), ein DNA-bindendes Protein (BALF2), eine Ribonukleotid-Reduktase (BORF2 und BaRF2), eine Thymidin-Kinase (BXLF1) sowie eine alkalische Exonuklease (BGLF5). Neben enzymatisch aktiven Proteinen sind auch frühe Proteine bekannt, die als Transaktivatoren an der Koordination der komplexen Genexpression der frühen Replikationsphase beteiligt sind bzw. den Übergang in die späte Phase induzieren (Dillner & Kallin, 1988). Viele der early-Gene enthalten in ihren Promotorenbereichen cis-wirksame Zielsequenzen für Zta (Z responsive elements, ZRE) (Farrell et al., 1989; Lieberman & Berk, 1990; Quinlivan et al., 1993) oder Rta (R

responsive elements, RRE) und werden durch diese aktiviert. BZLF1 transaktiviert Promotoren mit ZRE-Bindungsstellen, indem es die Ausbildung des aktiven Präinitiationskomplexes fördert. Durch die Bindung mit seiner Transkriptionsaktivierungsdomäne, die mit TFIID interagiert, stabilisiert es die Bindung von TFIID am Promotor, was zur Stimulation der Transkription führt (Lieberman & Berk, 1991).

Die zwischen der early- und late- Phase ablaufende Replikation der viralen DNA erfolgt ausgehend vom *oriLyt* nach dem Prinzip des rolling circle. Die Bindung des BZLF1-Proteins an den *oriLyt* ermöglicht, daß sich der Komplex der viralen DNA-Polymerase-Helikase-Primase daran anlagert und die DNA durch ein bisher unbekanntes virales Protein, das als einzelstrangspezifische Endonuklease fungiert, geschnitten wird (Modrow & Falke, 1996). Das dabei entstehende freie 3'-OH-Ende dient dabei als Primer für die Polymerisierungsreaktion, wobei unter Verwendung des geschlossenen DNA-Stranges als Matrize die Nukleotide kontinuierlich angekoppelt werden. Während dieses Vorgangs wird das 5'-Ende fortlaufend vom Matrizenstrang gelöst. Ausgehend vom 5'-Ende wird die DNA diskontinuierlich repliziert. So bildet sich ein DNA-Strang, der vielfache Einheiten des Genoms in konkatomere Anordnung erhält (Modrow & Falke, 1996).

In der späten Phase des lytischen Zyklus wird nach der DNA-Replikation das Virus-Assembly eingeleitet. Die dazu notwendigen Strukturproteine sind in den späten Genen kodiert, die zeitgleich mit der DNA-Synthese exprimiert werden. Dazu gehören das Haupt-Nukleokapsid-Protein (BCLF1), ein Tegument-Protein (BNRF1), ein Core-Protein (BXRf1) und die Membran-Glycoproteine gp350/220 (BLLF1) und gp85 (BXLf2) (Kieff & Liebowitz, 1991). Außerdem werden Proteine exprimiert, die die infizierte Zelle so verändern, daß das Virus reifen und die Zelle verlassen kann.

### 2.7.2 Die latente Vermehrung und Latenztypen

Von den zahlreichen bekannten offenen Leserahmen wird in der Latenz nur ein Satz von maximal elf Genprodukten exprimiert. Darunter befinden sich Gene, die zur Immortalisierung der lymphoiden Wirtszelle führen, aber keine Gene für Strukturproteine. Die Produktion von Nachkommenvirionen unterbleibt.

Die bisher bekannten Produkte latenter Gene sind die nichttranslatierten EBERs (EBV-encoded RNAs), die im Kern lokalisierten EBNAs 1-3c (Epstein-Barr virus nuclear

---

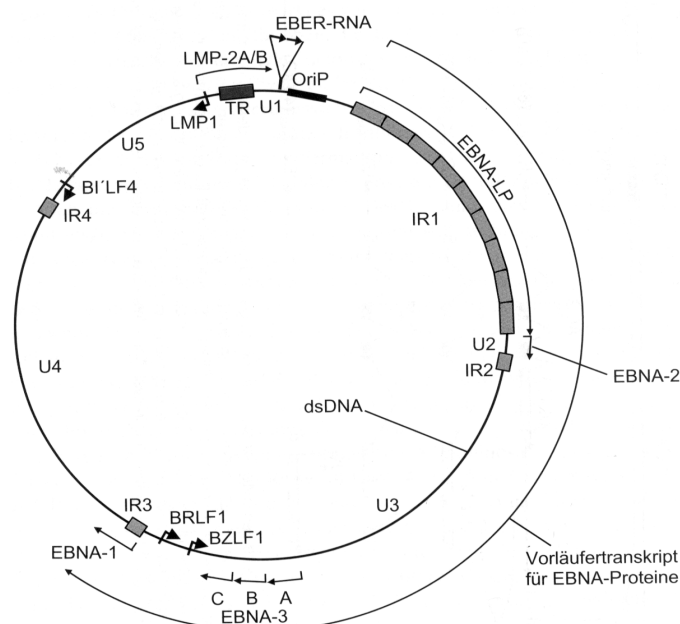
antigens 1-3c), das EBNA-LP (Leader protein) und die in der Zytoplasmamembran verankerten LMP1 (latent membrane protein) und LMP2A oder 2B.

Das Set der exprimierten Gene ist abhängig vom Phänotyp der Zelle. Es können daher drei Typen der Latenz unterschieden werden (Rowe et al., 1987). Das Muster der Latenztypen I, II und III wird durch die Transkription von unterschiedlichen Promotoren und differentielles splicing kontrolliert (Farrell, 1993 und 1995)

### 2.7.3 Die Proteine der Latenz

Die besondere Eigenschaft des EBV ist das Ingangsetzen der kontinuierlichen Proliferation von B-Zellen nach deren Infektion. Dieser Vorgang verläuft in der Zellkultur so effizient, daß das Virus in immunkompetenten Personen Mechanismen besitzen muß, um die Immunantwort zu unterlaufen.

Durch EBV immortalisierte B-Zellen haben die Erscheinung und die charakteristischen Oberflächenmarker proliferierender Immunoblasten und werden deshalb als lymphoblastoide Zelllinien (LCL) bezeichnet. Essentiell für die Immortalisierung sind LMP1 und alle EBNA-Proteine mit Ausnahme von EBNA3B (Farrell 1995). Wegen der leicht unterschiedlichen Effektivität der Immortalisierung wird nach den beiden EBV-Subtypen A und B eingeteilt. Dem liegt eine allelische Variation im EBNA2-Gen zugrunde (Rickinson et al., 1987).



**Abb.4: Die Lage der latenten Gene auf dem zirkularisierten EBV-Plasmid**  
(nach Modrow & Falke, 1996)

### 2.7.3.1 Die EBNA-Proteine

Die Gene der latenten EBNA-Proteine liegen weit voneinander entfernt über das ganze Virusgenom verstreut. Trotzdem wird von den EBNA-Genen eine gemeinsame Vorläufer-RNA von über 100.000 Basen Länge transkribiert, aus der die verschiedenen m-RNA-Spezies durch alternative, vielfache Spleißereignisse und die Verwendung unterschiedlicher Polyadenylierungssignale entstehen. Zwei Promotoren (Cp und Wp) kontrollieren die Synthese der Vorläufer-RNAs, die für die Synthese aller EBNA-Proteine verantwortlich sind. Cp befindet sich im Bereich des BamHI-C-Fragments der U1-Region, Wp innerhalb des BamHI-W-Fragments in den IR1-Wiederholungseinheiten. Außerdem fand man den Promotor Qp, der die Bildung von Transkripten kontrollieren, von denen nur EBNA1 translatiert wird. Dieses Kontrollelement liegt im BamHI-Fragment Q.

Das EBNA-LP (leader protein) wird im wesentlichen in zwei Exons codiert, die in den Sequenzelementen des IR1-Repeats liegen. Da jedes EBV-Isolat eine andere Anzahl von IR1-Wiederholungseinheiten besitzt, besteht auch das EBNA-LP aus einer entsprechenden Zahl von wiederholten Proteindomänen von jeweils 66 Aminosäuren. Nur die 45 AS des carboxyterminalen Bereichs sind einheitlich, da sie in einem Exon der U2-Genomregion codiert sind. Das EBNA-LP wird phosphoryliert und reichert sich im Zellkern an. Die Gruppe um Paul Farrell konnte zeigen, daß EBNA2 und EBNA-LP zusammen die Expression von Cyklin D2 in ruhenden B-Zellen aktivieren und damit die Zellen aus der G0-Phase in die G1-Phase treiben (Sinclair et al., 1994). Die Anwesenheit der beiden Proteine ist für die Immortalisierung ausreichend.

Das EBNA1-Protein ist im Leserahmen BKRF1 kodiert und mit einer - je nach Virusisolat unterschiedlichen - Größe von 70 - 80 kD das einzige virale Protein, das in fast allen durch EBV infizierten und proliferierenden Zellen exprimiert wird. Das an Serinresten phosphorylierte EBNA1 (Petti et al., 1990) vermittelt sowohl die DNA-Bindung (Ambinder et al., 1991; Inoue et al., 1991) als auch die Dimerisierung (Chen et al., 1993) von EBNA1-Molekülen über die C-terminalen Aminosäuren 459-607. Wie kristallographische Analysen gezeigt haben, ist das DNA-Bindungsmotiv homolog zu dem des E2-Proteins des Papillomavirus (Bochkarev et al., 1995). Neuere Daten weisen darauf hin, daß der für EBNA1 typische Glycin-Alanin-Repeat für das immunologische Nichterkennen von EBNA1 in EBV-immortalisierten Zellen verantwortlich ist. Er verhindert, daß EBNA1 durch den Proteasomenkomplex abgebaut wird und damit Peptide entstehen, die von MHC-Klasse-I-Proteinen präsentiert werden (Modrow & Falke, 1996). Durch die Bindung an den C-Promotor ist EBNA1 in der Lage, seine eigene Expression zu kontrollieren (Sugden &

Warren, 1989), da es positiv regulatorisch auf die Aktivität des C-Promotors wirkt (Sample et al., 1992). Diese Transaktivierungsdomäne ist ebenfalls im C-Terminus des Proteins lokalisiert.

Die primäre Funktion des EBNA1-Produktes ist die Aufrechterhaltung der Replikation latenter EBV-Genome, es erhält den episomalen Status des EBV-Genoms in den infizierten Zellen und wirkt als Transkriptionenhancer (Gahn & Sugden 1995; Middleton & Sugden, 1992; Reisman & Sugden, 1986; Sugden & Warren, 1989; Yates et al., 1985). EBNA1 bindet sequenzspezifisch als Homodimer an 18 bp lange, palindrome Konsensussequenzen im *oriP* des EBV, und zwar sowohl im BamHI-Q-Element (Rawlins et al., 1985) als auch im family-of-repeats (FR-) und dyad-symmetry (DS-) Element (Ambinder et al., 1990; Ambinder et al., 1991). Diese Konsensussequenzen sind jeweils in mehrfacher Kopienzahl vorhanden. Als einziges virales Protein ist es in jeder EBV-positiven BL- und NPC-Zelle vorhanden. Dies ist ein starker Hinweis darauf, daß es nicht nur für die Aufrechterhaltung des EBV-Genoms verantwortlich ist, sondern in Tumorzellen zu einem Selektionsvorteil beiträgt. Versuche mit transgenen Mäusen, welche EBNA1 unter der Kontrolle des Immunglobulin-Enhancers in Lymphozyten exprimieren und häufig Lymphome entwickeln, unterstützen diese Aussage (Wilson & Levine, 1992).

EBNA2, eines der ersten nach einer Infektion exprimierten Gene, ist für die Etablierung der Latenz und des immortalisierten Stadiums essentiell. So kann der Virusstamm P3HR-1, dessen Genom in dem für EBNA2 kodierenden Bereich eine Deletion aufweist, B-Zellen *in vitro* nicht immortalisieren (Bornkamm et al., 1982). Die transformierende Eigenschaft konnte man durch Komplementation der fehlenden DNA-Bereiche wieder herstellen (Kempkes et al., 1995a). Die beiden Subtypen des EBV unterscheiden sich in ihrer Sequenz des EBNA2 vor allem in einer relativ hydrophoben Domäne im Zentrum des Proteins voneinander. Dies beruht auf unterschiedlichen DNA-Sequenzen im Leserahmen BYRF1. EBNA2 Typ1 ist 491 AS lang, Typ2 443. Die Proteine sind phosphoryliert, haben Molekulargewichte von 75 bis 88 kD und reichern sich im Zellkern als oligomere Komplexe an. Außerdem wirkt EBNA2 als Transaktivator. Allerdings bindet es nicht selbst an die Promotoren, sondern vermittelt diesen Effekt durch Interaktion mit den zellulären Faktoren RBP-J $\kappa$ , TFIIB, TAF40, RPA70 und PU.1 (Zimmer-Strobl et al., 1993; Henkel et al., 1994; Tong et al., 1995). Es aktiviert sowohl den Promotor für das LMP1-Gen und den C-Promotor der EBNA-Gene als auch die Transkription zahlreicher zellulärer Gene, die für das Fortschreiten des Zellzyklus sorgen. Über die Transaktivierung von LMP1 setzt EBNA2 durch Interaktion mit dem Transkriptionsfaktor PU.1, der eine Bindungsstelle im LMP1-Promotor besitzt, den eigentlichen Immortalisierungsprozeß in Gang (Johannsen et al., 1994; Kempkes et al., 1995). EBNA2 ist nicht nur für die Initiation, sondern auch für die Aufrechterhaltung der Immortalisierung

notwendig (Kempkes et al., 1995). Außerdem verstärkt EBNA2 die Regulation des zellulären Protoonkogens bcl2, das die Apoptose verhindert (Reid, 1992), und ist ein Suppressor der Immunglobulin M (IgM)-Expression (Jochner et. al, 1996).

Die EBNA3-Proteine (EBNA3A, 3B, 3C) werden von mRNA-Spezies translatiert, die durch unterschiedliches Spleißen aus der gleichen Vorläufer-RNA entstehen. Diese beginnt wie die von EBNA1 im BamHI-C-Fragment. Für die Gene der EBNA3-Familie wird angenommen, daß sie aus einem gemeinsamen Vorläufer durch Genduplikation entstanden sind. Die Gene der EBNA3-Proteine sind tandemartig im Genom angeordnet, wobei die kodierenden Sequenzen für die Latenzproteine der EBNA3-Familie, die durch ein kurzes Intron getrennt werden, auf jeweils zwei Exons verteilt liegen (Hennessy et al., 1986). Alle drei Proteine sind stark hydrophil, enthalten repetitive Domänen am carboxyterminalen Ende, sind phosphoryliert und im Nukleus der latent infizierten Zellen, in Aggregaten zusammengeschlossen, gleichmäßig verteilt (Petti et al., 1990).

EBNA3A ist ein Regulationsfaktor für EBNA3C und zusammen mit diesem an der Immortalisierung von B-Zellen beteiligt (Kempkes et al., 1995; Tomkinson et al., 1993).

Eine ähnliche Funktion zeigt EBNA3B, das jedoch für die Immortalisierung der Wirtszelle nicht notwendig ist (Tomkinson & Kieff, 1992). Die Wirkungsweise der EBNA3-Familie ist noch unklar. Lediglich für EBNA3C konnte gezeigt werden, daß es in der Lage ist, die Expression von LMP1, CD21, CD23 und Vimentin (Allday & Farrell, 1994; Wang et al., 1990) zu erhöhen, indem es möglicherweise über seinen Leucin-Zipper mit einer angrenzenden basischen Region (Allday et al., 1993) an DNA bindet und so seine transaktivierende Wirkung entfaltet.

### **2.7.3.2 Die LMP-Proteine**

LMP1 wird im Leserahmen BNLF1 kodiert. Ein eigener, während der Viruslatenz aktiver Promotor kontrolliert seine Expression. LMP1 ist ein integrales Membranprotein mit sechs hydrophoben Membrandurchgängen (Liebowitz et al., 1992), einem kurzen hydrophilen Aminoterminus und einem langen hydrophilen Carboxyterminus, der sich im Zellinneren befindet, während die hydrophoben Transmembranregionen die Verankerung in der Cytoplasmamembran darstellen. LMP1 wird posttranslational an Serinresten der carboxyterminalen Region phosphoryliert. Es ist über Vimentin an das Cytoskelett assoziiert und deshalb in bestimmten Bereichen der Zelloberfläche in hoher lokaler Konzentration vorhanden. LMP1 besitzt einige Eigenschaften, die es als potentiell Onkogen ausweisen: So ist es in der Lage, Ratten- und NIH3T3-Zellen zu transformieren (Baichwal & Sugden, 1988; Wang et al., 1985). Verantwortlich scheinen dafür der C-

---

Terminus und die Transmembrandomänen bzw. alle drei Domänen sowie der Grad der Phosphorylierung zu sein (Izumi et al., 1994; Moorthy & Thorley-Lawson, 1993). Außerdem ist LMP1 für die Immortalisierung von B-Zellen essentiell, da EBV mit mutiertem LMP1 nicht in der Lage ist, B-Zellen zu immortalisieren (Kaye et al., 1993).

LMP1 verstärkt darüberhinaus die Expression einiger Zelladhäsionsmoleküle (ICAM-1, LFA-1, LFA-3) und einiger B-Zell-Aktivierungsmarker (CD21, CD23) auf der Oberfläche von B-Zellen (Wang et al., 1990) sowie die Expression des anti-apoptischen Protoonkogens bcl-2 (Henderson et al., 1991). Außerdem scheint LMP1 die Expression von Vimentin (Birkenbach et al., 1989), HLA-Klasse-II-Antigenen (Zhang et al., 1994) sowie einer  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-abhängigen Proteinkinase (Mosialos et al., 1994) zu induzieren. Wie allerdings LMP1 die Expression dieser verschiedenen Gene aktiviert, ist unklar. Der Struktur nach könnte es sich bei LMP1 um einen Wachstumsfaktorrezeptor handeln (Martin & Sugden, 1991), der mit G-Proteinen assoziiert kontinuierlich eine Signalkaskade auslöst und so die Expression verschiedener zellulärer Gene auslöst. Es gibt Hinweise, dass der Signalweg über  $\text{NF}\kappa\text{B}$  oder den AP1-Faktor laufen könnte (Farrell, 1998; Hammarskjöld & Simurda, 1992). Dabei aktiviert LMP1 über den TRAF- und TRADD/TRAF-2-Signaltransduktionsweg  $\text{NF}\kappa\text{B}$  (Mosialos et al., 1995; Sandberg et al., 1997) bzw. über den SEK/JNK-1-Kinase-Signaltransduktionsweg den Transkriptionsfaktor AP1 (Farrell, 1998). Die zytoplasmatische Domäne von LMP1 hat nämlich, obwohl sie nur eine geringe sequentielle Homologie dazu aufweist, eine ähnliche Funktion wie die des TNF-Rezeptors, der nach Bindung des Tumornekrosefaktors in der Zytoplasmamembran zu Oligomeren aggregiert. Aufgrund der dadurch induzierten Signalkaskade lagern sich die zellulären Faktoren TRAF-1 und TRAF-2 an die zytoplasmatischen Domänen an und leiten die Phosphorylierung und Aktivierung von  $\text{NF}\kappa\text{B}$  ein (Farrell, 1998). Dadurch werden automatisch alle im Kern von  $\text{NF}\kappa\text{B}$ -abhängigen Promotoren aktiviert.

Die Expression von LMP1 scheint von vielen positiven und negativen Faktoren reguliert zu werden (Fahraeus et al., 1990). Einer der positiven Faktoren ist EBNA2, von dem gezeigt wurde, daß es eine Suppression des LMP1-Promotors in B-Zellen aufheben kann (Fahraeus et al., 1993; Wang et al., 1990) bzw. positiv auf den Promotor wirkt (Laux et al., 1994). Auch EBNA3C ist in der Lage, die Expression von LMP1 zu steigern (Allday et al., 1993; Allday & Farrell, 1994)

LMP2A und LMP2B (terminal protein; TP1/TP2) dagegen werden erst nach der Zirkularisierung des viralen Genoms über die fusionierten Enden hinweg transkribiert. Erst wenn der Ringschluß vollzogen ist, können beide Gene vollständig abgelesen werden (Laux et al., 1988). Die Expression beider Proteine wird von zwei unterschiedlichen

Promotoren induziert. Das sehr hydrophobe LMP2B besteht ausschließlich aus zwölf potentiellen Transmembranregionen, seine Enden sind in das Zellinnere orientiert. LMP2A besitzt zusätzlich eine hydrophile zytoplasmatische Domäne. Beide Proteine sind in der Membran mit LMP1 assoziiert (Longnecker & Kieff, 1990) und liegen im Komplex mit zellulären Proteinkinasen der src-Familie vor. An der Immortalisierung jedoch scheinen sie nicht beteiligt zu sein (Kim & Yates, 1993; Longnecker et al., 1993).

Für LMP2A konnte gezeigt werden, daß es mit Tyrosinkinasen, speziell mit den für Lymphozyten spezifischen Kinasen c-lyn und c-fyn (Burkhardt et al., 1992), interagiert. LMP2A dient den Kinasen dabei als Substrat und wird an Serin-, Threonin- und Tyrosinresten phosphoryliert (Longnecker et al., 1991). Da diese Phosphotyrosinkinasen bei der Signaltransduktion der B-Zell-Proliferation eine Rolle spielen, sind sie durch ihre reversible Bindung an das an die Zellmembran gebundene LMP2A nicht mehr für die B-Zell-Aktivierung verfügbar. Außerdem wird diskutiert, daß LMP2A den Übergang des Virus in den lytischen Zyklus hemmt, indem es einen Block der rezeptorvermittelten  $Ca^{2+}$ -Mobilisierung induziert (Miller et al., 1993; Miller et al., 1994).

LMP2B dagegen reguliert die Aktivitäten von LMP2A und ist somit für die Proliferation EBV-infizierter Zellen von Bedeutung. Die Einlagerung von LMP2B in die Membran führt zur Freisetzung der gebundenen Tyrosinkinasen durch Veränderung des Abstandes der Phosphorylierungsstellen im N-Terminus des LMP2A-Proteins (Fruehling et al., 1996).

---

**Eigenschaften und Funktionen der während der Viruslatenz gebildeten Proteine des Epstein-Barr-Virus**

Protein	Molekular- gewicht (kD)	Modifikation	Funktion
LMP1	70	phosphoryliert	latentes Membranprotein (LMP1), integrales Membranprotein, induziert Expression von CD23, LFA-1, -3, ICAM und Bcl-2 über TNF-Rezeptor-ähnliche Signalkaskade
LMP2A	53	phosphoryliert	latentes Membranprotein; wird durch Src-Kinasen an Tyrosinresten phosphoryliert; Modulation der Signaltransduktion
LMP2B	40		latentes Membranprotein, aminoterminal verkürzte Version von LMP2A; sehr hydrophob; hemmt Funktion von LMP2A
EBNA1	70–80	phosphoryliert	latentes Kernprotein, bindet sich an OriP und fördert die episomale Replikation, Transaktivator für den EBNA-Promotor, Glycin-Alanin-Wiederholungseinheiten verhindern MHC-Klasse-I-Präsentation
EBNA2	75–88	phosphoryliert	latentes Kernprotein, Transaktivator für EBNA- und LMP1-Promotoren, bewirkt erhöhte Expression von CD21, CD23 und c-Frg
EBNA3	90–110		latente Kernproteine, drei Formen A–C; EBNA2A induziert EBNA3C-Synthese, EBNA3C induziert CD23 und LMP-Synthese
EBNA-LP	20–50	phosphoryliert	latente Kernproteine; aktiviert Expression von Cyclin2D, induziert gemeinsam mit EBNA2 den Übergang von G <sub>0</sub> zu G <sub>1</sub> des Zellzyklus

**Tab.1: Eigenschaften und Funktionen der während der Viruslatenz gebildeten Proteine**  
(nach Modrow & Falke, 1997)

### 2.7.4 Die EBER-Transkripte

Die EBER-RNAs EBER1 und EBER2 werden, im Gegensatz zu den anderen Latenzprodukten, nicht translatiert, sondern als kurze, nicht-polyadenylierte RNAs ohne Cap-Struktur (Clarke et al., 1992) von der zellulären RNA-Polymerase III in großen Mengen synthetisiert (Lerner et al., 1981). Die Expression von EBER 1 und 2 korreliert zeitlich mit der Expression von EBNA1, 3, 4 und 6 (Rooney et al., 1989). Die meisten dieser RNA-Moleküle liegen im Zellkern komplexiert mit zellulären La-Proteinen vor (Howe & Steitz, 1986; Lerner et al., 1988). Die EBERs sind über eine EBER stem-loop-Struktur mit EAP (EBER-associated protein) (Toczyski & Steitz, 1993) assoziiert, von dem gezeigt wurde, daß es identisch ist mit dem ribosomalen L22-Protein (Toczyski et al., 1994). Das L22-Protein enthält Bindungsstellen für die ribosomale 18S- und 28S-RNA eukaryontischer Zellen, wodurch die Translation zellulärer und viraler mRNA

möglicherweise reguliert wird (Dobbelstein & Shenk, 1995). Auch interagieren die EBER-Transkripte mit EBNA1 (Snudden et al., 1994). Morphologisch zeigen die EBER-Transkripte Sequenzhomologien zu den VA1- und VA2-RNAs der Adenoviren und können diese funktionell ersetzen. Durch ihre Interaktion mit der interferonabhängigen Proteinkinase DAI verhindern sie also auch die interferoninduzierte Immunantwort, indem sie einer Aktivierung der DAI-Kinase entgegenwirken, die den Translationsfaktor eIF-2 phosphoryliert und so die Proteinsynthese inhibiert (Clarke et al., 1991).

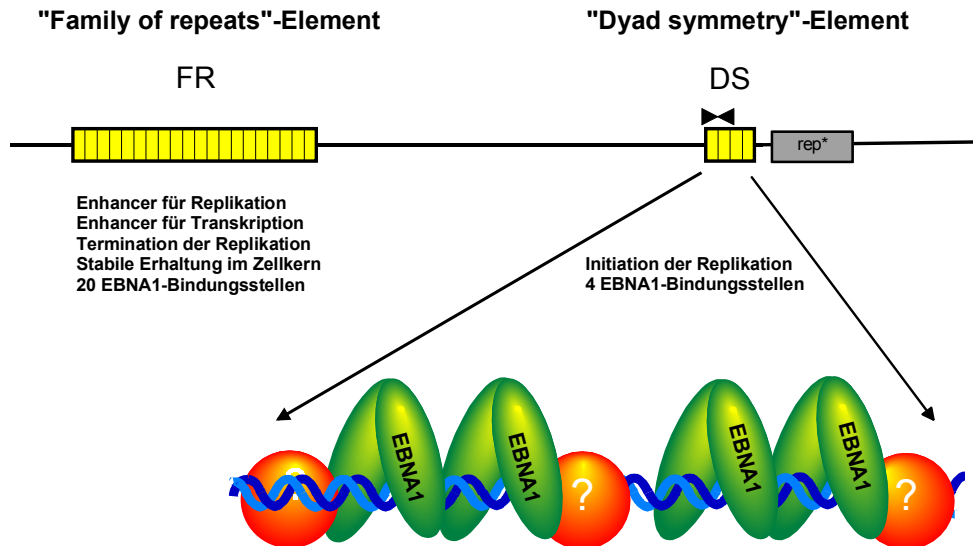
### 2.7.5 Der *oriP*

Die Replikation des Genoms des latenten EBV gilt als Modellsystem für die Replikation chromosomaler DNA in höheren Eukaryonten (DePamphilis, 1988). In Rajizellen, einer Zelllinie, die von einem afrikanischen Burkitt-Lymphom abgeleitet ist, persistiert EBV in einem strikt latenten Status mit einer stabilen Kopienzahl von etwa 50 zirkulären, histonbepackten, episomalen Plasmiden (Adams & Lindahl, 1975; Nonoyama & Pagano, 1972). Genau wie die chromosomale DNA wird jedes virale Plasmid einmal pro Zellzyklus in der frühen Synthesephase in bidirektionaler Form repliziert (Adams, 1987; Gussander & Adams, 1984; Hampar et al., 1974; Yates & Guan, 1991) und während der Mitose gleichmäßig auf die Tochterzellen verteilt. Diese Replikation- und Segregationsfunktion wird übernommen vom latenten Replikationsursprung, dem *oriP*, dem viralen Protein EBNA1 und der zellulären Replikationsmaschinerie (Lupton & Levine, 1985; Yates et al., 1984).

Der *oriP* besteht aus zwei cis-aktiven funktionellen Sequenzelementen, nämlich dem family of repeats (FR)-Element und dem dyad symmetry (DS)-Element, die durch eine etwa 1000 bp lange, nichtfunktionelle DNA voneinander getrennt sind (Lupton & Levine, 1985; Reisman et al., 1985). Das FR-Element mit einer Länge von etwa 600 bp enthält zwanzig mal einen 30 bp repeat in tandem, von dem jeder einzelne eine EBNA1-Bindungsstelle enthält (Hsieh et al., 1993; Rawlins et al., 1985; Reisman et al., 1985). Es wirkt im wesentlichen als Replikations- und Transkriptionenhancer, enthält die Terminationsstelle der bidirektionalen Replikation und trägt zur stabilen Erhaltung der EBV-Plasmide im Zellkern bei (Dhar & Schildkraut, 1991; Gahn & Schildkraut, 1989; Gahn & Sugden, 1995; Reisman & Sugden, 1986; Wysokenski & Yates, 1989).

Das 140 bp lange DS-Element dagegen enthält nur vier EBNA1-Bindungsstellen, wobei die EBNA1-Bindungsstellen #4 und #3 spiegelsymmetrisch angeordnet sind (Hsieh et al., 1993; Rawlins et al., 1985; Reisman et al., 1985). In EBNA1-exprimierenden Zellen wirkt

das DS-Element als der physikalische Ursprungsort der bidirektionalen Replikation und damit als relativ genau definiertes Initiatorelement im *oriP* (Gahn & Schildkraut, 1989; Platt et al., 1993; Wysokenski & Yates, 1989).



**Abb.5: Der *oriP* und seine Elemente. Die roten Kugeln stellen das noch unbekannte nonamerbindende Protein dar.**

Der *oriP* wird transaktiviert durch den viralen Transkriptionsfaktor EBNA1, der als Dimer an seine Erkennungssequenzen im *oriP* bindet und diese durch Ausbildung einer DNA-Schleife in unmittelbare Nachbarschaft bringt (Frappier & O'Donnell, 1991). Wie EBNA1 auf die Replikation Einfluß nimmt, ist bislang nicht bekannt. Da EBNA1 weder eine Helikase- noch ATPase-Aktivität oder Gyrasefunktion besitzt (Harrison et al., 1994), ist es denkbar, daß EBNA1 über eine Interaktion mit zellulären Faktoren die Verbindung zur Replikationsmaschinerie herstellt, wodurch die DNA-Replikation am *oriP* ihren Ursprung nimmt.

Wie durch *in vivo* footprints am DS-Element gezeigt wurde, binden in Abhängigkeit vom Zellzyklus neben dem viralen Protein EBNA1 zusätzliche Proteine an das DS-Element im *oriP* (Niller et al., 1995). Die dort gefundenen Proteinbedeckungen sind innerhalb dreier identischer Nonamersequenzen mit der Basenabfolge 5'-TTAGGGTTA-3' zu finden, die den Telomer-repeats menschlicher Telomere (TTAGGG)<sub>n</sub> homolog sind (Brown, 1989; Cross et al., 1989) und ansonsten weder im EBV- noch im bisher bekannten menschlichen Genom vorkommen. Die Bindung an die Nonamersequenzen sind spezifisch und unabhängig von EBNA1. Die Bedeutung der Nonamersequenzen zeigen Experimente mit EBV-Plasmiden, bei denen diese Sequenzen mutiert wurden. Sie blieben nicht mehr stabil im Zellkern erhalten und gingen schneller verloren als die Wildtyp-Variante mit intaktem *oriP* (Vogel et al., 1998; Koons et al., 2001). Möglich ist dabei, daß

Plasmide mit mutierten Nonameren nicht mehr repliziert werden oder den Kontakt zu den Chromosomen nicht mehr herstellen können, der zur stabilen Persistenz der EBV-Plasmide im Zellkern notwendig ist. Wie von Niller et al. 1995 gezeigt werden konnte, sind in Rajizellen freie Epstein-Barr-virale 5'-Enden auf den Nonameren lokalisiert, die mögliche Initiationspunkte der Replikation darstellen könnten. Damit ergibt sich eine gewisse Wahrscheinlichkeit, daß das Nonamer-bindende Protein bei der Initiation der Replikation des EBV eine tragende Rolle spielt.

### 2.7.6 Das rep\*/vIL-10p-Element

Vor kurzem wurde postuliert, daß das rep\*-Element, ein 298 Basen langes Sequenzelement, eine Bindungsstelle für zelluläre Proteine ist, die für die Replikation der chromosomalen DNA verantwortlich sind. Es ist zwischen den Nukleotiden 9370 und 9668 und damit knapp downstream hinter dem DS-Element angesiedelt. In Transfektionsversuchen mit kleinen Plasmiden stellte sich heraus, daß rep\* die Replikation des *oriP* unterstützt. (Kirchmaier & Sugden, 1998).

Während der latenten Phase des EBV werden weder die immediate early, early noch late Gene exprimiert. Das EBV besitzt einen BCRF-1 reading frame, der ein virales Homolog zum zellulären Interleukin 10-Gen (IL-10) darstellt (Moore et al., 1990). Das virale IL-10 wird sofort nach Infektion der B-Zelle und vorherrschend als spätes Produkt nach der Induktion des lytischen Kreislaufs produziert. Als spät exprimiertes Gen wird das vIL-10 nicht während der Latenz produziert (Hudson et al., 1985; Miyazaki et al., 1993; Touitou et al., 1996; Zeidler et al., 1997). Die Promotorregion des Hauptteils der mRNA für vIL-10, einer etwa 800 Basen langen mRNA, liegt annähernd zwischen den EBV-Nukleotiden 9000 und 9150 (Reisman et al., 1985; Harrison et al., 1994; Shirakata & Hirai, 1998; Yates et al., 2000) und überlappt das rep\*-Element zum größten Teil. Dies erleichtert eine Funktionsanalyse des rep\*-Elements.

## 2.8 Die Telomerase

Die Telomerase ist eine spezielle Reverse Transkriptase, die essentiell für die Telomer-Aufrechterhaltung ist. Die Telomerase ist ein Ribonucleoprotein (RNP) und benutzt eine interne RNA-Matrize, um die immer wieder gleichen Wiederholungs-Sequenzen im Telomer zu synthetisieren. Eine Deletion der essentiellen RNA-Komponente führt zu einer fortlaufenden Telomerverkürzung und damit einhergehend zur Chromosomen-Instabilität und Zelltod sowohl in Hefe als auch in Wirbeltierzellen (Singer & Gottschling, 1994; McEachern & Blackburn, 1996; Blasco et al., 1997; Lee et al., 1998).

Sowohl die Telomerlänge als auch die Telomeraseaktivität werden mit Zellalterung und Krebsentstehung in Verbindung gebracht. Während der Immortalisierung von Wirbeltierzellen in Zellkultur und in vielen menschlichen Tumoren wird die Telomerase aktiviert (Kim et al., 1994). Künstliche Verlängerung der Telomere durch von außen stimulierte hTERT-Expression in menschlichen Primärzellen führt zu einem Stillstand der Zellalterung, was darauf schließen läßt, daß die Telomeraseaktivität und die Telomerlänge eine direkte Rolle bei der Zellimmortalisierung spielen (Bodnar et al., 1998; Vaziri & Benchimol, 1998). Kürzlich wurde gezeigt, daß bereits die Expression nur von TERT zusammen mit dem SV40 T Antigen und aktiviertem Ras genügt, menschliche Primärzellen zu transformieren (Hahn et al., 1999).

Die Telomerase besteht aus einem Grundenzym und einigen assoziierten Proteinen. Das Grundenzym besteht neben der RNA-Komponente (telomerase RNA, TR) aus der katalytischen Proteinuntereinheit (telomerase reverse transcriptase, TERT). In Ciliaten beträgt die Länge der RNA 150 bis 200 bp, in Wirbeltierzellen ist die RNA-Komponente mit 390-450 Nucleotiden wesentlich länger (Blasco et al., 1995; Feng et al., 1995). Ihre Struktur ist innerhalb der Vertebraten hoch konserviert (Chen, Blasco & Greider, nicht veröffentlichte Ergebnisse). Die im Ciliaten *Euplotes* zuerst entdeckte katalytische TERT-Untereinheit (Lingner & Cech, 1996) ist homolog zu den gleichen Strukturen in Hefe (EST2), Mensch (hTERT) und Maus (mTERT) (Harrington et al., 1997b; Lingner et al., 1997b; Meyerson et al., 1997; Nakamura et al., 1997; Greenberg et al., 1998; Martin-Rivera et al., 1998). TERT enthält konservierte Sequenzmotive, die ähnlich auch in reversen Transkriptasen vorkommen und deren Mutation die Aktivität der Telomerase zum Erliegen bringt (Lingner et al., 1997b; Weinrich et al., 1997). Eine herabgesetzte Telomeraseaktivität kann durch *in vitro*-Zugabe der TERT- und RT- Komponenten wiederhergestellt werden (Weinrich et al., 1997; Beattie et al., 1998). Die Funktion der RNA-Untereinheit besteht darin, eine Antisense-Matrize für die Telomer-repeats bereitzustellen. Das Telomerase-Enzym bewegt sich in 6-Basenpaar-Sprüngen fort und ermöglicht so der DNA-Polymerase fortlaufend die Verlängerung der Telomere. Bei Wirbeltieren ist die Antisense-Sequenz der Telomerase-RNA ein Nonamer und lautet 5'-AAUCCCAAU-3' (Blasco et al., 1995; Feng et al., 1995).

Die Telomeraseaktivität wird in Säugerzellen sowohl in verschiedenen Zelltypen wie auch in verschiedenen Proliferationsstadien streng reguliert. Die menschliche Telomerase hat ein Molekulargewicht von etwa 1000 kDa, was darauf schließen läßt, daß sie aus verschiedenen zusätzlichen Untereinheiten außer hTERT und der RNA-Komponente besteht (Nakayama et al., 1997; Schnapp et al., 1998). Es ist wahrscheinlich, daß die

---

anderen Proteine wichtige Funktionen erfüllen. Zwei Proteine, p80 und p95 von Tetrahymena, sind mit Telomerase beispielsweise *in vivo* assoziiert (Gandhi & Collins, 1998).

Die Rolle, die diese beiden Proteine spielen, ist noch ungeklärt. Ein p80-Homolog, das telomerase-assoziierte Protein 1 (TEP1), ist mit dem Telomerase-Core-Enzym in menschlichen Zellen verbunden (Harrington et al., 1997a, Nakayama et al., 1997). Die Aufreinigung der Euplotes-Telomerase führte zur Entdeckung eines telomerase-assoziierten Proteins p43 (Lingner & Cech, 1996), welches seinerseits mit dem La Protein in Säugerzellen homolog ist, welches an das 3'-Ende vieler RNA-Polymerase III-Transkripte bindet (Lingner, Cech & Wolin, nicht veröffentlichte Daten). Kürzlich wurden zwei Chaperone, p32 und Hsp90 gefunden, die mit der menschlichen Telomerase interagieren und die RNP-Aggregation erleichtern (Holt et al., 1999). Jüngste Veröffentlichungen sprechen von zwei Proteinen (hStau und L22), die mit der RNA-Komponente interagieren (Siyuan et al., 2000). In Hefe sind mindestens drei Proteine (Est1p, Est3p und Cdc13p) mit der Telomerase assoziiert (Lin & Zakian, 1995; Steiner et al., 1996).

Obwohl diese Proteine *in vitro* die Telomeraseaktivität nicht zu beeinflussen scheinen (Lingner et al., 1997a), führen Mutationen in diesen Proteinen zu signifikanten Telomerverkürzungen und Einschränkung der Lebensfähigkeit der Zellen (Lendvay et al., 1996). Diese Telomerase-assoziierten Proteine könnten eine wichtige aber bisher noch nicht definierte Rolle in der Telomerasebiogenese, der Aggregation und Regulation spielen.

## 2.9 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

In jüngerer Zeit wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen dazu übergegangen, der Funktion der Einzelelemente des *oriP* nachzugehen. In dieser Arbeit wurden dazu die beiden möglicherweise für die Replikation notwendigen Elemente, die Telomer-repeats des DS-Elements und das Rep\*-Element, untersucht.

### 2.9.1 Untersuchung der Funktion der Telomer-repeats im *oriP*

Der latente Replikationsorigin des Epstein-Barr-Virus (*oriP*) besteht aus zwei *cis*-aktiven Sequenzelementen, die sowohl an der Initiation (DS-Element) als auch an der Termination (FR-Element) der DNA-Replikation beteiligt sind (Gahn & Schildkraut, 1989; Reisman et al., 1985). Der *trans*-aktive virale Replikationsfaktor, der die virale Replikation über das *cis*-Element *oriP* vermittelt, ist EBNA1 (Lupton & Levine, 1985; Yates et al.,

---

1985). Da weder EBNA1 noch ein anderes virales Protein ATPase- oder Helikaseaktivität besitzt, die für die Replikation der DNA benötigt werden, (Frappier & O'Donnell, 1991; Middleton & Sugden, 1992), ist es wahrscheinlich, daß ein oder mehrere zelluläre Proteine mit EBNA1 interagieren müssen, um eine Verbindung zur zellulären Replikationsmaschinerie herzustellen und die DNA-Replikation am *oriP* zu initiieren, beispielsweise durch die am DS-Element lokalisierten drei weiteren Proteinbindungen an den drei Nonamersequenzen (5'-TTAGGGTTA-3'), deren Abhängigkeit vom Zellzyklus nachgewiesen wurde (Niller et al., 1995).

Im allgemeinen wird für die Initiation der Replikation ein RNA-Primer benötigt, von dem aus die zelluläre DNA-Polymerase die Replikation beginnen kann, außerdem eine Helikase-Funktion und in diesem Falle die Affinität eines Proteins, an die Nonamersequenzen zu binden und den Weg für die übrige Replikationsmaschinerie zu bereiten.

Diese Anforderungen erfüllt die Telomerase zum Teil, die mit ihrer RNA-Matrize die Affinität via *antisense*-Bindung zu den entsprechenden DNA-Sequenzen besäße.

Die Aktivierung der Telomerase ist ein meist notwendiger Schritt, um die Immortalisierung von Zellen zu ermöglichen. Ein Charakteristikum von EBV ist es, Lymphozyten – oder im Falle von NPC Epithelialzellen – zu immortalisieren (Counter et al., 1994). Deswegen wäre es eine Möglichkeit, daß die Telomerase für die Replikation des *oriP* benötigt wird. Latente Proteine des EBV könnten für eine Reaktivierung der Telomerase verantwortlich sein, um die Replikation der viralen DNA zu ermöglichen und die Persistenz des Virus in den Zellen zu gewährleisten.

Um die Telomerase-Aktivität, ihre RNA-Konzentration und die Aktivität ihres Promotors sowie eine eventuelle Einflußnahme auf diese Parameter durch virale Latenzgene untersuchen zu können, wurden der TRAP-Assay, der RNase-Protection-Assay und der Luciferase-Assay herangezogen.

### **2.9.2 Untersuchung des rep\*-Elements des *oriP***

Um die möglichen Funktionen des rep\*-Elementes bezüglich der Replikation viraler und chromosomaler DNA weiter aufzuklären, wurde mittels *in vivo* Protein-DNA-Footprinting die Bedeckung des Elementes mit Proteinen untersucht.

## **3. Material und Methoden**

### **3.1 Ausgangsmaterial**

#### **3.1.1 Bakterien und Plasmide**

Für Klonierungen und Plasmid-Präparationen wurde der *E. coli* K12-Stamm DH5 $\alpha$ F' (F'/endA1 hsdR17 ( $r_k^-m_k^+$ ) supE44 thi-1 recA1 gyrA (Nal<sup>r</sup>) relA1  $\Delta$ (lac ZYA-argF) U169 deoR ( $\Phi$ 80dlac  $\Delta$ (lacZ)M15) (Woodstock et al., 1989; Raleigh et al., 1989) verwendet.

Für die Klonierung der EBV-Expressionsvektoren wie auch für die Herstellung der Sonden für den Protection-Assay wurde ein Plasmid aufbauend auf dem pRC/CMV-Vektor (Invitrogen) verwendet.

Die Luciferase-Vektoren mit den hTERT-Promotorkonstrukten wurden freundlicherweise von J. Carl Barrett, Laboratory of Molecular Carcinogenesis, National Institute of Environmental Health Sciences, North Carolina, überlassen.

#### **3.1.2 Eukaryotische Zelllinien**

Die EBV-positive Zelllinie Raji (Pulvertaft 1965) stammt aus dem Zellkulturbestand des Instituts für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Regensburg. Auch die EBV-negative Burkitt-Lymphomzelllinie DG 75 sowie die epitheliale Zelllinie HeLa und die EBV-positive Lymphoblastoide Zelllinie (LCL) 721 stammen aus diesem Hause.

Die EBV-positiven Zelllinien Mutu und Rael stammen aus dem National Center for Epidemiology, Budapest und wurden von Prof. Minarovits zur Verfügung gestellt.

Die Vorhäute zur Gewinnung der Fibroblasten wurden von der Kinderchirurgischen Praxis, Dr. Kamal Yousef, Regensburg, zur Verfügung gestellt. Sie wurden mit einem Skalpell zerkleinert, mit Trypsin für 4 h bei 37°C verdaut und die vereinzelt Zellen in Kulturmedium (RPMI, s.u.) überführt.

Alle Zelllinien wurden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank kultiviert. Dem Medium (RPMI 1640 mit 2mM L-Glutamin, Gibco) wurden 10% fötales Kälberserum und Penicillin/Streptomycin (100U/ml;100 $\mu$ g/ml) zugesetzt, um Kontaminationen durch Bakterien in Großansätzen vorzubeugen.

Je nach Wachstumseigenschaften wurden die Zellen alle 3-4 Tage auf etwa 5x10<sup>5</sup> Zellen/ml mit neuem Medium verdünnt.

## 3.2 Molekularbiologische Arbeitsmethoden

### 3.2.1 Reverse Transkription

Mittels reverser Transkription ist es möglich, RNA unter Einsatz von DNA-Oligomeren und dem Enzym Reverse Transkriptase in copy-DNA (cDNA) umzuschreiben.

Ausgegangen wurde von 500 ng Gesamt-RNA, die nach Zugabe von 2 µl 10x-Puffer (Puffer I; Perkin Elmer), 4 µl 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 2µl dNTP (jeweils 2 mM), 1 µl spezifischem Primer (30 pM) und H<sub>2</sub>O bidest auf ein Volumen von 18 µl gebracht und für 5 min auf 65°C erhitzt wurde. Anschließend stellte man die Probe auf Eis und gab 1 µl Reverse Transkriptase (5 U; Perkin Elmer), 1 µl RNasIn (10 U; Boehringer) zum Ansatz. Die Probe wurde für 5 min bei 37°C inkubiert, dann für 1 h bei 42°C. Die Reaktion wurde mit einer 5-minütigen Erhitzung auf 95°C abgebrochen.

*Folgende Primer wurden bei der Reversen Transkription verwendet:*

LMP1: 5'-GTAGCGGCCGCGGTTAGTCATAGTAGCTTAG-3'  
EBNA2: 5'-GAAGCCGGCAAGGGTTTTTACTGGATGGAGG-3'  
LMP2A: 5'-CTTGCGGCCGCTTCAGTGTATGCATAGTC-3'  
hTER:.. 5'-GAGAAGCTTGAAGTGCATGTGTGAGCCGAG-3'  
hTERT: 5'-AATGCGGCCGCCATCAGTCCAGGATGGTCTTG-3'

### 3.2.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR (Polymerase-Kettenreaktion) wurde dazu verwendet, cDNA oder bestimmte DNA-Bereiche aus genomischer DNA zu amplifizieren. Dazu wird eine thermostabile DNA-Polymerase benötigt.

Für die RT-PCR wurden aus dem oben erläuterten Ansatz 2 µl cDNA, für DNA-Bereiche aus genomischer DNA ca. 50 ng DNA verwendet.

Der PCR-Standardansatz bestand aus 2,5 µl 10x-Puffer (Puffer II; Perkin Elmer), 1 µl 5'-Primer (30 nM), 1 µl 3'-Primer (30 nM), 1 U Taq-Polymerase (Perkin Elmer), und der entsprechenden Menge DNA. Dieses Gemisch wurde mit H<sub>2</sub>O bidest auf ein Volumen von 25 µl gebracht und bis zur weiteren Verwendung im Cyclyer auf Eis gestellt. Die Standardeinstellung des PCR-Cyclers (MJ Research, PTC-200 Peltier Thermal Cyclyer) lautete für den Schritt 1: 3 min 95°C; Schritt 2: 30 sec 94°C; Schritt 3: 30 sec 52°C; Schritt

4: für je 1000 bp 60 sec 72°C. 35-malige Wiederholung von Schritt 2-4, danach Kühlung der Proben bis zur weiteren Verwendung auf 4°C.

### **Verwendete Primer:**

#### ***hTER:***

3'-Primer: 5'-GAGAAGCTTGAAGTGCATGTGTGAGCCGAG-3'

5'-Primer: 5'-TATAAATAAAGCGGCCGCGGGTTGCGGAGGGTGGG-3'

#### ***hTERT (RT3):***

3'-Primer: 5'-AATGCGGCCGCCATCAGTCCAGGATGGTCTTG-3'

5'-Primer: 5'-CAAGTCCTACGTCCAGTGCCAGGGGATCCCGCAG-3'

#### ***EBNA2:***

3'-Primer: 5'-GAAGCCGGCAAGGGTTTTTACTGGATGGAGG-3'

5'-Primer: 5'-CCAAAGCTTATCTGCCGCCATCATGCCTAC-3'

#### ***LMP1:***

3'-Primer: 5'-GTAGCGGCCGCGGTTAGTCATAGTAGCTTAG-3'

5'-Primer: 5'-GGGAAGCTTATGGAACACGACCTTGAGAG-3'

#### ***LMP2a:***

3'-Primer: 5'-CTTGCGGCCGCTTCAGTGTATGCATAGTC-3'

5'-Primer: 5'-CCCAAGCTTATCCCTCTCGCCTTGTTTCTC-3'

### **3.2.3 Klonierung von PCR-Produkten**

#### **3.2.3.1 Reinigung der DNA-Fragmente über Agarosegele**

PCR-Produkte und durch Restriktionsverdau gewonnene DNA-Fragmente wurden mittels Auftrag auf ein Agarosegel von unerwünschten DNA-Stücken getrennt, der Reaktionserfolg verifiziert, gereinigt und wiedergewonnen. Dazu wurden zu den PCR- oder Restriktionsverdauansätzen 10% Loading Dye dazugegeben und dieser Mix auf ein Agarosegel (1,5%) aufgetragen. Nach ca. 1 h bei 100 Volt Spannung wurde das Gel auf den UV-Illuminator gelegt, die entsprechende Bande ausgeschnitten und mit dem NucleoSpin-Reinigungskit von Macherey-Nagel gemäß den Herstellerangaben gereinigt. Die damit gewonnenen DNA-Fragmente wurden danach für nachfolgende Anwendungen wie Ligation, in vitro-Transkription oder Sequenzieren weiterverwendet.

---

TAE-Puffer (50x):	242 g	Tris
	57,1 ml	Essigsäure
	100 ml	0,5 M EDTA
	ad 1 l mit H <sub>2</sub> O bidest	

### 3.2.3.2 Ligation

Zu 50 ng Plasmid-DNA wurden 50 ng geschnittene PCR- oder aus Plasmiden ausgeschnittene DNA-Fragmente gegeben, 1 µl 10x Puffer und 2U T4-Ligase (beides New England Biolabs) dazugegeben, der Ligationsansatz auf insgesamt 10 µl gebracht und ÜN bei 14°C inkubiert.

### 3.2.3.3 Herstellung ultrakompetenter Zellen nach Inoue (Inoue et al, 1990):

DH5α-E. coli wurden in 250 ml SOB-Medium bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6 bei RT kultiviert, 10 min auf Eis inkubiert, bei 2500 g für 10 min und 4°C abzentrifugiert. Resuspendiert wurden die Bakterien in 80 ml kaltem "TB"-Puffer und wiederum für 10 min auf Eis stehen gelassen. Es erfolgte eine erneute Zentrifugation mit 2500 g für 10 min bei 4°C. Das Pellet wurde vorsichtig in 20 ml kaltem "TB"-Puffer aufgenommen, DMSO bis zu einer Endkonzentration von 7% zugegeben, der Ansatz wiederum 10 min auf Eis stehengelassen. Daraufhin wurde die Zellsuspension in 0,5-ml-Aliquots aufgeteilt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C bis zu einem Jahr gelagert.

SOB-Medium:	2% (w/v)	Bacto-Trypton
	0,5% (w/v)	Hefeextrakt
	10 mM	NaCl
	2,5 mM	KCl
	10 mM	MgCl <sub>2</sub>
	10 mM	MgSO <sub>4</sub>
	mit KOH auf pH 6,7 - 7, autoklavieren	

TB-Puffer:	10 mM	Pipes
	55 mM	MnCl <sub>2</sub>
	15mM	CaCl <sub>2</sub>
	250 mM	KCl
	mit KOH auf pH 6,7 und steril filtrieren.	

### 3.2.3.4 Transformation

Nach der Ligation wurde der Ligationsansatz mit 40  $\mu$ l kompetenter Zellen vermischt (nach Protokoll von Inoue et al., 1990, s.o.), 2  $\mu$ l Mercaptoethanol (0,5 M) dazugegeben und der Ansatz auf Eis 30 min inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock bei 42°C (60 sec) im Wasserbad und die Zugabe von 500  $\mu$ l SOC-Medium. Es folgte eine Inkubation der Proben für 1 h bei 37°C im Schüttler.

Danach wurden die Bakterien pelletiert (5000 rpm für 5 min), der Überstand bis auf ca. 100  $\mu$ l abgenommen und verworfen. Das Pellet wurde im verbliebenen Überstand resuspendiert und auf eine mit Ampicillin behandelte Agarplatte aufgetragen.

Daraufhin wurden die Agarplatten bei 37°C im Brutschrank über Nacht inkubiert.

Die so erhaltenen Kolonien wurden für eine Miniprep weiterkultiviert.

SOC-Medium:	2% (w/v)	Bacto-Trypton
	0,5% (w/v)	Hefeextrakt
	10 mM	NaCl
	2,5 mM	KCl
	10 mM	MgCl <sub>2</sub>
	10 mM	MgSO <sub>4</sub>
	20 mM	Glucose
	mit KOH auf pH 6,7 - 7, steril filtrieren.	

## 3.2.4 DNA-Präparationstechniken: Plasmidisolierung aus Bakterien

### 3.2.4.1 Miniprep: Klassische alkalische Lyse

Die Bakterien werden in 3 ml LB<sub>Amp</sub> sterilen Reagenzgläsern über Nacht kultiviert, in 1,5 ml-Eppendorf-Cups überführt und 5 min bei 5500 rpm (3200 g) bei RT durch zwei aufeinanderfolgende Zentrifugationsschritte pelletiert. Der Überstand wird jeweils verworfen. Das Pellet wird resuspendiert in 200  $\mu$ l Puffer S1 + RNase (Macherey-Nagel), mit 200  $\mu$ l Puffer S2 lysiert und mit 200  $\mu$ l Puffer S3 die Proteine und Zellkompartimente ausgefällt. Diese werden durch eine Zentrifugation mit  $v_{max}$  (ca 20.000g) für 5 min bei RT pelletiert, der Überstand in ein neues Cup überführt und die DNA durch Zugabe von 600  $\mu$ l Isopropanol (entspricht 1 Vol.) bei -20°C für eine Stunde ausgefällt.

Durch eine erneute Zentrifugation bei  $v_{max}$  für 30 min und RT wird die DNA pelletiert, mit 70% Ethanol gewaschen und ca 15 min mit offenem Deckel getrocknet. Das getrocknete Pellet wird in 40  $\mu$ l H<sub>2</sub>O<sub>milipore</sub> aufgenommen und resuspendiert. Für einen analytischen Restriktionsenzymverdau reichen in der Regel 2  $\mu$ l.

LB <sub>Amp</sub> -Medium:	1%(w/v)	Bacto-Trypton
	1% (w/v)	NaCl
	10 mM	Tris/HCl pH 7,2
	0,5% (w/v)	Hefeextrakt
	75 µg/ml	Ampicillin

Puffer S1 (Resuspensionspuffer)

50 mM	Tris/HCl
10 mM	EDTA, pH8
100 µg/ml	RNase A

Puffer S2 (Lysepuffer)

200 mM	NaOH
1 %	SDS

Puffer S1 (Neutralisierungspuffer)

2.8 M	KAc, pH 5,1
-------	-------------

### 3.2.4.2 Maxiprep: Macherey-Nagel

Zur Präparation von Plasmid-DNA in größerem Maßstab wurde auf die Plasmid-DNA-Aufreinigungskits von Macherey-Nagel (Nucleobond 500/2000 für max. Plasmid-Ausbeute von 500 bzw. 2000 µg) zurückgegriffen. Zur Kultivierung der Bakterien wurden 200 bzw. 500 ml LB<sub>Amp</sub>-Medium mit aus der Transformation oder Glycerinkultur stammenden Bakterien angeimpft und über Nacht bei 37°C in einem Schüttler inkubiert. Die Bakterien wurden mittels Zentrifugation pelletiert (10 min; 4°C; 5500 rpm; Kontron A6.9 oder A6.14) und nach Angabe des Herstellers resuspendiert, lysiert, neutralisiert und über die entsprechende Säule gereinigt. Nach der Aufreinigung wurde die Plasmid-DNA mit Isopropanol gefällt, pelletiert, mit Ethanol gewaschen und in 500 µl H<sub>2</sub>O gelöst. Die Bestimmung der Konzentration erfolgte photometrisch.

### 3.2.4.3 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Plasmiden – Restriktionsverdau

100 µg Plasmid-DNA wurden mit 40U der entsprechenden Restriktionsenzyme dem vom Hersteller angegebenen Puffer für 2,5 h bei 37°C (Ausnahme: Sma I bei RT) inkubiert. Der Verdau wurde auf ein Agarosegel aufgetragen, elektrophoretisch nach Größe aufgetrennt und die entsprechenden Gelstücke mit einem Skalpell unter UV-Licht ausgeschnitten. Die so erhaltenen Gelstücke wurden mittels Qiaquick entsprechend den

Maßgaben des Herstellers (Qiagen) aus dem Gel aufgereinigt und den entsprechenden nachfolgenden Behandlungen unterzogen.

### 3.3 Experimente zur Erlangung der Ergebnisse

#### 3.3.1 RNase-Protection-Assay:

Der RNase-Protection-Assay dient dazu, aus Gesamt-RNA eine spezifische mRNA zu detektieren und deren Vorhandensein quantitativ zu erfassen.

##### 3.3.1.1 RNA-Gewinnung

Die RNA wurde mit der peqGOLD RNAPure™-Lösung (PeqLAB) gemäß Anleitung des Herstellers gewonnen. Das Prinzip basiert auf der Phenol-Guanidiniumisothiocyanat-Methode (Chomczynski & Sacchi, 1987) und gewährleistet die Gewinnung von Gesamt-RNA. Die Konzentration wurde photometrisch bestimmt, die Qualität und Unversehrtheit durch Auftrag auf ein 1%-Agarosegel überprüft.

##### 3.3.1.2 RNA in vitro-Transkription

Die RNA in vitro-Transkription der für den RNase-Protection-Assay benötigten Antisense-Sonde erfolgte mit der T3- bzw. T7- RNA-Polymerase (Boehringer/Roche). Dazu wurden 2 µl 10x Puffer, 2 mM dATP, dTTP, dGTP und 0,02 mM dCTP, 10 U RNasIn, 200 ng Plasmid-DNA, 4 µl radioaktives dCTP\* und 20 U T3-/T7-Polymerase auf ein Reaktionsvolumen von 20 µl gebracht und bei 37°C 1h inkubiert. Darauffolgend wurden 10 U DNase zugegeben und weitere 15 min bei 37°C inkubiert. Es erfolgte eine Zugabe von 38 µl TES, um das Volumen auf 60 µl zu bringen. Zum Ansatz wurden daraufhin 60 µl Phenol/Chloroform (1:1) hinzugefügt, gut gemischt und die Phasen bei einer Zentrifugation (3 min, 14.000 rpm, 4°C) getrennt und der wässrige Überstand in eine Polyacrylamid-Säule (Bio-Gel P6-Säule, BioRad) überführt. Nach den Angaben des Herstellers wurde die radioaktive RNA eluiert, die nichteingebauten Nukleotide verblieben in der Säule. Die RNA wurde mit 120 µl Ethanol (100%), 10 µg tRNA und 5 µl Natriumacetat (3M, pH 5,2) 1 h bei -20°C gefällt, bei 4°C und 14.000 rpm 15 min pelletiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde unter Erhitzung auf 95°C für 60 sec in 100 µl Hybridisierungspuffer resuspendiert und 2 µl davon im Szintillationszähler gemessen.

TES-Puffer:	10 mM	TrisHCl, pH 7,5
	5 mM	EDTA, pH 8,0
	0,1%	SDS

Hybridisierungspuffer:	40 mM	PIPES
	400 mM	NaCl
	80%	Formamid
	mit 10 M NaOH auf pH 6,4 titrieren.	

### 3.3.1.3 Hybridisierung

Die RNA wurde auf Eis aufgetaut und 10 µg in einer Vakuumzentrifuge getrocknet. Die RNA wurde mit 50 µl Hybridisierungspuffer (s.o.) resuspendiert und die jeweiligen Sonden (jeweils 500.000 cpm) dazugegeben. Nach einer kurzen Erhitzung auf 95°C fand die Hybridisierung in einem Heizblock über Nacht bei 60°C statt.

### 3.3.1.4 RNase-Verdau

Am nächsten Tag wurde zu den Proben je 350 µl Rnasepuffer mit RNase A (5 µg/ml/Ansatz) und RNase T1(500 U/Ansatz) gegeben. Der Ansatz wurde bei RT für 30 min inkubiert. Der Verdau der nichthybridisierten RNAs wurde durch Zugabe von 60 µl Proteinase K (1 mg/ml + 200 µl 20% SDS) innerhalb 30 min bei 37°C abgebrochen. Die Proteine wurden durch Ausschüttelung mit 460 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) entfernt. Die Phasentrennung wurde mit einer Zentrifugation (3 min, 14.000 rpm, RT) erreicht. Der wässrige Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und nach Zugabe von 10 µg tRNA mit 900 µl Ethanol (100%) die RNA bei -20°C für 1 h gefällt. Das daraus resultierende Pellet wurde in 6 µl Formamid-Auftragungspuffer resuspendiert, für 3 min auf 95°C erhitzt, kurz auf Eis gestellt und auf ein 6%iges Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Die Laufdauer betrug etwa 2 h bei 1500 V. Anschließend wurde das Gel auf Whatman-Papier übertragen und im Vakuumtrockner bei 70°C etwa 1 h lang getrocknet. Es wurde ein Röntgenfilm (Kodak) aufgelegt und in einer Kasette mit Verstärkerfolie in der Nacht bei -80°C exponiert.

RNAse-Puffer:	10 mM	TrisHCl, pH 7,5
	5 mM	EDTA, pH 8,0
	300 mM	NaCl

Formamid-Auftragungspuffer:	10 mM	EDTA, pH 8,0
	1 mg/ml	Xylencyanolblau

---

	1 mg/ml	Bromphenolblau
	80%	Formamid
Polyacrylamidgel (6%):	46 g	Urea
	10 ml	TBE (10x)
	15 ml	Polyacrylamid (19:1; 40%)
	32 ml	H <sub>2</sub> O
	300 µl	APS (10%)
	70 µl	TEMED
TBE (10x):	54 g	Tris
	27.5 g	Borsäure
	20 ml	EDTA (0,5 M, pH 8,0)
	ad 1 l mit H <sub>2</sub> O bidest	

### 3.3.2 Der TRAP-Assay

Der TRAP (telomeric repeat amplification protocol)-Assay (Kim & Wu, 1997) beruht auf der Entdeckung, daß Telomerase in der Lage ist, nicht nur an natürliche Telomerenden die entsprechenden Hexamere anzuhängen, sondern auch künstlich angebotene Oligonukleotide als Primer erkennt und diese ebenfalls verlängert.

Mittels radioaktiver PCR kann man die Anheftungsrate der Oligonukleotide sichtbar machen und an der Intensität der Markierung die Aktivität der Telomerase ablesen.

#### 3.3.2.1 Proteinextraktherstellung

In der Log-Phase befindliche Zellen werden pelletiert (10 min bei 1500 rpm), der Überstand verworfen, das Pellet mit kaltem PBS resuspendiert und nochmals abzentrifugiert. Das daraus resultierende Pellet wird vorsichtig mit dem hypotonischen Puffer A (10 mM Tris/HCl, pH 7,5; 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 10 mM KCL) resuspendiert (100 µl/10<sup>6</sup> Zellen). Das Zellgemisch wird wieder wie oben zentrifugiert, der Überstand verworfen. Nun wird das neue Pellet in CHAPS-Lyse-Puffer (10 mM Tris/HCl, pH 7,5; 1 mM MgCl<sub>2</sub>; 1 mM EGTA; 10% Glycerol; 0,5% CHAPS; 1 mM DTT; 0,5 mM PMSF) aufgenommen (wiederum 100µl/10<sup>6</sup> Zellen) und durch leichtes Schütteln 30 min auf Eis lysiert. Um die schweren Zellbestandteile, Zellmembranen und unlysierten Zellen abzutrennen erfolgt eine halbstündige Ultrazentrifugation (100.000g bei 4°C, Kontron Centrikon T-1160), der daraus resultierende Überstand wird in Eppendorfcups aliquotiert und in flüssigem Stickstoff bis zur weiteren Verwendung schockgefroren.

---

### 3.3.2.2 Proteinmengenbestimmung

Verschiedene Volumina Zellextrakt werden mit dem Protein-Assay (BioRad) nach den Angaben des Herstellers auf Proteingehalt untersucht und mit einer BSA-Eichkurve verglichen. Daraus ist der Proteingehalt der verschiedenen Zellextrakte zu berechnen.

### 3.3.2.3 TS-Primer-Markierung

0,1 µg TS-Primer (5'-AATCCGTCGAGCAGAGTT-3') werden mit 2 µl T4-Kinase-Puffer (10x, Boehringer Mannheim), 3 µl  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP (Amersham), 10 U T4-Kinase und H<sub>2</sub>O auf 20 µl Gesamtansatzvolumen gebracht und 1h bei 37°C inkubiert. Die Kinase wird anschließend bei einer 70°C-Inkubation 10 min lang inaktiviert und das Ansatzvolumen mit H<sub>2</sub>O auf 500 µl verdünnt.

### 3.3.2.4 TRAP-Assay

5 µl Puffer B (10x-Puffer: 200 mM Tris/HCL, pH 8,3; 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 630 mM KCl, 10 mM EGTA, 1 mg/ml BSA, 0,05% Tween 20) werden vermengt mit 1,25 ml dNTP (je 2 mM), 5 µl heißem TS-Primer und mit Wasser auf ein Volumen von 49 µl gebracht. Abschließend werden bei verschiedenen Versuchsansätzen 0,5 bis 2 µg Protein aus dem Proteinextrakt, bei jeweils einem Parallelansatz 0,8 µg RNase dazugegeben. Anschließend werden die Ansätze 30 min bei RT inkubiert, danach die Telomerase bei 65°C 3 min lang inaktiviert.

### 3.3.2.5 PCR

Darauffolgend werden zu den Ansätzen je 0,1 µg CX-Primer (5'-(CCCTTA)<sub>3</sub>CCCTAA-3'), 2,5 U Taq-Polymerase und zwei Tropfen Mineralöl hinzugefügt. Die anschließende PCR mit 25 Zyklen erfolgt bei 94°C für 30 sec, 50°C für 30 sec und 72°C für 1 min.

### 3.3.2.6 Aufreinigung und Konzentration der PCR-Produkte

Es werden zu jedem Ansatz 200 µl Chloroform hinzugefügt und die 50 µl wässriger Phase in ein neues Eppendorfcup übertragen. Mit 250 µl H<sub>2</sub>O auf ein Volumen von 300 µl gebracht, werden die Proben mit 300 µl Phenol ausgeschüttelt, die Phasen mit 200 µl Chloroform getrennt und der daraus resultierende Überstand wiederum in ein neues Eppendorfcup überführt. Nach Zugabe von 40 µl NaAc (3M, pH 5,2) und 1 ml Ethanol (100%) wird die DNA über Nacht bei -20°C gefällt.

Nach einer einstündigen Zentrifugation bei 4°C und 15.000 rpm wird der Überstand verworfen, das Pellet mit 70%igem Ethanol gewaschen und luftgetrocknet.

---

Das Pellet wird in 20 µl Laufpuffer aufgenommen, die DNA bei 95°C 5 min denaturiert und 6 µl davon auf ein 6%iges PAA-Gel aufgetragen. Abschließend wird das Gel auf Wheatman-Papier übertragen, 1 h unter Vakuum getrocknet und am Imager via Screening (GS-363 Molecular Imager System, Bio-Rad) ausgewertet.

## 3.4 Transfektionen

Für das Einbringen von Fremd-DNA in Säugerzellen stehen verschiedene Möglichkeiten wie die DEAE-Dextran-Methode, CaPO<sub>4</sub>-Kopräzipitation, Elektroporation und sowie einige kommerzielle Kits zur Verfügung.

### 3.4.1 Transfektion mittels Elektroporation

Bei der Elektroporation benötigt man eine hohe Zellzahl (ab  $5 \times 10^7$  Zellen) und mehr DNA (ab 20 µg). Von Vorteil ist die relativ konstante und teilweise extrem hohe Transfektionseffizienz (> 80 %) innerhalb einer Zelllinie. Zellmembranen können als elektrische Kondensatoren betrachtet werden. Diese Eigenschaft wird bei der Elektroporation benutzt, indem durch Anlegen eines Hochspannungsfeldes ein kurzzeitiger Zusammenbruch, der mit der Bildung von Poren in der Zellmembran einhergeht, verursacht wird. Auf diese Weise kann die Plasmid-DNA in die Zelle gelangen. Im verwendeten Gene-Pulser-Gerät (Bio-Rad) werden Kondensatoren bis zur voreingestellten Kapazität aufgeladen und über einen Hochspannungsstromimpuls durch die Zellsuspension hindurch entladen. Die HeLa – und DG 75-Zellen wurden in der vorliegenden Arbeit ausschließlich durch Elektroporation transfiziert.

Vor Beginn werden die Elektroporationsküvetten (Bio-Rad; 4 mm Elektrodenabstand) aus der Lagerlösung (70 % Ethanol) entnommen und in der Sterilbank getrocknet. Anschließend werden 200 µl DNA-PBS-DMSO-Gemisch (20 µg DNA, 7,5 µl DMSO, mit PBS ad 200 µl)-Lösung vorgelegt und eisgekühlt.

Die in Log-Phase befindlichen Zellen werden bei 400 g in einer Tischzentrifuge (Hettich Rotanta) für 10 min abzentrifugiert, der Überstand abgesaugt und verworfen. Die Zellpellets werden in PBS ohne Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup> (PBS-) resuspendiert und in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen (Falcon) vereinigt. Parallel zur Ermittlung der Zellzahl dieser Suspension erfolgt eine erneute Zentrifugation (s.o.) und anschließende Resuspendierung in PBS-. Die Konzentration wird dabei auf etwa  $2,5 \times 10^7$  Zellen/ml (also etwa  $1,0 \times 10^7$  Zellen/400 µl) eingestellt. In jede Transfektionsküvette werden 400 µl Zellsuspension gegeben und mit der dort vorliegenden DNA-PBS-Lösung vermischt. Nach einer kurzen Inkubationszeit auf Eis (ca. 10 min) erfolgt die Elektroporation (Single

Puls, 250 V, 1050  $\mu\text{F}$ ,  $\infty \Omega$ ). Die behandelten Küvetten werden für eine weitere 10-minütige Inkubation bei 37°C in den Brutschrank gestellt. Danach überführt man den Inhalt in auf 37°C vorgewärmte mit 25 ml RPMI+10% FKS gefüllte Petrischalen (Falcon, 100 x 20 mm). Im auf 37°C geheizten Brutschrank bleiben die transfizierten Zellen bis zur weiteren Verwendung.

### 3.4.2 Transfektion mit der DEAE-Dextran-Methode

Diese Form der Transfektion wurde hauptsächlich bei den Vorhaut-Fibroblasten angewendet, von denen für eine Elektroporation nicht genug Zellen kultiviert werden konnten. Außerdem wurden diese Zellen durch die Elektroporation fast gänzlich abgetötet, eine Optimierung der Transfektionsbedingungen konnte das Ergebnis nicht verbessern.

Je Ansatz wurden 3 bis 5 x 10<sup>7</sup> Zellen in der log-Phase geerntet und abzentrifugiert (300 g; 5 min; 4°C). Bis zu insgesamt 30  $\mu\text{g}$  DNA wurde in sterile 15 ml-Polypropylenröhrchen vorgelegt und mit den in 2 ml Medium (RPMI ohne FKS; 250  $\mu\text{g}/\text{ml}$  DEAE-Dextran; 0,1 mM Chloroquindiphosphat; 50 mM Tris HCL, pH 7,3) aufgenommenen Zellen 30 min in einem Schüttelwasserbad (60 rpm) inkubiert. Nach zweifachem Waschen mit Vollmedium wurden die Zellen 48 Stunden unter Standardbedingungen inkubiert.

### 3.4.3 Transfektion mit Superfect von Qiagen

Die Transfektion wurde mit 5  $\mu\text{g}$  DNA gemäß den Standardvorschlägen des Herstellers durchgeführt und gab geringfügig bessere Ergebnisse als die DEAE-Dextran-Methode.

## 3.5 Das duale Luciferase-Test-System

Genetische Reportersysteme sind weit verbreitet, um eukaryontische Genexpression und zelluläre Physiologie zu untersuchen. In diesem Falle wurde das "Dual-Luciferase Assay System" von Promega verwendet, um die Umstände zu untersuchen, unter denen der Telomerase-Promotor angeschaltet werden könnte.

Der Begriff "dualer Reporter" nimmt bezug auf die simultane Expression und Messung zweier verschiedener und voneinander unabhängiger Reporterenzyme innerhalb einer Messreihe. Der zu untersuchende Reporter korreliert dabei üblicherweise mit den jeweiligen Untersuchungsbedingungen, während der co-transfizierte Kontroll-Reporter die interne Kontrolle darstellt, die als "Grundlinienseffekt" dient. Die Verrechnung der Aktivität des Experiment-Reporters mit der internen Kontrolle minimiert die experimentelle Abweichung, die zum Beispiel hervorgerufen wurde durch die unterschiedliche Zelldichte

---

oder Transfektionseffizienz. Auch andere Störfaktoren wie Unterschiede in der pipettierten Menge oder der Effizienz der Zellyse können dadurch vermindert werden. Dadurch erlauben die dualen Reportersysteme meist eine höhere Aussagekraft bei der Interpretation der experimentell dargestellten Daten, indem sie die Auswirkungen von Fehlerquellen und äußerer Einflüsse reduzieren.

Beim Promega Dual-Luciferase™ Reporter Assay System werden die Aktivität der Leuchtkäfer- (Firefly-) (*Photinus pyralis*) und der Leuchtqualle- (Renilla-) (*Renilla reniformis*) Luciferase innerhalb eines Versuchsansatzes durch zwei direkt aufeinanderfolgenden Messungen ermittelt. Die Firefly-Luciferase wird nach der Zugabe des "Luciferase Assay Reagents II (LAR II)" gemessen. Nach der Ermittlung der Firefly-Luciferase wird diese Reaktion unterbrochen und durch Zugabe des "Stop and Glo<sup>R</sup>-Reagenz" zur gleichen Probe gleichzeitig die Renilla-Luciferase-Reaktion ausgelöst. Auch die Renilla-Luciferase erzeugt ein typisches Leuchten, welches über den Zeitraum der Untersuchung langsam abnimmt.

Im DLR™ Assay System erreichen beide Reporter einen linearen Aktivitätsanstieg mit subattomolarer Sensitivität und keinerlei Eigenaktivität weder auf seiten der Reporter noch auf seiten der untersuchten Zellen.

### 3.5.1 Chemie des Luciferase-Assays

Aufgrund der in der Evolution unterschiedlichen Ursprünge der Firefly- und Renilla-Luciferase haben beide Enzyme völlig unterschiedliche Enzymstruktur und Substratanforderungen. Diese Unterschiede machen es möglich, selektiv zwischen ihrer emittierten Biolumineszenz zu unterscheiden. So wird die Lumineszenz der Firefly-Luciferase-Reaktion durch gleichzeitige Aktivierung der Renilla-Luciferase-Reaktion völlig unterdrückt.

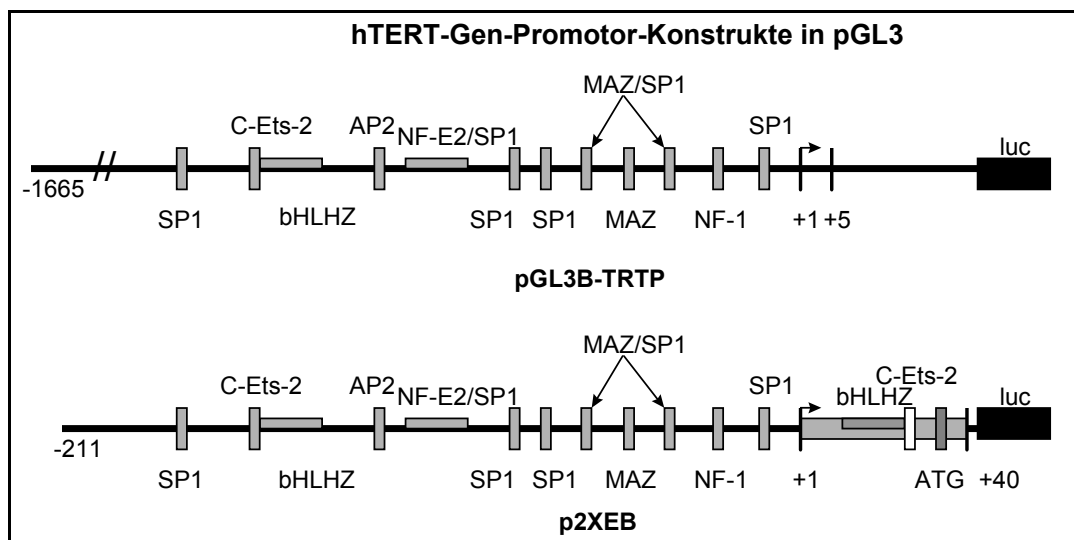
Die Firefly-Luciferase ist ein 61 kDa schweres Proteinmonomer, das keine post-translatierte Veränderung für seine Enzymaktivität benötigt. Somit kann es als genetischer Reporter sofort nach erfolgter Translation fungieren. Die Lichtemission wird durch Oxidation des Käfer-Luziferins in einer Reaktion, die ATP, Mg<sup>2+</sup> und O<sub>2</sub> benötigt, erreicht. Unter natürlichen Bedingungen erfolgt die Oxidation durch ein Luciferyl-AMP-Zwischenprodukt, das sehr langsam umgesetzt wird. Dadurch entsteht ein Lichtblitz, der sich schnell verflüchtigt, nachdem Substrat und Enzym gemischt wurden.

Die Renilla-Luciferase ist ein 36kDa schweres Proteinmonomer. Auch sie benötigt keine post-translationalen Veränderung und kann nach erfolgter Translation sofort als genetischer Reporter eingesetzt werden. Die von der Renilla-Luciferase katalysierte

---

Leuchtreaktion benötigt O<sub>2</sub> und Coelenterat-Luciferin (Coelenterazin). Die Kinetik der Reaktion liefert ein während der Messung nur langsam abnehmendes Lumineszenzsignal. Ebenso wie die Firefly-Luciferase gibt auch die Renilla-Luciferase-Reaktion sehr sensitive und in einem weiten Bereich von 5 Größenordnungen lineare Ergebnisse.

### 3.5.2 Luziferase-Vektorkonstrukte



**Abb. 2.1** Luciferase-hTERT-Promotorkonstrukte mit potentiellen Consensus-Sequenzen (freundlicherweise überlassen von J.C. Barrett)

Um die Aktivität des Luziferase-Promotors und die direkten Auswirkungen der kotransfizierten viralen Proteine überprüfen zu können, wurden mittels Luziferase-Assays Veränderungen der Telomerase-Promotoraktivität untersucht. Verwendet wurden dabei zwei verschiedene in einen pGL3-Vektor klonierte Versionen des Telomerase-Promotors: Der längere pGL3B-TRTP-Klon umfaßt 1670 Basenpaare (-1665 bis +5) oberhalb des Firefly-Luziferasegens, der kürzere Klon p2XEB war 251 Basenpaare lang (-211 bis +40). pGL3B umfaßt somit den ganzen hTERT-Promotor und weite Teile upstream, denen noch keine Funktion zugeordnet werden konnte, während das kürzere p2XEB-Konstrukt den bisher angenommenen Minimalpromotor, jedoch dazu noch Teile des ersten Exons enthält. Beide Konstrukte beinhalten damit mehrere Bindungsstellen für SP1 und MAZ-Proteine, die oft kooperativ bei Promotoren wirken. Außerdem befinden sich im hTERT-Promotor eine typische E-Box (c-Ets-2), die eine Induktion des Promotors mittels c-myc ermöglicht. Im p2XEB-Konstrukt befindet sich im ersten Exon ebenfalls eine derartige E-Box, die einen Einfluß von c-myc noch verstärken könnte (Horikawa et al., 1999). Die gleiche Basenabfolge ist darüberhinaus noch eine Zielsequenz für RBP-Jk.

### 3.5.3 Herstellung der Zellysate

Die zu untersuchenden Zellen wurden in 15 ml-Falcon-Röhrchen 10 min bei 1500 rpm abzentrifugiert (nicht-adhärente Zellen), einmal mit PBS-Puffer gewaschen und mittels erneuter Zentrifugation wieder pelletiert, oder - bei adhärenen Zellen - das Medium abgekippt und die Zellen in der Zellkulturflasche mit PBS-Puffer gewaschen. Der PBS-Puffer wurde sorgfältig entfernt und die angegebene Menge PLB-Reagenz auf die Zellen gegeben. Dies waren pro Zellkulturschale 1 ml PLB-Puffer. Die adhärenen HeLa- und Fibroblastenzellen wurden mit einem Zellschaber von der Schale abgelöst und wie alle übrigen durch mehrmaliges auf- und ab-Pipettieren homogenisiert. Entweder wurde das Zellysate sofort für die Messungen weiterverwendet oder bei  $-80^{\circ}\text{C}$  bis zum späteren Gebrauch weggefroren.

### 3.5.4 Durchführung der Messungen

In Sarstedt-Meßröhrchen wurden 100  $\mu\text{l}$  LAR II-Puffer in einem Luminometerröhrchen (Sarstedt Nr. 55.478) vorgelegt. Das Luminometer (Berthold, Lumat LB 9501) wurde auf zehnekundenlange Messung programmiert. Es wurden 20  $\mu\text{l}$  Zellysate zum Puffer gegeben und mittels auf- und abpipettieren vermischt. Das Meßröhrchen wurde in das Luminometer eingesetzt und die Messung gestartet. Sofort nach erfolgter Firefly-Luciferasemessung wurden zu dem Ansatz 100  $\mu\text{l}$  Stop&Glo-Reagenz gegeben, ebenfalls durch auf- und abpipettieren vermischt, die Probe wiederum in das Luminometer gegeben und erneut gemessen. Die daraus ermittelten Werte der Firefly- und Renilla-Lumineszenz wurden miteinander in Relation gebracht, wobei die Firefly-Lichtemission als Kontrollwert diente.

## 3.6 PCR und Sequenzierungen für die EBV-Promotor-Studien

### 3.6.1 rep\*/vIL-10p-Region

Für die Sequenzierung der rep\*/vIL-10p-Region wurde die genomische DNA einer PCR unterworfen. Dazu wurden 50 ng DNA verwendet. Der PCR-Standardansatz bestand aus 2,5  $\mu\text{l}$  10x-Puffer (Puffer II; Perkin Elmer), 1  $\mu\text{l}$  Primer 1 (30 nM), 1  $\mu\text{l}$  Primer 2 (30 nM), 1 U Taq-Polymerase (Perkin Elmer). Dieses Gemisch wurde mit  $\text{H}_2\text{O}$  bidest auf ein Volumen von 25  $\mu\text{l}$  gebracht und bis zur weiteren Verwendung im Cycler auf Eis gestellt.

---

---

Die Standardeinstellung des PCR-Cyclers (MJ Research, PTC-200 Peltier Thermal Cycler) lautete:

Schritt 1: 3 min 95°C

Schritt 2: 30 sec 94°C

Schritt 3: 30 sec 52°C

Schritt 4: 50 sec 72°C

35-malige Wiederholung von Schritt 2-4, danach Kühlung der Proben bis zur weiteren Verwendung auf 4°C.

Primer:

Primer 1: 5'-TGGGTTTTTGGGAGGTATATG-3' (9244-9264)

Primer 2: 5'-CCTAATTTTCAACCTATAACATAACTTC-3' (9957-9930)

Beide Stränge der PCR-Produkte von allen 5 Zelllinien wurden auf einem ABI 377 DNA Sequenzersystem mit Dye-gelabelten ddNTPs sequenziert.

### 3.6.2 Herstellung der Kontrollsequenzen für OriLyt, Cp, Rp, Zp, LMPp, Qp

Primer

**OriLyt:**

Primer 1: 5'-GGTAGGATTCAGCTAGGTTCCCTACT-3' (53176-53200)

Primer 2: 5'-TGGTGCTTCCTAAAGGCGGGGCTC-3' (53657-53680)

**C-Promotor:**

Primer 1: 5'-CTTGCAGGGCAGACGG-3' (10595-10614)

Primer 2: 5'-GGTGCCTTGTCTCTATGCCATC-3' (11342-11364)

**R-Promotor:**

Primer 1: 5'-CTGCGTCTGTTTGTGTAGTGAGGTG-3' (10126-10650)

Primer 2: 5'-CAATAACAACAACGCGCCCCAGAAGCTCT-3' (107165-107193)

**Z-Promotor:**

Primer 1: 5'-GTTTGGGTCCATCATCTTCAGCAAAG-3' (103140-103166)

Primer 2: 5'-GCAGTAACCCCCGAGGCAAGTCATC-3' (103674-103697)

---

**LMP1-Promotor:**

Primer 1: 5'-AGAGGAGGAGAAGGAGAGCAAGG-3' (169375-169397)

Primer 2: 5'-CAATCGGGAGAATCGGCGGAGTGG-3' (169943-169966)

**Q-Promotor:**

Primer 1: 5'-GGCGAAGCTGGCTCACGAAG-3' (62145-62165)

Primer 2: 5'-CCCCAAACATACACCGTGCGAAAG-3' (62534-62548)

Für die Sequenzierung dieser Regionen wurde die genomische DNA einer PCR unterworfen. Dazu wurden 50 ng DNA verwendet. Der PCR-Standardansatz bestand aus 2,5 µl 10x-Puffer (Puffer II; Perkin Elmer), 1 µl Primer 1 (30 nM), 1 µl Primer 2 (30 nM), 1 U Taq-Polymerase (Perkin Elmer). Dieses Gemisch wurde mit H<sub>2</sub>O bidest auf ein Volumen von 25 µl gebracht und bis zur weiteren Verwendung im Cyclor auf Eis gestellt. Die Standardeinstellung des PCR-Cyclors (MJ Research, PTC-200 Peltier Thermal Cyclor) lautete:

Schritt 1: 3 min 95°C

Schritt 2: 30 sec 94°C

Schritt 3: 30 sec 52°C

Schritt 4: 50 sec 72°C

35-malige Wiederholung von Schritt 2-4, danach Kühlung der Proben bis zur weiteren Verwendung auf 4°C.

Beide Stränge der PCR-Produkte von allen 5 Zelllinien wurden auf einem ABI 377 DNA Sequenzersystem mit Dye-gelabelten ddNTPs sequenziert.

### **3.7 DMS *in vivo* footprinting**

Die Bindungsstelle eines Proteins auf der DNA kann durch *footprint*-Techniken ermittelt werden.

Für die Footprint-Versuche wurden 10<sup>7</sup> in der exponentiellen Phase befindliche Zellen geerntet, mit PBS-Puffer gewaschen, in 1 ml PBS resuspendiert und für 1 min bei RT mit 5 µl Dimethylsulfat inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 5 ml DMS Stop-Puffer beendet. Die Zellen wurden ein zweites mal in der Stop-Lösung und danach zweimal mit PBS gewaschen und die genomische DNA gewonnen.

Dazu wurde 1 ml jedes Ansatzes mit 10 ml Lyse-Puffer versetzt, und bei 37°C über Nacht inkubiert. Nach 10 minütiger Eiskühlung wurden 4 ml gesättigter NaCl-Lösung

zugegeben. Die Proben wurden wiederum für 5 min auf Eis gestellt und dann bei RT für 15 min und 2300 g pelletiert. Die Überstände wurden in ein 50 ml-Falcon-Tube überführt und mit 100 µl RNase A (10 mg/ml) versetzt. Nach einer weiteren Inkubation von 15 min bei 37°C wurde die DNA mit Ethanol gefällt und mit 5 ml 70% Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde in je 250 µl Wasser aufgenommen und die DNA-Konzentration photometrisch bestimmt. Die DNA-Konzentration wurde auf eine Endkonzentration von 100 ng/µl eingestellt.

DMS-Stop-Puffer:	1,5 M	NaAc (pH 7)
	1 M	β-Mercaptoethanol
	250 µg/ml	Hefe-tRNA
Lyse-Puffer:	50 mM	Tris/HCl (pH 8)
	20 mM	EDTA (pH 8)
	600 µg/ml	Proteinase K
	2 % (w/v)	SDS

### 3.7.1 G-Sequenzierung nach Maxam & Gilbert (1980)

200 µl Lösung der genomischen DNA wurden für 1 min bei RT mit 1 µl DMS inkubiert. Auf Eis wurden 50 µl kalter DMS-Stop-Puffer (s.o.) zugesetzt. Die DNA wurde mit 750 µl Ethanol (100%) gefällt, abzentrifugiert und das Pellet zwei mal mit 700 µl 75% Ethanol gewaschen. Am Ende wurde das Pellet in 90 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen. Diese wurden mit 10 µl Piperidin (10 M) versetzt. Die Inkubation erfolgte für 30 min bei 90°C. Dabei wurden die Reaktionsgefäße mit mehreren Schichten Teflonband abgedichtet und die Deckel mit Bleigewichten beschwert, um ein Austreten der Dämpfe zu verhindern und die Reaktionsbedingungen konstant zu halten. Die Ansätze wurden auf Eis gestellt und anschließend im Vakuum getrocknet. Es erfolgte eine zweimalige Aufnahme in Wasser mit erneuter Trocknung, um das Piperidin völlig zu entfernen. Abschließend wurde die DNA in 40 µl Wasser aufgenommen und photometrisch die Konzentration bestimmt.

### 3.7.2 LM-PCR

Um die Footprints sichtbar zu machen, wurde die DNA einer "ligation-mediated PCR" unterworfen (Mueller & Wold, 1989; Garrity & Wold, 1992), modifiziert nach Niller et al. 1995.

Dazu wurden pro Ansatz 3 µl Vent-Puffer (10x, New England Biolabs), 0,72 µl einer äquimolaren Mischung aus dATP, dCTP, dGTP und dTTP (je 10 mM), 1 µl Primer 1 (0,3 pmol/µl) und 2 µg piperidinespaltene DNA mit Wasser auf ein Volumen von 29,5 µl aufgefüllt und 0,5 µl Vent-(exo-) DNA-Polymerase (1U; New England Biolabs) zugegeben. Die Primer-Extension-1-Bedingungen waren 5 min 94°C, 30 min 60°C und 10 min 72°C. Für die Ligation des Standardlinkers wurde der Ansatz auf Eis mit 5 µl PCR-Linker-Mix, 2 µl Ligationspuffer (Boehringer Mannheim), 1 µl T4-DNA-Ligase (5U, Boehringer Mannheim) und 12 µl Wasser gemischt. Nach einer Übernachtinkubation bei 4°C wurde der Ansatz mit Wasser auf 250 µl erweitert, die DNA mit Ethanol präzipitiert, einmal mit 75% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 82 µl Wasser aufgenommen.

Dazu wurden 10 µl Vent-Puffer (s.o.), 2,4 µl einer äquimolaren Mischung aus dCTP, dATP, dGTP und dTTP (je 10 µM) 2 µl Primer 2 (5 pmol/µl), 2 µl Primer 7 (5 pmol/µl) und 0,5 µl vent-(exo-) DNA-Polymerase (2 U/µl) gegeben. Die PCR wurde in 20 Zyklen bei 1 min 94°C, 1,5 min 60°C und 3 min 72°C durchgeführt.

Die radioaktive Markierung des Primers 3 (5 pmol/µl) wurde mit 3 µl PNK-Puffer (10x), 5 µl [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP, 20 µl Wasser und 1 µl PNK (10 U/µl) für 1 h bei 37°C durchgeführt. Nach einer Hitzeinaktivierung der Kinase bei 10°C für 10 min wurden die freien Nukleotide über eine Spin-Column (BioRad) abgetrennt. Der gesamte Ansatz wurde für die Primer Extension 2 eingesetzt.

Für die radioaktive Markierung der DNA-Fragmente wurden die Ansätze auf Eis transferiert und 5 pmol der radioaktiv markierten Primer sowie 10 µl Vent-Puffer (10x), 2,5 nmol aller dNTPs und 0,5 Units der Vent-(exo-)DNA-Polymerase zugegeben. Die Ansätze wurden für 90 sec auf 94°C erhitzt und dann die PCR-Bedingungen für 8 Zyklen auf 2 min 94°C, 2 min 62°C und 5 min 72°C mit einem Schlußlauf von 5 min bei 72°C eingestellt.

Zu jedem PCR-Ansatz wurden 100 µl Chloroform pipettiert, gevortext, abzentrifugiert und die wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Sie wurde mit 200 µl Wasser und 200 µl Phenol versetzt, geschüttelt und kurz abzentrifugiert. Wiederum wurde die wässrige Phase in ein neues Gefäß überführt, 300 µl Chloroform dazugegeben, geschüttelt und kurz abzentrifugiert, die wässrige Phase erneut in ein neues Gefäß pipettiert. Die DNA wurde mit 100% Ethanol gefällt, mit 75% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 10 µl Formamid-Auftragungspuffer resuspendiert. Dieses Gemisch wurde 3 min auf 95°C erhitzt, kurz auf Eis gestellt und auf ein 6%iges Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Die Laufdauer betrug etwa 2 h bei 1500 V. Anschließend wurde das Gel auf Whatman-Papier übertragen und im Vakuumtrockner bei 70°C etwa 1 h lang getrocknet.

Es wurde ein Röntgenfilm (Kodak) aufgelegt und in einer Kassette mit Verstärkerfolie über Nacht bei  $-80^{\circ}\text{C}$  exponiert.

Formamid-Auftragspuffer:	10 mM	EDTA, pH 8,0
	1 mg/ml	Xylencyanolblau
	1 mg/ml	Bromphenolblau
	80%	Formamid
Polyacrylamidgel (6%):	46 g	Urea
	10 ml	TBE (10x)
	15 ml	Polyacrylamid (19:1; 40%)
	32 ml	H <sub>2</sub> O
	300 $\mu\text{l}$	APS (10%)
	70 $\mu\text{l}$	TEMED
TBE (10x):	54 g	Tris
	27.5 g	Borsäure
	20 ml	EDTA (0,5 M, pH 8,0)
	ad 1 l mit H <sub>2</sub> O bidest	

### 3.8 Verwendete Computerprogramme

Molecular Analyst/ PC Molecular Imager PC Version 1.4 (Bio-Rad) (Auswertung der Luziferase-Messungen)

Generunner, Version 3.0 (Untersuchung von DNA auf Restriktionsenzymchnittstellen)

Blast-Search (DNA-Suche und -Vergleich mit Einträgen in die Genbank)

Medline (Literaturquellen)

Microsoft Office (Word; Exel)(Textverarbeitung und Tabellenkalkulation)

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Gewinnung der Gen-Expressionsplasmide

Für die späteren Aktivitätsstudien wurden die dafür erforderlichen Gen-Expressionsplasmide hergestellt. Dazu wurde die vollständige mittels RT-PCR gewonnene cDNA der viralen Gene LMP1, EBNA2 und LMP2A in den pRC-CMV-Vektor (Invitrogen) hinter einen CMV-Promotor gesetzt.

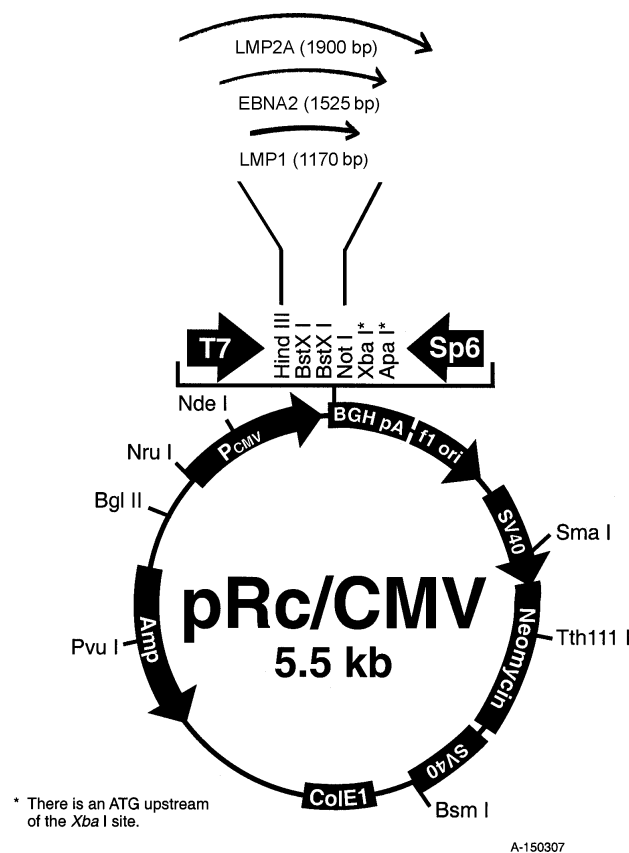


Abb. 3.1: Genexpressionskonstrukte im pRc/CMV-Vektor (Invitrogen)

Um die Telomerase-Aktivität, ihre RNA-Konzentration und die Aktivität ihres Promotors sowie eine eventuelle Einflußnahme viraler Latenzgenprodukte auf diese Parameter untersuchen zu können, wurden der TRAP-Assay, der RNase-Protection-Assay und der Luciferase-Assay verwendet.

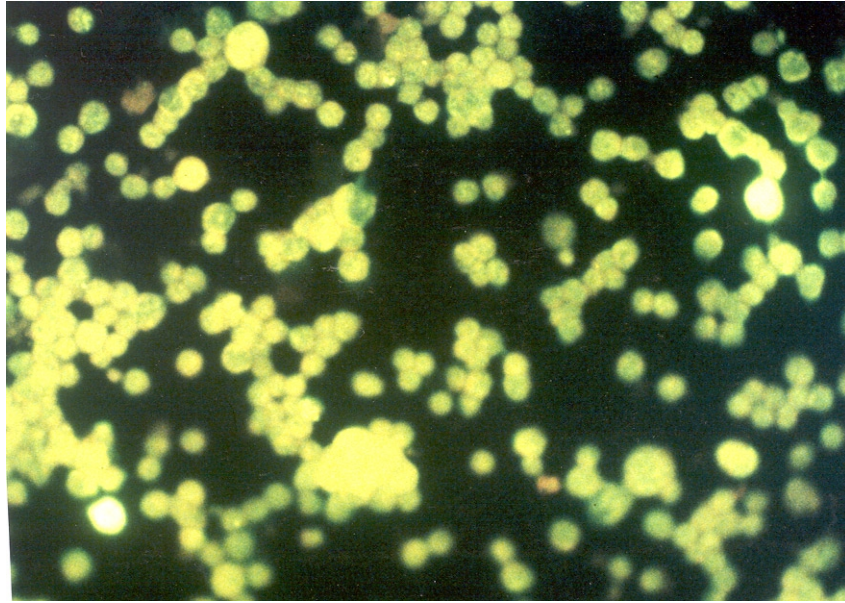
## 4.2 Optimierung des Transfektionsprotokolls

Transfektionsart/Zelllinien	HeLa	DG75	VH-Fib
<i>Elektroporation</i>	30%	90%	10%
<i>DEAE-Dextran</i>	10%	20%	<1%
<i>CaCl<sub>2</sub></i>	5%	10%	<1%
<i>Lipofectamin</i>	30%	25%	tot
<i>Superfect</i>	15%	20%	10%

**Tabelle 3.1: Transfektionsoptimierung für die verschiedenen Zellarten mit verschiedenen Transfektionsmethoden.**

Die Effektivität wurde mit einem GFP-Vektor gemessen und die Anzahl der grün leuchtenden Zellen ins Verhältnis zu der der nichtleuchtenden Zellen gesetzt.

Generell war die Zelllinie DG75 am besten zu transfizieren, mit weitem Abstand folgten die HeLa-Zellen. Erwartungsgemäß am schwierigsten zu transfizieren erwiesen sich die primären Vorhautfibroblasten. Die Methode der Elektroporation erwies sich als beste und konsistenteste für alle drei Zellarten. Der Nachteil, daß dafür wesentlich mehr Zellen und DNA benötigt wurden (ca. 10 Mio. Zellen bzw. 20 µg DNA pro Ansatz), da bei der Elektroporation durchschnittlich etwa die Hälfte der Zellen schwer geschädigt oder getötet werden, wurde durch die bessere Effizienz ausgeglichen. Obwohl die Ergebnisse mit Superfect (Qiagen) bei den Vorhautfibroblasten mit denen der Elektroporation gleichwertig waren, wurde die Elektroporation bevorzugt, da die Versuche alle mit dem gleichen Versuchsaufbau abgewickelt werden konnten. Das speziell für die Transfektion von primären Zellen entwickelte Lipofectamin (Life Technologies) tötete trotz Anwendung entsprechend den Angaben des Herstellers die Fibroblasten quantitativ ab.

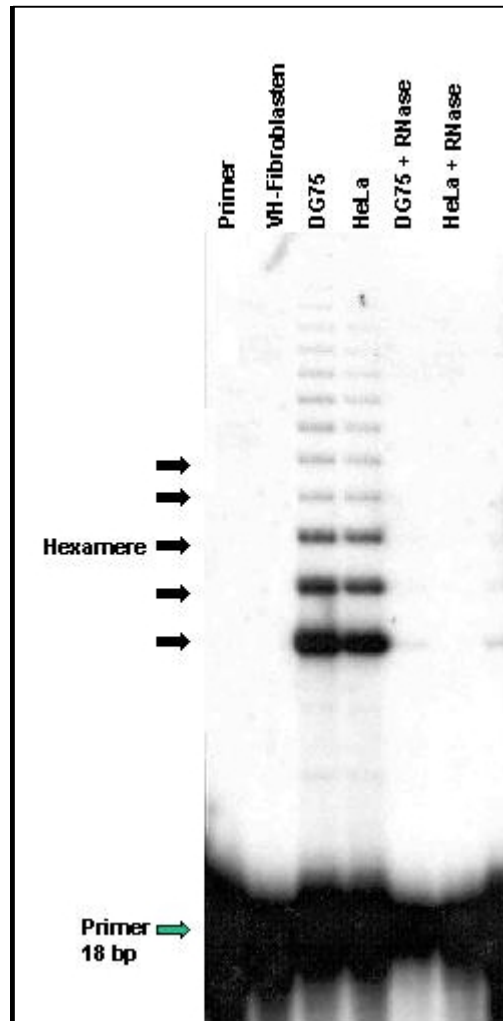


**Abb.3.2: Elektroporation: Mit EGFP-Expressionsvektor transfizierte DG 75-Zellen**

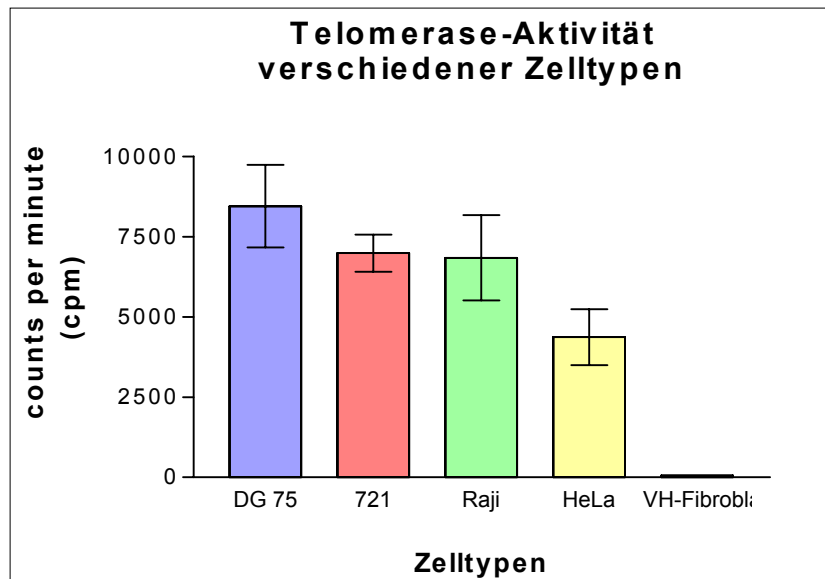
Die DG-75-Zellen wurden mit 20 µg Plasmid-DNA mittels Elektroporation transfiziert. Die Detektion erfolgte durch UV-Anregung ( $\lambda = 300 \text{ nm}$ ).

### 4.3 Telomeraseaktivitätsnachweis mittels TRAP-Assay

Zunächst wurde die Telomerase-Aktivität in mit Hilfe des Telomerase-Repeat-Amplification-Protokolls (TRAP-Assay)(Kim et al., 1994, modifiziert nach Broccoli), in verschiedenen, unbehandelten Zelltypen gemessen. Bei der Visualisierung der Telomeraseaktivität mittels TRAP-Assay entsteht bei einer positiven Reaktion ein typisches Leitermuster, bestehend aus den Telomer-Hexameren, die von der Telomerase an den artifiziellen Primer angeheftet werden. Die unteren Sprossen dieser Leiter sind am deutlichsten ausgeprägt, da kürzere DNA-Abschnitte bei der PCR bevorzugt werden. Deutlich ist die RNA-Abhängigkeit der Telomerase-Aktivität zu erkennen. Bei Versuchsansätzen, denen RNase zugesetzt wurde, kommt diese völlig zum Erliegen.



**Abb. 3.3: Telomerase-Aktivität in verschiedenen Zellen, nachgewiesen mit dem Telomerase-Repeat-Amplification-Protokoll nach Kim et al., 1994, modifiziert nach Broccoli.**  
Die Telomerase-Aktivität wurde mittels des Telomerase-Aktivitätsassays (TRAP-Assay) mit 2 µg Gesamtproteinextrakt bestimmt. Die Pfeile markieren die von der Telomerase an den künstlichen Primer angefügten Telomer-Hexamere. Der grüne Pfeil zeigt den radioaktiv markierten freien Primer.

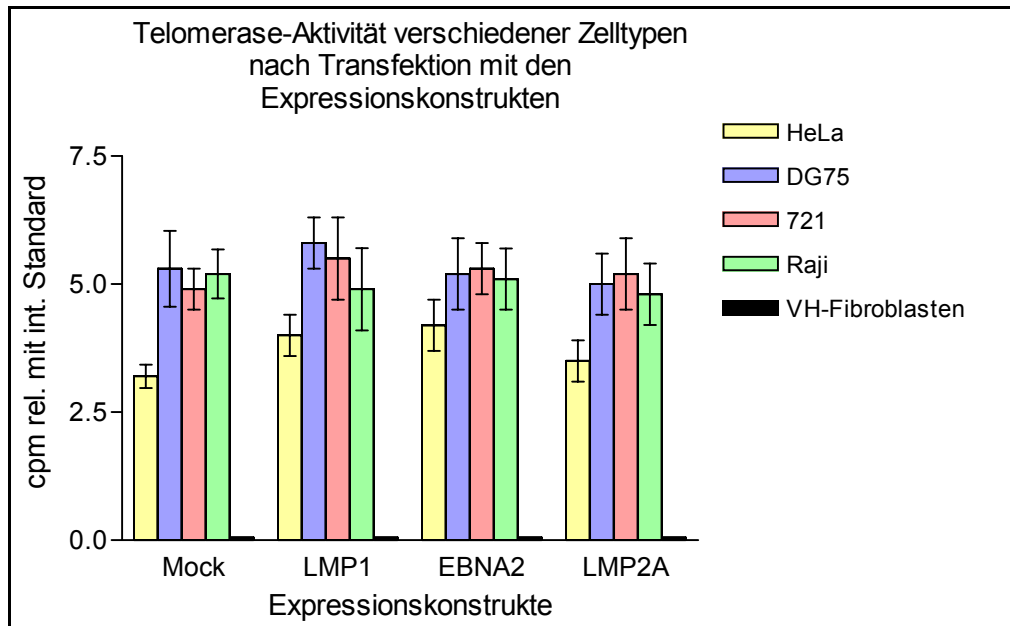


**Abb.3.4: Telomerase-Aktivität bei unbehandelten Zellen verschiedener Zelltypen**

Die Abb. zeigt die in verschiedenen Zelltypen mittels des TRAP-Assays gemessene Telomerase-Aktivität. Die Telomerase-Aktivität wird in counts per minute (cpm) angegeben. Zur Messung wurden 2 µg Gesamtproteinextrakt eingesetzt.  $n = 4 (\pm \text{SEM})$ .

Wie erwartet zeigt dabei die Primärzellkultur aus Vorhaut-Fibroblasten praktisch keinerlei Aktivität, während sie in der Cervix-Karzinom-Zelllinie HeLa sowie in den Burkitt's-Lymphom-Zelllinien DG75 und 721 die Telomerase stark aktiv ist. Dies ist übereinstimmend mit der bisher veröffentlichten Literatur, daß somatische, nichtentartete Zellen keinerlei aktive Telomerase enthalten, diese allerdings in entarteten Tumorzellen sehr aktiv sein kann.

Die verschiedenen Zelltypen wurden nun mit unterschiedlichen EBV-Genexpressionsvektoren transfiziert. Im wesentlichen handelte es sich dabei um hinter einen CMV-Promotor geschaltete cDNA-Konstrukte der latenten viralen Gene LMP1, EBNA2, LMP2a. Als Negativkontrolle wurde ein EGFP-Expressionsvektor transfiziert. Damit konnte gleichzeitig auch die Transfektionseffizienz kontrolliert werden. Die Transfektion wurde mittels Elektroporation durchgeführt, die Zellen nach 48 Stunden im Brutschrank geerntet, der Proteinextraktgewinnung unterzogen und je 2 µg Proteinextrakt in die TRAP-Reaktion eingebracht. Die daraus abgeleiteten Aktivitäten wurden mit einem internen PCR-Standard standardisiert.



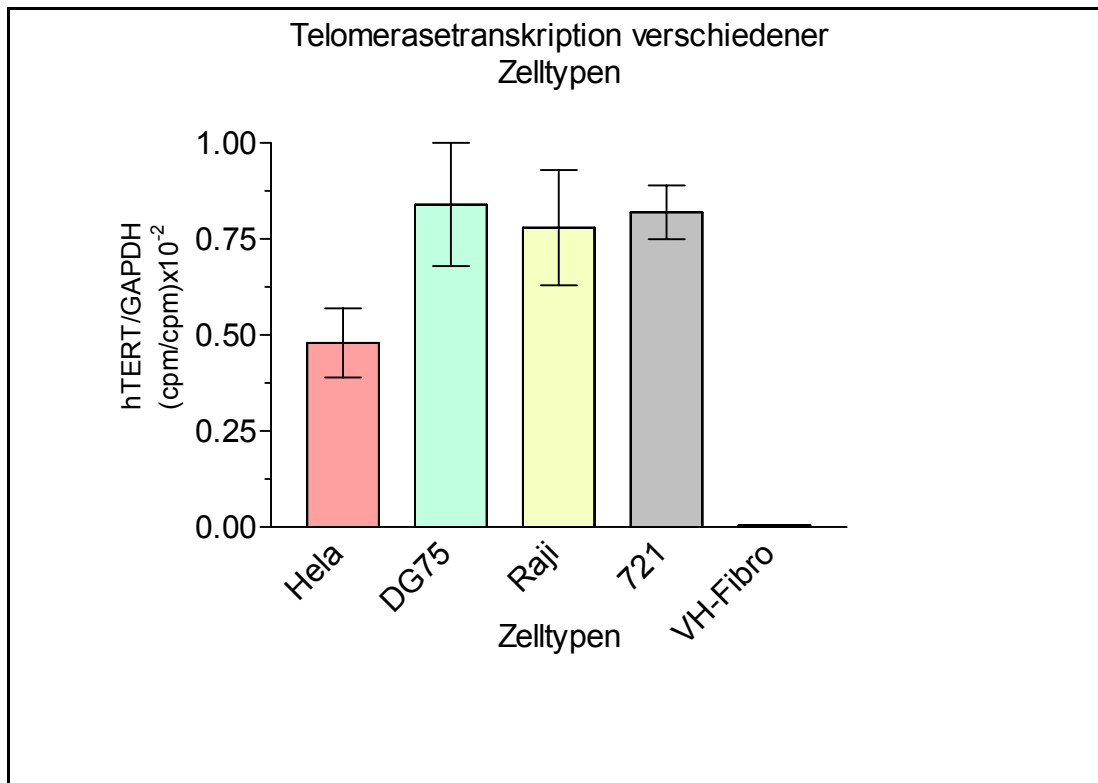
**Abb. 3.5: Telomeraseaktivität verschiedener Zelllinien, die mit verschiedenen viralen Protein-Expressionsvektoren transfiziert wurden: Reihe 1: HeLa; Reihe 2: DG75; Reihe 3: 721; Reihe 4: Fibroblasten**

Die Abb. zeigt die in verschiedenen transfizierten Zelltypen mittels des TRAP-Assays gemessene Telomerase-Aktivität. Die Telomerase-Aktivität wurde relativiert durch einen internen PCR-Standard in counts per minute (cpm) angegeben. Zur Messung wurden 2 µg Gesamtproteinextrakt eingesetzt.  $n = 4$  ( $\pm$  SEM).

Eine signifikante Änderung der Telomeraseaktivitäten durch die Transfektion der viralen Gene konnte nicht festgestellt werden.

## 4.4 Telomerase-Transkriptionsmessung mittels RNase-Protection-Assay

Um eine eventuelle Induktion oder Erhöhung der Telomerase-Transkription durch virale Latenzgene nachzuweisen, wurden in verschiedene Zelltypen Genexpressionskonstrukte viraler Latenzgene transfiziert und mittels RNase-Protection-Assay die RNA-Menge der Telomerase und anderer zellulärer Gene gemessen.

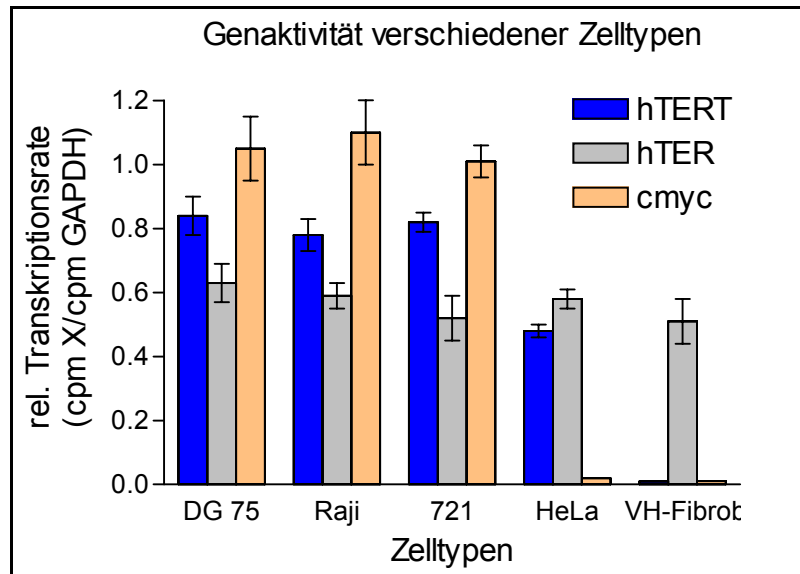


**Abb. 3.6: Messung der hTERT-mRNA-Menge in verschiedenen Zelltypen**

Gemessen wurden im Protection-Assay 10 µg Gesamt-RNA (hTERT) bzw. 2 µg Gesamt-RNA (GAPDH); n=3 (± SEM).

Bezüglich der Telomerase wurde die Transkription der beiden Hauptkomponenten, des Haupt-Proteinanteils hTERT und des Telomerase-RNA-Anteils hTER bestimmt. So konnte in allen untersuchten Zelllinien eine deutliche Transkription der Telomerase-Hauptproteinkomponente hTERT-mRNA nachgewiesen werden, während in den Vorhautfibroblasten keinerlei Genaktivität gefunden wurde.

Da bekannt ist, daß EBNA2 c-myc hochreguliert und von c-myc angenommen wird, daß es seinerseits die Telomerase aktivieren kann, wurde auch der Gehalt von c-myc gemessen. Als interner Standard diente die RNA-Konzentration des Haushaltgens Glyzerinaldehydphosphatase-Dehydrogenase (GAPDH).



**Abb. 3.7: RNA-Menge der hTERT-, hTER – und c-myc-Gene in verschiedenen Zellen**

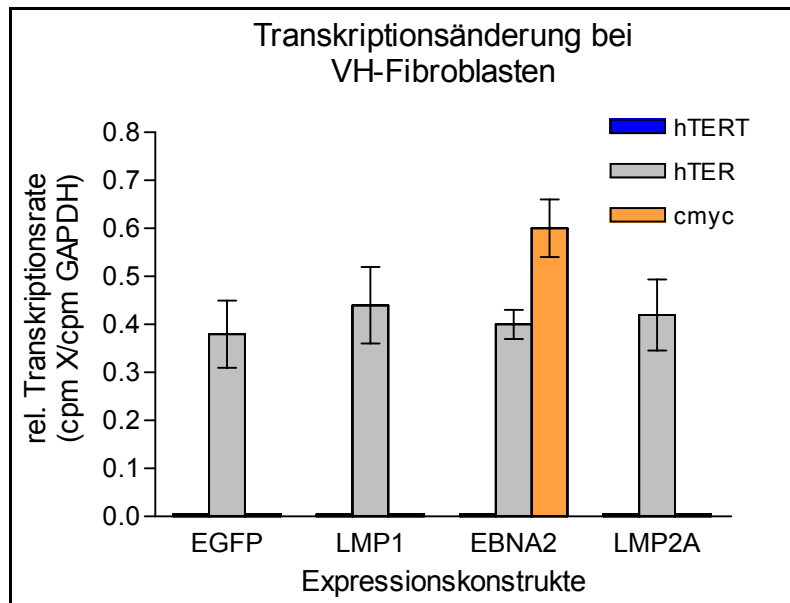
Gemessen wurden im Protection-Assay 10 µg Gesamt-RNA (hTERT, hTER) bzw. 2 µg Gesamt-RNA (GAPDH, c-myc); n=3 (± SEM).

Im Vorversuch wurden unbehandelte Zellen auf ihre jeweiligen Basisaktivitäten untersucht. Dazu wurden die Zellen in RPMI-Medium zur log-Phase kultiviert, in Guanidiniumthiocyanat-Puffer lysiert und ihre Gesamt-RNA gewonnen. Diese wurde einem RNase-Protection-Assay (RPA) unterworfen und dabei mit hTERT-, hTER-, c-myc- und GAPDH-Antisense-RNA-Sonden die fraglichen mRNAs detektiert.

Während die hTER-RNA-Konzentration bei allen Zelltypen in etwa gleich hoch war, konnten bei der c-myc-mRNA und der hTERT-mRNA innerhalb der Zelltypen erhebliche Unterschiede festgestellt werden. Bei den Fibroblasten war eine Transkription des hTERT-Gens praktisch nicht zu detektieren, bei den untersuchten Zelllinien dagegen war eine Transkription leicht zu erkennen. Das Vorkommen der c-myc-mRNA beschränkt sich auf die Burkitt's-Lymphomzellen wie DG75 und Raji sowie auf die LCL 721. Bei der Zervikalkarzinomzelllinie HeLa sowie bei den primären Vorhautfibroblasten war eine Detektion nicht möglich.

Im nachfolgenden Experiment wurden wie bereits bei der Vorbereitung der TRAP-Assay-Reihe die Zellen mit den Expressionsvektoren für die viralen Gene LMP1, EBNA2 und LMP2A und wiederum als Negativ- und Transfektionseffizienzkontrolle ein EGFP-Expressionsvektor transfiziert, nach 48 Stunden geerntet und wiederum die Gesamt-RNA gewonnen. Die Vorgehensweise des RPA war die gleiche wie im Einführungsexperiment. Dabei konnten folgende Ergebnisse erzielt werden:

#### 4.4.1 Änderung der Genaktivität bei Fibroblasten



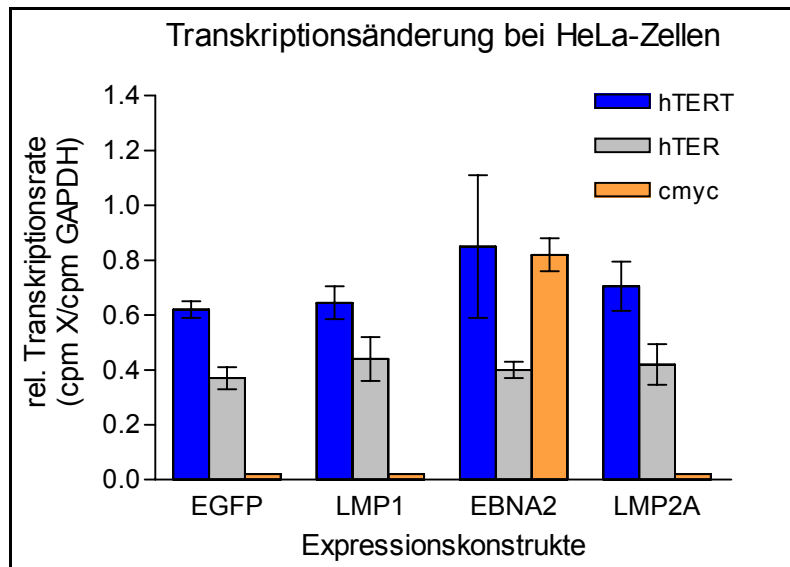
**Abb. 3.8: Änderung der Genaktivität bei Vorhaut-Fibroblasten**

Gemessen wurden im Protection-Assay 10 µg Gesamt-RNA (hTERT, hTER, c-myc) bzw. 2 µg Gesamt-RNA (GAPDH); n=3 (± SEM).

Bei den Fibroblasten ist – wie bereits im Vorversuch gezeigt wurde – ein Grundspiegel an hTER-RNA vorhanden, der sich durch Transfektion der viralen Genkonstrukte nicht verändert. hTERT-mRNA läßt sich praktisch nicht nachweisen, eine Induktion des Telomerase-Protein-Gens kann auch nach Transfektion nicht erzielt werden.

Dagegen läßt sich die cmyc-Transkription durch das EBNA2-Konstrukt anschalten. Bei den anderen Expressionskonstrukten kann dieser Effekt nicht erzielt werden. Ein direkter Einfluß der EBNA2- oder c-myc-Expression auf die Telomerasegene besteht offenbar nicht.

#### 4.4.2 Änderung der Genaktivität bei HeLa-Zellen

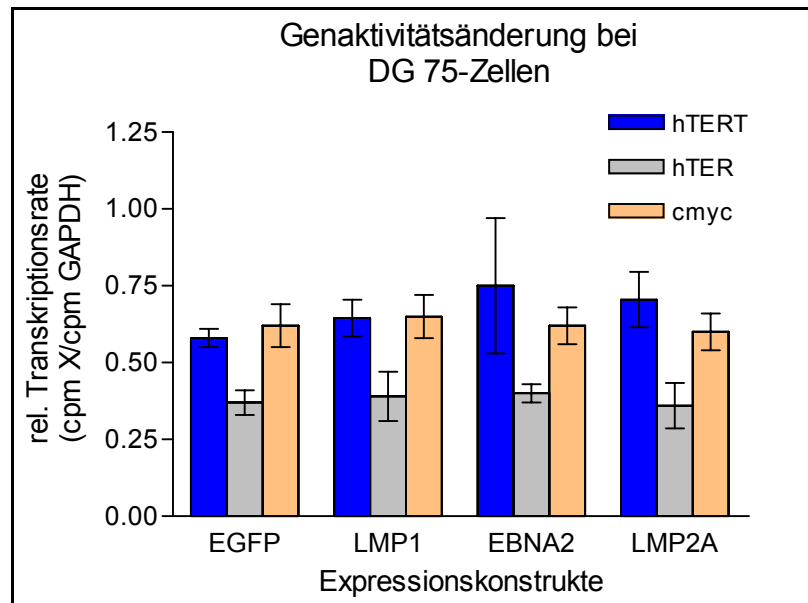


**Abb. 3.9: Änderung der Genaktivität bei HeLa-Zellen**

Gemessen wurden im Protection-Assay 10 µg Gesamt-RNA (hTERT, hTER, c-myc) bzw. 2 µg Gesamt-RNA (GAPDH); n=3 (± SEM).

Auch bei der Zervikalkarzinom-Zelllinie HeLa konnte durch die Transfektion mit EBNA2 eine signifikante Hochregulierung des cmyc-Gens erzielt werden. Außerdem konnte sowohl ein Grundpegel an hTERT-mRNA als auch an hTER-RNA gemessen werden. Durch Kotransfektion der viralen Genexpressionskonstrukte konnte bei den beiden Telomerase-Genen jedoch keine signifikante Induktion festgestellt werden.

#### 4.4.3 Änderung der Genaktivität bei DG75-Zellen

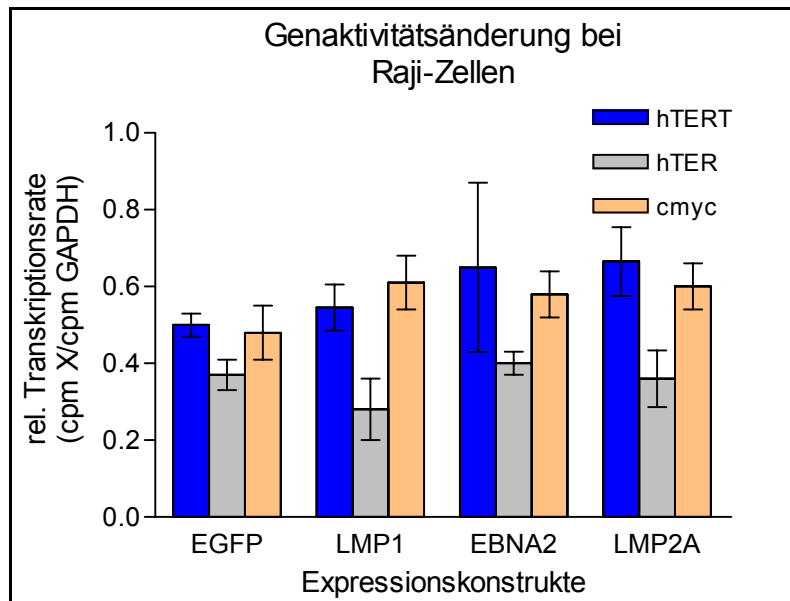


**Abb. 3.10: Änderung der Genaktivität bei DG75-Zellen**

Gemessen wurden im Protection-Assay 10  $\mu$ g Gesamt-RNA (hTERT, hTER) bzw. 2  $\mu$ g Gesamt-RNA (GAPDH, c-myc); n=3 ( $\pm$  SEM).

Bei der Burkitt's-Lymphomzelllinie DG 75 erkennt man neben der konstitutiven hTERT- und hTER-Expression auch einen ebenfalls konstitutiven c-myc-mRNA-Spiegel, hervorgerufen durch die Chromosomentranslokation des c-myc-Gens bei Burkitt's-Lymphomen. Die Höhe der Konzentration von hTER-RNA und hTERT-mRNA sowie der c-myc-mRNA blieb auf diesem hohen Niveau nach Transfektion der Expressionsvektoren in allen Meßreihen praktisch konstant. Eine zusätzliche Induktion von c-myc durch den EBNA2-Expressionsvektor fand offenbar nicht statt.

#### 4.4.4 Änderung der Genaktivität bei Raji-Zellen



**Abb. 3.11: Änderung der Genaktivität bei Raji-Zellen**

Gemessen wurden im Protection-Assay 10 µg Gesamt-RNA (hTERT, hTER) bzw. 2 µg Gesamt-RNA (GAPDH, c-myc); n=3 (± SEM).

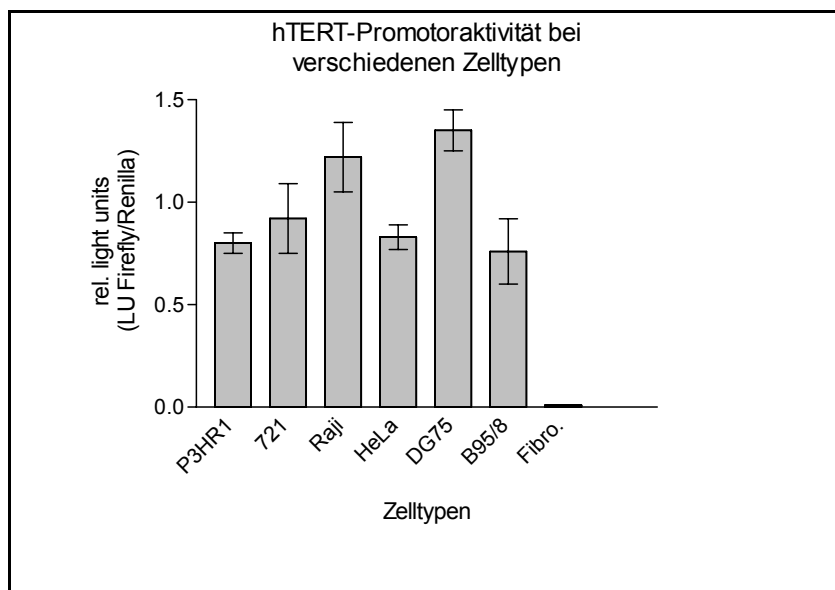
Das Expressionsmuster der EBV-positiven Burkitt's-Lymphomzelllinie Raji entspricht dem der EBV-negativen Burkitt's-Lymphom-Zelllinie DG 75. Auch hier waren die deutlich detektierbaren Transkriptionsspiegel der Telomerasegene und des c-myc-Gens nicht weiter induzierbar.

## 4.5 Telomerase-Promotor-Studien mittels Luziferase-Assay

### 4.5.1 hTERT-Promotor-Aktivität in verschiedenen Zelltypen

Zunächst wurde das längere pGL3B-TRTP-Promotorkonstrukt in verschiedene Zelltypen transfiziert, um zu erfahren, in welchen dieser Zellarten der Promotor Aktivitäten entfaltet und daraus abschätzen zu können, welche Zelltypen für die weiteren Versuche geeignet sind. Verwendet wurden dabei die Zelllinien B95-8, P3HR1, 721, Raji, HeLa und DG75 und als Primärzellen Vorhaut-Fibroblasten.

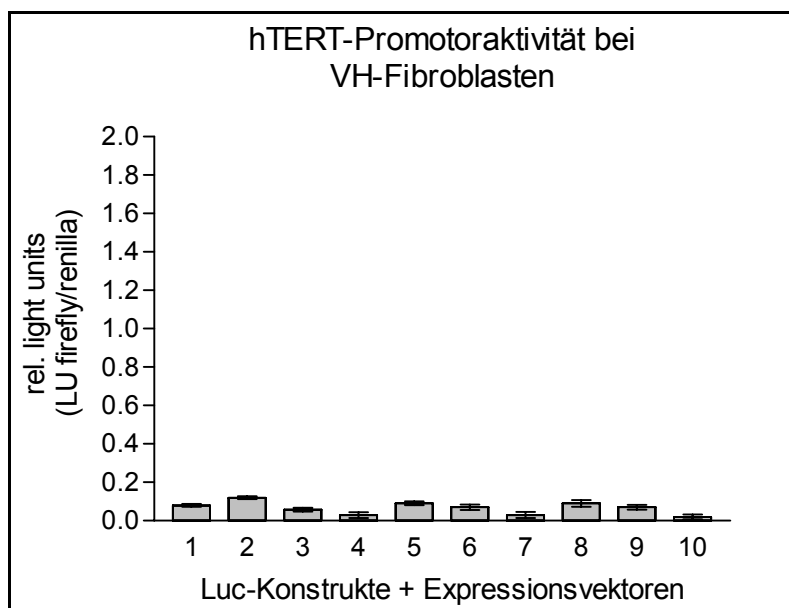
Dabei konnte eine deutliche Aktivität des Promotors in allen verwendeten Zelllinien nachgewiesen werden, am stärksten in den DG75- und Raji-Zellen, jedoch praktisch keine in den Vorhaut-Fibroblasten.



**Abb.3.12: Telomerase-Promotor-Aktivität verschiedener Zelllinien, gemessen mittels Luciferase-Assay**

Die relative Luciferase-Aktivität wurde ermittelt durch Messung des Promotokonstrukts, das mit dem internen Standard des pRK-TK-Vektors ins Verhältnis gesetzt wurde; n=3 ( $\pm$  SEM).

#### 4.5.2 Veränderung der Promotoraktivität bei Vorhaut-Fibroblasten



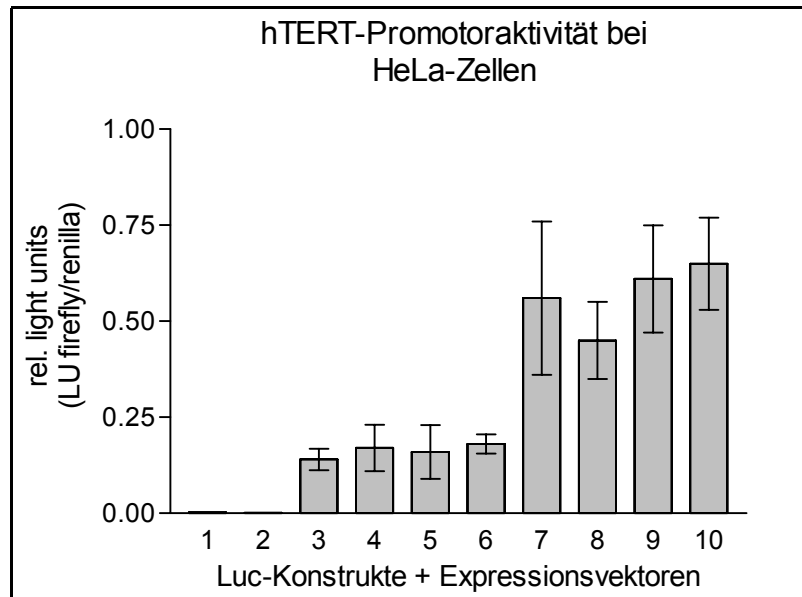
**Abb.3.13: Einfluß der zutransfizierten Expressionskonstrukte auf die Aktivität des hTERT-Promotors in Vorhaut-Fibroblasten: 1: EGFP; 2: pGL3; 3: pGL3B-TRTP; 4: LMP1 + pGL3B-TRTP; 5: EBNA2 + pGL3B-TRTP; 6: LMP2A+ pGL3B-TRTP; 7: p2XEB; 8: LMP1+ p2XEB; 9: EBNA2+ p2XEB; 10: LMP2A+ p2XEB**

Die relative Luciferase-Aktivität wurde ermittelt durch Messung des Promotokonstrukts, das mit dem internen Standard des pRK-TK-Vektors ins Verhältnis gesetzt wurde; n=3 ( $\pm$  SEM). Die Spuren 1 und 2 repräsentieren den Hintergrund.

Verglichen wurden hier jeweils die transfizierten Expressionskonstrukte mit den beiden Promotorkonstrukten. Negativkontrolle für die Expressionskonstrukte war neben den

Versuchen wie oben ein GFP-Konstrukt (Balken 1) auch der pGL3-Basic-Vektor (Balken 2). Außerdem wurde die Aktivität der Promotoren ohne kotransfizierte virale Expressionsproteinplasmide gemessen (Balken 3 und 7). Die Untersuchung zeigt, daß sich die Promotoraktivität durch Kotransfektion der viralen Expressionsplasmide nicht steigern läßt, die Werte bleiben im Rahmen des Hintergrundeffektes.

#### 4.5.3 Veränderung der Promotoraktivität bei HeLa-Zellen



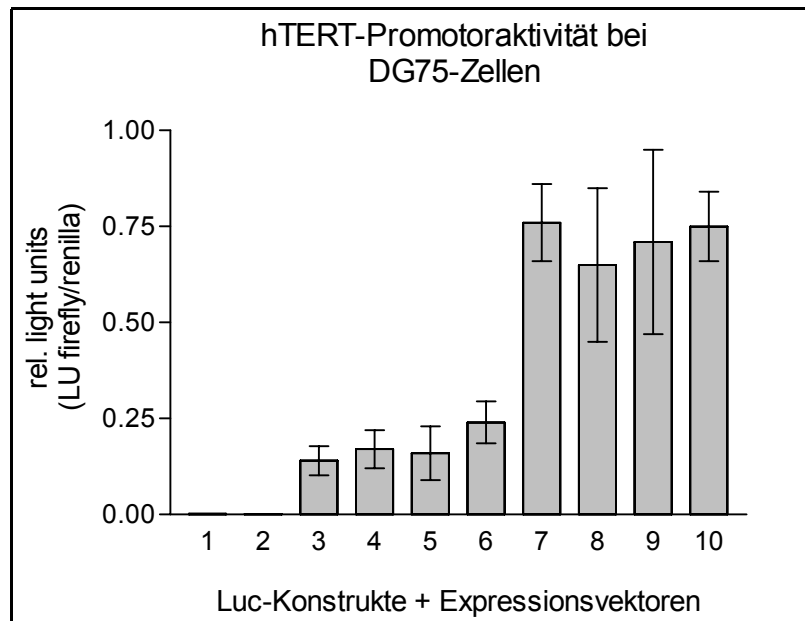
**Abb.3.14: Einfluß der zutransfizierten Expressionskonstrukte auf die Aktivität des hTERT-Promotors in HeLa-Zellen: 1: EGFP; 2: pGL3; 3: pGL3B-TRTP; 4: LMP1+ pGL3B-TRTP; 5: EBNA2+ pGL3B-TRTP; 6: LMP2A+ pGL3B-TRTP; 7: p2XEB; 8: LMP1+ p2XEB; 9: EBNA2+ p2XEB; 10: LMP2A+ p2XEB**

Die relative Luciferase-Aktivität wurde ermittelt durch Messung des Promotorkonstrukts, das mit dem internen Standard des pRK-TK-Vektors ins Verhältnis gesetzt wurde; n=3 ( $\pm$  SEM). Die Spuren 1 und 2 repräsentieren den Hintergrund.

Ein anderes Bild ergibt sich erwartungsgemäß in HeLa-Zellen: Während die beiden Negativkontrollen (1/2) im Verhältnis vernachlässigbar sind, ergibt sich bei Transfektion des Promotor-Luziferase-Konstruktes bei allen anderen Werten eine deutliche Promotoraktivität, die sich allerdings durch Kotransfektion der Expressionskonstrukte nicht verändern läßt. Auch bei dem Parallelexperiment mit den p2XEB-Promotorkonstrukten konnten prinzipielle Veränderungen nicht festgestellt werden, obwohl hier beim Promotorkonstrukt sowie bei allen drei Expressionskonstrukten eine im Vergleich zum längeren pGL3B-TRTP- Promotorkonstrukt und dessen Kotransfektanten (Balken 3-6) eine Aktivitätserhöhung um den Faktor 3 bis 4 festgestellt werden konnte.

#### 4.5.4 Veränderung der Promotoraktivität bei DG75-Zellen

Bei den DG75-Zellen ergibt sich ein ähnliches Bild wie bei der HeLa-Zelllinie:



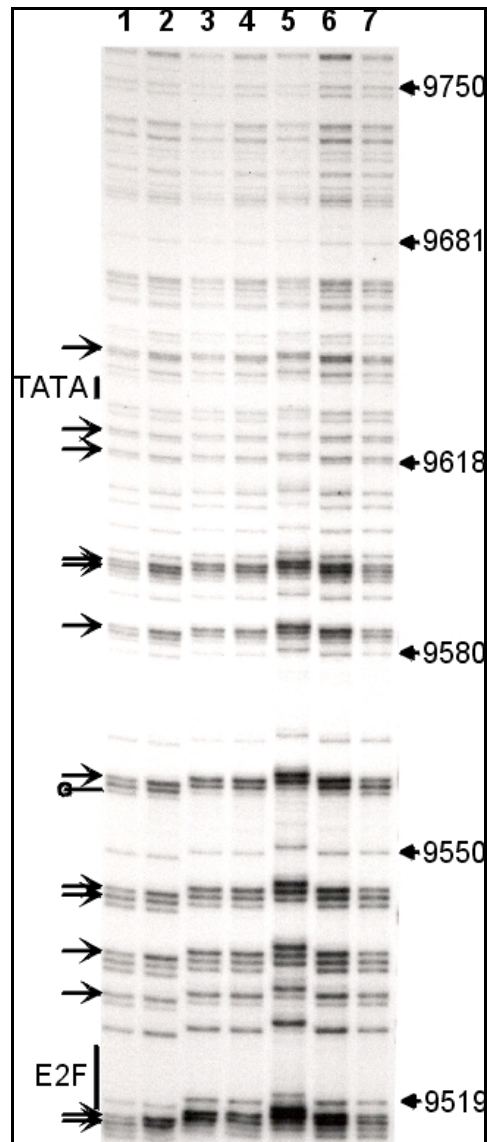
**Abb.3.15:** : Einfluß der zutransfizierten Expressionskonstrukte auf die Aktivität des hTERT-Promotors in DG 75 –Zellen: 1: EGFP; 2: pGL3; 3: pGL3B-TRTP; 4: LMP1+ pGL3B-TRTP; 5: EBNA2+ pGL3B-TRTP; 6: LMP2A+ pGL3B-TRTP; 7: p2XEB; 8: LMP1+ p2XEB; 9: EBNA2+ p2XEB; 10: LMP2A+ p2XEB

Die relative Luciferase-Aktivität wurde ermittelt durch Messung des Promotorkonstrukts, das mit dem internen Standard des pRK-TK-Vektors ins Verhältnis gesetzt wurde; n=3 ( $\pm$  SEM). Die Spuren 1 und 2 repräsentieren den Hintergrund.

Während die Negativkontrollen erwartungsgemäß an der Nachweisgrenze liegen, zeigen die übrigen Versuche eine deutliche Aktivität, wobei auch hier das Vollängenkonstrukt des Telomerase-Promotors ohne Exon-Anteil eine vergleichbar niedrigere Aktivität zeigt als das Promotorkonstrukt mit Exon-Anteil.

## 4.6 Footprintuntersuchung des rep\*/vIL-10p-Elements

Für die Analyse des rep\*/vIL-10-Elements wurden fünf Zelllinien genommen, die die beiden Latenztypen I und III repräsentieren. Dabei stehen Rael und Mutu BLI-CI216-Zellen für die Latenz des Typs I (Klein et al., 1972; Ernberg et al., 1989; Gregory et al., 1990; Minarovits et al., 1991), Raji, LCL 721 und die Mutu BLIII-CI99-Zellen für die Latenz des Typs III (Kavathas et al., 1990; Walls & Perricaudet, 1991; Little & Schildkraut, 1995).



**Abb.: 3.12: Genomischer Footprint des rep\*/vIL-10-Elements - unterer Strang**

Spur 1: G-Sequenz von LCL 721; Spuren 2-6: Footprints, Spur 2: LCL 721; Spur 3: Mutu III; Spur 4: Rael; Spur 5: Raji; Spur 6: Mutu I; Spur 7: G-Sequenzierung der Mutu I-DNA. Auf der linken Seite der Abbildung werden die footprints durch Pfeile (hypersensitive Basen) und Kreise (geschützte Basen) gekennzeichnet, mögliche Transkriptionselemente werden durch vertikale Balken angezeigt; auf der rechten Seite die Position der Nukleotide einiger G-Basen (nach Baer et al., 1984).

Die nur geringgradige *in vivo*-Protektion durch Proteinbedeckung der DNA legt nahe, daß das Element während der EBV-Latenz weder während des Latenztyps I noch III aktiv ist.

Alle analysierten Zelllinien zeigen die gleichen genomischen Footprint-Muster in dieser Region und es gibt keine signifikanten Hinweise auf sequenzspezifische Protein-DNA-Interaktionen. Die Identität der Proteine, die die leichten Footprints verursachen, ist noch ungeklärt.

---

## 5. Diskussion

### 5.1 EBV als Modellsystem für die Replikation

Die Replikation des Epstein-Barr-Virus kann als virales Modellsystem für die chromosomale DNA-Replikation in höheren Eukaryonten dienen (DePamphilis, 1988). In der Burkitt's-Lymphom-Zelllinie Raji persistiert das EBV mit einer stabilen Kopienanzahl von etwa 50 zirkulären Plasmiden in einem strikt latenten Status (Adams & Lindahl, 1975; Nonoyama & Pagano, 1972). Jedes dieser Plasmide wird genau einmal pro Zellzyklus in der Synthesephase mit Hilfe der zellulären Replikationsmaschinerie (Adams, 1987) repliziert und die Replikation in der Mitosephase dank des trans-aktiven Replikationsfaktors EBNA1 auf die Tochterzellen gleichmäßig verteilt. EBNA1 besitzt weder eine Helikase-, ATPase-Aktivität noch eine Gyrasefunktion (Harrison et al., 1994). EBNA1 stellt über eine Interaktion mit zellulären Faktoren die Verbindung zur Replikationsmaschinerie her, durch die die DNA-Replikation am oriP ihren Ursprung nehmen kann.

Wie durch *in vivo* footprints am DS-Element gezeigt wurde, binden in Abhängigkeit vom Zellzyklus neben dem viralen Protein EBNA1 zusätzliche Proteine an das DS-Element, namentlich an die Nonamersequenzen des DS-Elements (Niller et al., 1995). Da bei der Bindung des Nonamer-spezifischen Proteins eine *minor groove* bindende Aktivität beteiligt zu sein scheint (Büchner, 1995), wie sie für einige Replikationsproteine beschrieben ist (Dickinson & Kohwi-Shigematsu, 1995), besteht die Wahrscheinlichkeit, daß es sich dabei um ein Protein handelt, das zur Replikationsmaschinerie gehört. Darüberhinaus konnten den Nonameren freie Epstein-Barr virale DNA 5'-Enden zugeordnet werden (Niller et al., 1995), die wahrscheinlich Initiationspunkte der Replikation am DS-Element des oriP darstellen. Deshalb ist es denkbar, daß es einen Zusammenhang zwischen der Bindung des Nonamer-bindenden Proteins und der Initiation der DNA-Replikation gibt.

Die Nonamersequenzen sind homolog mit den Telomerrepeats menschlicher Telomere (Brown, 1989; Cross et al., 1989) und außer dort weder im EBV- noch im menschlichen Genom vorkommend. Die Bindung an die Nonamersequenzen sind spezifisch und EBNA1-unabhängig (Niller et al., 1995). Bei Experimenten mit EBV-Plasmiden, die mutierte Nonamersequenzen trugen, wurden diese nicht mehr stabil im Zellkern erhalten und gingen schneller verloren als die Wildtyp-Plasmide (Vogel et al., 1998, Koons et al., 2001). Es besteht dabei die Möglichkeit, daß die Plasmide mit den mutierten Nonameren nicht mehr repliziert wurden oder den Kontakt zu den Chromosomen nicht mehr herstellen konnten, die zur stabilen Persistenz der EBV-Plasmide im Zellkern notwendig ist.

---

## 5.2 Zellimmortalisierungswege anderer Viren

Die Expression viraler oder zellulärer Onkogene führt oft zu einem Zellzyklus-Arrest oder zur Apoptose, die beide zumindest teilweise vom Tumorsuppressor p53 und weiterer Zellzyklus-Kontrollstationen abhängen (Ko & Prives, 1996; Mowat, 1998). Das adenovirale E1A führt beispielsweise in primären Fibroblastenzellen zu einer Stabilisierung von p53 und zur Einleitung der Apoptose (Debbas & White, 1993; Lowe & Ruley, 1993). Eine Reihe von DNA-Viren, wie das SV40, das Adenovirus oder das Papillomavirus sind in der Lage, primäre Nagerfibroblasten zu immortalisieren. Dazu werden meist zwei Funktionen für die Immortalisierung benötigt: Die Suppression von p53 durch direkte Interaktion und die Hemmung von Rb. Das große T-Antigen von SV40, das sehr effektiv Nagerfibroblasten zu immortalisieren in der Lage ist, bindet beispielsweise an das pRb-Protein und interagiert gleichzeitig mit dem Tumorsuppressor p53 (Srinivasan et al., 1989; Zhu et al., 1992). Auch das adenovirale E1A oder E7 von HPV können Nagerfibroblasten transformieren, aber nur mit zusätzlichen Partnern, in diesem Falle dem adenoviralen E1B oder HPV E6, auch immortalisieren (Hawley-Nelson et al., 1989; Watanabe et al., 1989; Yew & Berk, 1992). Das Gleichgewicht zwischen Proliferation und der Außerkraftsetzung der Überwachungspunkte des Zellzyklus ist ein wesentliches Merkmal dieser onkogenen DNA-Viren. In all diesen Fällen interagieren virale Proteine mit dem Tumorsuppressor p53, um den Zellzyklus-Arrest zu verhindern und die Rb-induzierte Apoptose zu vermeiden.

## 5.3 Zweckmäßigkeit der verwendeten viralen Proteine

Für die Experimente wurden die drei latenten EBV-Proteine EBNA2, LMP1 und LMP2A herangezogen.

EBNA2 ist für die Etablierung der Latenz und des immortalisierten Stadiums essentiell. So kann der Virusstamm P3HR-1, dessen Genom in dem für EBNA2 kodierenden Bereich eine Deletion aufweist, B-Zellen *in vitro* nicht immortalisieren (Bornkamm et al., 1982). Die transformierende Eigenschaft konnte man durch Komplementation der fehlenden DNA-Bereiche wieder herstellen (Kempkes et al., 1995a). Außerdem wirkt EBNA2 als Transaktivator. Allerdings bindet es nicht selbst an die Promotoren, sondern vermittelt diesen Effekt durch Interaktion mit den zellulären Faktoren RBP-J $\kappa$ , TFIIB, TAF40, RPA70 und PU.1 (Zimmer-Strobl et al., 1993; Henkel et al., 1994; Tong et al., 1995). Es aktiviert sowohl den Promotor für das LMP1-Gen und den BCR2-Promotor der EBNA-Gene als auch die Transkription zahlreicher zellulärer Gene, die für das Fortschreiten des Zellzyklus sorgen. Über die Transaktivierung von LMP1 setzt EBNA2 durch Interaktion mit

dem Transkriptionsfaktor PU.1, der eine Bindungsstelle im LMP1-Pomotor besitzt, den eigentlichen Immortalisierungsprozeß in Gang (Johannsen et al., 1994; Kempkes et al., 1995). EBNA2 ist nicht nur für die Initiation, sondern auch für die Aufrechterhaltung der Immortalisierung notwendig (Kempkes et al., 1995). Außerdem verstärkt EBNA2 die Regulation des zellulären Protoonkogens bcl2, das die Apoptose verhindert (Reid, 1992). Von der Gruppe um Bornkamm wurde gezeigt, daß EBNA2 direkt die Transkription des Protoonkogens c-myc induziert. Ausgehend davon wird indirekt die Expression zweier wichtiger Elemente der Zellzyklusmaschinerie, Cyclin D2 und cdk4, induziert, die ruhende Lymphoblasten in die frühe G<sub>1</sub>-Phase des Zellzyklus treiben. Der molekulare Mechanismus, mit dem EBNA2 die Transkription von c-myc aktiviert, ist dagegen noch unklar (Kaiser et al., 1999).

LMP1 besitzt einige Eigenschaften, die es als potentiell Onkogen ausweisen: So ist es in der Lage, Ratten- und NIH3T3-Zellen zu transformieren (Baichwal & Sugden, 1988; Wang et al., 1985). Verantwortlich scheinen dafür der C-Terminus und die Transmembrandomänen bzw. alle drei Domänen sowie der Grad der Phosphorylierung zu sein (Izumi et al., 1994; Moorthy & Thorley-Lawson, 1993). Außerdem ist LMP1 für die Immortalisierung von B-Zellen essentiell, da EBV mit mutiertem LMP1 nicht in der Lage ist, B-Zellen zu immortalisieren (Kaye et al., 1993).

LMP1 verstärkt darüberhinaus die Expression einiger Zelladhäsionsmoleküle (ICAM-1, LFA-1, LFA-3) und einiger B-Zell-Aktivierungsmarker (CD21, CD23) auf der Oberfläche von B-Zellen (Wang et al., 1990) sowie die Expression des anti-apoptotischen Protoonkogens bcl-2 (Henderson et al., 1991). Außerdem scheint LMP1 die Expression von Vimentin (Birkenbach et al., 1989), HLA-Klasse-II-Antigenen (Zhang et al., 1994) sowie einer Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-abhängigen Proteinkinase (Mosialos et al., 1994) zu induzieren. Wie allerdings LMP1 die Expression dieser verschiedenen Gene aktiviert, ist unklar. Der Struktur nach könnte es sich bei LMP1 um einen Wachstumsfaktorrezeptor handeln (Martin & Sugden, 1991), der mit G-Proteinen assoziiert kontinuierlich eine Signalkaskade auslöst und so die Expression verschiedener zellulärer Gene auslöst. Es gibt Hinweise, dass der Signalweg über NF-kappa-B oder den AP1-Faktor laufen könnte (Farrell, 1998; Hammarskjöld & Simurda, 1992). Dabei aktiviert LMP1 über den TRAF- und TRADD/TRAF-2-Signaltransduktionsweg NFκB (Mosialos et al., 1995; Sandberg et al., 1997) bzw. über den SEK/JNK-1-Kinase-Signaltransduktionsweg den Transkriptionsfaktor AP1 (Farrell, 1998). Die zytoplasmatische Domäne von LMP1 hat nämlich, obwohl sie nur eine geringe sequentielle Homologie zueinander aufweist, eine ähnliche Funktion wie die des TNF-Rezeptors, der nach Bindung des Tumornekrosefaktors in der Zytoplasmamembran zu Oligomeren aggregiert (Mosialos et

al., 1995). Aufgrund der dadurch induzierten Signalkaskade lagern sich die zellulären Faktoren TRAF-1 und TRAF-2 an die zytoplasmatischen Domänen an und leiten die Phosphorylierung und Aktivierung von NF $\kappa$ B ein (Huen et al., 1995). Dadurch werden automatisch alle im Kern von NF $\kappa$ B-abhängigen Promotoren aktiviert.

Wenig ist über die Fähigkeit des LMP1 bekannt, primäre Zellen zusammen mit zellulären Onkogenen zu transformieren. Derartige kooperative Transformationen wären wichtig für das Verständnis des LMP1 in einem multifaktoriellen Prozeß der Immortalisierung und könnte als genetisches Modell für Krebsentstehung dienen. Vor allem LMP1 zeigte sich in neueren Studien geeignet, die Proliferation von primären Mausfibroblasten zu induzieren. Damit läge es nahe, LMP1 mehrere Funktionen in der Wachstumsregulierung und der Verhinderung des Zellzyklus-Arrests sowie der Apoptose bei abnormaler Proliferation zuzuschreiben (Yang et al., 2000). Obwohl die Proliferation in primären Fibroblasten von Mausembryonen alleine durch LMP1 stark erhöht werden kann, ist die Aktivierung der Telomeraseaktivität und damit die Immortalisierung nicht alleine durch LMP1 möglich, sondern bedarf noch des Zusammenwirkens mit zellulären Onkogenen. In neueren Studien wurde eine Interaktion zwischen LMP1 und dem CDK4-Onkogen gefunden (Yang et al., 2000), die auch zu einer Aktivierung der Telomeraseaktivität führt.

Die Expression von LMP1 scheint von vielen positiven und negativen Faktoren reguliert zu werden (Fahraeus et al., 1990). Einer der positiven Faktoren ist EBNA2, von dem gezeigt wurde, daß es eine Suppression des LMP1-Promotors in B-Zellen aufheben kann (Fahraeus et al., 1993; Wang et al., 1990) bzw. positiv auf den Promotor wirkt (Laux et al., 1994). Auch EBNA3C ist in der Lage, die Expression von LMP1 zu steigern (Allday et al., 1993; Allday & Farrell, 1994).

Für LMP2A konnte gezeigt werden, daß es mit Tyrosinkinase, speziell mit den für Lymphozyten spezifischen Kinasen c-lyn und c-fyn (Burkhardt et al., 1992), interagiert. LMP2A dient den Kinasen dabei als Substrat und wird an Serin-, Threonin- und Tyrosinresten phosphoryliert (Longnecker et al., 1991). Da diese Phosphotyrosinkinase bei der Signaltransduktion der B-Zell-Proliferation eine Rolle spielen, sind sie durch ihre reversible Bindung an das an die Zellmembran gebundene LMP2A nicht mehr für die B-Zell-Aktivierung verfügbar. Außerdem wird diskutiert, daß LMP2A den Übergang des Virus in den lytischen Zyklus hemmt, indem es einen Block der rezeptorvermittelten Ca<sup>2+</sup>-Mobilisierung induziert (Miller et al., 1993; Miller et al., 1994). LMP2A spielt auch eine wichtige Rolle in der Erhaltung der Lebensfähigkeit infizierter B-Zellen, indem es selektiv den SLP-65-regulierten Signalweg alternativ aktiviert oder reprimiert (Engels et al., 2001). Über die Rolle des LMP2A bei der B-Zell-Immortalisierung gibt es unterschiedliche Ansichten: Die Gruppe um R. Longnecker halten LMP2A für die Immortalisierung als entbehrlich (Longnecker et al., 1992), auf der anderen Seite zeigten W. Hammerschmidt

und Kollegen, daß die Deletion von LMP2 die Lymphozytenimmortalisation signifikant herabsetzte (Briemeier et al., 1996).

## **5.4 Von der Proteinabhängigkeit alternative Wege der Immortalisierung mit EBV infizierter Lymphoblasten**

### **5.4.1 Rolle der EBER-Transkripte**

Wie jüngst gezeigt wurde, könnten auch die von der RNA-Polymerase III transkribierten viralen RNA-Fragmente, die EBERs, die Widerstandsfähigkeit der EBV-infizierten Zellen dadurch erhöhen, indem sie die Expression des Apoptose verhindernden Proteins bcl-2 heraufregulieren und damit onkogene Funktionen ausüben. Normalerweise würde die in allen Burkitt's-Lymphomzellen vorhandene Chromosomentranslokation, die das c-myc-Gen einschließt und damit zur konstitutiven Aktivierung des c-myc-Gens führt, sowohl zur Tumorentwicklung führen (Land et al., 1983) als auch in die Apoptose treiben (Askew et al., 1991). Durch die von den EBER-Transkripten ausgelöste erhöhte Expression von bcl-2 wird diese allerdings verhindert und sorgt dadurch dafür, daß c-myc seine ebenfalls onkogene Wirkung (Vaux et al., 1988) entfalten kann (Takada, 2001).

### **5.4.2 Immortalisierung durch Chromosomenaberrationen**

Jüngere Ergebnisse (Okubo et al., 2001) zeigen, daß es nicht unbedingt Proteine sein müssen, die in den Lymphoblasten die Telomerase aktivieren und somit deren Immortalität bedingen, sondern daß dies durch Chromosomenaberrationen ausgelöst werden kann. So wurden in EBV-LCLs mit hoher Telomeraseaktivität abnormale Karyotypen gefunden (Tahara et al., 1997; Kataoka, 1997) und es konnte kürzlich nachgewiesen werden, daß alle durch EBV immortalisierten LCLs abnorme Karyotypen aufzeigten und die stark erhöhte Telomeraseaktivität mit der Veränderung des Karyotyps parallel einherging (Okubo et al., 2001).

## 5.5 Diskussion der vorliegenden Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit ist es gelungen, mit eigens dafür konstruierten Expressionsvektoren verschiedene Zelllinien zu transfizieren und die jeweilige Telomeraseaktivität bzw. Telomerasepromotoraktivität zu messen.

Es wurde die Technik des TRAP-Assays und des RNase-Protection-Assays etabliert.

### 5.5.1 Techniken

Die verwendeten Techniken erwiesen sich als aussagekräftig und brachten konsistente Ergebnisse. Mit dem Telomerase-Aktivitäts-(TRAP)-Assay konnte spezifisch und hinreichend quantitativ die Telomeraseaktivität der Zellen nachgewiesen werden, wie die deutliche Differenz zwischen telomerase-positiven Zelllinien wie HeLa oder DG75 und primären Zellen zeigt.

Mit dem RNase-Protection-Assay ist es qualitativ wie quantitativ gelungen, die An beziehungsweise Abwesenheit von hTERT-mRNA sowie die Veränderung der c-myc-mRNA nach der Transfektion von EBNA2 darzustellen.

Der duale Luziferaseassay ist, wie auch hier die deutlichen Unterschiede zwischen nicht-telomeraseproduzierenden zu telomeraseproduzierenden Zellen zeigt, als Nachweis für die Promotoraktivität des hTERT-Promotors geeignet.

### 5.5.2 Die Ergebnisse der Untersuchung der Telomer-repeats / Einfluß zutransfizierter EBV-Gene auf die Telomeraseaktivität und -transkription

In den untersuchten Zelllinien konnten durch die Transfektion mit EBNA2, LMP2A und LMP1 keine Aktivierung beziehungsweise Erhöhung der Aktivierung der Telomeraseaktivität ausgelöst werden, aufgrund der man Rückschlüsse auf das onkogene Potential des EBV oder seinen Replikationsmechanismus innerhalb der Zelle ziehen könnte. Dies ist insofern erstaunlich, als gezeigt wurde, daß es diese Proteine, vor allem das LMP1 sind, die die Immortalisierung der Zellen und damit die Telomeraseaktivität initiieren.

Allerdings ist es möglich, daß die Aktivierung bzw. Erhöhung der Aktivierung der Telomerase mehrere zusätzliche Faktoren benötigt, die hier nicht dargestellt wurden. So ist eine Interaktion von LMP1 mit dem CDK4-Onkogen notwendig, um in Mäusefibroblasten die Telomerase anzuschalten und diese damit zu immortalisieren (Yang et al, 2000). Bei Mäusen ist die Erhöhung der Telomeraseaktivität durch Überexpression mit NFκB gelungen (Yin et al, 2000). Da LMP1 im Menschen über den TRAF- und TRADD/TRAF-2-Signaltransduktionsweg NFκB aktivieren kann (Mosialos et

al., 1995; Sandberg et al., 1997) bzw. über den SEK/JNK-1-Kinase-Signaltransduktionsweg den Transkriptionsfaktor AP1 (Farrell, 1998) und dadurch alle im Kern von NF $\kappa$ B-abhängigen Promotoren aktiviert werden, ist hier von einem multifaktoriellen Zusammenspiel auszugehen.

Außerdem gibt es durch die von EBV ausgelösten Chromosomenaberrationen eine Möglichkeit, ohne direkte Proteineinwirkung die Telomeraseaktivierung und Immortalisierung zu erklären (Okubo et al., 2001). Noch weiterer Klärung bedarf es wohl, eine mögliche Rolle der EBER-Transkripte in diesem Zusammenhang zu beleuchten, die sich positiv auf die bcl2-Expression auswirken und die onkogene Wirkung des c-myc-Proteins ermöglichen (Vaux et al., 1988; Takada, 2001) .

Eine signifikante Reaktion konnte nach der Transfektion von EBNA2 auf die c-myc-Regulation in Nicht-Burkitt's-Lymphom-Zellen beobachtet werden. Ist die c-myc-Expression in Burkitt's-Lymphomzellen wie der verwendeten DG75 und Raji-Zelllinien oder in der Lymphoblastoiden Zelllinie 721 bedingt durch die Auswirkungen der Chromosomentranslokation konstitutiv hoch, ist sie in HeLa-Zellen und den Vorhautfibroblasten als Primärzellen unter unbehandelten Bedingungen nicht zu detektieren. Bei einer Transfektion mit dem EBNA2-Expressionsvektor konnte dagegen in diesen Zellen eine deutliche Erhöhung der c-myc-Transkription gemessen werden, was auf eine direkte Aktivierung von c-myc durch EBNA2 hinweist, wie sie bereits von Bornkamm (Kaiser et al., 1999) demonstriert wurde. Wie jüngst von der Arbeitsgruppe um Paul Farrell gezeigt werden konnte, induziert c-myc seinerseits direkt das Zellzyklusregulierende Gen Cyclin D2, so daß die Zellen zur Proliferation angeregt werden (Lindsay et al., 2001). Inwieweit damit auch der Telomerasepromotor von einer Aktivierung durch Cyclin D2 betroffen sein könnte, war noch nicht Gegenstand von Untersuchungen.

### 5.5.3 Die hTERT-Promotoraktivität

Die Promotoraktivität des hTERT-Promotors wurde mittels Luciferase-Assay gemessen. Auch hierbei konnte durch Kotransfektion der Expressionsvektoren viraler Latenzgene keine signifikante Erhöhung der Aktivität erreicht werden. Allerdings unterschieden sich die beiden Promotorkonstrukte signifikant voneinander. Das Volllängenkonstrukt des Telomerase-Promotors ohne Exon-Anteil (pGL3B-TRTP) zeigte eine niedrigere Aktivität als das Promotorkonstrukt mit Exon-Anteil (p2XEB). Verantwortlich dafür dürfte die zweite, downstream des ATG liegende E-Box sein, an die mit den Onkoproteinen der Ets-Familie die Transkriptionsfaktoren aus der Familie der bHLHZ-Transkriptionsfaktoren binden können (Grandori & Eisenmann, 1997; Sieweke et al., 1998; Dang et al, 1998).

Diese E-Box fungiert möglicherweise als positiv regulatorisches Element, das in Zusammenarbeit mit der upstream liegenden E-Box ihre volle Wirkung entfalten kann. Weitere Promotoruntersuchungen sind hier angebracht.

## 5.6 Untersuchung des rep\*-Elements

Die rep\*/vIL-10-Region des EBV wurde hinsichtlich ihrer möglichen dualen Funktion als replikatives und transkriptionelles Element untersucht. Die Rolle einer unterstützenden replikativen Funktion von rep\* wurde von der Gruppe um Sugden (Kirchmaier & Sugden, 1998) vorgeschlagen. Zufälligerweise bedeckt das rep\*-Element die upstream-Region der TATA-Box für das Haupttranskript der 800 Basenpaare langen mRNA des vIL-10, dem viralen Homolog des zellulären IL-10 (Touitou et al., 1996). Die *in vivo*-Protektion der DNA durch Proteine und die CpG-Methylierungsmuster (Niller et al., 2001) legen jedoch nahe, daß das Element während der EBV-Latenz nicht aktiv ist. In Übereinstimmung mit der fehlenden Expression der vIL-10 mRNA während der Latenz (Hudson et al., 1985; Touitou et al., 1996), konnte beim rep\*/vIL-10p-Element keinerlei Proteinbedeckung gefunden werden, was auch durch Methylierungsgrad der CpG-Dinukleotide bekräftigt wird. Demnach ist der fragliche Bereiche in allen untersuchten Zelllinien zu einem hohen Prozentsatz (50 –100 %) methyliert (Niller et al., 2001).

Alle analysierten Zelllinien zeigen die gleichen genomischen Footprint-Muster in dieser Region, unabhängig davon, ob Typ I oder Typ III-Latenz vorliegt. Es gibt keine signifikanten Hinweise auf sequenzspezifische Protein-DNA-Interaktionen. Die Identität der Proteine, die die leichten Footprints verursachen, ist bis dato noch nicht geklärt. Es könnte sich dabei um allgemeine Chromatin-Verpackungs-Proteine handeln.

Theoretisch bestünde die Möglichkeit, daß Mitglieder der E2F-Proteinfamilie eine Rolle bei der rep\*/vIL-10p-Bindung spielen. Allerdings macht es die Transition von C zu T am Nukleotid 9518 in Rael- und Mutu-Zellen schwieriger für Proteine dieser Familie, dort zu binden (Wingender et al., 2001). Außerdem handelt es sich bei der genomischen Bedeckung nicht um einen typischen E2F-Footprint (Zwicker et al., 1996). Die wenig spezifische Proteinbedeckung und der hohe Methylierungsgrad von rep\*/vIL-10p (Salamon et al., 2001) weisen diesem Element eher den Status eines inaktiven Promotorelements zu. Die scharfe Grenze zwischen unmethyliertem DS-Element (Salamon et al., 2000) und stark methyliertem rep\*/vIL-10p könnten aber eine Rolle beim Aufbau des Replikationsinitiationskomplexes am DS-Element spielen.

In neueren Studien wurde gezeigt, daß der *oriP*, insbesondere das DS-Element, sowohl mit dem human origin recognition complex (hsORC) als auch mit dem wiederum daran

---

bindenden MCM-Komplex interagiert, Proteinkomplexen, die an Replikationsorigins binden und notwendig für die Einleitung der Replikation sind. Darüberhinaus wurde festgestellt, dass EBNA1 und hsORC miteinander *in vivo* interagieren. Ob der hsORC-Komplex dabei nur an das DS-Element bindet oder auch an das knapp danebenliegende rep\*-Element, konnte dabei nicht näher eingegrenzt werden (Chaudhuri et al., 2001; Schepers et al., 2001; Diffley et al., 1994). Nach den hier vorliegenden Ergebnissen ist eine Bindung des hsORC an das rep\*-Element unwahrscheinlich (Niller et al., 2001).

Diese Studien unterstützen die Annahme, daß Replikationsorigin *oriP* des Epstein-Barr-Virus für die Initiierung der Replikation auf die zelluläre Replikationsmaschinerie zurückgreift.

---

## **6. Literaturverzeichnis**

- Abbot**, S.D., Rowe, M., Cadwallader, K., Ricksten, A., Gordon, J., Wang, F., Rymo, L., Rickinson, A.B. (1990). Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 induces expression of the virus-encoded latent membrane protein. *J. Virol.* **64**, 2126-2134.
- Adams**, A. (1987). Replication of latent Epstein-Barr virus genomes in Raji-Zells. *J. Virol.* **61**, 1743-1746.
- Adams**, A., Lindahl, T. (1975). Epstein-Barr virus genomes with properties of circular DNA molecules in carrier cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**, 1477-1481.
- Addinger**, H.K., Delius, H., Freese, U.K., Clark, J., Bornkamm, G.W. (1985). A putative transforming gene of the jijoye virus differs from that of Epstein-Barr virus prototypes. *Virology* **141**, 221-234.
- Ahearn**, J.M., Hayward, S.D., Hickey, J.C., Fearon, D.T. (1988). Epstein-Barr virus (EBV) infection of murine L cells expressing recombinant human EBV/C3d receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 9307-9311.
- Aligue**, R., Bastos, R., Serratosa, J., Enrich, C., James, P., Pujades, C., Bachs, o.(1990). Increase in a 55-kDa keratin-like protein in the nuclear matrix of rat liver cells during proliferation activation. *Exp. Cell. Res.* **186**, 346-353.
- Allday**, M.J., Crawford, D.H., Thomas, J.A. (1993). Epstein-Barr virus (EBV) nuclear antigen 6 induces expression of the EBV latent membrane protein and an activated phenotype in Raji cells. *J.Gen. Virol.* **74**, 361-369.
- Allday**, M.J., Farrel, 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.
- Ambinder**, R.F., Mullen, M., Chang, Y., Hayward, G.S., Hayward, S.D. (1991). Functional domains of Epstein-Barr virus nuclear antigen EBNA-1. *J. Virol.* **65**, 1466-1478.
- Ambinder**, R.F., Shah, W.A., Rawlins, D.R., Hayward, G.S., Hayward, S.D. (1990). Definition of the sequence requirements for binding of the EBNA-1 protein to its palindromic target sites in Epstein-Barr virus DNA. *J. Virol.* **64**, 2369-2379.
- Anagnostopoulos**, I., Hummel, M., Kreschl, C., Stein, H. (1995). Morphology, immunophenotype, and distribution of latently and/or productively Epstein-Barr virus-infected cells in acute infectious mononucleosis: Implications for the interindividual infection route of Epstein-Barr virus. *Blood* **85**, 744-750.
- Andiman**, W.A., Eastman, R., Martin, K., (1985). Opportunistic lymphoproliferations associated with Epstein-Barr viral DNA in infants and children with AIDS. *Lancet* **2**, 1390-1393.
-

- Aquino**, A., Lisi, A., Pozzi, D., Ravagnan, G., Grimaldi, S. (1994). EBV membrane receptor (CR2) is phosphorylated by protein kinase C (PKC) in the early stages of virus entry into lymphoblastoid cell line (Raji). *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **196**, 794-802.
- Baichwal**, V.R., Sugden, B. (1988). Transformation of Balb/3T3 cells by the BNLF-1 gene of Epstein-Barr virus. *Oncogene* **2**, 461-467.
- Bayliss**, G.J., Wolf, H. (1981). An Epstein-Barr virus early protein induced cell fusion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 7162-7165.
- Bayliss**, G.J., Wolf, H. (1981). The regulated expression of Epstein-Barr virus. III. Proteins specified by EBV during the lytic cycle. *J. Gen. Virol.* **56**, 105-118.
- Bear**, R., Bankier, A.T., Biggin, M.D., Deininger, P.L., Farrel, P.J., Gibbson, T.J., Hatfull, G., Hudson, G.S., Satchwell, S.C., Seguin, C., Tufnell, P.S., Barrell, B.G. (1984). DNA sequence and expression of the B95-8 Epstein-Barr virus genome. *Nature* **310**, 207-211.
- Beattie**, T.L., Zhou, W., Robinson, M.O., and Harrington, L. (1998). Reconstitution of human telomerase activity in vitro. *Curr. Biol.* **8**, 177-180.
- Bidwell** JP, Van Wijnen AJ, Fey EG, Dowretzky S, Penman S, Stein JL, Lian JB, Stein GS. (1993). Osteocalcin gene promoter-binding factors are tissue-specific nuclear matrix components. *Proc Natl Acad Sci USA* **90** (8), 3162-3166.
- Biggin**, M., Bodescot, M., Perricaudet, M., Farrell, P. (1987). Epstein-Barr virus gene expression in P3HR-1-superinfected Raji cells. *J. Virol.* **61**, 3120-3132.
- Birkenbach**, M., Liebowitz, D., Wang, F. Simple, J., Kieff, E. (1989). Epstein-Barr virus latent infection membrane protein increases vimentin expression in human B-cell line. *J. Virol.* **63**, 4079-4084.
- Blasco**, M.A., Funk, W., Villeponteau, B., and Greider, C.W. (1995). Functional characterization and developmental regulation of mouse telomerase RNA. *Science* **269**, 1267-1270
- Blasco**, M.A., Lee, H.W., Hande, M.P., Samper, E., Lansdorp, P.M., DePinho, R.A., Greider, C.W. (1997). Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking telomerase RNA. *Cell* **91**, 25-34.
- Bochkarev**, A., Barwell, J.A., Pfuetzner, R.A., Furey, W., Edwards, A.M., Frappier, L. (1995). Crystal structure of the DNA-binding domain of the Epstein-Barr virus origin-binding EBNA1. *Cell* **83**, 39-46.
- Bodnar**, J.V. (1988). A domain model for eukaryotic DNA organization: a molecular basis for cell differentiation and chromosome evolution. *J. Theor. Biol.* **132**, 479-507.
- Bodnar**, A.G., Ouellette, M., Frolkis, M., Holt, S.E., Chiu, C.P., Morin, G.B., Harley, C.B., Shay, J.W., Lichtsteiner, S., and Wright, W.E. (1998). Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* **279**, 349-352.
- Bornkamm**, G.W., Delius, H., Zimmer, U., Hudewentz, J., Epstein, M.A. (1980). Comparison of Epstein-Barr virus strains of different origin by analysis of the viral DNAs. *J. Virol.* **35**, 603-618.
-

- Bornkamm**, G.W., Hudewentz, J., Freese, U.K., Zimmer, U. (1982). Deletion of the non-transforming Epstein-Barr virus strain P3HR-1 causes fusion of the large internal repeat to the DSL region. *J. Virol.* **43**, 952-968.
- Bradford**, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Brooks**, L., Yao, Q.Y., Rickinson, A.B., Young, L.S. (1992). Epstein-Barr virus latent gene transcription in nasopharyngeal carcinoma cells: coexpression of EBNA1, LMP1, and LMP2 transcripts. *J. Virol.* **66**, 2689-2697.
- Brown**, W.R.A. (1989). Molecular cloning of human telomeres in yeast. *Nature* **338**, 774-776.
- Büchner**, D. (1995). Proteinbindungsanalyse eines neuen Sequenzelements im *oriP* des Epstein-Barr-Virus. Diplomarbeit an der Universität Regensburg.
- Buisson**, M., Manet, E., Trescol-Biemont, M.C., Gruffat, H., Durand, B., Sergeant, A. (1989). The Epstein-Barr virus (EBV) early protein EB2 is a posttranscriptional activator expressed under the control of EBV transcription factors EB1 and R. *J. Virol.* **63**, 5276-5284.
- Burkhardt**, A.L., Bolen, J.B., Kieff, E., Longnecker, R. (1992). An Epstein-Barr virus transformation-associated membrane protein interacts with src family tyrosine kinases. *J. Virol.* **66**, 5161-5167.
- Burkitt**, D. (1958). A carcinoma involving the jaws in African children. *Brit. J. Sur.* **46**, 218-223.
- Burkitt**, D. (1962). A childrens cancer dependent on climatic factors. *Nature* **194**, 232-234.
- Calender**, A., Billaud, M., Aubry, J.B., Banchereau, J., Vuillaume, M., Lenoir, G.M. (1987). Epstein-Barr virus (EBV) induces expression of B-cell activation markers on in vitro infection of EBV-negative B-Lymphoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 8060-8064.
- Calos**, M.P. (1998). Stability without a centromere. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 4084-4085.
- Carel**, J.C., Myones, B.L., Frazier, B., Holers, V.M. (1990). Structural requirements for C3d.g/ Epstein-Barr virus receptor (CR2/CD21) ligand binding, internalisation, and viral infection. *J. Biol. Chem.* **265**, 12293-12299.
- Chang**, R.S., Lewis, J.P., Abildgaard, C.F. (1973). Prevalence of oropharyngeal excretors of leucocyte-transforming agents among a human population. *N. Engl. J. Med.* **289**, 1325-1329.
- Chang**, Y.N., Dong, D.L.Y., Hayward, G.S., Hayward, S.D. (1990). The Epstein-Barr virus Zta transactivator: a member of the bZIP family with unique DNA-binding specificity and a dimerization domain that lacks the characteristic heptad leucine zipper motif. *J. Virol.* **64**, 3358-3369.
-

- Chaudhuri** B, Xu H, Todorov I, Dutta A, Yates JL (2001). Human DNA replication initiation factors, ORC and MCM, associate with oriP of Epstein-Barr-Virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 10085-10089
- Chen**, M., Middeldorp, J.M., Hayward, S.D. (1993). Separation of the complex DNA binding domain of EBNA-1 into DNA recognition and dimerization subdomains of novel structure. *J. Virol.* **67**, 4875-4885.
- Chevallier-Greco**, A., Manet, E., Chavrier, P., Mosnier, C., Daillie, J., Sergeant, A. (1986). Both Epstein-Barr virus (EBV)-encoded trans-acting factors, EB1 and EB2, are required to activate transcription from an EBV early promoter. *EMBO J.* **5**, 3243-3249.
- Clarke**, P.A., Schwemmle, M., Schickinger, J., Hilse, K., Clemens, M.J. (1991). Binding of Epstein-Barr virus small RNA EBER-1 to the double stranded RNA-activated protein kinase DAI. *Nucl. Acids Res.* **19**, 243-248.
- Clarke**, P.A., Sharp, N.A., Clemens, M.J. (1992). Expression of genes for the Epstein-Barr virus small RNAs EBER-1 and EBER-2 in Daudi Burkitt's lymphoma cells: effects of interferon treatment. *J. Gen. Virol.* **73**, 3169-3175.
- Cleary**, M.L., Nalesnik, M.A., Shearer, W.T., Sklar, J. (1988). Clonal analysis of transplant-associated lymphoproliferations based on the structure of genomic termini of Epstein-Barr virus. *Blood* **72**, 349-352.
- Cockerill**, P.N., Garrard, W.T. (1986). Chromosomal loop anchorage of the kappa immunoglobulin gene occurs next to the enhancer in a region containing topoisomerase II sites. *Cell* **44**, 273-282.
- Cohen**, J.I. (1992). A region of herpes simplex virus VP16 can substitute for a transforming domain of Epstein-Barr virus nuclear protein 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 8030-8034.
- Cohen**, J.I., Kieff, E. (1991). An Epstein-Barr virus nuclear protein 2 domain essential for transformation is a direct transcriptional activator. *J. Virol.* **65**, 5880-5885.
- Collins**, K., Kobayashi, R., Greider, C.W. (1995). Purification of Tetrahymena telomerase and cloning of genes encoding the two protein components of the enzyme. *Cell* **81**, 677-686.
- Cordier**, M., Calender, A., Billaud, M., Zimmer, U., Rousselet, G., Pavlish, O., Banchereau, J., Tursz, T., Bornkamm, G., Lenoir, G.M. (1990). Stable transfection of Epstein-Barr virus (EBV) nuclear antigen 2 in lymphoma cells containing the EBV P3HR1 genome induces expression of B-cell activation molecules CD21 and CD23. *J. Virol.* **64**, 1002-1013.
- Countryman**, J.U., Jenson, H., Seibl, R., Wolf, H., Miller, G. (1987). Polymorphic proteins encoded within BZLF1 of defective and standard Epstein-Barr viruses disrupt latency. *J. Virol.* **12**, 3672-3679.
- Cross**, S.H., Allshire, R.C., McKay, S.J., McGill, N.I., Cooke, H.J. (1989). Cloning of human telomeres by complementation in yeast. *Nature* **338**, 771-774.
- Dang** W., Sun X. H., Sen R. (1998). ETS-mediated cooperation between basic helix-loop-helix motifs of the immunoglobulin  $\mu$  heavy chain gene enhancer. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 1477-1488
-

- Dambaugh**, T., Beisel, C., Hummel, M., King, W., Fennewald, S., Cheung, A., Heller, M., Raab-Traub, N., Kieff, E. (1980). Epstein-Barr virus DNA. VII Molecular cloning and detailed mapping of Epstein-Barr virus (B95-8) DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 2999-3003.
- Dambaugh**, T., Hennesy, K., Chamnaukit, L., Kieff, E. (1984). U2 region of Epstein-Barr virus DNA may encode Epstein-Barr virus nuclear antigen 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 7623-7636.
- Dean**, F., Hurwitz, J. (1991). Simian virus 40 large T antigen untwists DNA at the origin of DNA replication. *J. Biol. Chem.* **266**, 5062-5071.
- Debbas**, M., E. White. (1993). Wild-type p53 mediates apoptosis by E1A, which is inhibited by E1B. *Genes Dev.* **7**, 546-554
- Decker**, L.L., Klamen, L.D., Thorley-Lawson, D.A. (1996). Detection of the latent form of Epstein-Barr virus DNA in the peripheral blood of healthy individuals. *J. Virol.* **70**, 3286-3289.
- Delecluse**, H.J., Bartnizke, S., Hammerschmidt, W., Bullerdiek, J., Bornkamm, G.W. (1993). Episomal and integrated copies of Epstein-Barr virus coexist in Burkitt lymphoma cell lines. *J. Virol.* **67**, 1292-1299.
- DePamphilis**, M.L. (1988). Transcriptional elements as components of eucaryotic origin of DNA replication. *Cell* **52**, 635-638.
- Devereux**, J., Haeberli, P., Smithies, O. (1984). A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucl. Acids Res.* **12**, 387-395.
- Dhar**, V., Schildkraut, C.L. (1991). Role of EBNA1 in arresting replication forks at the Epstein-Barr virus oriP family of tandem repeats. *Mol. Cell. Biol.* **11**, 6268-6278.
- Diffley** JF, Cocker JH, Dowell SJ, Rowley A. (1994). Two steps in the assembly of complexes at yeast replication origins in vivo. *Cell* **78** (2), 303-16
- Dijkwel**, P.A., Hamlin, J.L. (1988). Matrix attachment regions are positioned near replication initiation sites, genes, and an interamplicon junction in the amplified dihydrofolate reductase domain of Chinese hamster ovary cells. *Mol. Cell. Biol.* **8**, 5398-5409.
- di Renzo**, L., Altiook, A., Klein, G., Klein, E. (1994). Endogenous TGF-beta contributes to the induction of the Epstein-Barr virus lytic cycle in two Burkitt lymphoma cell lines. *Int. J. Cancer* **57**, 914-919.
- Dickinson**, L.A., Kohwi-Shigematsu, T. (1995). Nucleolin is a matrix attachment region DNA-binding protein that specifically recognizes a region with high base-unpairing potential. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 456-465.
- Dignam**, J.D., Lebovitz, R.M., Roeder, R.G. (1983). Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucl. Acids Res.* **11**, 1475-1489.
- Dillner**, J., Kallin, B. (1988). The Epstein-Barr virus proteins. *Adv. Cancer Res.* **50**, 95-158.
-

- Dillner, J., Kallin, B., Alexander, H., Ernberg, I., Uno, M., Ono, Y., Klein, G., Lerner, R.A.** (1986). An Epstein-Barr virus (EBV)-determined nuclear antigen (EBNA5) partly encoded by the transformation-associated Bam WYH region of EBV DNA: preferential expression in lymphoblastoid cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 6641-6645.
- Dobbelstein, M., Shenk, T.** (1995). In vitro selection of RNA ligands for the ribosomal L22 protein associated with Epstein-Barr virus-expressed RNA by using randomized and cDNA-derived RNA libraries. *J. Virol.* **69**, 8027-8034.
- Dornreiter, I., Erdile, L.F., Gibert, I.U., von Winkler, D., Kelly, T.J., Fanning, E.** (1992). Interaction of DANN polymerase alpha-primase with cellular replication protein A and SV40 T antigen. *EMBO J.* **11**, 769-776.
- Epstein, M.A., Achong, B., Barr, Y.M.** (1964). Virus particles in cultured lymphoblasts form Burkitt's Lymphoma. *Lancet* **1**, 702-703.
- Epstein, M.A., Barr, Y.M.** (1964). Cultivation *in vitro* of human lymphoblasts from Burkitt's malignant lymphoma. *Lancet* **1**, 252-253.
- Fahraeus, R., Jansson, A., Ricksten, A., Sjoblom, A., Rymo, L.** (1990). Epstein-Barr virus-encoded nuclear antigen 2 activates the viral latent membrane protein promoter by modulation the activity of a negative regulatory element. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 7390-7394.
- Fahraeus, R., Jansson, A., Sjoblom, A., Nilsson, T., Klein, G., Rymo, L.** (1993). Cell phenotype-dependent control of Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 gene regulatory sequences. *Virology* **195**, 71-80.
- Farrell, P.J.** (1995). Epstein-Barr virus immortalizing genes. *Trends in Microbiology* **3**, 105-109.
- Farrell, P.J.** (1998). Signal transduction from the Epstein-Barr virus LMP-1 transforming protein. *Trends in Microbiology* **6**, 175-177.
- Farrell, P.J., Rowe, D.T., Rooney, C.M., Kouzarides, T.** (1989). Epstein-Barr virus BZLF1 transactivator specifically binds to a consensus AP-1 site and is related to c-fos. *EMBO J.* **8**, 127-132.
- Feng, J., Funk, W.D., Wang, S.S., Weinrich, S.L., Avilion, A.A., Chiu, C.P., Adams, R.R., Chang, E., Allsopp, R.C., Yu, J., et al.** (1995). The RNA component of human telomerase. *Science* **269**, 1236-1241.
- Fingerroth, J.D., Weis, J.J., Tedder, T.F., Strominger, J.L., Biro, P.A., Fearson, D.T.** (1984). Epstein-Barr virus receptor of human B lymphocytes is the C3d receptor CR2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 4510-4516.
- Fischer, N., Kremmer, E., Lautshcam, G., Mueller-Lantsch, N., Grässer, F.A.** (1997). Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 forms a complex with the nuclear transporter karyopherin  $\beta$ . *J. Biol. Chem.* **272**, 3999-4005.
- Frade, R., Barel, M., Ehlin-Henriksson, B., Klein, G.** (1995). gp140, the C3d receptor of human B lymphocytes, is also the Epstein-Barr virus receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 1490-1493.
-

- Frappier, L., Goldsmith, K., Bendell, L. (1994).** Stabilization of the EBNA1 protein on the Epstein-Barr virus latent origin of DNA replication by a DNA looping mechanism. *J. Biol. Chem.* **269**, 1057-1062.
- Frappier, L., O'Donnell, M. (1991).** Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 mediates a DNA loop within the latent replication origin of Epstein-Barr virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 10875-10879.
- Frappier, L., O'Donnell, M. (1991).** Overproduction, purification, and characterization of EBNA1, the origin binding protein of Epstein-Barr virus. *J. Biol. Chem.* **266**, 7819-7862.
- Frappier, L., O'Donnell, M., (1992).** EBNA1 distorts oriP, the Epstein-Barr virus latent replication origin. *J. Virol.* **66**, 1786-190.
- Fried, M., Crothers, D.M. (1981).** Equilibria and kinetics of lac repressor-operator interaction by polyacrylamid gel electrophoresis. *Nucl. Acids Res.* **9**, 6505-6524.
- Fruehling, S., Lee, S.K., Herrold, R., Frech, B., Laux, G., Kremmer, E., Grässer, F.A., Longnecker, R. (1996).** Identification of latent membrane protein 2A (LMP2A) domains essential for the LMP2A domain-negative effect on B-lymphocyte surface immunoglobulin signal transduction. *J. Virol.* **70**, 6216-6226.
- Fukayama, M., Hayashi, Y., Iwasaki, Y., Chong, J., Ooba, T., Takizawa, T., Koike, M., Mizutani, S., Miyaki, M., Hirai, K. (1994).** Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma and Epstein-Barr virus infection of the stomach. *Lab. Invest.* **71**, 73-81.
- Gahn, T.A., Schildkraut, C.L. (1989).** The Epstein-Barr virus origin of plasmid replication, *oriP*, contains both the initiation and termination sites of DNA replication. *Cell* **58**, 527-535.
- Gahn, T.A., Sugden, B. (1995).** An EBNA1-dependent enhancer acts from a distance of 10 kilobase pairs to increase expression of the Epstein-Barr virus LMP gene. *J. Virol.* **69**, 2633-2636.
- Gandhi, L., Collins, K. (1998).** Interaction of recombinant Tetrahymena telomerase proteins p80 and p95 with telomerase RNA and telomeric DNA substrates. *Genes Dev.* **12**, 721-733.
- Gargano, G., Caporossi, D., Gualandi, G., Calef, E. (1992).** Different localization of Epstein-Barr virus genome in two subclones of the Burkitt lymphoma cell line Namalwa. *Genes Chromosomes Cancer* **4**, 205-210.
- Gerber, P., Lucas, S., Nonoyama, M., Perlin, E., Goldstein, L.I. (1972).** Oral excretion of Epstein-Barr virus by healthy subjects and patients with infectious mononucleosis. *Lancet* **2**, 988-989.
- Glickman, J., Howe, J.G., Steitz, J.A. (1988).** Structural analysis of EBER1 and EBER2 ribonucleoprotein particles present in Epstein-Barr virus infected cells. *J. Virol.* **62**, 902-911.
- Goldsmith, K., Bendell, L., Frappier, L. (1993).** Identification of EBNA1 amino acid sequences required for the interaction of the functional elements of the Epstein-Barr virus latent origin of DNA replication. *J. Virol.* **67**, 3418-3426.
-

- Gong, F., Kieff, E. (1990).** Intracellular trafficking of two major Epstein-Barr virus glycoproteins, gp350/250 and gp110. *J. Virol.* **64**, 1507-1516.
- Gorlich, D., Vogel, F., Mills, A.D., Hartmann, E., Laskey, R. (1995).** Distinct functions for two importin subunits in nuclear import. *Nature* **377**, 246-248.
- Grandori C., Eisenman R. N. (1997).** Myc target genes. *Trends Biochem. Sci.*, **22**, 177-181
- Grässer, F.A., Haiss, P., Göttel, S., Mueller-Lantzsch, N. (1991).** Biochemical characterisation of Epstein-Barr virus nuclear antigen 2A. *J. Virol.* **65**, 3779-3788.
- Greenberg, R.A., Allsopp, R.C., Chin, L., Morin, G.B., DePinho, R.A. (1998).** Expression of mouse telomerase reverse transcriptase during development, differentiation and proliferation. *Oncogene* **16**, 1723-1730.
- Greenspan, J.S., Greenspan, D., Lennette, E.T., Abrams, D.I., Conant, M.A., Pterson, V., Freese, U.K. (1985).** Replication of Epstein-Barr virus within the epithelial cells of oral "hairy" leukoplakia, an AIDS-associated lesion. *New Engl. J. Med.* **313**, 1546-1571.
- Greider, C.W., Blackburn, E.H. (1989).** A telomeric sequence in the RNA of Tetrahymena telomerase required for telomere repeat synthesis. *Nature* **337**, 331-337.
- Grogan, E.A., Summers, W.P., Dowling, S., Shedd, D., Gradoville, L., Miller, G. (1983).** Two Epstein-Barr viral nuclear neoantigens distinguished by gene transfer, serology, and chromosome binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 7650-7653.
- Gronostajski, R.M. (1986).** Analysis of nuclear factor I binding to DNA using degenerate oligonucleotides. *Nucl. Acids. Res.* **14**, 9117-9132.
- Gussander, E., Adams, A. (1984).** Electron microscopic evidence for replication of circular Epstein-Barr virus genomes in latently infected Raji cells. *J. Virol.* **52**, 549-556.
- Gutsch, D.E., Holley-Guthrie, E.A., Zhang, Q., Stein, B., Blonar, M.A., Baldwin, A.S., Kenney, S.C. (1994).** The bZIP transactivator of Epstein-Barr virus, BZLF1, functionally and physically interacts with the p65 subunit of NF $\kappa$ B. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 1939-1948.
- Hahn, W.C., Counter, C.M., Lundberg, A.S., Beijersbergen, R.L., Brooks, M.W., Weinberg, R.A. (1999).** Creation of human tumor cells with defined genetic elements. *Nature* **400**, 464-468.
- Hammar skjöld, M., Simurda, M.C. (1992).** Epstein-Barr virus latent membrane protein transactivates the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat through induction of NF $\kappa$ B activity. *J. Virol.* **66**, 6496-6501.
- Hammerschmidt, W., Sugden, B. (1988).** Identification and characterization of oriLyt, a lytic origin of DANN replication in Epstein-Barr virus. *Cell* **55**, 427-433.
- Hammerschmidt, W., Sugden, B. (1989).** Genetic analysis of immortalizing functions of Epstein-Barr virus in human B lymphocytes. *Nature* **340**, 393-397.
-

- Hampar**, B., Tanaka, A., Nonoyama, M., Derge, J.G. (1974). Replication of the resident repressed Epstein-Barr virus genome during the early S phase (S-1 period) of nonproducer Raji cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **71**, 631-635.
- Harrington**, L., McPhail, T., Mar, V., Zhou, W., Oulton, R., Bass, M.B., Arruda, I., Robinson, M.O. (1997a). A mammalian telomerase-associated protein. *Science* **275**, 973-977.
- Harrington**, L., Zhou, W., McPhail, T., Oulton, R., Yeung, D.S., Mar, V., Bass, M.B., and Robinson, M.O. (1997b). Human telomerase contains evolutionarily conserved catalytic and structural subunits. *Genes Dev.* **11**, 3109-3115.
- Harris**, A., Young, B.D., Griffin, B.E. (1985). Random association of Epstein-Barr virus genomes with host cell metaphase chromosomes in Burkitt's lymphoma-derived cell lines. *J. Virol.* **56**, 328-332.
- Harrison**, S., Kimberly, F., Hearing, J. (1994). Sequence requirements of the Epstein-Barr virus latent origin of DNA replication. *J. Virol.* **68**, 1913-1925.
- Hatfull**, G., Bankier, A.T., Barrell, B.G., Farrell, P.J. (1988). Sequence analysis of Raji Epstein-Barr virus DNA. *Virology* **164**, 334-340.
- Hawley-Nelson**, P., K. H. Vousden, N. L. Hubbert, D. R. Lowy, J. T. Schiller. (1989). HPV16 E6 and E7 proteins cooperate to immortalize human foreskin keratinocytes. *EMBO J.* **8**, 3905-3910
- Hearing**, J., Mülhaupt, Y., Harper, S. (1992). Interaction of Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 with the viral latent origin of replication. *J. Virol.* **66**, 694-705.
- Heinemann**, T., Gong, M., Sample, J., Kieff, E. (1988). Identification of the Epstein-Barr virus gp85 gene. *J. Virol.* **62**, 1101-1107.
- Henderson**, S., Rowe, M., Gregory, C., Croom-Carter, D., Wang, F., Longnecker, R., Kieff, E., Rickinson, A. (1991). Induction of bcl2-expression by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 protects infected B-cells from programmed cell death. *Cell* **65**, 1107-1115.
- Henkel**, T., Ling, P.D., Hayward, S.D., Peterson, M.G. (1994). Mediation of Epstein-Barr virus EBNA2 transactivation by recombination signal-binding protein J kappa. *Science* **265**, 92-95.
- Henle**, G., Henle, W. (1966). Immunofluorescence in cells derived from Burkitt's lymphoma. *J. Bacteriol.* **91**, 1248-1256.
- Henle**, G., Henle, W., Diel, V. (1968). Relation of Burkitt's tumor-associated herpes type virus to infectious mononucleosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **59**, 94-101.
- Henle**, W., Diehl, V., Kohn, G., Zur Hausen, H., Henle, G. (1967). Herpes-type virus and chromosome marker in normal leucocytes after growth with irradiated Burkitt cells. *Science* **157**, 1064-1065.
- Hennessy**, K., Wang, F., Woodland, F., Bushman, E., Kieff, E. (1986). Definitive identification of a member of the Epstein-Barr virus nuclear protein 3 family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 5693-5697.
-

- 
- Hennighausen**, L., Lubon, H. (1987). Interaction of protein with DNA in vitro. *Methods Enzymol.* **152**, 721-735.
- Ho**, M., Miller, G., Atchison, R.W., Breinig, M.K., Dummer, J.S., Andiman, W., Starzl, D.E., Eastman, R., Griffith, B.D., Hardesty, R.L., et al. (1985). Epstein-Barr virus infections and DNA hybridization studies in posttransplantation lymphoma and lymphoproliferative lesions: the role of primary infection. *J. Infect. Dis.* **152**, 876-886.
- Holt**, S.E. (1999). Functional requirement of p23 and Hsp90 in telomerase complexes. *Genes Dev.* **13**, 817-826.
- Honess**, R.W., Watson, D.H. (1977). Unity and diversity in the herpesviruses. *J. Gen. Virol.* **37**, 15-37.
- Horikawa** I, Cable PL, Afshari C, Barrett JC (1999). Cloning and characterization of the promoter region of human telomerase reverse transcriptase gene. *Cancer Res.* **59**, 826-830
- Howe**, J.G., Steitz, J.A. (1986). Localization of Epstein-Barr virus encoded small RNAs by in situ hybridisation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 9006-9010.
- Hsieh**, D.J., Camiolo, S.M., Yates, J.L. (1993). Constitutive binding of EBNA1 protein to the Epstein-Barr virus replication origin, oriP, with distortion of DNA structure during the latent infection. *EMBO J.* **12**, 4933-4944.
- Huen** DS, Henderson SA, Croom-Carter D, Rowe M. (1995). The Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 (LMP1) mediates activation of NF-kappa B and cell surface phenotype via two effector regions in its carboxy-terminal cytoplasmic domain. *Oncogene* **10** (3), 549-60.
- Hurley**, E.A., Agger, S., McNeil, J.A., Lawrence, J.B., Calendar, A., Lenoir, G., Thorley-Lawson, D. (1991). When EBV persistently infects B-cell lines, it frequently integrates. *J. Virol.* **65**, 1245-1254.
- Inoue**, N., Harada, S., Honma, T., Kitamura, T., Yanagi, K. (1991). The domain of Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 essential for binding to oriP region has a sequence fitted for the hypothetical basic-helix-loop-helix structure. *Virology* **182**, 84-93.
- Izumi**, K.M., Kaye, K.M., Kieff, E. (1994). Epstein-Barr virus recombinant molecular genetic analysis of the LMP1 amino-terminal cytoplasmic domain reveals a probable structural role, with no component essential for primary B-lymphocyte growth transformation. *J. Virol.* **68**, 4369-4376.
- Jankelevich**, S., Kolman, J.L., Bodnar, J.W., Miller, G. (1992). A nuclear matrix attachment region organizes the Epstein-Barr viral plasmid in Raji cells into a single DNA domain. *EMBO J.* **11**, 1165-1176.
- Jiang**, W.Q., Szekely, L., Wendel-Hansen, V., Ringertz, N., Klein, G., Rosen, A. (1991). Co-localization of the retinoblastoma protein and the Epstein-Barr virus-encoded nuclear antigen EBNA-5. *Exp. Cell. Res.* **197**, 314-318.
- Jochner**, N., D. Eick, U. Zimmer-Strobl, M. Pawlita, G. W. Bornkamm, B. Kempkes. 1996. Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 is a transcriptional suppressor of the
-

immunoglobulin mu gene: implications for the expression of the translocated c-myc gene in Burkitt's lymphoma cells. *EMBO J.* **15**, 375-382

- Johannsen**, E., Koh, E., Mosialos, G., Tong, X., Kieff, E., Grossman, E. (1994). Epstein-Barr virus nuclear protein 2 transactivation of the latent membrane protein 1 promoter is mediated by J kappa and PU.1. *J. Virol.* **69**, 253-262.
- Jones**, C.H., Hayward, S.D., Rawlins, D.R. (1989). Interaction of the lymphocyte-derived Epstein-Barr virus nuclear antigen EBNA-1 with its DNA binding sites. *J. Virol.* **63**, 101-110.
- Kaiser** C, Laux G, Eick D, Jochner N, Bornkamm GW, Kempkes B (1999). The proto-oncogene c-myc is a direct target gene of Epstein-Barr-Virus nuclear antigen 2. *J. Virol.* **73** (5), 4481-4484
- Kaye**, K.M., Izumi, K.M., Kieff, E. (1993). Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 is essential for B-lymphocyte growth transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 9150-9154.
- Kempkes**, B., Pich, G., Zeidler, R., Sugden, B., Hammerschmidt, W. (1995). immortalization of human B lymphocytes by a plasmid containing 71 kilobase of Epstein-Barr virus DNA. *J. Virol.* **69**, 231-238.
- Kempkes**, B., Spitkovsky, D., Jansen-Dürr, P., Ellwart, J.W., Kremmer, E., Delecluse, H.J., Rottenberger, C., Bornkamm, G.W., 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.
- Kenney**, SC., Holley-Guthrie, E., Mar, E.C., Smith, M. (1989). The Epstein-Barr virus BMLF1 promoter contains an enhancer element that is responsive to the BZLF1 and BRLF1 transactivators. *J. Virol.* **63**, 3878-3883.
- Kieff**, E., Liebowitz, D. (1991). Epstein-Barr virus and its replication. *Fundamental virology* (second edition), Raven Press Ltd., New York, Kapitel 35 .
- Kiledjian**, M., Dreyfuss, G. (1992). Primary structure and binding activity of hnRNA U protein: binding RNA through RGG box. *EMBO J.* **11**, 2655-2664.
- Kim**, A.L., Maher, M., Hayman, J.B., Ozer, J., Zerby, D., Yates, J.L., Lieberman, P.M (1997). An imperfect correlation between DNA replication activity of Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 (EBNA1) and binding to the nuclear import receptor, Rch1/impotin?? *Virology* **239**, 340-351.
- Kim**, N.W., Piatyszek, M.A., Prowse, K.R., Harley, C.B., West, M.D., Ho, P.L., Coviello, G.M., Wright, W.E., Weinrich, S.L., Shay, J.W. (1994). Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* **266**, 2011-2015.
- Kim**, N.W., Wu, F. (1997). Advances in quantification and characterization of telomerase activity by the telomeric repeat amplification protocol (TRAP). *Nucleic Acids Res.* **25**, 2595-2597.
- Kim**, O., Yates, J.L. (1993). Mutants of Epstein-Barr virus with a selective marker disrupting the TP gene transform B cells and replicate normally in culture. *J. Virol.* **67**, 7634-7640.
-

- Kirchmaier** AL, Sugden B (1998). Rep\*: a viral element that can partially replace the origin of plasmid DNA synthesis of Epstein-Barr virus. *J. Virol.* **72**(6), 4657-66.
- Klein**, G. (1989). Viral latency and transformation. The strategy of Epstein-Barr virus. *Cell* **58**, 5-8.
- Knutson**, J.C., (1990). The level of c-fgr RNA is increased by EBNA-2, an Epstein-Barr virus gene required for B-cell immortalization. *J. Virol.* **64**, 2530-2536.
- Ko**, L. J., C. Prives. (1996). p53: puzzle and paradigm. *Genes Dev.* **1**, 1054-1072
- Konishi** K, Maruo S, Kato H, Takada K (2001). Role of Epstein-Barr-Virus-encoded latent membrane protein 2A on virus-induced immortalization and virus activation. *J. Gen. Virol.* **82**, 1451-1456
- Koons** MD, Van Scoy S, Hearing J (2001). The replicator of the Epstein-Barr-Virus latent cycle origin of DNA replication, oriP, is composed of multiple functional elements. *J. Virol.* **75** (22), 10582-10592
- Laemmli**, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Laux**, G., Dugrillon, F., Eckert, C., Adam, B., Zimmer-Strobl, U., Bornkamm, G.W. (1994). Identification and characterization of an Epstein-Barr virus nuclear antigen 2-responsive cis elements in the bidirectional promoter region of latent membrane protein and terminal protein 2 genes. *J. Virol.* **68**, 6947-6958.
- Laux**, G., Perricaudet, M., Farrell, P.J. (1988). A spliced Epstein-Barr virus gene expressed in latently transformed lymphocytes is created by circularisation of the linear viral genome. *EMBO J.* **7**, 769-774.
- Lee**, H.W., Blasco, M.A., Gottlieb, G.J., Horner, J.W., II, Greider, C.W., DePinho, R.A. (1998). Essential role of mouse telomerase in highly proliferative organs. *Nature* **392**, 569-574.
- Lendvay**, T.S., Morris, D.K., Sah, J., Balasubramanian, B., Lundblad, V. (1996). Senescence mutants of *Saccharomyces cerevisiae* with a defect in telomere replication identify three additional EST genes. *Genetics* **144**, 1399-1412.
- Lerner**, M.R., Andrews, N.C., Miller, G., Steitz, J.A. (1981). Two small RNAs encoded by Epstein-Barr virus and complexed with systemic lupus erythematosus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 805-809.
- Levin**, N., Aman, P., Masucci, M.G., Klein, G., Öberg, B., Strander, H., Henle, W., Henle, G. (1987). Characterization of EBV-carrying B cell populations in healthy seropositive individuals with regard to density, release of transforming virus and spontaneous outgrowth. *Int. J. Cancer* **39**, 472-476.
- Liebowitz**, D., Kopan, R., Fuchs, E., Sample, J., Kieff, E. (1987). An Epstein-Barr virus transforming protein associates with vimentin in lymphocytes. *Mol. Cell. Biol.* **7**, 2299-2308.
- Liebowitz**, D., Mannik, J., Takada, K., Kieff, E. (1992). Phenotypes of Epstein-Barr virus LMP1 deletion mutants indicate transmembrane and amino-terminal cytoplasmic domains necessary for effect in B-lymphoma cells. *J. Virol.* **66**, 4612-4616.
-

- Lin, J.J., Zakian, V.A. (1995).** An in vitro assay for *Saccharomyces* telomerase requires EST1. *Cell* **81**, 1127-1135.
- Lindahl, T., Adams, A., Bjursell, G., Bornkamm, G.W., Kaschka-Dierich, C., Jehn, U. (1976).** Covalently closed circular duplex DNA of Epstein-Barr virus in a human lymphoid cell line. *J. Mol. Biol.* **102**, 511-530.
- Ling, P.D., Ryon, J.J., Hayward, S.D. (1993).** EBNA-2 of herpesvirus *Papio* diverges significantly from the type A and type B EBNA-2 proteins of Epstein-Barr virus but retains an efficient transactivation domain with a conserved hydrophobic motif. *J. Virol.* **67**, 2990-3003.
- Lingner, J., Cech, T.R. (1996).** Purification of telomerase from *Euplotes aediculatus*: requirement of a primer 3' overhang. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 10712-10717.
- Lingner, J., Cech, T.R., Hughes, T.R., Lundblad, V. (1997a).** Three ever shorter telomere (EST) genes are dispensable for in vitro yeast telomerase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 11190-11195.
- Lingner, J., Hughes, T.R., Shevchenko, A., Mann, M., Lundblad, V., Cech, T.R. (1997b).** Reverse transcriptase motifs in the catalytic subunit of telomerase. *Science* **276**, 561-567.
- Lingner, J., Hendrick, L.L., Cech, T.R. (1994).** Telomerase RNAs of different ciliates have a common secondary structure and a permuted template. *Genes Dev.* **8**, 1984-1998.
- Loeb, J.D., Schlenstedt, G., Pellman, D., Kornitzer, D., Silver, P.A., Fink, G.R. (1995).** The yeast nuclear import receptor is required for mitosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 7647-7651.
- Longnecker, R., Druker, B., Roberts, T., Kieff, E. (1991).** An Epstein-Barr virus protein associated with cell growth transformation interacts with a tyrosine kinase. *J. Virol.* **65**, 3681-3692.
- Longnecker, R., Kieff, E. (1990).** A second Epstein-Barr virus membrane protein (LMP2) is expressed in latent infection and colocalizes with LMP1. *J. Virol.* **64**, 2319-2326.
- Longnecker, R., Miller, C.L., Miao, X.Q., Tomkinson, B., Kieff, E. (1993).** The last seven transmembrane and carboxy-terminal cytoplasmic domains of Epstein-Barr virus latent membrane protein 2 (LMP2) are dispensable for lymphocyte infection and growth transformation *in vitro*. *J. Virol.* **67**, 2006-2013.
- Lowe, S. W., H. E. Ruley. (1993).** Stabilization of the p53 tumor suppressor is induced by adenovirus 5 E1A and accompanies apoptosis. *Genes Dev.* **7**, 535-545
- Lupton, S., Levine, A.J. (1985).** Mapping genetic elements of Epstein-Barr virus that facilitate extrachromosomal persistence of Epstein-Barr virus-derived plasmids in human cells. *Mol. Cell. Biol.* **5**, 2533-2542.
- Mackey, D., Middleton, T., Sugden, B. (1995).** Multiple regions within EBNA1 can link DNAs. *J. Virol.* **69**, 6199-6208.
-

- Mannick**, J.B., Cohen, J.I., Birkenbach, M., Marchini, A., Kieff, E. (1991). The Epstein-Barr virus nuclear protein encoded by the leader of the EBNA RNAs (EBNA-LP) is important in B-lymphocyte transformation. *J. Virol.* **65**, 6826-6837.
- Marschall**, M., Schwarzmann, F., Leser, U., Oker, B., Alliger, P., Mairhofer, H., Wolf, H. (1991). The B'LF4 trans-activator of Epstein-Barr virus is modulated by type and differentiation of the host cell. *Virology.* **181** (1), 172-179.
- Martin**, J., Sugden, B. (1991). The latent membrane protein oncoprotein resembles growth factor receptors in the properties of its turnover. *Cell. Growth Differ.* **2**, 653-600.
- Martin-Rivera**, L., Herrera, E., Albar, J.P., Blasco, M.A. (1998). Expression of mouse telomerase catalytic subunit in embryos and adult tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 10471-10476.
- Masucci**, M.G., Ernberg, I. (1994). Epstein-Barr virus: A daption to a life within the immune system. *Trends in Microbiology* **2**, 125-130.
- Matsuo**, T., Heller, M., Petti, L., O'Shiro, E., Kieff, E. (1984). Persistence of the entire Epstein-Barr virus genome integrated into human lymphocyte DNA. *Science* **226**, 1322-1325.
- Maxam**, A.M., Gilbert, W. (1980). Sequencing end-labeled DNA with base-specific chemical cleavages. *Methods Enzymol.* **65**, 499-560.
- McEachern**, M.J., and Blackburn, E.H. (1996). Cap-prevented recombination between terminal telomeric repeat arrays (telomere CPR) maintains telomeres in *Kluyveromyces lactis* lacking telomerase. *Genes Dev.* **10**, 1822-1834.
- Meyerson**, M. (1997). hEST2, the putative human telomerase catalytic subunit gene, is up-regulated in tumor cells and during immortalization. *Cell* **90**, 785-795.
- Middledorp**, J.M., Schielen, W. (1996). Probing the structure of the ori-P binding region of EBNA-1 using epitope analysis and computer modelling techniques. 21<sup>st</sup> Herpesvirus Workshop, DeKalb, Abstract, 38.
- Middleton**, T., Gahn, T.A., Martin, J.M., Sugden, B. (1991). Immortalizing genes of Epstein-Barr virus. *Adv. Virus Rs.* **40**, 19-55.
- Middleton**, T., Sugden, B. (1992). EBNA1 can link the enhancer element to the initiator element of the Epstein-Barr virus plamid origin of DNA replication. *J. Viro.* **66**, 489-495.
- Middleton**, T., Sugden, B. (1992). A chimera of EBNA1 and the estrogen receptor activates transcription but not replication. *J. Virol.* **66**, 1795-1798.
- Middleton**, T., Sugden, B. (1994). Retention of plasmid DNA in mammalian cells is enhanced by the binding of the Epstein-Barr virus replication protein EBNA1. *J. Virol.* **68**, 4067-4071.
- Miller**, C.L., Lee, J.H., Kieff, E., Longnecker, R. (1994). An integral membrane protein (LMP2) blocks reactivation of Epstein-Barr virus from latency following surface immunoglobulin crosslinking. *Proc. Acad. Sci. USA* **91**, 772-776.
-

- Miller**, C.L., Longnecker, R., Kieff, E. (1993). Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A blocks calcium mobilization in B lymphocytes. *J. Virol.* **67**, 3087-3094.
- Miller**, C.L., Lee, J.H., Kieff, E., Longnecker, R. (1994). An integral membrane protein (LMP2) blocks reactivation of Epstein-Barr virus from latency following surface immunoglobulin crosslinking. *Proc. Acad. Sci. USA* **91**, 772-776.
- Miller**, C.L., Burkhardt, A.L., Lee, J.H., Stealey, B., Longnecker, R., Bolen, J.B., Kieff, E. (1995). Integral membrane protein 2 of Epstein-Barr virus regulates reactivation from latency through domain negative effects on protein-tyrosine kinases. *Immunity* **2**, 155-166.
- Miller**, G., Niederman, J.C., Andrews, L.L. (1973). Prolonged oropharyngeal excretion of Epstein-Barr virus after infectious mononucleosis. *N. Engl. J. Med.* **288**, 229-232.
- Miller**, G. (1990). Epstein-Barr virus. Biology, pathogenesis and medical aspects. In: *Virology*, Second edition. Hrsg.: Fields, B.N., Knipe, D.M., et al., Raven Press Ltd., New York, 1921-1958.
- Miller**, N., Hutt-Fletcher, L.M. (1988). A monoclonal antibody to glycoprotein gp85 inhibits fusion but not attachment to Epstein-Barr virus. *J. Virol.* **62**, 2366-2372.
- Milman**, G., Hwang, E.S. (1987). Epstein-Barr virus nuclear antigen forms a complex that binds with high concentration dependence to a single DNA-binding site: *J. Virol.* **61**, 465-471.
- Mirkovitch**, J., Mirault, M.E., Laemmli, U.K. (1984). Organization of the higher-order chromatin loop: specific DNA attachment sites on nuclear scaffold. *Cell* **39**, 223-232.
- Miyashita**, E.M., Yang, B., Lam, K., Crawford, D.H., Thorley-Lawson, D.A. (1995). A novel form of Epstein-Barr virus latency in normal B-cells *in vivo*. *Cell* **80**, 593-601.
- Modrow**, S., Falke, D. (1996). *Molekulare Virologie*. In: Spektrum Lehrbuch, Heidelberg, Kapitel 18.4.
- Moorthy**, R.K., Thorley-Lawson, D.A. (1993). Biochemical, genetic, and functional analyses of the phosphorylation sites on the Epstein-Barr virus-encoded oncogenic latent membrane protein LMP-1. *J. Virol.* **67**, 2637-2645.
- Moorthy**, R.K., Thorley-Lawson, D.A. (1993). All three domains of the Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein LMP-1 are required for transformation of rat-1 fibroblasts. *J. Virol.* **67**, 1638-1646.
- Moriuchi**, H., Moriuchi, M., Cohen, J.I. (1995). Proteins and cis-acting elements associated with transactivation of the varicella-zoster virus (VZV) immediately-early gene 62 promoter by VZV open reading frame 10 protein. *J. Virol.* **69**, 4693-4701.
- Mosialos**, G., Birkenbach, M., VanArsdale, T., Ware, C., Yalamanchili, R., Kieff, E. (1995). The Epstein-Barr virus transforming protein LMP1 engages signaling proteins for the tumor necrosis factor receptor family. *Cell* **80**, 389-399.
- Mosialos**, G., Hanislian, S.H., Jawahar, S., Vara, L., Kieff, E., Chatila, T.A. (1994). A  $Ca^{2+}$ /calmodulin dependent protein kinase, CaM kinase-Gr, expressed after transformation of primary human B lymphocytes by Epstein-Barr virus (EBV) is induced by the Epstein-Barr virus oncogene LMP1. *J. Virol.* **68**, 1697-1705.
-

- Moss**, D.J., Schmidt, C., Eliot, S., Suhrbier, A., Burrows, S., Khanna, R. (1996). Strategies involved in developing an effective vaccine for EBV-associated diseases. *Adv. Cancer Res.* **69**, 213-145.
- Mowat**, M. R. (1998). p53 in tumor progression: life, death, and everything. *Adv. Cancer Res.* **74**, 25-48
- Nagata**, G., Guggenheimer, R.A., Enomoto, T., Lichy, J.H., Hurwitz, J. (1982). Adenovirus DNA replication in vitro: identification of a host factor that stimulates synthesis of the preterminal protein-dCMP complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 6438-6442.
- Nakamura**, T.M., Morin, G.B., Chapman, K.B., Weinrich, S.L., Andrews, W.H., Lingner, J., Harley, C.B., Cech, T.R. (1997). Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human. *Science* **277**, 955-959.
- Nakayama**, J., Saito, M., Nakamura, H., Matsuura, A., Ishikawa, F. (1997). TLP1: a gene encoding a protein component of mammalian telomerase is a novel member of WD repeats family. *Cell* **88**, 875-884.
- Nemerow**, G.R., Mold, C., Keivens-Schwend, V., Tollefson, V., Cooper, N.R. (1987). Identification of gp350 as the viral glycoprotein mediating attachment of Epstein-Barr virus (EBV) to the EBV/C3d receptor of B cells: sequence homology of gp350 and C3 complement fragment C3d. *J. Virol.* **61**, 1416-1420.
- Niller**, H.H., Glaser, G., Knüchel, R., Wolf, H. (1995). Nucleoprotein complexes and DNA 5'-ends at oriP of Epstein-Barr virus. *J. Biol. Chem.* **270**, 12846-12868.
- Niller**, H.H., Hennighausen, L. (1991). Formation of several specific nucleoprotein complexes on the human cytomegalovirus immediate early enhancer. *Nucl. Acids Res.* **19**, 3715-3721.
- Niller** HH, Salamon D, Takacs M, Uhlig J, Wolf H, Minarovits J (2001). Protein-DNA-interaction and CpG methylation at rep\*/vIL-10p of latent Epstein-Barr-Virus genomes in lymphoid cell lines. *Biol. Chem.* **382**, 1411-1419
- Nonoyama**, M., Pagano, J.S. (1972). Separation of Epstein-Barr virus DNA from large chromosomal DNA in non-virus-producing cells. *Nat. New Biol.* **238**, 169-171.
- Oh**, S.J., Chittenden, T., Levine, A.J. (1991). Identification of cellular factors that bind specifically to the Epstein-Barr virus origin of DNA replication. *J. Virol.* **65**, 514-519.
- Okubo** M, Tsurukubo Y, Higaki T, Kawabe T, Goto M, Murase T, Die T, Furuichi Y, 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**(1), 30-34.
- Petti**, L., Sample, C., Kieff, E. (1990). Subnuclear localization and phosphorylation of Epstein-Barr virus latent infection nuclear proteins. *Virology* **176**, 563-574.
- Platt**, T.H.K., Tcherepanova, I.Y., Schildkraut, C.L. (1993). Effect of number and position of EBNA-1 binding sites in Epstein-Barr virus oriP on the sites of initiation, barrier formation, and termination of replication. *J. Virol.* **67**, 1739-1745.
-

- Polvino-Bodnar**, M., Schaffer, P.A. (1988). Mutational analysis of Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 (EBNA1). *Nucl. Acids Res.* **16**, 3415-3434.
- Pope**, J.H., Home, M.K., Scott, W. (1968). Transformation of fetal human leucocytes in vitro by filtrates of a human leukemic cell line containing herpes-like virus. *Int. J. Cancer* **3**, 857-866.
- Powers**, M.A., Forbes, D.J. (1994). Cytosolic factors in nuclear transport. What's importin? *Cell* **79**, 931-934.
- Prang**, N.S., Hornef, M.W., Jäger, M., Wagner, W.J., Wolf, H., Schwarzmann, F. (1997). Lytic replication of Epstein-Barr virus in the peripheral blood: Analysis of viral gene expression in B-lymphocytes during infectious mononucleosis and in the normal carrier state. *Blood* **89**, 1665-1677.
- Puck**, T.T., Marcus, P.J., Cieciura, S.J. (1956). Clonal growth of mammalian cells in vitro. *J. Exp. Med.* **103**, 273-284.
- Pulvertaft**, R.J.V. (1964). Cytology of Burkitt's tumor (African lymphoma). *Lancet* **10**, 238-240.
- Pulvertaft**, R.J.V. (1965). A study of malignant tumors in Nigeria by short term tissue culture. *J. Clin. Pathol.* **18**, 261-273.
- Purtilo**, D.T., Sakamoto, K., Barnabei, V., Seeley, J., Bechtold, T., Rogers, G., Yetz, J., Harada, S. (1982). Epstein-Barr virus-induced diseases in boys with the X-linked lymphoproliferative syndrome (XLP): update on studies of the registry. *Am. J. Med.* **73**, 49-56.
- Qu**, L., Rowe, D.T. (1992). Epstein-Barr virus latent gene expression in uncultured peripheral blood lymphocytes. *J. Virol.* **66**, 3715-3724.
- Quinlivan**, E.B., Holley-Guthrie, E.A., Norris, M., Gutsch, D., Bachenheimer, S.L., Kenney, S.C. (1993). Direct BRLF1 binding is required for cooperative BZLF1/BRLF1 activation of the Epstein-Barr virus early promoter, BMRF1. *Nucl. Acids Res.* **21**, 1999-2007.
- Rawlins**, D.R., Milman, G., Hayward, G.S. (1985) Sequence specific DNA binding of the Epstein-Barr virus nuclear antigen (EBNA-1) to clustered sites in the plasmid maintenance region. *Cell* **42**, 859-868.
- Reid**, P. (1992). Apoptotic cell death induced by c-myc is inhibited by bcl-2. *Nature* **359**, 552-554.
- Reisman**, D., Yates, J., Sugden, B. (1985). A putative origin of replication of plasmids derived from Epstein-Barr virus is composed of two *cis*-acting components. *Mol. Cell. Biol.* **5**, 1822-1832
- Reisman**, D., Sugden, B. (1986). *trans* Activation of an Epstein-Barr viral transcriptional enhancer by the Epstein-Barr viral nuclear antigen 1. *Mol. Cell. Biol.* **6**, 3838-3846.
- Ring**, C.J.A. (1994). The B cell-immortalizing functions of Epstein-Barr virus. *J. Gen. Virol.* **75**, 1-13.
- Roizman**, B., Sears, A.E. (1996). Herpesviridae. In: *Virology*, Third edition. Hrsg.: Fields, B.N., Knipe, D.M., *et al.*, Raven Press Ltd., New York, 2221-2230.
-

- Roizman, B., Carmichael, L.E., Deinhardt, F., de The, G., Nahmias, A.J., Plowright, W., Rapp, F., Sheldrick, P., Takahashi, M., Wolf, K. (1981).** Herpesviridae: definition, provisional nomenclature and taxonomy. *Intervirology* **16**, 201-217.
- Romero, D.P., Blackburn, E.H. (1991).** A conserved secondary structure for telomerase RNA. *Cell* **67**, 343-353.
- Rooney, C., Howe, J.G., Speck, S.H., Miller, G. (1989).** Influences of Burkitt's lymphoma and primary B cells on latent gene expression by the nonimmortalizing P3J-HR-1 strain of Epstein-Barr virus, *J. Virol.* **63**, 1531-1539.
- Rooney, C., Rowe, D.T., Ragot, T., Farrell, P.J. (1989).** The spliced BZLF1 gene of Epstein-Barr virus transactivates an early EBV promoter and induces the virus productive cycle. *J. Virol.* **63**, 3109-3116.
- Rowe, M., Lear, A.L., Croom-Carter, D., Davies, A.H., Rickinson, A.B. (1992).** Three pathways of Epstein-Barr virus gene activation from EBNA1-positive latency in B lymphocytes. *J. Viro.* **66**, 122-131.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989).** *Molecular Cloning, A laboratory manual*, 2nd edition. Cold Spring Harbour Laboratory, New York.
- Sample, J., Henson, E.B.D., Sample, C. (1992).** The Epstein-Barr virus nuclear protein 1 promoter active in type I latency is autoregulated. *J. Virol.* **66**, 4654-4661.
- Sandvej, K., Krenacs, L., Hamilton dutoit, S.J., Rindum, J.L., Pindborg, J.J., Pallesen, G. (1992).** Epstein-Barr virus latent and replicative gene expression in oral hairy leukoplakia. *Histopathology* **20**, 387-395.
- Sandberg, M., Hammerschmidt, W., Sugden, B. (1997).** Characterization of LMP-1's association with TRAF1, TRAF2, and TRAF3. *J. Virol.* **71**, 4649-4656.
- Scala, G., Quinto, I., Ruocco, M.R., Mallardo, M., Ambrosino, C., Squitieri, B., Tassone, P., Venuta, S. (1993).** Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 transactivates the long terminal repeat of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* **67**, 2853-2861.
- Schepers, A., Pich, D., Hammerschmidt, W. (1993).** A transcription factor with homology to the AP-1 family links RNA transcription and DNA replication in the lytic cycle of Epstein-Barr virus. *EMBO J.* **12**, 3912-3929.
- Schepers A, Ritzi M, Bousset K, Kremmer E, Yates JL, Harword J, Diffley JF, Hammerschmidt W (2001).** Human origin recognition complex binds to the region of the latent origin of DNA replication of Epstein-Barr-Virus. *EMBO* **20**, 4588-4602
- Schnapp, G., Rodi, H.P., Rettig, W.J., Schnapp, A., Damm, K. (1998).** One-step affinity purification protocol for human telomerase. *Nucleic Acids Res.* **26**, 3311-3313.
- Sculley, T.B., Kreofsky, T., Pearson, G.R., Spelsberg, T.C. (1983).** Partial purification of the Epstein-Barr virus nuclear antigen(s). *J. Biol. Chem.* **258**, 3974-3982.
- Sieweke M. H., Tekotte H., Jarosch U., Graf T. (1998).** Cooperative interaction of Ets-1 with USF-1 required for HIV-1 enhancer activity in T cells. *EMBO J.* **17**, 1728-1739
- Sinclair, A.J., Brimmell, M., Shanahan, F., Farrell, P.J. (1991).** Pathways of activation of the Epstein-Barr virus productive cycle. *Virology* **65**, 2237-2244.
-

- Sinclair**, A.J., Palermo, I., Peters, G., Farrell, P.J. (1994). EBNA-2 and EBNA-LP cooperate to cause G0 to G1 transition during immortalization of resting human B lymphocytes by Epstein-Barr virus. *EMBO J.* **13**, 3321-3328.
- Singer**, M.S., Gottschling, D.E. (1994). TLC1: template RNA component of *Saccharomyces cerevisiae* telomerase. *Science* **266**, 404-409.
- Sixbey**, J.W., Nedrud, J.G., Raab-Traub, N., Hanes, R.A., Pagano, J.S. (1984). Epstein-Barr virus replication in oropharyngeal epithelial cells. *N. Engl. J. Med.* **310**, 1225-1230.
- Snudden**, D.K., Hearing, J., Smith, P.R., Grässer, F.A., Griffin, B.E. (1994). EBNA-1, the major nuclear antigen of Epstein-Barr virus, resembles 'RRGG'RNA binding proteins. *EMBO J.* **13**, 4840-4847.
- Snudden**, D.K., Smith, P.R., Lai, G., Ng, M.H., Griffin, B.E. (1995). Alterations in the structure of the EBV nuclear antigen, EBNA1, in epithelial cell tumors. *Oncogene* **10**, 1545-1552.
- Spear**, P.G. (1985). Glycoproteins specified by herpes simplex virus. In: *The Herpesviruses*, Vol. 3. Hrsg.: Roizman, B., Plenum Publishing Corp., New York, 315-356.
- Spender** LC, Cornish GH, Rowland B, Kempkes B, Farrell P (2001). Direct and indirect regulation of cytokine and cell cycle proteins by EBNA-2 during Epstein-Barr-Virus infection. *J. Virol.* **75** (8), 3537-3546
- Srinivas** SK, Sixbey JW. (1995). Epstein-Barr virus induction of recombinase-activating genes RAG1 and RAG2. *J Virol.* **12**, 8155-8159.
- Srinivasan**, A., K. W. Peden, J. M. Pipas. (1989). The large tumor antigen of simian virus 40 encodes at least two distinct transforming functions. *J. Virol.* **63**, 5459-5463
- Steiner**, B.R., Hidaka, K., Futcher, B. (1996). Association of the Est1 protein with telomerase activity in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 2817-2821.
- Sugden**, B., Warren, N. (1989). A promoter of Epstein-Barr virus that can function during latent infection can be transactivated by EBNA-1, a viral protein required for viral DNA replication during latent infection. *J. Virol.* **63**, 2644-2649.
- Sekely**, L., Selivanova, G., Magnusson, K.P., Klein, G., Wiman, K.G. (1993). EBNA-5, an Epstein-Barr virus-encoded nuclear antigen, binds to the retinoblastoma and p53 proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 5455-5459.
- Tanner**, J., Weis, J., Fearon, D., Whang, Y., Kieff, E., (1987). Epstein-Barr virus gp350/250 binding to the B lymphocyte C3d receptor mediates adsorption, capping, and endocytosis. *Cell* **50**, 203-213.
- Tanner**, J., Whang, J., Sears, A., Kieff, E. (1988). Soluble gp350/250 and deletion mutant glycoproteins block Epstein-Barr virus adsorption to lymphocytes. *J. Virol.* **62**, 4452-4464.
- Thorley-Lawson**, D.A., Miyashita, E.M., Khan, G. (1996). Epstein-Barr virus and the B cell: that's all it takes. *Trends in Microbiology* **4**, 204-208.
-

- Toczyski**, D.P., Matera, A.G., Ward, D.C., Steitz, J.A. (1994). The Epstein-Barr virus (EBV) small RNA EBER1 binds and relocalizes ribosomal protein L22 in EBV-infected human B lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 3463-3467.
- Toczyski**, D.P., Steitz, J.A. (1993). The cellular RNA-binding protein EAP recognizes a conserved stem-loop in the Epstein-Barr virus small RNA EBER1. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 703-710.
- Tomkinson**, B., Kieff, E. (1992). Use of the second site homologous recombination to demonstrate that Epstein-Barr virus nuclear protein EBNA-3B is not important for B-lymphocyte infection or growth transformation *in vitro*. *J. Virol.* **66**, 2893-2903.
- Tomkinson**, B., Robertson, E., Kieff, E. (1993). Epstein-Barr virus nuclear proteins (EBNA) 3A and 3C are essential for B lymphocyte growth transformation. *J. Virol.* **67**, 2014-2025.
- Tsui**, S., Schubach, W.H. (1994). Epstein-Barr virus nuclear protein 2A forms oligomers *in vitro* and *in vivo* through a region required for B-cell transformation. *J. Virol.* **68**, 4287-4294.
- Urie**, G., Buisson, M., Chambard, P., Sergeant, A. (1989). The Epstein-Barr virus early protein EB1 activates transcription from different responsive elements including AP-1 sites. *EMBO J.* **8**, 1447-1453.
- van Boxel**, J.A., Buell, D.N. (1974). IgD on cell membranes of human lymphoid cell lines with a multiple immunoglobulin classes. *Nature* **251**, 443-444.
- Vaziri**, H., and Benchimol, S. (1998). Reconstitution of telomerase activity in normal human cells leads to elongation of telomeres and extended replicative life span. *Curr. Biol.* **8**, 279-282.
- Vogel**, M., Wittmann, K., Endl, E., Glaser, G., Knüchel, R., Wolf, H., Niller, H.H. (1998). Plasmid maintenance assay based on green fluorescent protein and FACS of mammalian cells. *BioTechniques* **24**, 540-544.
- Wang**, D., Liebowitz, D., Kieff, E. (1985). An EBV membrane protein expressed in immortalized lymphocytes transforms established rodent cells. *Cell* **42**, 831-840.
- Wang**, F., Gregory, C.D., Rowe, M., Rickinson, A.B., Wang, B., Birkenbach, M., Kikutani, H., Kishimoto, T., Kieff, E. (1987). Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 specifically induces expression of the B-cell activation antigen CD23. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 3452-3456.
- Wang**, F., Gregory, C., Sample, C., Rowe, M., Lieboitz, D., Murray, R., Rickinson, A., Kieff, E. (1990). Epstein-Barr virus latent membrane protein (LMP1) and nuclear proteins 2 and 3C are effectors of phenotypic changes in B lymphocytes: EBNA-2 and LMP1 cooperatively induces CD23. *J. Virol.* **64**, 2309-2318.
- Wang**, F., Tsang, S.F., Kurilla, M.G., Cohen, J.I., Kieff, E. (1990). Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 transactivates latent membrane protein LMP1. *J. Virol.* **64**, 3407-3416.
- Watanabe**, S., T. Kanda, K. Yoshiike. (1989). Human papillomavirus type 16 transformation of primary human embryonic fibroblasts requires expression of open reading frames E6 and E7. *J. Virol.* **63**, 965-969
-

- Weinrich**, S.L. (1997). Reconstitution of human telomerase with the template RNA component hTR and the catalytic protein subunit hTERT. *Nat. Genet.* **17**, 498-502.
- Wen**, L.T., Lai, P.K., Bradley, G., Tanaka, A., Nonoyama, M. (1990). Interaction of Epstein-Barr viral (EBV) origin of replication (oriP) with EBNA-1 and cellular anti-EBNA-1 proteins. *Virology* **178**, 293-296.
- Wick** M, Zubov D, Hagen G (1999). Genomic organization and promoter characterization of the gene encoding the human telomerase reverse transcriptase (hTERT). *Gene* **232**, 97-106
- Wildy**, P., Watson, D.H. (1963). Electron microscopic studies on the architecture of animal viruses. *Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **27**, 25-47.
- Wolf**, H., Bogedain, C., Schwarzmann, F. (1993). Epstein-Barr virus and its interaction with the host. *Intervirology* **35**, 26-39.
- Wolf**, H., Haus, M., Wilmes, E. (1984). Persistence of Epstein-Barr virus in the parotid gland. *J. Virol.* **51**, 795-798.
- Wysokenski**, D.A., Yates, J.L. (1989). Multiple EBNA1-binding sites are required to form an EBNA1-dependent enhancer and to activate a minimal replicative origin within *oriP* of Epstein-Barr virus. *J. Virol.* **63**, 2657-2666.
- Yang**, X, Sham J, Ng M, Tsao SW, Zhang D, Lowe SW, Cao L (2000). LMP1 of Epstein-Barr-Virus induces proliferation of primary mouse embryonic fibroblasts and cooperatively transforms the cells with a p16-insensitive CDK4 oncogene. *J. Virol.* **74** (1), 883-891
- Yaswen**, L.R., Stephens, E.B., Davenport, L.C., Hutt-Fletcher, L.M. (1993). Epstein-Barr virus glycoprotein gp85 associates with the BKRF2 gene product and is incompletely processed as a recombinant protein. *Virology* **195**, 387-396.
- Yates**, J.L., Guan, N. (1991). Epstein-Barr virus-derived plasmids replicate only once per cell cycle and are not amplified after entry into cells. *J. Virol.* **65**, 483-488.
- Yates**, J.L., Warren, N., Reisman, D., Sugden, B. (1984). A cis-acting element from the Epstein-Barr viral genome that permits stable replication of recombinant plasmids in latently infected cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 3806-3810.
- Yates**, J.L., Warren, N., Sugden, B. (1985). Stable replication of plasmids derived from Epstein-Barr virus in various mammalian cells. *Nature* **313**, 812-815.
- Yin** L, Hubbard A, Giardina C (2000). NF- $\kappa$ B regulates transcription of the mouse telomerase catalytic subunit. *J. Biol. Chem.* **275**, 36671-36675
- Zdziencka**, M.Z., Tran, Q., van der Schans, G.P., Simons, J.W. (1988). Characterization of an X-ray-hypersensitive mutant of V79 Chinese hamster cells. *Mutat. Res.* **194**, 239-249.
- Zhai**, Z.H., Wang, X., Qian, X.Y. (1988). Nuclear matrix-intermediate filament system and its alteration in adenovirus infected HeLa cell. *Cell. Biol. Int. Rep.* **12**, 99-108.
- Zhang**, D., Frappier, L., Gibbs, E., Hurwitz, J., O'Donnell, M. (1998). Human RPA (hSSB) interacts with EBNA1, the latent origin binding protein of Epstein-Barr virus. *Nucl. Acids. Res.* **26**, 631-637.
-

- Zhang**, Q., Brooks, L., Busson, P., Wang, F., Charron, D., Kieff, E., Rickinson, A.B., Tursz, T. (1994). The cellular proteins that bind specifically to the Epstein-Barr virus (EBV) latent membrane protein 1 increases HLA class II expression in an EBV-negative B cell line. *Eur. J. Immunol.* **24**, 1467-1470.
- Zhang**, S., Nonoyama, M. (1994). The cellular proteins that bind specifically to the Epstein-Barr virus origin of plasmid DNA replication belong to a gene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 2843-2847.
- Zimber**, U., Addinger, H.K., Lenoir, G.M., Vuillaume, M., Knebel-Doeberitz, M.V., Laux, G., Desgranges, C., Wittmann, P., Freese, U.K., Schneider, U., Bornkamm, G.W. (1986). Geographical prevalence of two types of Epstein-Barr virus. *Virology* **154**, 56-66.
- Zimber-Strobl**, U., Suentzenich, K.O., Laux, G., Eick, D., Cordier, M., Calender, A., Billaud, M., Lenoir, G.M., Bornkamm, G.W. (1991). Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 activates transcription of the terminal protein gene. *J. Virol.* **65**, 415-423.
- zur Hausen**, H., O'Neill, F.J., Freese, U.K., Hecker, E. (1978). Persisting oncogenic herpesvirus induced by the tumor promoter TPA. *Nature* **272**, 373-375.
-

## 7. Eigene Arbeiten

- Salamon**, D., Takacs, M., Ujvari, D., **Uhlig**, J., Wolf, H., Minarovits, J., Niller, H.H. (2001). Protein-DNA binding and CpG methylation at nucleotide resolution of latency-associated promoters Qp, Cp, and LMP1p of Epstein-Barr virus. *J Virol.* 75 (6), 2584-96.
- Takacs** M, Salamon D, Myohanen S, Li H, Segesdi J, Ujvari D, **Uhlig** J, Niller HH, Wolf H, Berencsi G, Minarovits J. (2001) Epigenetics of latent Epstein-Barr virus genomes: high resolution methylation analysis of the bidirectional promoter region of latent membrane protein 1 and 2B genes. *Biol Chem* 382 (4), 699-705.
- Niller** HH, Salamon D, Takacs M, **Uhlig** J, Wolf H, Minarovits J. (2001). Protein-DNA-interaction and CpG methylation at rep\*/vIL-10p of latent Epstein-Barr Virus genomes in lymphoid cells. *Biol. Chem.* 382 (10), 1411-1419
- Niller** HH, Salamon D, **Uhlig** J, Ranf S, Granz M, Schwartzmann F, Wolf H, Minarovits J. (2002). Nucleoprotein structure of immediate-early promoters Zp and Rp, and of oriLyt of latent Epstein-Barr virus genomes. *J Virol.* 76 (8), 4113-8
-

# Danksagung

## **Prof. Dr. Hans Wolf**

danke ich zur Bereitstellung des Arbeitsplatzes in seinem Institut.

## **Prof. Dr. Armin Kurtz**

danke ich für die Vertretung der Arbeit vor der Fakultät.

## **Dr. Hans-Helmut Niller**

danke ich für die Themenstellung, die Betreuung und Anleitung sowie die Einführung in eine Vielzahl molekularbiologischer Methoden.

## **Dr. Markus Müller**

danke ich für technische und menschliche Unterstützung während der Zeit meiner Dissertation.

## **Dr. Gerald Glaser und Matthias Vogel**

danke ich für das kollegiale und freundschaftliche Arbeitsverhältnis innerhalb der Arbeitsgruppe.

## **Meiner Familie**

danke ich für die meist wohlwollende Hinnahme zahlreicher Entbehrungen während dieser Zeit.

---

Hiermit versichere ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfaßt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe.

Lappersdorf, der 23.11.2001

Jörg Uhlig

---