

**Der Übergang von der Latenz
zur lytischen Replikation des Epstein-Barr-Virus:
Vergleichende Analysen zur Bedeutung
regulatorischer HI-Motive im Promotor
des viralen Gens BZLF-1**



Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) der
Naturwissenschaftlichen Fakultät III – Biologie
und Vorklinische Medizin der Universität Regensburg

Vorgelegt von
Heide Sommer aus Nürnberg

2001

Promotionsgesuch wurde eingereicht am: _____

Die Arbeit wurde angeleitet von: Prof. Dr. Hans Wolf

Prüfungsausschuss:

Prof. Dr. Stephan Schneuwly (Vorsitzender)
Prof. Dr. Rainer Deutzmann
Prof. Dr. Hans Wolf
Prof. Dr. Dr. Hans Robert Kalbitzer
Prof. Dr. Georg Löffler i.R. (Ersatzprüfer)

Die vorliegende Arbeit wurde selbständig und
ohne Zuhilfenahme unzulässiger Hilfsmittel angefertigt,

Heide Sommer

Die Arbeit wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Rainer Deutzmann betreut.

Inhaltsverzeichnis

<i>Inhaltsverzeichnis</i>	<i>I</i>
<i>Verzeichnis der im Text verwendeten Abkürzungen</i>	<i>IV</i>
<i>Zusammenfassung</i>	<i>VII</i>
<i>1 Einleitung</i>	<i>1</i>
1.1 Die Familie der Herpesviren	1
1.2 Das Epstein-Barr-Virus	2
1.2.1 Die Entdeckung des Epstein-Barr-Virus	2
1.2.2 EBV-assoziierte Erkrankungen	3
1.2.3 Genomstruktur des Epstein-Barr-Virus	7
1.2.4 Der Infektionsweg von EBV	9
1.2.5 Latente Infektion und Immortalisierung von B-Zellen	10
1.2.6 Die lytische Vermehrung des Epstein-Barr-Virus	15
1.2.7 Das BZLF-1-Gen	16
1.2.8 Die Regulation des BZLF-1-Gens	18
1.3 Zielsetzung der Arbeit	23
2 Material und Methoden	25
2.1 Ausgangsmaterialien	25
2.1.1 Bakterien	25
2.1.2 Nährmedien für Bakterien	26
2.1.3 Verwendete Ausgangsplasmide	26
2.1.4 Zelllinien	27
2.1.5 Verwendete Antikörper und Seren	29
2.1.6 Verwendete Oligonukleotide	29
2.1.7 Verwendete EDV-Programme	33
2.2 Arbeiten mit Bakterien	34
2.2.1 Anzucht von Bakterien im Fermenter	34
2.2.2 Transformation von Bakterien	34
2.2.3 Aufbewahrung von Bakterienkulturen	36
2.3 Arbeiten mit Zellkulturen	36
2.3.1 Transfektion von eukaryotischen Zellen	36
2.3.2 Nachweissysteme für Reporterproteine	38
2.3.3 Chemische Induktion der lytischen Replikation von EBV	39
2.3.4 Aufbewahrung von Zellkulturen	39

2.4	Arbeiten mit Proteinen	40
2.4.1	Gekoppelte <i>in vitro</i> -Transkription und Translation (Promega, Mannheim)	40
2.4.2	Expression von Zta-Protein in Bakterien	40
2.4.3	Analyse von Proteinen mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	41
2.4.4	Western Blot-Analyse	41
2.4.5	Proteinmengenbestimmung	42
2.4.6	Gelretardations-Experimente (<i>Bandshift</i>)	42
2.4.7	Immunfluoreszenz	45
2.5	Arbeiten mit DNA	45
2.5.1	Isolierung von DNA	45
2.5.2	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	47
2.5.3	Restriktionsenzymverdau von Plasmid-DNA	48
2.5.4	Gelelektrophorese von DNA	48
2.5.5	DNA-Extraktion und Aufreinigung aus Agarosegelen	49
2.5.6	Southern Blot	49
2.5.7	Amplifikation von DNA mittels PCR (Polymerase-Ketten-Reaktion)	50
2.5.8	Zielgerichtete <i>in-vitro</i> Mutagenese mittels PCR (<i>QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit</i> (Stratagene, Heidelberg)	51
2.5.9	Sequenzierung von DNA	53
2.5.10	Klonierungen	54
2.6	Arbeiten mit RNA	55
2.6.1	Isolierung von Gesamt-RNA mit RNAzol B	55
2.6.2	Denaturierende Gelelektrophorese	55
2.6.3	Northern-Blot-Analyse	56
2.6.4	Primer Extension-Experiment	57
3	Ergebnisse	60
3.1	Transfektionsstudien zur Funktion und Bedeutung der HI-Motive	60
3.1.1	Untersuchungen mit künstlichen Minimalpromotoren zeigten positiv- und negativ-regulatorische Eigenschaften der HI-Motiv.	61
3.1.2	Im Kontext des Originalpromotors reprimieren die HI-Motive die Basalaktivität und die Transaktivierung durch Zta.	64
3.1.3	Im Kontext des Originalgens (BZLF-1-Promotor und –Leserahmen) <i>co</i> -stimulieren die HI-Motive eine Transaktivierung durch Zta.	73
3.1.4	Untersuchungen zur unterschiedlichen Funktion der HI-Motive in zwei verschiedenen Reportersystemen.	78
3.2	Herstellung rekombinanter Epstein-Barr Viren	84
3.2.2	Erste Untersuchungen zur Replikationskompetenz der rekombinanten EBV-Varianten.	92
4	Diskussion	94

4.1 Die Bedeutung des BZLF-1-Gens für die lytische Virusvermehrung und experimenteller Ansatz der Arbeit.	94
4.2 Die Bedeutung der HI-Motive <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i>	95
4.3 Rekombinante Epstein-Barr-Viren: Die Wirkungsweise der HI-Motive im Kontext des Gesamtgenoms von EBV.	103
<i>Anhang</i>	<i>105</i>
5 <i>Literaturverzeichnis</i>	<i>115</i>
<i>Danksagung</i>	<i>138</i>

Verzeichnis der im Text verwendeten Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ADCC	Antikörper-abhängige zellvermittelte Zytotoxizität (<i>antibody-dependent cellular</i>
Ak	Antikörper
amp	Ampicillin
AP	alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BCIP	5-Bromo-4-chlor-3-indolylphosphat
BL	Burkitt's Lymphom
Bp	Basenpaar(e)
BS	n-Buttersäure
BZLF-1	Gen für Z-Transaktivator oder Z-Transaktivator
°C	Grad in Celsius
CAEBV	chronisch aktive Epstein-Barr-Virus-Infektion
cm	Zentimeter
CTL	Zytotoxische T-Lymphozyten
d	desoxy
Da	Dalton
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
ds	Doppelstrang
DTT	Dithiothreitol
EA	Frühes EBV-Antigen (<i>early antigen</i>)
EBER	Epstein-Barr-Virus-encoded RNA
EBNA	Epstein-Barr-Virus-encoded nuclear antigen
EBV	Epstein-Barr-Virus
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure (Titrplex III)
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
<i>et al.</i>	und andere
EtBr	Ethidiumbromid
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FKS	fötales Kälberserum
g	Gramm
Gp	Glykoprotein
h	Stunde (n)
H ₂ O bid.	Zweifach destilliertes Wasser aus einer Millipore-Anlage

Abkürzungen

HD	<i>Hodgkin disease</i>
HIV	humanes Immunschwäche-Virus
HLA	humanes Leukozyten Antigen
HMW	<i>High Molecular Weight Marker</i>
hnRNA	Heteronukleäre Ribonukleinsäure
HSV	Herpes-Simplex-Virus
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IM	Infektiöse Mononukleose
IR	<i>Internal Repeat</i>
k	Kilo
kB(p)	Kilobasen(paar)
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB-Medium	Luria Bertani-Medium
LCL	lymphoblastoide Zelllinie
LMP	Latentes Membranprotein
LMW	<i>Low Molecular Weight Marker</i>
LTR	<i>Long Terminal Repeat</i>
M	Mol(ar)
m	Meter oder milli
MHC	Haupt-Histokompatibilitäts-Komplex (<i>major histocompatibility-complex</i>)
min	Minute
ml	Milliliter
mRNA	<i>messenger-RNA</i>
MW	Molekulargewicht
μ	mikro (10^{-6})
n	nano (10^{-9})
NBT	<i>4-Nitro blue tetrazolium chloride</i>
NPC	Nasopharynxkarzinom
OD _x	optische Dichte bei der Wellenlänge (x)
ORF	<i>Open Reading Frame</i>
ori	Replikationsursprung (<i>origin of replication</i>)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphat buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PEG	Polyethylenglycol
Pmol	picomol
Pol	Polymerase
RARα	<i>Retinoic acid receptor α</i>
RIMMH	Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Regensburg
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuclease

Abkürzungen

RT	reverse Transkriptase
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Reverse Transkription
Rta	R-Transaktivator
RXR α	<i>Retinoid acid receptor α</i>
SLAM	<i>Signaling lymphocytic activation molecule</i>
SAP	<i>SLAM-associated protein</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
sek	Sekunde
ss	Einzelstrang
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
Taq	DNA-abhängige DNA-Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TGF- β	<i>Tumor Growth Factor β</i>
TPA	12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetat
TR	<i>Terminal Repeat</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-Aminomethan
U	Enzym-Einheit (Units) oder Unique
u.a.	unter anderem
UV	ultraviolettes Licht
VCA	Viruskapsid-Antigen
V	Volt
Vol.	Volumen
VZV	Varizella-Zoster-Virus
W	Watt
wt	Wildtyp
x g	x-fache Erdbeschleunigung
XLPS	X-gebundenes lymphoproliferatives Syndrom
z.B.	zum Beispiel
ZRE	<i>Zta-responsive element</i>
Zta	Z-Transaktivator

Zusammenfassung

Eine Erstinfektion mit Epstein-Barr-Virus führt in der Regel zunächst zu einer lebenslangen asymptomatischen Persistenz. Um die Verbreitung des Virus zu gewährleisten, kommt es zu wiederkehrenden lytischen Vermehrungszyklen und zur Produktion infektiöser Virionen. Für die Induktion der lytischen Replikation spielt das BZLF-1-Gen eine entscheidende Rolle. Sein Genprodukt Zta ist als erstes virales Protein nach Induktion der lytischen Virusvermehrung nachweisbar. Es konnte gezeigt werden, daß seine Expression in latent infizierten B-Lymphozyten ausreicht, die lytische Kaskade des Virus in Gang zu setzen. Daher ist es verständlich, daß die Expression dieses essentiellen Induktors der lytischen Replikation vielfältig reguliert wird. Dabei wird die Regulation der Transkription als die wichtigste Stufe angesehen. Im Promotor von BZLF-1 existieren eine Reihe regulatorischer Sequenzen. Von unserer Arbeitsgruppe wurde ein neuartiges regulatorisches Bindungsmotiv HI (Homologie I) in 6-facher Kopie im Promotor von BZLF-1 entdeckt. Vorarbeiten mit dem distalen Promotoranteil von BZLF-1 vor dem Luciferase-Gen deuteten auf eine negativ-regulatorische Funktion dieser Motive auf die Basalaktivität des BZLF-1-Promotors hin.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluß dieser HI-Motive auf die komplexe Regulation des Schaltgens der lytischen Virusvermehrung *in vivo* in Transfektionsexperimenten untersucht. Dazu wurden Luciferase-Reporterplasmide, die den vollständigen Promotor von BZLF-1 mit und ohne Mutationen in den HI-Motiven trugen, in verschiedene lymphoide und epitheliale Zelllinien transfiziert. Im Gegensatz zu *in vitro*-Transkriptionsexperimenten, die zeitgleich von Arnd Dankesreiter durchgeführt wurden, zeigte der BZLF-1-Promotor eine stark reprimierte Basalaktivität. Bei Mutation der HI-Motive, stieg die Basalaktivität drastisch an. Die Repression der HI-Motive wurde durch die Aufrechterhaltung einer hemmenden Chromatinstruktur des Promotors, die *in vitro* nicht ausgebildet werden konnte, erklärt. Auch die Aktivierung des Promotors durch das Zta-Protein war durch die HI-Motive reprimiert. Nach Mutation speziell des HI γ -Motivs stieg die Aktivität des Promotors signifikant an.

Es war von Interesse, welche regulatorische Funktion die HI-Motive im Kontext des Gesamtgenoms von EBV hatten. Zu diesem Zweck wurden in den HI-Motiven mutierte, rekombinante EB-Viren hergestellt. Die hierfür nötigen Rekombinationsplasmide, die das BZLF-1-Gen (Promotor und ORF) enthielten, wurden zunächst in Transfektionsexperimenten auf ihre Funktion hin untersucht. Auch in dieser natürlichen Umgebung zeigte sich die stark reprimierte Basalaktivität des Promotors. Mit und ohne mutierte HI-Motive konnte kein BZLF-1-Protein nachgewiesen werden. Nach Transaktivierung mit dem Zta-Protein zeigte

sich jedoch überraschenderweise eine positiv regulatorische Funktion der HI-Motive auf die autokrine Stimulation des Promotors. Nach Mutation der HI-Motive sank die Expression des BZLF-1-Proteins dramatisch. Es stellte sich die Frage, wodurch der Unterschied zwischen dem Luciferase-Reporter und dem BZLF-1-Rekombinationsplasmid zustande kam. Da sich beide Plasmide nur hinsichtlich des Reportergens unterschieden, wurden die Startbereiche beider Konstrukte genauer untersucht, da ein Einfluß der HI-Motive auf die Positionierung der RNA-Polymerase im 5'-untranslatierten Bereich des BZLF-1-ORF vermutet wurde. *Primer-Extension*-Experimente konnten diese Vermutung jedoch nicht bestätigen. Da auch die von den Plasmiden synthetisierte mRNA-Menge in etwa gleich war, konnte davon ausgegangen werden, daß die Regulation der BZLF-1-Expression auf posttranskriptionaler Ebene oder auf Ebene der Translation stattfand.

Erste Untersuchungen des rekombinanten EBV in 293-Zellen bestätigten die Ergebnisse der Transfektionsexperimente mit den Rekombinationsplasmiden. Nach Aktivierung des rekombinanten Virus mit BZLF-1-Protein konnte in einer anschließenden Immunfluoreszenz kein VCA-Protein nachgewiesen werden, was zeigte, daß die lytische Replikation des Virus nicht aktiviert werden konnte. Erste Infektionsstudien zeigten ebenfalls keine Infektion von Raji-Zellen mit dem rekombinanten Virus.

Die erzielten Ergebnisse machen deutlich, daß die HI-Motive für die Repression der Basalaktivität und somit für die Latenz des Virus von großer Bedeutung sind. Welche Funktion ihm dabei zukommt, bzw. wie eine autokrine Stimulation und somit ein Übergang in den lytischen Replikationszyklus dabei verhindert wird, ist nicht geklärt.

In den zwei unterschiedlichen experimentellen Ansätzen (*in vivo* und *in vitro*) zeigte sich deutlich der duale Charakter der HI-Motive. Je nach vorhandenen Transkriptionsfaktoren, dem allgemeinen Kontext und der Umgebung in der sie sich befinden, können sie sowohl positiv- als auch negativ-regulatorisch wirksam sein. Dies zeigt erneut die enge Anpassung des Epstein-Barr-Virus an seine Zielzelle.

1 Einleitung

1.1 Die Familie der Herpesviren

Die Bezeichnung „Herpesviren“ leitet sich vom griechischen Wort *herpein* (kriechen) ab, und bezeichnet die typische, schlängelnde Ausbreitung der Hautausschläge bei einer Infektion mit dem Vertreter *Herpes simplex*. Außer im Menschen konnten Herpesviren auch in anderen Wirbeltieren wie Amphibien, Fröschen, Fischen, Nagern, Katzen und Affen, sowie in Pilzen und Austern nachgewiesen werden (Honess und Watson, 1977)

Biologie der Herpesviren im allgemeinen und die des Epstein-Barr-Virus im speziellen:

Die Familie der Herpesviren umfaßt etwa 100 Arten und ist durch ihre einheitliche Morphologie definiert. Die Viruspartikel besitzen einen Durchmesser von 100 bis 300 nm. Das ikosaedrische Nukleokapsid mit 162 Kapsomeren (Wildy und Watson, 1968) umschließt einen Proteinkern (*Core*), um den die doppelsträngige, lineare DNA mit einer Größe von 120-240 kbp und einem GC-Gehalt von 32%-75% gewickelt ist. Das Nukleokapsid wird durch eine proteinreiche fibrilläre Tegumentschicht (*Matrix*) variabler Stärke von der Hüllmembran getrennt (Roizman *et al.*, 1981) (Siehe Abb. 1). Die herpesviralen Partikel sind von einer Doppelmembran umhüllt (*Envelope*), die sich von der Kernmembran der Wirtszelle ableitet. Diese setzt sich aus zum Teil glykosylierten Proteinen und Lipiden zusammen. Die auf der Hüllmembran sitzenden Glykoproteine (*Spikes*) vermitteln die Interaktion mit zellulären Rezeptoren.

Bei EBV erfolgt die Bindung an die Zielzelle durch eine Wechselwirkung des viralen Glykoproteins gp350/220 auf der Virushülle an den zellulären Cd3-Komplementrezeptor CD21 (= CR2). Dieser wird primär auf der Oberfläche von B-Zellen und follikulären dendritischen Zellen, aber auch auf T-Zell-Subpopulationen (Fingerroth *et al.*, 1984; Braun *et al.*, 1998) und unreifen Thymozyten (Watry *et al.*, 1991), exprimiert. Ob CD21 auch epithelialen Zellen als EBV-Rezeptor dient, wird noch diskutiert. Das gp350/220 hat eine 100-fach höhere Affinität zum CD21-Rezeptor als der natürliche Ligand C3d (Cooper *et al.*, 1990). Nach erfolgter Rezeptorbindung kommt es zur Quervernetzung der CD21-Moleküle (Tanner *et al.*, 1988) und zur Endozytose des Viruspartikels. Durch die Fusion der

Virusmembran mit der des endozytotischen Vesikels gelangt das Nukleokapsid in das Zytoplasma und wird mit Hilfe des Zytoskeletts in den Kern transportiert (Tanner *et al.*, 1987), um dort oder bereits an der Kernpore zerlegt zu werden. Das EBV-Genom zirkularisiert anschließend über eine homologe Rekombination der *terminal repeats* (Alfieri *et al.*, 1991). Nach der Translation der Proteine im Zytoplasma werden diese in den Zellkern zurückgeschleust, um für den Zusammenbau des Virus zur Verfügung zu stehen. Die Entscheidung, ob es in der infizierten Zelle zu einer lytischen oder latenten Vermehrung kommt, hängt vom Zelltyp und damit vom vorliegenden Expressionsmuster an Transkriptions- und Regulationsfaktoren ab.

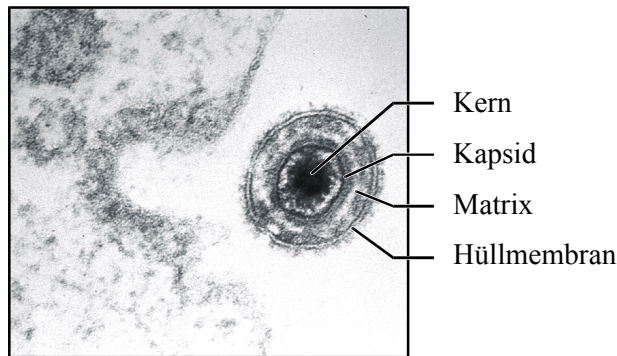


Abb. 1 ***Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Herpesvirus kurz nach dem Verlassen der Wirtszelle.***

Charakteristisch für Vertreter der Herpesviridae ist eine lebenslange Persistenz im Wirtsorganismus, die durch einen zweiphasigen Lebenszyklus gekennzeichnet ist. Nach der Primärinfektion erfolgt eine unterschiedlich lange Latenzphase, in der das Virusgenom episomal oder in Ausnahmefällen auch ins Wirtsgenom integriert vorliegt (Delecluse *et al.*, 1993). Die Latenz wird durch wiederkehrende lytische Replikationsphasen unterbrochen, bei denen infektiöse Virionen freigesetzt werden und sich die Virusinfektion häufig symptomatisch manifestieren kann. Der Übergang von der Latenz in den lytischen Replikationszyklus wird durch verschiedenste Faktoren ausgelöst. Dazu gehören der Einfluß von Chemikalien, Hormonen und Strahlung, sowie angeborene oder erworbene Immunschwächen. Die genauen molekularen Mechanismen dieser Reaktivierungen sind bis heute weitgehend unbekannt.

Einteilung der Herpesviren

Aufgrund ihrer biologischen Eigenschaften werden die Herpesviren in die drei Unterfamilien der Alpha-, Beta- und Gammaherpesvirinae eingeteilt. Die Unterfamilie der Gammaherpesvirinae wiederum wird unterteilt in die Gattungen Rhadinovirus [Humanes Herpesvirus 8 (HHV 8), Herpes-Virus Saimiri (HVS) und Marek's Disease Virus (MDV)] und Lymphocryptovirus (Epstein-Barr-Virus, EBV). Lymphocryptoviren sind endemisch in allen Primaten der Alten Welt. Dabei beschränkt sich EBV auf den Menschen als seinen natürlichen Wirt.

1.2 Das Epstein-Barr-Virus

1.2.1 Die Entdeckung des Epstein-Barr-Virus

1958 beschrieb Denis Burkitt ein Lymphom, das in Ost- und Zentralafrika die häufigste Tumorerkrankung bei Kindern war, und heute als Burkitt's Lymphom (BL) bekannt ist (Burkitt, 1962; Burkitt, 1958). Die Verbreitung des BL in Afrika korrelierte mit der von Malaria. Tatsächlich weiß man heute, daß das Auftreten der Malaria die Inzidenz des BL deutlich erhöht (Facer und Playfair, 1989). Denis Burkitt vermutete daher schon damals einen Zusammenhang zwischen einem durch Arthropoden übertragenen infektiösen Agens und der Entstehung des Tumors (Burkitt, 1962). Gleichzeitig mit Pulvertaft (Pulvertaft, 1964) gelang im Jahre 1964 Tony Epstein, einem in England arbeitenden Virologen, und Yvonne Barr die Kultivierung von BL-Zellen (Epstein und Barr, 1964). Im selben Jahr wurden von Epstein und Barr herpesvirusähnliche Partikel in B-Zell-Linien aus Burkitt's Lymphomen nachgewiesen (Epstein und Barr, 1964). Gertrude und Werner Henle identifizierten dieses Virus als neue Gattung (Henle und Henle, 1966) und bezeichneten es nach seinen Entdeckern als Epstein-Barr-Virus. Die Arbeitsgruppe von Volker Diehl brachte das neue Virus das erste mal mit der Erkrankung der Infektiösen Mononukleose (IM) in Verbindung, als die Serokonversion einer Angestellten in Zusammenhang mit dieser Krankheit gebracht werden konnte (Henle *et al.*, 1968). Nachfolgende epidemiologische Studien zeigten, daß weltweit bis zu 95 % aller Erwachsenen seropositiv gegen EBV-Antigene waren (Henle *et al.*, 1969; Gerber und Lucas, 1972).

1.2.2 EBV-assoziierte Erkrankungen

1.2.2.1 Infektiöse Mononukleose

Der Zeitpunkt der Primärinfektion mit EBV ist regional unterschiedlich. Es wird beobachtet, daß das Alter, in dem die Primärinfektion auftritt, abhängig von den sozio-ökonomischen Lebensbedingungen ist (Evans, 1982). Während sie in Entwicklungsländern bereits im frühen Kindesalter erfolgt und dabei meist als stille Infektion verläuft, findet sie in den Industriestaaten mit hohem hygienischen Standard erst im Alter zwischen 15 und 25 Jahren statt. Aufgrund der späten Infektion erhöht sich die Wahrscheinlichkeit, an **Infektiöser Mononukleose** (IM), auch Pfeiffer'sches Drüsenfieber oder *kissing disease* genannt, zu erkranken (Evans, 1978). Aus hämatologischer Sicht kommt es im Verlauf der IM zu einer starken Proliferation EBV-infizierter B-Lymphozyten, gefolgt von einem Anstieg EBV-spezifischer zytotoxischer T-Zellen, was zu einer Umkehrung des Verhältnisses $CD4^{+}/CD8^{+}$ -Zellen führt. Charakteristische klinische Symptome sind Kopfschmerzen, Halsentzündung, Fieber und geschwollene zervikale Lymphknoten. Auf diagnostischer Ebene äußert sich die IM durch das Auftreten der EBV-spezifischen Antikörper der IgM-Klasse. Dabei sind die Antikörper gegen lytische Genprodukte wie das virale Kapsidantigen (VCA) und das *Early-Antigen* (EA) von Bedeutung. Die IM ist normalerweise selbstlimitierend und dauert ca. 3 Wochen (Chang und Chang, 1980).

1.2.2.2 Chronisch aktive EBV-Infektion (CAEBV)

In seltenen Fällen kommt es zu einem chronisch aktiven Verlauf der Infektion mit EBV (Okano *et al.*, 1991). Diese als **CAEBV** (*chronic active EBV infection*) bezeichnete Krankheit ist durch einen anhaltend hohen IgG-Titer gegen virale Proteine der lytischen Virusvermehrung wie z. B. VCA und EA, die eine starke Virusproduktion im Körper zeigen, charakterisiert (Kawa-Ha *et al.*, 1989; Ishihara *et al.*, 1989). Diese Phase der Infektion kann wochen- oder sogar jahrelang anhalten (Tobi und Straus, 1982) und zusätzlich zu den für IM typischen Symptomen können beispielsweise noch Depressionen, extreme Müdigkeit sowie Hepatitis oder Enzephalitis hinzukommen. Durch die Entstehung EBV-assoziiierter Tumore kann die Krankheit auch tödlich verlaufen. Die lebenslange Persistenz des Virus mit wiederkehrenden Reaktivierungen erschwert die eindeutige Definition und Diagnose chronisch aktiver Infektionen mittels Serologie, Antigen- oder Nukleinsäurenachweis.

1.2.2.3 Duncan Syndrom (X-linked lymphoproliferative syndrome, XLPS)

Die als Duncan-Syndrom oder XLPS bezeichnete Krankheit wurde 1975 erstmals beschrieben (Purtilo *et al.*, 1975) und betrifft ausschließlich Männer. Die bei der Erstinfektion entstehende lymphoide Hyperplasie kann nicht beseitigt werden (Purtilo, 1985). Dies führt aufgrund der lymphoiden Infiltration verschiedener Organe des Patienten wie Leber, Niere, Thymus oder Knochenmark beispielsweise zu einer Zerstörung des peripheren Immunsystems und in vielen Fällen durch Organversagen (Sullivan und Woda, 1989) zum Tod des Patienten. 70% der Betroffenen sterben innerhalb der ersten zwei Lebensjahre an einer unkontrollierten, progressiven IM. Überlebende entwickeln polyklonale Lymphome oder Hypo- bzw. Agammaglobulinämie (Grierson und Purtilo, 1987) und sterben zu 100% vor Erreichen des vierzigsten Lebensjahres. Genetische Studien betroffener Familien zeigten eine Korrelation der Symptome mit einer Mutation auf dem X-Chromosom (Xq25) (Skare *et al.*, 1987). Vor kurzem konnte nun der entscheidende Hinweis auf die Natur des betroffenen Gens gefunden werden. Das identifizierte Gen, SH2D1A / SAP, codiert für ein Signalmolekül, das eine SH2-Domäne und einen kurzen cytoplasmatischen Schwanz aufweist. Erste Daten zu seiner Funktion lassen vermuten, daß es die Bindung anderer SH-2-Domänen-haltiger Signalmoleküle an den T/B-Zell-Oberflächenrezeptor SLAM blockiert. Auch eine Funktion des Proteins in der Homöostase von B- und T-Zellen während der Virus-Infektion wird diskutiert (Coffey *et al.*, 1998).

1.2.2.4 EBV-assoziierte Tumorerkrankungen

Als erstes human-pathogenes Virus wurde das Epstein-Barr-Virus ursächlich mit der Entstehung von Tumoren beim Menschen in Verbindung gebracht [Übersicht in (Grässer *et al.*, 1995)]. Die Eigenschaft des EBV, B-Zellen zu immortalisieren, ist für die Entstehung maligner Erkrankungen von entscheidender Bedeutung. Eine Infektion mit EBV führt jedoch aufgrund der effizienten immunologischen Überwachung virusinfizierter Zellen nicht unweigerlich zur Entstehung von Tumoren. Immundefizienzen und ungünstige Umweltfaktoren begünstigen die Entstehung EBV-assoziiierter Krankheiten. Unter solchen Bedingungen wird bereits im Vorfeld proliferativer Erkrankungen ein Anstieg in der Zahl virusinfizierter Zellen im peripheren Blut beobachtet. Bei diesen virusinfizierten Zellen handelt es sich um latent infizierte, ruhende B-Zellen (Babcock *et al.*, 1999).

Burkitt's Lymphom (BL)

Das Burkitt's Lymphom ist ein malignes, wenig differenziertes *non-Hodgkin* B-Zell-Lymphom monoklonalen Ursprungs (Lenoir und Bornkamm, 1987). In Papua Guinea und in Äquatorial-Afrika, wo das BL endemisch auftritt, sind nahezu 100% der Tumore mit EBV assoziiert. Die Verbreitung des in Afrika endemischen BL korreliert zudem mit dem Auftreten der Malaria. In Gebieten, in denen das Burkitt's Lymphom nur sporadisch verbreitet ist (z.B. Europa), sind nur etwa 15-20 % der BL-Tumoren EBV-assoziert. Demnach scheint in den Endemiegebieten das EBV die Entstehung des BL als Cofaktor zu begünstigen. Charakteristisch für alle Burkitt's Lymphome sind typische Chromosomentranslokationen, welche die Bande q24 des Chromosoms 8 betreffen (Croce und Nowell, 1985). Durch die unterschiedlichen Translokationen gelangt das Protoonkogen *c-myc* unter die regulatorische Kontrolle eines Immunglobulin-Locus der Chromosomen 2, 14 oder 22 (Manolov und Manolova, 1972). Eine Überexpression von *c-myc* konnte als entscheidender Faktor für den BL-Phänotyp bewiesen werden (Polack *et al.*, 1996). Die *c-myc* Deregulation sowie das Auftreten EBV-negativer Burkitt's Lymphome relativieren die alleinige Rolle von EBV bei der Entstehung des Burkitt's Lymphoms. Derzeit werden mehrere Modelle der Tumorentstehung unter Beteiligung der EBV-Infektion, der Immunantwort auf eine Malaria-Infektion sowie der *c-myc*-Translokation diskutiert (Lenoir und Bornkamm, 1987).

Eine Infektion mit EBV führt durch die Expression der latenzassoziierten Proteine zu einer Stimulation der Zellteilung und zugleich zu einer Unterdrückung der Apoptose der infizierten Zellen. Diesen Vorgang bezeichnet man als Immortalisierung. Da EBV auch unreife B-Zellen infizieren kann und die Entstehung illegitimer Rekombinationsereignisse fördert (Srinivas und Sixbey, 1995), werden auch Zellen dauerhaft zur Vermehrung stimuliert, die für die Entwicklung von *c-myc*-assoziierten Genomrearrangements prädestiniert sind. Außerdem ermöglicht EBV Zellen, die möglicherweise Mutationen erworben haben, die zur Apoptose führen würden, sich weiter zu teilen, und weitere Mutationen zu erwerben, die manchmal zur Ausbildung maligner Tumore führen.

Nasopharynxkarzinom (Halsrachenkarzinom)

Das Halsrachenkarzinom (NPC) ist ein stark metastasierender Tumor von meist undifferenzierten Epithelzellen im Halsrachenraum. In allen untersuchten Biopsien undifferenzierter NPCs konnte EBV-DNA nachgewiesen werden (Wolf *et al.*, 1973). Es ist weltweit verbreitet, wobei eine auffällige Häufung im asiatischen Raum, speziell in den südlichen Provinzen Chinas, in Nordafrika und bei der Bevölkerungsgruppe der Innuids zu

beobachtet ist. Neben einer genetischen Prädisposition (Lu *et al.*, 1990) spielen Umwelteinflüsse, vor allem Ernährungsgewohnheiten (Poirier *et al.*, 1989) wie z.B. Nitrosamine in gesalzenem Fisch, Rauch oder kanzerogene Phorbolester in pflanzlicher Nahrung, Tees und Hausmedizin (*Euphorbiaceen*) eine wichtige Rolle. In der Pflanzenwelt Asiens konnten Phorbolester-ähnliche Verbindungen nachgewiesen werden, die in *in vitro*-Versuchen den lytischen Vermehrungszyklus bei EBV in Zellkultur stimulierten (Zeng *et al.*, 1994). Diese starke Vermehrung von EBV kann schon lange vor Entstehung des NPCs serologisch nachgewiesen werden und wird als Pathogenesefaktor für NPC angesehen (Raab-Traub *et al.*, 1983; Fahraeus *et al.*, 1988).

Hodgkin-Lymphom (Hodgkin's Disease, HD)

Das Hodgkin-Lymphom ist durch das Auftreten von Reed-Sternberg-Zellen (RS-Zellen) gekennzeichnet (Jarrett, 1998). Diese Zellen machen jedoch nur etwa 1 % der Tumormasse aus (Deacon *et al.*, 1991; Deacon *et al.*, 1993; Knecht *et al.*, 1993; Herbst *et al.*, 1990; Uccini *et al.*, 1990). In über 50 % der RS-Zellen kann in EBV-positiven HD-Fällen das Virus nachgewiesen werden. Der Ursprung der RS-Zellen ist unbekannt. Das Hodgkin-Lymphom ist weltweit verbreitet und gehört vor allem in den westlichen Ländern zu den häufigsten Tumorerkrankungen.

Immunoblastische B-Zell-Lymphome (BLPD)

Im gesunden Virusträger werden latent infizierte, proliferierende B-Zellen durch das Immunsystem kontrolliert und eliminiert. Bei Personen mit Immuninsuffizienzen kann es dagegen im Zuge einer Primärinfektion oder EBV-Reaktivierung zur Ausbildung von B-Zell-Lymphomen (BLPD) kommen, die als *in vivo*-Äquivalente lymphoblastoider Zelllinien (LCL) angesehen werden können. Die proliferierenden Zellen sind im Gegensatz zum BL, HD und NPC anfangs polyklonalen Ursprungs, werden später aber erst oligo- und schließlich monoklonal (Hanto *et al.*, 1981). Die zugrunde liegenden Immundefekte können genetischen Ursprungs sein oder aber Folge einer Immunsuppression wie beispielsweise bei Organ- oder Gewebetransplantation oder einer HIV-Infektion sein.

Immunoblastische T-Zell-Lymphome (TLPD)

Obgleich T-Zellen nicht als primäre Zielzellen für das EB-Virus nachgewiesen wurden, sind verschiedene T-Zell-Lymphome deutlich mit EBV assoziiert (Lee *et al.*, 1996). Hierzu zählen die T-Zell-Lymphozytose, T-Zell-Lymphome im Nasalbereich und periphere T-Zell-

Lymphome. Im Unterschied zu B-lymphoproliferativen Erkrankungen nach Organtransplantationen wird nur eine eingeschränkte Gruppe viraler Gene der Latenz exprimiert (EBNA-1, LMP-1 und LMP-2A/B; Latenztyp II). Dies läßt darauf schließen, daß EBV in diesen Lymphomen zum Zeitpunkt der Untersuchung eine geringere Bedeutung für die Zell-Proliferation spielt, als in immunoblastischen B-Zell-Lymphomen. Für die Entstehung von T-Zell-Lymphomen ist das EBV möglicherweise dennoch von erheblicher Bedeutung.

Orale Haarleukoplakie (OHL)

Die orale Haarleukoplakie (OHL) ist eine typische Komplikation bei AIDS-Patienten. Die OHL ist auf eine unzureichende immunologische Kontrolle EBV-infizierter Zellen zurückzuführen (Itin, 1993). Kennzeichnend für OHL ist die starke lytische Vermehrung des EBV in den differenzierenden epithelialen Geweben der Zungenränder.

1.2.3 Genomstruktur des Epstein-Barr-Virus

Das EBV-Genom liegt im Nukleokapsid als lineare, doppelsträngige DNA mit einer Größe von etwa 172 kBp und einem GC-Gehalt von 60 % vor (Baer *et al.*, 1984). Das virale Genom kodiert für etwa 100 Proteine. Im Zellkern infizierter Zellen dagegen liegt die virale DNA als kovalent geschlossenes, episomal replizierendes Molekül (Klein *et al.*, 1974), oder, in seltenen Fällen, auch in das Wirtsgenom integriert vor (Henderson *et al.*, 1983), (Delecluse *et al.*, 1993) Nach der Infektion zirkularisiert die DNA durch homologe Rekombination der sich an den Enden befindenden, etwa 500 Bp langen Wiederholungssequenzen (*Terminal Repeats*, TR) (Given und Kieff, 1979; Kintner und Sugden, 1979; Alfieri *et al.*, 1991). Diese Sequenzen enthalten zudem wichtige Signale für die Verpackung der DNA in Viruspartikel (Hammerschmidt und Sugden, 1989). Das Genom wird durch vier interne Tandemrepetitionen (*Internal Repeats*, IR1-4) in fünf singuläre Sequenzen (*Unique Regions*, U1-5) unterteilt. Der IR1-Abschnitt (*BamW-repeat*) setzt sich aus 6-12 Wiederholungen einer Sequenz von 3,2 kBp Größe zusammen. Unmittelbar an die Repetitionen IR2 und IR3 schließen sich zwei einander weitgehend homologe ca. 1 kBp große Abschnitte an, die als Replikationsursprünge (ori_{Lyt}) in der lytischen EBV-Replikation fungieren (Hudewentz *et al.*, 1982; Hammerschmidt und Sugden, 1988). Die Replikation des Genoms während des latenten Zyklus beginnt hingegen an dem zwischen U1 und IR1 gelegenen Replikationsursprung *OriP* (Yates und Guan, 1991; Yates *et al.*, 1985). Die Genome einzelner EBV-Isolate variieren in

ihrer Gesamtlänge aufgrund verschiedener Deletionen und einer unterschiedlichen Anzahl von Repetitionen. Die Zahl der Genomkopien ist ebenfalls für jede EBV-positive Zelllinie charakteristisch und schwankt zwischen 2 und 200 Molekülen pro Zelle.

Die Nomenklatur der viralen Gene setzt sich aus deren Lage auf dem Genom und deren Orientierung zusammen. Das virale Genom wurde durch Spaltung mit dem Restriktionsenzym *Bam*HI in die Bereiche *Bam*HI A bis *Bam*HI Z und *Bam*HI a bis *Bam*HI g aufgeteilt. Die Größeneinteilung der Bereiche erfolgte alphabetisch, wonach das größte Fragment mit *Bam*HI A, das kleinste mit *Bam*HI g bezeichnet wurde. Da das EBV-Genom über nach links und rechts laufende offene Leserahmen verfügt, werden Gene, die nach rechts abgelesen werden mit RF (*Right Frame*), und Gene, die nach links abgelesen werden, mit LF (*Left Frame*) bezeichnet. BZLF-1 bezeichnet somit den ersten nach links gerichteten Leserahmen im *Bam*HI-Fragment Z. Als Grundlage für diese Nomenklatur diente der Laborstamm B95-8 (Frade *et al.*, 1985). Dieses EBV-Isolat enthält eine 13,6 kBp lange Deletion, weshalb man Gene in diesem Bereich mit einem Apostroph gekennzeichnet hat. Ein Beispiel hierfür ist das *immediate-early*-Gen BI'LF-4. In Abb. 2 ist eine Übersicht über die Genomstruktur, über die wichtigsten Genprodukte der Latenz und der lytischen Replikation sowie über die kodierenden offenen Leserahmen dargestellt.

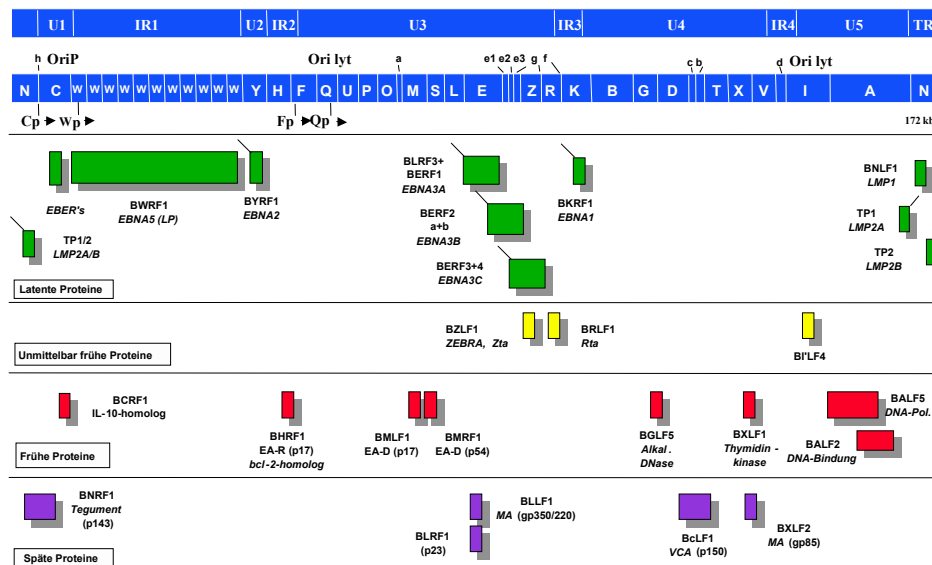


Abb. 2 Übersicht über die wichtigsten EBV-Genprodukte und die kodierenden Leserahmen.

TR = Terminal Repeat; IR = Internal Repeat; U = Unique Region; Ori = Origin; LMP = Latent Membran Protein; TP = Terminal Protein; p = Protein; gp = Glykoprotein; EA = Early Antigen; VCA = Virus Capsid Antigen; MA = Major Antigen; TK = Thymidine Kinase; Pol = Polymerase; LP = Leader Protein;

1.2.4 Der Infektionsweg von EBV

Die Übertragung des Virus erfolgt hauptsächlich oral über Speichel (Buchwald *et al.*, 1987). Eine Weitergabe des Virus durch Blutprodukte oder Knochenmarktransplantation ist auch möglich (Qu und Rowe, 1992; Masucci und Ernberg, 1994). Die Haupteintrittspforte des Virus sind die lympho-epithelialen Gewebe des Hals-Rachen-Raums. Die Identität der primären Zielzellen des EBV ist bislang nicht eindeutig geklärt. Früher wurden differenzierte Epithelzellen der Parotis (Sixbey *et al.*, 1984) als Hauptort der lytischen Virusvermehrung *in vivo* und damit als primäres Ziel während der Infektion angesehen. Der Differenzierungsstufe des epithelialen Gewebes wurde dabei eine wichtige Rolle zugeschrieben (Becker *et al.*, 1991). Die Bedeutung der epithelialen Gewebe für die Virusvermehrung und Verbreitung wird heute in Frage gestellt, da in Gewebeschnitten von Tonsillen von Personen mit IM als auch bei gesunden seropositiven Trägern in der Regel keine EBV-infizierten Epithelzellen nachgewiesen werden konnten (Tao *et al.*, 1995). Heute werden vielmehr die B-Lymphozyten sowohl als Ort der Latenz und als Reservoir von EBV, wie auch als Ort der lytischen Infektion und der Produktion infektiöser Viruspartikel angesehen (Thorley-Lawson *et al.*,

1996). Das Virus konnte aber auch in NK- und in Muskelzellen nachgewiesen werden. *In vitro* konnte gezeigt werden, daß Epithelzellen durch Fusion mit EBV-positiven B-Lymphozyten infiziert werden können (Bayliss und Wolf, 1981). Es ist demnach noch unklar, ob die Infektion von Epithelzellen einen obligaten Schritt im Replikationszyklus von EBV darstellt, oder ob die Primärinfektion direkt über die Infektion epithelständiger B-Zellen geschieht, welche insbesondere in den Tonsillen in großer Zahl vorhanden sind (Rickinson und Kieff, 1996).

Auch während der asymptomatischen Persistenz des Virus in den ruhenden B-Gedächtniszellen findet erfolgreich lytische Vermehrung statt. Durch Reaktivierung können persistierende B-Zellen wieder in den lytischen Zyklus übergehen. Die Produktion von Nachkommenviren bleibt auf Zellschichten und Gewebe beschränkt, die dem Immunsystem nicht zugänglich sind (Wolf *et al.*, 1984; Greenspan *et al.*, 1985; Sixbey *et al.*, 1986). So wird EBV ständig an einigen Orten des Körpers, wie der Ohrspeicheldrüse oder der Gebärmutter Schleimhaut, produziert ohne vom Immunsystem erkannt zu werden. Die lytische Replikation des Virus führt zur Infektion differenzierter Epithelzellen der Speicheldrüsen und zur Freisetzung infektiöser Viruspartikel in der Speichelflüssigkeit des Wirts.

Im peripheren Blut manifestiert sich die lytische Replikation nur in Abwesenheit einer EBV-spezifischen Immunantwort. Genprodukte der lytischen Virusvermehrung können daher in der Regel nur bei Patienten mit IM, bei Immunsupprimierten nach Organtransplantation, sowie im Falle einer CAEBV im verstärkten Maße im peripheren Blut nachgewiesen werden (Prang *et al.*, 1993).

1.2.5 Latente Infektion und Immortalisierung von B-Zellen

Die Latenz des Epstein-Barr-Virus wird vorwiegend durch die strikte Kontrolle der *immediate-early*-Gene des lytischen Replikationszyklus gesteuert (Mayer *et al.*, 1993). In der Latenz werden bis zu 9 virale Proteine (EBNA-1-6, LMP-1, LMP-2A, LMP-2B), zwei kurze, nichttranslatierte Transkripte der Polymerase III (EBER-1 und -2) sowie Transkripte des Leserahmens BARF-0 (Sadler und Raab-Traub, 1995; Fries *et al.*, 1997; Kienzle *et al.*, 1999) synthetisiert. In B-Lymphozyten in Zellkultur und im Organismus während der Erstinfektion bzw. unter Immunsuppression werden alle diese Gene abgelesen (Latenztyp III, Lat III). Dagegen können in ruhenden B-Gedächtniszellen nur EBER-Transkripte und LMP-2A-Protein nachgewiesen werden (Lat-0) (Miyashita *et al.*, 1997). Weitere Latenzformen (Lat-I,

Einleitung

Lat-II) mit stark eingeschränkter Expression viraler Gene werden in Burkitt's Lymphomen, Hodgkin Lymphomen sowie in Nasopharynxkarzinomen gefunden (Tabelle 1).

Latenz-Typ	EBNA-Promotor	Genprodukte	Gewebe- oder Zelltyp
Lat-0		LMP-2A, EBERs	Ruhende B-Gedächtniszellen
Lat-I	Qp	EBNA-1, EBERs, BARF-0-Transkripte	Biopsien von Burkitt's Lymphomen und davon frisch etablierte Zelllinien
Lat-II	Qp	EBNA-1, LMP-1, LMP-2A, LMP-2B, EBERs, BARF-0-Transkripte	NPC, Hodgkin-Lymphom
Lat-III	Wp<24h Qp>24h	EBNA-1-6, LMP-1, LMP-2A, LMP-2B, EBERs, BARF-0	Lymphoblastoide B-Zelllinien in Zellkultur, periphere B-Zellen von IM-Patienten, immunoblastische Lymphome

Tabelle 1 Latenzformen des Epstein-Barr-Virus [modifiziert nach (Thorley-Lawson *et al.*, 1996)]

Die Expression der latenten Genprodukte führt zur Immortalisierung der infizierten Zelle und somit zu unbegrenztem Wachstum in Zellkultur (Pope *et al.*, 1967; Lewin *et al.*, 1990). Sechs der elf in der Latenz exprimierten Gene sind für die Immortalisierung *in vitro* essentiell (EBNA-1, 2, 3A, 3C, 5 und LMP-1) (Hammerschmidt und Sugden, 1989; Kempkes *et al.*, 1995).

Alle prozessierten EBNA-mRNAs gehen durch alternatives Spleißen aus einem mehr als 100 kBp langen Primärtranskript hervor. Die Transkription wird von den Promotoren C_P und W_P aus gesteuert (Qu und Rowe, 1992), welche im *Bam*HI C-bzw. *Bam*HI W-Fragment des EBV-Genoms lokalisiert sind, und zu unterschiedlichen Zeitpunkten während Etablierung und Aufrechterhaltung der Latenz aktiv sind (siehe Tabelle 1) (Woisetschlaeger *et al.*, 1990). Das Virus besitzt somit prinzipiell die Möglichkeit, die Expression der einzelnen EBNA-Proteine über posttranskriptionelle Mechanismen zu regulieren. Zwei weitere Promotoren, F_p und Q_p, kontrollieren die Synthese von Transkripten, von denen nur EBNA-1 translatiert wird

(Sample *et al.*, 1992). In Zellen der mit EBV assoziierten Tumore scheint nur Fp aktiv zu sein.

EBNA-1 ist eines von sechs nukleären Proteinen von EBV. Es wird vom Leserahmen BKRF-1 kodiert und kann von verschiedenen Promotoren im Bereich *Bam*H1 C, W, F und Q transkribiert werden (Qu und Rowe, 1992; Schaefer und Speck, 1994). EBNA-1 ist ein Phosphoprotein, das in Form eines Homodimers an das FR-Element (*Family of Repeats*) innerhalb des Ori_p bindet und sowohl für die Initiation der Replikation des viralen Genoms, als auch für die Segregation der Episome während der Mitose benötigt wird (Reisman *et al.*, 1985; Lupton und Levine, 1985; Rawlins *et al.*, 1985). Das Protein ist damit für die Persistenz des Episoms in sich teilenden Zellen von essentieller Bedeutung. EBNA-1 wird in jeder EBV-infizierten proliferierenden Zelle, also auch in EBV-positiven Tumorzellen, exprimiert. EBNA-1 ist für die Persistenz des Virus in der infizierten Zelle und somit zumindest indirekt für die Aufrechterhaltung des immortalisierten Zustands notwendig. Es wirkt als Transaktivator, indem es an den C-Promotor bindet und so die Expression der EBNA-Proteine reguliert. Transformierende Eigenschaften des EBNA-1 Proteins konnten im transgenen Mausmodell gezeigt werden (Wilson *et al.*, 1996).

EBNA-2 wird vom Leserahmen BYRF-1 kodiert. Es gehört mit EBNA-5 zu den ersten viralen Genprodukten, die in latent infizierten Zellen nachgewiesen werden können (Rooney *et al.*, 1989; Hitt *et al.*, 1989; Alfieri *et al.*, 1991). EBNA-2 ist ein regulatorisch wirksames Transaktivatorprotein, dessen Expression direkt oder indirekt zur Erhöhung einer Reihe zellulärer (CD21, CD23, *c-fgr*) (Wang *et al.*, 1990b; Wang *et al.*, 1990a; Knutson, 1990) und viraler (LMP-1, LMP-2, EBNA-1) (Fahraeus *et al.*, 1990; Zimmer Strobl *et al.*, 1991) Proteine führt. Die Aktivierung des LMP-1 Gens stellt einen entscheidenden Schritt zur Immortalisierung der Wirtszelle dar (Kempkes *et al.*, 1995). EBNA-2 bindet dabei nicht direkt an die Zielpromotoren, sondern indirekt durch Wechselwirkung mit dem zellulären Transkriptionsfaktor RBPjκ (*recombination signal binding protein Jκ* = CBF1) (Henkel *et al.*, 1994). In der frühen Phase der Infektion von B-Zellen bewirkt EBNA-2 zusammen mit EBNA-5 einen Wechsel der Zelle von der G₀-Phase in die G₁-Phase des Zellzyklus (Sinclair *et al.*, 1994)

EBNA-3A, 3B, 3C (EBNA-4, 5, 6) werden jeweils durch einen langen und einen kurzen Leserahmen kodiert (Ricksten, Kallin, 1988): EBNA-3A von den Leserahmen BLRF-1 und BERF-1, EBNA-3B von BERF-2a und BERF-2b und EBNA-3C von BERF-3 und BERF-4.

Die stark hydrophilen Proteine besitzen jeweils übereinstimmende Aminosäuresequenzen am Carboxyterminus. Daher vermutet man ähnliche Funktionen. EBNA-3A und EBNA-3C, nicht aber EBNA-3B, sind für die Immortalisierung von B-Zellen von Bedeutung (Tomkinson *et al.*, 1993). Für EBNA-3C konnte eine Funktion als Regulatorprotein gezeigt werden (Kempkes *et al.*, 1995): EBNA-3C hat transaktivierende Eigenschaften auf die Expression von LMP-1 und CD21 (Wang *et al.*, 1990b). In EBNA-3C negativen Raji-Zellen führt die Expression von EBNA-3C zu einem Anstieg von LMP-1, CD23 und Vimentin in der G₁-Phase des Zellzyklus. Weiterhin enthält EBNA-3C ein Leucin-*Zipper*-Motiv, was auf eine Protein-Protein-Wechselwirkung hindeutet (Allday *et al.*, 1993). Die Funktion von EBNA-3B ist unbekannt.

EBNA-5 (EBNA-LP) entsteht durch alternatives Spleißen aus der *Leader*-Sequenz, die allen EBNA-Transkripten gemeinsam ist. Die Wirkungsweise des Proteins ist weitgehend unbekannt. *In vitro* konnte eine Interaktion mit dem Tumorsuppressorprotein p53 und dem Retinoblastom-Suppressorprotein pRb gezeigt werden (Jiang *et al.*, 1991). EBNA-5 bewirkt zusammen mit EBNA-2 den Wechsel von der G₀ in die G₁-Phase des Zellzyklus (Sinclair *et al.*, 1994).

LMP-1 wird vom Leserahmen BNLF-1 kodiert. Es handelt sich um ein integrales Membranprotein, das in immortalisierten B-Zellen und in vielen EBV-assoziierten Tumoren nachgewiesen werden kann (Kieff und Liebowitz, 1990). Es existieren zwei Formen des Proteins: eine längere in latent infizierten Zellen und eine kürzere Form während der lytischen Vermehrung, die auch als Bestandteil der Viruspartikel nachgewiesen werden konnte (Mann *et al.*, 1985). LMP-1 war das erste EB-virale Protein, für das transformierende Eigenschaften nachgewiesen werden konnten (Wang *et al.*, 1985). Auf molekularer Ebene gehört LMP-1 zur Familie der TNF-Rezeptor-ähnlichen Proteine (TNF-Rezeptor, CD40, Lymphotoxin-Rezeptor). LMP-1 steigert die Expression einiger Adhäsionsmoleküle wie ICAM-1, LFA-1 und LFA-3 auf der Oberfläche von B-Zellen (Wang *et al.*, 1990a), des Protoonkogens *bcl-2* (Henderson *et al.*, 1991) und einer Calcium-abhängigen Proteinkinase (Mosialos *et al.*, 1994). Besonders die Überexpression von *bcl-2* und die damit verbundene Verhinderung des programmierten Zelltods (Apoptose) ist ein wichtiger Hinweis auf den Wirkmechanismus von LMP-1. Ein weiterer Hinweis hierfür ist die Aktivierung des zellulären Transkriptionsfaktors NFκB (Mitchell und Sugden, 1995).

LMP-2A und LMP-2B werden aufgrund ihrer Leserahmen, die über die *Terminal Repeats* von EBV laufen, nur im episomalen Zustand transkribiert (Laux *et al.*, 1988). Die beiden Proteine unterscheiden sich im ersten Exon, welches LMP-2B fehlt. In ruhenden B-Zellen hemmt LMP-2A die Antigenrezeptor-vermittelte Aktivierung der Zellen (Fruehling *et al.*, 1996). Dadurch vermeidet EBV eine Aktivierung der latenten oder auch der lytischen Replikation und trägt dazu bei, die Latenz zu stabilisieren und die Immunerkennung infizierter Zellen im Körper zu verhindern (Fruehling und Longnecker, 1997). Die Funktion von LMP-2B ist weitgehend unbekannt. Möglicherweise fungiert es als Antagonist zu LMP-2A.

EBER-1 und EBER-2 werden als einzige latente virale Transkripte ohne CAP-Struktur und ohne Poly-A-Schwanz von der Polymerase III transkribiert (Arrand und Rymo, 1982) und nicht translatiert. Beide RNA-Moleküle besitzen eine hochkonservative, charakteristische Sekundärstruktur und sind in latent infizierten Zellen primär im Zellkern lokalisiert (Howe und Steitz, 1986) (Greifenegger, unveröffentlichte Beobachtungen). Aufgrund struktureller Ähnlichkeiten mit den RNAs VA-1 und VA-2 in Adenovirus-infizierten Zellen wurde eine Hemmung antiviraler und antiproliferativer Effekte von Interferon als Funktion der EBERs vermutet (Rosa *et al.*, 1981). *In vitro* konnte gezeigt werden, daß EBER-1 durch Bindung der Interferon-induzierten Proteinkinase DAI / PKR eine Autophosphorylierung des Enzyms verhindern und damit die Wirkung des Interferons hemmen kann (Sharp *et al.*, 1993). *In vivo* ist die Funktion der EBER-Transkripte für die Latenz von EBV und die Transformation von Zellen bis jetzt völlig unklar (Clemens, 1994). Die Beobachtung, daß die Neusynthese der EBER-Transkripte nach Induktion des lytischen Zyklus negativ reguliert wird, könnte ein Hinweis darauf sein, daß ihnen eine Bedeutung bei der Aufrechterhaltung der Latenz zukommt (Greifenegger *et al.*, 1998). Die Transkripte der EBER-Gene wurden bisher in jeder latent infizierten Zelle nachgewiesen. In Fällen von oraler Haarleukoplakie (OHL) mit lytischer Virusvermehrung (Gilligan *et al.*, 1990) oder in manchen Fällen von Brustkrebs (Bonnet *et al.*, 1999) waren sie hingegen nicht nachweisbar.

BARF-0- (B95-8) und **BARF-1-Transkripte** (Wildtyp-EBV) wird eine Schar von RNAs genannt, die auf dem Gegenstrang des Genoms zu frühen Genen im Bereich *Bam*HI A abgelesen werden. *In vitro* können diese Transkripte für ein 20 kDa-Protein kodieren, das 40 % Homologie zum ICP4-Transkriptionsfaktor von Herpes-Simplex-Virus aufweist (Chen *et*

al., 1992). Mittlerweile konnte dieses Protein auch in infizierten Zellen nachgewiesen werden (Strockbine *et al.*, 1998).

1.2.6 Die lytische Vermehrung des Epstein-Barr-Virus

Der lytische Vermehrungszyklus von EBV kann *in vitro* an künstlich aktivierten B-Lymphozyten erforscht werden. Dazu werden verschiedene Induktoren der lytischen Genkaskade (Tovey *et al.*, 1978), (Kallin *et al.*, 1979; Bauer *et al.*, 1982) wie z.B. Phorbol ester, Buttersäure, Ca-Ionophore (Daibata *et al.*, 1992), Anti-Ig-Immunglobuline und andere anti-Oberflächen-Antikörper (Bayliss und Wolf, 1981) verwendet. Eine weitere Methode stellt die Überinfektion von latent EBV-infizierten Raji-Zellen mit dem Virus aus P3HR-1-Zellen dar. Das Genom des Virus codiert für zahlreiche Polypeptide, die verschiedene Schritte des Nukleotidstoffwechsels katalysieren (Thymidinkinase, Thymidilatsynthetase und dUTPase) und bei der DNA-Synthese und Genomvermehrung aktiv sind (DNA-Polymerase, Helicase, Primase) (Roizman, 1996). Im Vergleich zur Latenz verläuft die lytische Replikation des EB-Virus kaskadenartig. Sie kann in die drei Phasen *immediate-early* (unmittelbar früh), *early* (früh) und *late* (spät) eingeteilt werden. In der ersten Phase erfolgt die Umstellung von der latenten Genexpression in die lytische Kaskade. Bisher konnten bei EBV drei sehr frühe Genprodukte identifiziert werden (BZLF-1, BRLF-1 und BLRF-4), die transaktivierende Eigenschaften haben. Ihre Aufgabe ist einerseits, die latenten Promotoren wie den LMP-1-Promotor und den C- und W-Promotor der EBNA-Proteine zu reprimieren, andererseits die nächste Stufe der *early*-Gene anzuschalten (Kenney *et al.*, 1989). Die Klasse der *immediate-early*-Gene wird unabhängig von anderen viralen Proteinen zu Beginn der lytischen Virusvermehrung exprimiert. Somit kommt den sehr frühen Genen eine regulatorische Funktion bei der Entscheidung über latente oder lytische Replikation zu.

In der zweiten Phase der lytischen Replikation werden die frühen Gene transkribiert. Dazu werden solche Gene gerechnet, die vor der Replikation des EBV-Genoms exprimiert werden. Etwa 30 Proteine werden dieser Gruppe zugeordnet. Die meisten enthalten in ihrem Promotorbereich Bindestellen für die *immediate-early*-Proteine Zta (*Z-responsive-elements*, ZRE) oder Rta (*R-responsive elements*, RRE). Diese Gruppe enthält regulatorisch wirksame Faktoren wie das Genprodukt des Leserahmens BMLF-1 (Chevallier-Greco *et al.*, 1986; Buisson *et al.*, 1989) oder Proteine, die direkt an der Replikation des viralen Genoms beteiligt

sind, wie die DNA-Polymerase (BALF-5), Thymidinkinase (BXLf-1), ein Einzelstrang-DNA bindendes Protein (BALF-2) und eine Ribonukleotid-Reduktase (BaRF-1).

In der letzten Phase der lytischen Virusvermehrung werden die späten Proteine exprimiert. Zu ihnen zählt man ca. 30 Strukturproteine, die für den Zusammenbau des Viruspartikels und für die Virusreifung essentiell sind wie das Membranprotein gp350/220 (BLLF-1), und das Virus-Kapsidprotein (*Virus-Capsid-Antigen*, VCA, BcLF-1).

1.2.7 Das BZLF-1-Gen

Dem BZLF-1-Gen kommt eine Schlüsselrolle zu, da dessen Genprodukt Zta als einziges der drei *immediate-early*-Proteine in der Lage ist, in lymphoiden Zellen die Latenz zu beenden und die lytische Replikation einzuleiten (Grogan *et al.*, 1984; Countryman *et al.*, 1987). Ferner ist Zta unentbehrlich für die lytische Replikation vom Ori_{lyt} (Countryman *et al.*, 1987). Der Leserahmen BZLF-1 wird von drei mRNAs mit einer Länge von 1,0 kBp, 3,3 kBp und 4,0 kBp translatiert (Manet *et al.*, 1989). Die mRNAs starten dabei alternativ von den zwei verschiedenen Promotoren Zp und Rp, wobei das kurze Transkript nur den Leserahmen BZLF-1 enthält (Zp), die beiden längeren Transkripte bicistronisch sind und die Leserahmen BRLF-1 und BZLF-1 enthalten (Rp) (Abb. 3). Über seine Bindestellen auf der DNA (ZRE) wirkt Zta aktivierend auf seinen eigenen Promotor (autokrine Stimulation) und auf andere Promotoren wie beispielsweise der frühen Gene BRLF-1, BSLF-2 / BMLF-1 sowie auf den bidirektionalen Promotor für BHLF-1 und BHRF-1 im Bereich des Ori_{lyt} (Flemington und Speck, 1990).

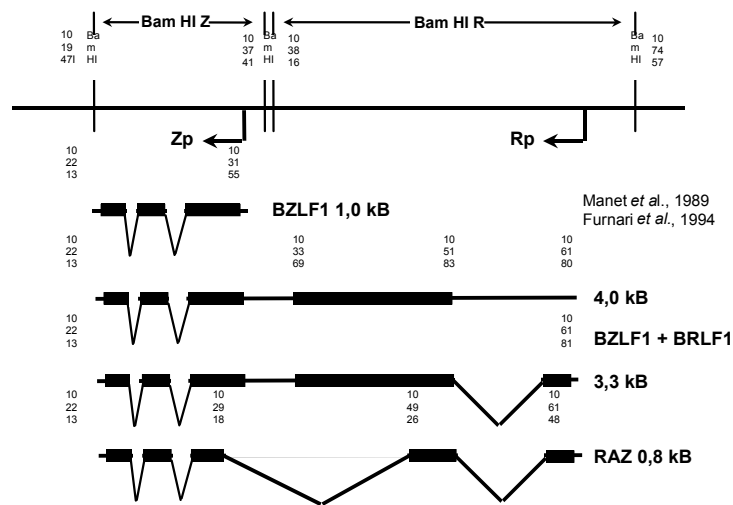


Abb. 3 Spleißvarianten der Leserahmen BRLF-1 und BZLF1.
 RAZ = Hybridprotein aus den Leserahmen BZLF-1 und BRLF1;
 Zp = Promotor des Leserahmens BZLF-1; Rp = Promotor des Leserahmens BRLF-1;
 Dicke Balken = Exon-Bereiche; Dünne Linie = Intron-Bereiche;
 Abgewinkelte Pfeile = Startpunkte der Transkription; Zahlen = Positionen im B95-8 Genom;
 (entnommen der Dissertation von Nadja Prang, Universität Regensburg, 1996)

Das *immediate-early*-Protein Zta (EB1, ZEBRA) besteht aus drei Exons und hat eine Länge von 245 Aminosäuren (Biggin *et al.*, 1987) (Abb. 3). Zta ist ein sequenzspezifisches, DNA-bindendes Protein, das der Familie der *Leucin-Zipper*-Transaktivatoren (bZIP) zugeordnet wird. Diese carboxyterminale *Leucin-Zipper*-Domäne ist für die Dimerisierung des Proteins (Turner und Tjian, 1989) und für die DNA-Bindung mit notwendig (Landschulz *et al.*, 1988; Gentz *et al.*, 1989). Benachbart dazu befindet sich das stark basische zweite Exon, das Homologie zu einer Familie DNA-bindender Proteine (*c-jun*, *c-fos*, *fra-1*, GCN4, CREB und C/EBP) aufweist. Diese Region, die für die DNA-Bindung mitverantwortlich ist (Struhl, 1987; Vogt *et al.*, 1987) und große Ähnlichkeit mit dem *fos*-Protoonkogen aufweist (Farrell *et al.*, 1989), ist zwischen den Vertretern dieser Familie stark konserviert. Die lange aminoterminal Domäne vermittelt die transaktivierenden Eigenschaften (Lieberman und Berk, 1990; Giot *et al.*, 1991; Flemington *et al.*, 1992). Neben seinen transaktivierenden Eigenschaften auf virale Promotoren scheint Zta auch durch Bindung an zelluläre AP-1 Bindestellen die Transkription der Wirtszelle zu modulieren (Farrell *et al.*, 1989; Flemington und Speck, 1990). Zta interagiert mit zellulären Transkriptionsfaktoren, die an der Regulation

der Zellproliferation beteiligt sind wie der Untereinheit p65 von NFκB (Gutsch *et al.*, 1994), dem Retinolsäure-Rezeptor RARα / RXRα (Sista *et al.*, 1993) oder dem Tumorsuppressor-Protein p53 (Zhang *et al.*, 1994). Somit beeinflusst Zta aktiv die zelluläre Genexpression. Zudem gibt es Hinweise, daß Zta in einigen humanen Epithelzelllinien einen G₀ /G₁-Arrest induziert, und somit den latenten Proteinen EBNA-2 und EBNA-5 entgegenwirkt (Cayrol und Flemington, 1996). Angesichts der zentralen Rolle des BZLF-1-Gens für die Umschaltung von latenter zu lytischer Replikation ist es einsichtig, daß vielseitige Mechanismen zur Regulation von BZLF-1 existieren.

1.2.8 Die Regulation des BZLF-1-Gens

In latent infizierten Zellen ist die Expression von BZLF-1 auf allen Ebenen der Genexpression stark reprimiert. Als wichtigste Stufe der Regulation wird die Transkriptionsebene angesehen (Schwarzmann *et al.*, 1994; Montalvo *et al.*, 1995; Montalvo *et al.*, 1991; Flemington und Speck, 1990). Desweiteren konnte auch eine Regulation auf posttranskriptioneller (Prang *et al.*, 1995; Prang *et al.*, 1999) und posttranslationaler Ebene (Daibata *et al.*, 1992; Katz *et al.*, 1992; Becker *et al.*, 1991), sowie eine immunologische Kontrolle (Bogedain *et al.*, 1995) (Callan *et al.*, 1998); (Rickinson und Moss, 1997) gezeigt werden.

1.2.8.1 Transkriptionskontrolle

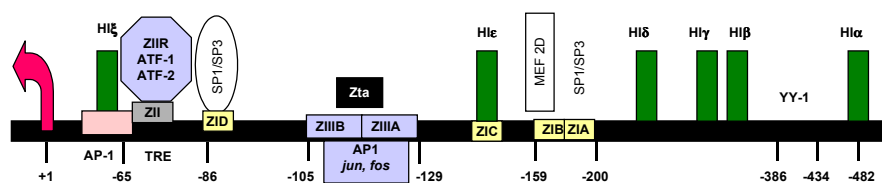


Abb. 4 Schematische Darstellung des Promotors von BZLF-1.

Rechtecke und Kreise stellen regulatorisch aktive Bereiche und daran bindende Faktoren dar. Der rote Pfeil markiert den Startpunkt der Transkription bei +1. HIα bis HIξ bezeichnet die verschiedenen HI-Motive im Promotor.

Die BZLF-1-Promotorregion enthält zahlreiche Bindestellen für negativ- und positiv-regulatorisch wirksame, virale und zelluläre Faktoren (Abb. 4). Mittels *Footprint*-Analysen konnten im proximalen Teil des Promotors von BZLF-1 (Position –221 bis +1) vier homologe proteinbindende Sequenzmotive ZIA-ZID sowie ein ZII-Motiv lokalisiert werden.

Die ZI-Motive wirken in Abwesenheit von TPA negativ-regulatorisch. Nach Zugabe von TPA verursachen diese, genau wie das ZII-Motiv, eine starke Aktivierung des Promotors. Grundlage dieser Stimulierung ist eine Aktivierung der Phospholipase C, die einerseits über Diacetylglycerin (DAG) und die Phosphokinase C (PKC) zur Bindung des Transkriptionsfaktors Sp3 an ZIB (Liu *et al.*, 1997), andererseits über Inositoltriphosphat (IP3) und Calmodulin zur Bindung des Faktors Msp1 an ZIA, C und D sowie ZII (Chatila *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 1997) führt.

Das ZII-Motiv setzt sich aus einer aktivierenden und einer reprimierenden Domäne zusammen (Liu *et al.*, 1998). Die aktivierende Domäne enthält eine Konsensus-Bindestelle für den zellulären Faktor AP-1, der durch TPA induzierbar ist (Flemington und Speck, 1990). Von der reprimierenden Domäne wurde gezeigt, daß deren Zerstörung zu einer deutlich stärkeren Aktivierbarkeit des Promotors nach TPA-Behandlung führt. Dagegen bewirkt eine Zerstörung der TPA-sensitiven Bereiche eine weitaus geringeren Induzierbarkeit des Promotors und somit indirekt eine Stabilisierung der Latenz des EBV (Wang *et al.*, 1997).

Weiterhin wurden im proximalen Bereich des Promotors von BZLF-1 zwei Zta-bindende Motive ZIIIA und ZIIIB charakterisiert, die für die autokrine Regulation des Promotors verantwortlich sind (Flemington und Speck, 1990b). Das Bindungsmotiv ZIIIA weist eine Homologie von sieben Basenpaaren zur AP-1-Bindestelle auf und reagiert somit ebenfalls sensitiv auf TPA-Behandlung. ZIIIB dagegen besitzt nur Affinität zu Zta (Flemington und Speck, 1990).

Im distalen Bereich des Promotors von Position -221 bis -551 wurden eine Reihe negativ-regulatorischer Bereiche identifiziert (Montalvo *et al.*, 1991). Der Transkriptionsfaktor YY1 bindet mehrmals in diesem Bereich (Montalvo *et al.*, 1995). YY-1 besitzt sowohl negativ als auch positiv-regulatorische Eigenschaften. Wie diese Effekte zustande kommen ist bislang ungeklärt. Für den *c-fos*-Promotor konnte gezeigt werden, daß die reprimierenden Eigenschaften von YY-1 durch direkte Wechselwirkung mit Transkriptionsfaktoren wie z.B. CREB (*c-AMP-responsive-element-binding-factor*) vermittelt werden (Zhou *et al.*, 1995).

Über den gesamten Promotorbereich verteilt befinden sich sechs Kopien der von unserer Arbeitsgruppe beschriebenen HI-Motive (Schwarzmann *et al.*, 1994) mit der Konsensus-Sequenz 5'-ACA GAT/G GA/G-3'. Aufgrund einer in *Bandshift*- und *Footprint*-Analysen identifizierten unterschiedlichen Proteinbindung während der Latenz und der lytischen Replikation des EBV, wurde eine regulatorische Funktion dieser Motive vermutet. Ferner konnte ein Bereich zwischen Position -177 und -203, der auf eine Aktivierung des B-

Zellrezeptors reagiert (Shimizu und Takada, 1994), sowie die Sequenz zwischen +12 und –86, die auf die Differenzierung von epithelialen Zellen antwortet (Karimi *et al.*, 1995), identifiziert werden.

1.2.8.2 Posttranskriptionelle Regulation

Daten aus unserer Arbeitsgruppe (Prang *et al.*, 1995) zeigten erstmals, daß die latente Replikation bei EBV durch negative Regulation des *immediate-early*-Gens BZLF-1 auf posttranskriptioneller Ebene stabilisiert wird. Aufgrund der komplementären Anordnung des BZLF-1-Gens zum Gen EBNA-1 war theoretisch eine Kontrolle beider Gene durch die Bildung einer doppelsträngigen Hybrid-RNA aus den beiden Transkripten denkbar. Für die Regulation der Genexpression durch natürlich vorkommende *Antisense*-Transkripte gab es bislang nur begrenzt Hinweise (Kimelman und Kirschner, 1989; Khochbin und Lawrence, 1989; Hildebrandt und Nellen, 1992; Wightman *et al.*, 1993). Vergleichbar ist die Anordnung latenter Gene in *Antisense*-Orientierung, wie sie bei EBV vorliegt, mit der Situation bei anderen Herpesviren. LAT (*Latency-Associated Transcripts*) bei HSV-1 (Herpes-Simplex-Virus-1) sind komplementär zum 3'-Ende des *immediate-early*-Gens ICP-0 (Wagner *et al.*, 1988; Farrell *et al.*, 1991). Ob bei HSV-1 ein *Antisense*-Mechanismus vorliegt und einen Einfluß auf die Etablierung und Aufrechterhaltung der Latenz hat, ist unklar. Es konnte aber gezeigt werden, daß die Zahl der latent infizierten Neuronen in den Ganglien ohne LATs geringer ist (Sawtell und Thompson, 1992). Bei EBV konnte die Bildung der Hybrid-RNA aus BZLF-1 und EBNA-1 hn-RNA von unserer Arbeitsgruppe direkt nachgewiesen werden (Prang *et al.*, 1999). Es konnte gezeigt werden, daß eine Aufhebung der Hybridbildung zum Start der lytischen Replikation führt. Über die Mechanismen, durch die dieses *Antisense*-Hybrid die Expression von BZLF-1 verhindern, und somit die Latenz stabilisieren könnte, ist wenig bekannt.

1.2.8.3 Posttranslationale Regulation

Auf posttranslationaler Ebene wird die Expression des BZLF-1-Proteins durch Modifikationen oder durch Wechselwirkung mit verschiedenen zellulären Faktoren reguliert (Sista *et al.*, 1993; Zhang *et al.*, 1994; Zhang *et al.*, 1994). Es konnte gezeigt werden, daß eine Phosphorylierung von Zta an den Positionen Ser 173, Ser 167 (Daibata *et al.*, 1992) die Induktion der lytischen Replikation verhindert (Gottlieb und Jackson, 1993; Kolman *et al.*, 1993). Eine Phosphorylierung von Ser 186 aktiviert dagegen die Expression des Transkriptionsfaktors (Baumann *et al.*, 1998). Für die transaktivierenden Eigenschaften von

Zta ist eine Dimerisierung über das *Leucin-Zipper*-Motiv im carboxyterminalen Bereich des Proteins von Bedeutung (Flemington und Speck, 1990a). Nur als Homodimer entfaltet Zta seine transaktivierenden Eigenschaften. Eine Hemmung der transaktivierenden Eigenschaften von Zta ist für die Wechselwirkung von Zta mit *jun* (Sato *et al.*, 1992), der p65-Untereinheit von NFκB (Gutsch *et al.*, 1994), dem Tumorsuppressorprotein p53 (Zhang *et al.*, 1994) und dem Retinolsäurerezeptor RARα / RXRα (Sista *et al.*, 1993) beschrieben. Nur *in vitro* beschrieben ist eine Interaktion von Zta mit dem RAZ-Protein von EBV (Furnari *et al.*, 1994). Das bislang nur auf RNA-Ebene nachgewiesene und somit *in vivo* noch hypothetische RAZ-Protein besitzt den Aminoterminus des R-Transaktivators und den Carboxyterminus und damit die Dimerisierungsdomäne von Zta. RAZ besitzt aufgrund dieses Spleißmusters allerdings keine Transaktivierungsdomäne. Somit könnte ein hypothetisches RAZ / Zta oder ein RAZ / RAZ Dimer zwar an Bindestellen für Zta binden, jedoch nicht transaktivieren. Transfektionsexperimente in Zellkultur haben gezeigt, daß keine stöchiometrische Wechselwirkung zwischen RAZ und Zta notwendig ist, damit RAZ die Transaktivierung durch Zta hemmt (Segouffin *et al.*, 1996).

Ob die Aktivität des Zta-Proteins durch eine gesteuerte Lokalisation in der Zelle kontrolliert wird, ist nicht geklärt. In den differenzierten Schichten epithelialer Gewebe bei oraler Haarleukoplakie OHL wurde eine solche Regulation vermutet (Becker *et al.*, 1991). So konnte Zta in den basalen Schichten der Zunge, wo keine lytische Replikation stattfindet, immunhistochemisch ausschließlich im Zytoplasma nachgewiesen werden. In den ausdifferenzierten Schichten, wo EBV-Vermehrung stattfindet, war Zta dagegen im Zellkern lokalisiert. Diese Daten konnten von einer anderen Arbeitsgruppen bislang jedoch nicht bestätigt werden (Young *et al.*, 1991).

Die verschiedenen Ebenen der Regulation des BZLF-1-Gens bzw. von Zta sind in Abb. 5 dargestellt.

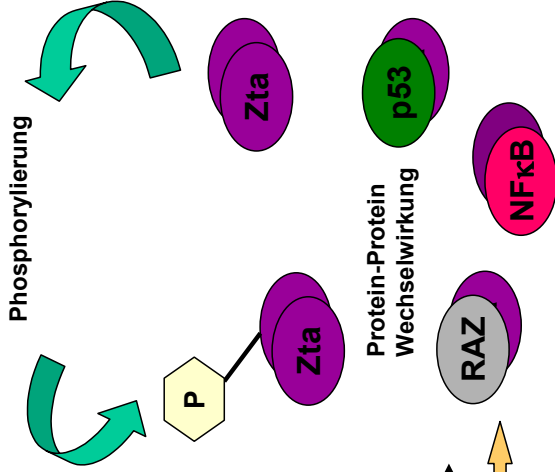


Abb. 5

Gezeigt sind die verschiedenen Ebenen der Regulation von BZLF-1. Die Transkriptionskontrolle erfolgt über regulatorische Motive und daran bindende Faktoren im BZLF-1-Promotor. Die posttranskriptionelle Kontrolle erfolgt über einen Antisense-Mechanismus, bei dem die BZLF-1-hn-RNA ein Hybrid mit dem komplementären EBNA-1-Intron bildet. Auf posttranslationaler Ebene kommt es zu Modifikationen des Z-Proteins, wie Phosphorylierung, oder zu Protein-Proteinwechselwirkungen mit zellulären oder viralen Faktoren.

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Das Epstein-Barr-Virus besitzt die Fähigkeit, nach der Primärinfektion lebenslang im Wirtsorganismus zu persistieren. Abhängig vom Typ und dem Differenzierungsgrad der Zelle repliziert EBV aktiv oder wird latent an die Tochterzellen weitergegeben. Da die aktive Vermehrung mit der Zerstörung der Wirtszelle verbunden ist, greifen in latent infizierten Zellen Regulationsmechanismen zur Aufrechterhaltung der Latenz auf allen Ebenen der Genexpression. Dabei wird die Transkriptionskontrolle als wichtigster Schritt angesehen. Das Gen BZLF-1 nimmt eine Schlüsselposition ein, da es als einziges virales Protein in der Lage ist, die Latenz des Virus in B-Zellen zu beenden. In latent infizierten Zellen ist der Promotor von BZLF-1 aufgrund verschiedenster regulatorischer Sequenzen nur schwach aktiv. Dazu gehören auch die von unserer Arbeitsgruppe lokalisierten HI-Motive, die in sechsfacher Kopienzahl im Promotor von BZLF-1 vertreten sind. Vorarbeiten haben gezeigt, daß die Funktion der HI-Motive sehr stark von benachbarten regulatorisch wirksamen Elementen abhängt (Heide Sommer, Diplomarbeit). So konnte im Kontext des distalen Promotorteils von BZLF-1 eine reprimierende Wirkung der HI-Motive auf die Basalaktivität festgestellt werden (Schwarzmann *et al.*, 1994). Isoliert von ihrer natürlichen Umgebung konnte über die Basalaktivität keine Aussage getroffen werden, da sich diese etwa auf dem Niveau der Negativ-Kontrolle befand. Hier konnte jedoch ein positiv-regulatorischer Effekt auf die autokrine Stimulation durch Zta festgestellt werden (Diplomarbeit Heide Sommer, Universität Regensburg, 1995).

Im Rahmen dieser Arbeit sollte nun untersucht werden, welcher Art die Funktion der HI-Motive auf die Basalaktivität des Promotors und auf die Transaktivierung durch Zta im Promotor von BZLF-1 ist.

Zu diesem Zweck sollte der gesamte BZLF-1-Promotor vor das Luciferasegen kloniert werden und die verschiedenen distal gelegenen HI-Motive einzeln oder in Kombination mutiert werden. In Transfektionsexperimenten zusammen mit einem Expressionsplasmid für Zta sollte die Aktivierbarkeit der unterschiedlichen Promotorvarianten und die Rolle der einzelnen HI-Motive für die Regulation des Promotors untersucht werden. Die Experimente sollten sowohl in lymphoiden als auch in epithelialen Zelllinien durchgeführt werden, da diese unterschiedlich permissiv für die aktive Vermehrung des Virus sind: in lymphoiden Zellen repliziert EBV normalerweise latent, in epithelialen lytisch. Mittels *Bandshift*-Experimenten

sollten zudem potentielle Faktoren, die eine Interaktion zwischen den HI-Motiven und Zta vermitteln, analysiert werden.

Da aus Vorarbeiten bekannt war, daß die Expression von BZLF-1 auch von anderen viralen Genen wie z.B. EBNA-1 über *Antisense*-Hybridisierung beeinflußt werden kann, sollte die Funktion und die Bedeutung der einzelnen HI-Motive für die Regulation des BZLF-1-Gens und damit für die Vermehrung des EBV durch die Herstellung eines rekombinant hergestellten, mutierten Virus in Zusammenarbeit mit H.-J. Delecluse (GSF, München) untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Ausgangsmaterialien

2.1.1 Bakterien

Für Klonierungsarbeiten und Produktion der Plasmide für Transfektionsexperimente wurden die Bakterienstämme DH5 α und TOP10 (Invitrogen) verwendet. Zur Herstellung von Zta-Protein in Bakterien wurde der Bakterienstamm BL21 DE3 verwendet. Zur Herstellung des rekombinanten EBV kamen die Bakterienstämme BJ5183 und DH10B zum Einsatz.

DH5 α :

F'/*endA1 hsdR17* ($r_k^- m_k^+$) *supE44 thi1 recA1 gyrA* (Nal¹) *relA1* $\Delta(lac ZYA -argF)$ U169 ($\phi 80d lac (lacZ)$ M15). (Woodcock *et al.*, 1989; Raleigh *et al.*, 1989)

Top10

F *mcrA* $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$ $\Phi 80lacZ\Delta M15$ $\Delta lacX74$ *recA1 deoR araD139* $\Delta(ara-leu)7697 galU galK rpsL$ (Str^R) *end A1 nupG*

BJ5183

F' *endA sbcB* $recBC^- galK met^- str^r thi-1 bioT hsdR$ ($r_k^- m_k^+$) λ^- (Hanahan, 1983)

DH10B

F⁻ *mcrA* $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$ $\phi 80dlacZ\Delta M15$ $\Delta lacX74$ *endA1 recA1 deoR* $\Delta(ara, leu)7697 araD139 galU galK nupG rpsL$ λ^- (Bedthesda Research Laboratories)

BL21 DE3

hsdS gal (lcIts857 *ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7 gene 1*) (Studier und Moffatt, 1986)

2.1.2 Nährmedien für Bakterien

LB-Medium

5 g / l NaCl
5 g / l Bacto-Trypton
5 g / l Hefeextrakt
pH 7,3

SOC-Medium

0,5 g / l NaCl
20 g / l Bacto-Trypton
5 g / l Hefeextrakt
0,186 g / l KCl
0,95 g / l MgCl₂
Nach dem Autoklavieren
mit 20 ml / l Glucose-
Lösung (180 g / l, steril
filtriert) versetzt.

SOB-Medium

0,5 g / l NaCl
20 g / l Bacto-Trypton
5 g / l Hefeextrakt
0,186 g / l KCl
pH 7,0

2.1.3 Verwendete Ausgangsplasmide

pGL2 basic (Promega)

pGL3 control (Promega)

pSEAP (Tropix)

pCMV-SEAP (Tropix)

pET 5c ZcDNA

pCMV-Z'

pCMVZcDNA

pCR II™ TOPO (Invitrogen)

pCP16 (Cherepanov und Wackernagel, 1995)

Die Plasmidkarten sowie die Beschreibung der verwendeten Plasmide sind im Anhang aufgeführt.

2.1.4 Zelllinien

2.1.4.1 Allgemeines

Alle verwendeten Zelllinien stammten aus dem Besitz des Instituts für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universität Regensburg. Alle Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank kultiviert. Den Medien wurde abwechselnd Kanamycin (50 µg / ml) oder Penicillin / Streptomycin (200 µg / ml) zugesetzt, um Kontaminationen durch Bakterien und Resistenzbildung vorzubeugen. Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Suspensionszellen wurden bei einer Zelldichte von ca. 2×10^6 / ml 1:4 auf eine Zelldichte von $0,5 \times 10^6$ / ml verdünnt. Adhärent wachsende Zelllinien wurden, sobald sie zu einem konfluenten Zellrasen gewachsen waren, mit Hilfe einer Trypsin / EDTA-Lösung (2 ml für 75 cm² Falcon® Zellkulturflasche, 4 ml für 175cm²-Falcon®-Zellkulturflasche) von der Unterlage abgelöst, 1:10 mit Zellkulturmedium verdünnt, und neu ausgesät.

2.1.4.2 Suspensionszellen

BJAB (Klein *et al.*, 1974)

Die EBV-negativen BJAB-Zellen stammen aus einem Burkitt's Lymphom eines Afrikaners.

LCL / EMMI

Die LCL-Zelllinie wurde durch Immortalisierung von B-Lymphozyten mit dem EBV-Stamm B95-8 etabliert. Die B-Lymphozyten stammten von einem ehemaligen Institutsmitglied.

Raji (ATCC CCL 86)

Die Raji-Zelllinie stammt aus einem afrikanischem Burkitt's Lymphom. Die Zelllinie besitzt eine Deletion in der Region, die für das frühe Protein p138 (Leserahmen BALF-2) kodiert. Daher können die Zellen keine funktionsfähigen Viruspartikel bilden.

P3HR1 Klon 13 (ATCC HTB 62)

Die latent mit EBV infizierte Burkitt's Lymphom Zelllinie besitzt eine Deletion in der U2 Region, in IR2 sowie im rechten Teil des IR1 (siehe Abb. 2). Somit fehlt ihr unter anderem das für die Immortalisierung von lymphoiden Zellen essentielle EBNA2-Protein. In einem

Teil der Viruspartikeln von P3HR1 Klon13 ist das Genom rearrangiert, wodurch die BamHI-Z-Region unter der Kontrolle des in der Latenz aktiven W-Promotors steht (*het*-DNA). Daher repliziert die Zelllinie in einem geringen Maß spontan lytisch. Sie entstand beim Passagieren der BL-Zelllinie Daudi.

P3HR1 Klon 16 (Taylor *et al.*, 1989)

Diese Zelllinie entspricht dem Klon 13, besitzt aber keine *het*-DNA, weshalb die meisten dieser Zellen latent infiziert sind.

2.1.4.3 Adhärente Zellen

H1299 (Mitsudomi *et al.*, 1992)

Bei H1299 handelt es sich um Zellen eines p53-negativen, humanen Lungenzellkarzinoms. Die Zellen wurden in Dulbecco's MOD Medium (Gibco BRL) kultiviert.

Cos7 (ATCC RRL 1651)

Bei Cos7 handelt es sich um eine mit SV40 T-Ag (*simian virus 40 large T antigen*) immortalisierte fibroblastenähnliche, embryonale Affennieren-Epithelzelllinie, die ebenfalls in Dulbecco's MOD *Eagle* Medium (Gibco BRL) kultiviert wurde.

Tera 9117

Die Zelllinie Tera 9117 wurde freundlicherweise von Dr. Buettner, Institut für Pathologie der Universität Regensburg, zur Verfügung gestellt. Es handelt sich hierbei um eine schwach tumorigene undifferenzierte, humane Zelllinie aus einem Teratokarzinom. Sie kann durch Retinolsäure zur Differenzierung angeregt werden. Diese Zellen wurde in *Minimal Essentiell (Eagle)* Medium (MEM, Gibco BRL) kultiviert.

293 (Graham *et al.*, 1977)

Die Linie 293 ist eine durch Adenovirus Typ 5 (Ad 5) transformierte humane, embryonale Nierenzelllinie. Diese adhärent wachsende Zelllinie wurde in RPMI 1640 kultiviert.

2.1.5 Verwendete Antikörper und Seren

Bezeichnung	Ziel	Firma
Maus-anti-BZ1 (MAK)	BZLF-1 Protein von EBV	Dako
Kaninchen-anti-Maus (HRP-gekoppelt)	Fc-Teil von Maus-AKs	Dako
Kaninchen-anti-Maus (AP-gekoppelt)	Fc-Teil von Maus-AKs	Dako
Ziege-anti-Maus	Fc-Teil von Maus-AKs	Dianova
Epstein-Barr-Virus-VCA (MAK)	VCA-Protein von EBV	Chemicon
Kaninchen-Anti-Mensch IgG (HRP-gekoppelt)	Menschliches IgG	Dako
Ziege-anti-Maus (Texas Red-gekoppelt)	Maus IgG H + L	Dianova
NPC-Serum	verschiedene EBV-Proteine	RIMMH
YY1 (H-10) Maus monoklonales IgG ₁	YY1 Protein	Santa Cruz
α VCA	VCA-Protein von EBV	Chemicon

2.1.6 Verwendete Oligonukleotide

Die synthetischen Oligonukleotide, die als Sequenzier-*Primer*, PCR-*Primer* sowie für Gelretardationsanalysen verwendet wurden, wurden von der Firma Metabion aus Martinsried hergestellt.

PCR-Primer

Name	Anwendung	Sequenz (5'-3')
BZLF-1 <i>forward</i>	5'- <i>Primer</i> zur Amplifikation des 2595 Bp-Fragments aus B95-8 für rekombinante EB-Viren (Position 104770 bis Position 102175)	CAG CGC TAT GTA CAA GCT CC
BZLF-1 <i>reverse</i>	3'- <i>Primer</i> zur Amplifikation des 2595 Bp-Fragments aus B95-8 für rekombinante EB-Viren (Position 104770 bis Position 102175)	AGG CGT GAA GCA GGC GTG G
PCR-BZLF-1* <i>forward</i>	5'- <i>Primer</i> zur Amplifikation des mutierten distalen Teils des Promotors von BZLF-1 aus pLuc Zp* (Bindet an Pos. -513 bis -531 bezogen auf den Transkriptionsstart)	TGC CCC AGC CAC TTG ACC

Material & Methoden

PCR-BZLF-1* <i>reverse</i>	3'- <i>Primer</i> zur Amplifikation des mutierten distalen Teils des Promotors von BZLF-1 aus pLuc Zp* (Bindet an Pos. –264 bis –284 bezogen auf den Transkriptionsstart)	CAT TAA GTT CGG GGG TCA GG
ON <i>KpnI</i> (Promotion Nadja Prang)	5'- <i>Primer</i> zur Amplifikation des BZLF-1-Promotors aus B95-8 sowie des distalen Promotoranteils von BZLF-1 aus pSSVHbs-Konstrukten	GGA TCC CTA ACG GTA CCC CCG G
ON <i>NheI</i> (Promotion Nadja Prang)	3'- <i>Primer</i> zur Amplifikation des distalen des Promotoranteils von BZLF-1 aus pSSVHbs-Konstrukten (Bindet an Position –256 bis -230 bezogen auf den Transkriptionsstart)	GAC ATT CAT CAG CTA GCA ATG TAT CC
ON <i>BglII</i>	3'- <i>Primer</i> zur Amplifikation des vollständigen BZLF-1-Promotors aus B95-8	CGG CAA GGA GAT CTG TTT AGT G
Extention <i>Primer</i>	Oligonukleotid zur Hybridisierung mit BZLF-1 RNA für <i>Primer</i> Extention-Experimente (Bindet an Position 103091-103113 des EBV-Genoms)	AAG GCA CCT GGT ATG GGT CAG G

Künstlich eingeführte Schnittstellen für Restriktionsenzyme sind fett gedruckt.

Sequenzier-Primer

Name	Anwendung	Sequenz (5'-3')
SP-BZLF-1/1	Position 104774-104754 im B95-8-Genom	GAT GAA CTC GAA AGT CTC C
SP-BZLF-1/2	Position 103778-103759 im B95-8-Genom	AGG ACC TGT CCA TGA ACC
SP-BZLF-1/2 <i>reverse</i>	Position 103172-103194 im B95-8-Genom	AAA GGT GGC CGG CAA GG
SP-BZLF-1/3	Position 103277-103759 im B95-8-Genom	CAC GTC CCA AAC CAT GAC
SP-BZLF-1/4	Position 102779-102761 im B95-8-Genom	GCA GTG GTG TTT GCT TGC

SP-BZLF-1/5	Position 102278-102260 im B95-8-Genom	AGC CTG GAT GTT GAC TCC
BZLF-1 <i>forward</i>	Position 104754-104774 im B95-8-Genom	CAG CGC TAT GTA CAA GCT CC
BZLF-1 <i>reverse</i>	Position 102175-102194 im B95-8-Genom	AGG CGT GAA GCA GGC GTG G
M13 (Invitrogen®)	Universal M13 <i>Primer</i>	GTA AAA CGA CGG CCA G
M13 <i>reverse</i> (Invitrogen®)	Universal M13 <i>reverse Primer</i>	CAG GAA ACA GCT ATG AC
Seq pGL2	5'-Sequenzierprimer für pGL2-Plasmide Position 5886-13	GAG CTAACA TAA CCC GGG AGG TAC C

Oligonukleotide für Bandshift-Experimente

Name	Anwendung	Sequenz (5'-3')
HS-ZRE pos.	Spezifische Zta-Bindestelle (Kenney <i>et al</i> ,1997)	CAT CAT <u>GTG CAA</u> GCT <u>ATG</u> <u>TGC AAT</u> G
HS-ZRE neg.	Gegenstrang zu HS-ZRE pos.	CAT <u>TGC ACA</u> TAG <u>CTT GCA</u> <u>CAT</u> GAT C
HI α pos. (orig. Flanken)	HI α -Motiv aus BZLF-1-Promotor mit original flankierenden Sequenzen	GGC TCC GTT <u>CAG TAG ACA</u> ACC TCC TGG G
HI α neg. (orig. Flanken)	Gegenstrang zu HI α pos.	CCC AGG AGG <u>TTG TCT ACT</u> GAA CGG AGC C
HI α pos.	HI α -Motiv aus BZLF-1-Promotor ohne original flankierenden Sequenzen	CAG ATT CAA <u>ATC ATC TGT</u> CAT GGA CTC T
HI α neg.	Gegenstrang zu HI α pos	AGA GTC CAT <u>GAC AGA TGA</u> TTT GAA TCT G
HI α * pos.	Mutiertes HI α -Motiv	CAG ATT CAA <u>ATA AGC TTG</u> CAT GGA CTC T

HI α * neg.	Gegenstrang zu HI α * pos	AGA GTC CAT <u>GCA AGC TTA</u> TTT GAA TCT G
HI β pos.	HI β -Motiv aus BZLF-1-Promotor	GAG GAA GCA <u>GCC ATA TGT</u> GGC AAG CTT GG
HI β neg.	Gegenstrang zu HI β pos.	CCA AGC TTG <u>CCA CAT ATG</u> GCT GCT TCC TC
HI β * pos.	Mutiertes HI β -Motiv	GAG GAA GCA <u>GCA GTA TAC</u> GGC AAG CTT GG
HI β * neg.	Gegenstrang zu HI β * pos	CCA AGC TTG <u>CCG TAT ACT</u> GCT GCT TCC TC
HI γ pos.	HI γ -Motiv aus BZLF-1-Promotor	CCA GTA TAC <u>GGA CAG ATG</u> <u>GAC</u> CTG AGC CA
HI γ neg.	Gegenstrang zu HI γ pos.	TGG CTC AGG <u>TCC ATC TGT</u> <u>CCG</u> TAT ACT GG
HI γ * pos.	Mutiertes HI γ -Motiv	CCA GTA TAC <u>GGC AAG CTT</u> <u>GAC</u> CTG AGC CA
HI γ * neg.	Gegenstrang zu HI γ * pos.	TGG CTC AGG <u>TCA AGC TTG</u> <u>CCG</u> TAT ACT GG
HI γ links verkürzt pos.	HI γ -Motiv aus BZLF-1-Promotor mit verkürzter linker Flanke	ACG <u>GAC AGA TGG</u> ACC TGA GCC A
HI γ links verkürzt neg.	Gegenstrang zu HI γ links verkürzt pos.	TGG CTC AGG <u>TCC ATC TGT</u> <u>CCG</u> T
HI γ rechts verkürzt pos.	HI γ -Motiv aus BZLF-1-Promotor mit verkürzter rechter Flanke	CCA GTA <u>TAC GGA CAG ATG</u> GAC C
HI γ rechts verkürzt neg.	Gegenstrang zu HI γ rechts verkürzt pos.	GGT <u>CCA TCT GTC</u> CGT ATA CTG G
HI γ beidseitig verkürzt pos.	HI γ -Motiv aus BZLF-1-Promotor mit beidseitig verkürzten Flanken	ACG <u>GAC AGA TGG</u> ACC
HI γ beidseitig verkürzt neg.	Gegenstrang zu HI γ beidseitig verkürzt pos.	GGT <u>CCA TCT GTC</u> CGT
HI β / γ pos.	Originalsequenz aus BZLF-1- Promotor mit HI β / γ -Motiven	GGA AGC AGC <u>CAT ATG TGG</u> <u>ACA GAT GGA</u> CCT GAG CC

HIβ/γ neg.	Gegenstrang zu HIβ/γ pos.	GGC TCA GGT <u>CCA TCT GTC</u> <u>CAC ATA TGG</u> CTG CTT CC
HIδ pos.	HIδ -Motiv aus BZLF-1-Promotor	AGA GTC <u>CAT GAC AGA GGA</u> TTT GAA TCT G
HIδ neg.	Gegenstrang zu HIδ pos.	CAG ATT CAA <u>ATC CTC TGT</u> <u>CAT GGA</u> CTC T
HIδ* pos.	Mutiertes HIδ -Motiv aus BZLF-1-Promotor	AGA GTC <u>CAG AAT TCA GGA</u> TTT GAA TCT G
HIδ* neg.	Gegenstrang zu HIδ* pos.	CAG ATT CAA <u>ATC CTG AAT</u> <u>TCT GGA</u> CTC T
YY1 pos.	Bindestelle für das YY1-Protein	GCG TCC GCG <u>GCC ATC</u> TTG GCG GCT GGT
YY1 neg.	Gegenstrang zu YY1 pos.	ACC AGC CGC CAA <u>GAT GGC</u> CGC GGA GCG
YY1* pos.	Mutierte Bindestelle für das YY1- Protein	GCG TCC GCG <u>ATT ATC</u> TTG GCG GCT GGT
YY1* neg.	Gegenstrang zu YY1* neg.	ACC AGC CGC CAA <u>GAT AAT</u> CGC GGA CGC

Proteinbindestellen sind unterstrichen.

Oligonukleotide für „quick change“-Mutagenese

Name	Anwendung	Sequenz (5'-3')
ON <i>Eco</i> RI	<i>Primer 1</i> zur Einführung einer <i>Eco</i> RI-Schnittstelle in das HI δ-Motiv.	CAC AGA GTC CGA ATT CGA GGA TTT GAA TCT G
ON <i>Eco</i> RI rev.	<i>Primer 2</i> zur Einführung einer <i>Eco</i> RI-Schnittstelle in das HI δ-Motiv.	CAG ATT CAA ATC CTC GAA TTC GGA CTC TGT G

2.1.7 Verwendete EDV-Programme

Zum Anfertigen der Arbeit wurden die Programme WinWord 97, Powerpoint 97, Sigma Plot 5,0, (Microsoft), sowie Photoshop 5,0 (Adobe) verwendet. Zur Suche von Restriktionsenzymchnittstellen in der EBV-DNA-Sequenz oder in sequenzierten Bereichen wurde die Software der *University of Wisconsin Genetics Computer Group (UWGCG)* auf

einer INDY9000-Rechenanlage oder die *Gene Runner* Software 2.0 (*Hastings Software*) verwendet. Die graphische Darstellung von Plasmiden erfolgte mit Hilfe der *Vector NTI* Software (InforMax). Bei Literaturrecherchen stand die *NLM Medline* im Internet (<http://ncbi.nlm.nih.gov>), für das Literaturverzeichnis der *Reference Manager Version 8.5* (*Research Information Systems*) zur Verfügung.

2.2 Arbeiten mit Bakterien

2.2.1 Anzucht von Bakterien im Fermenter

Für die Gewinnung ausreichender Mengen viraler DNA der rekombinanten EBV-Stämme war eine Anzucht im 5 l Fermenter nötig, da es sich um Plasmide mit nur einer Kopie des Genoms pro Zelle handelte.

Der Fermenter wurde mit 37 °C warmen LB-Medium (angereichert mit 0,3 M NaCl, 2 % Glycerin), das 30 µg / ml Chloramphenicol enthielt, gefüllt und mit 800 ml ÜN-Kultur angeimpft, so daß ein Endvolumen von 5 l erreicht wurde. Durch elektronisch gesteuerte Zugabe von 1 M NaOH wurde der pH-Wert konstant auf pH 7,0 gehalten. Bei einer konstanten Temperatur von 37 °C, konstanter Sauerstoffzufuhr, sowie einer Umdrehungszahl des Rührwerks von 400 rpm, lief der Fermenter ca. 8 h, bis eine optische Dichte (OD) von $\geq 1,5$ erreicht wurde. Anschließend wurden die Bakterien aus dem Fermenter geerntet und die Plasmid-DNA isoliert.

2.2.2 Transformation von Bakterien

2.2.2.1 Rubidiumchlorid-Methode

Herstellung kompetenter Bakterien

Am Vorabend einer Präparation wurde eine 5 ml Vorkultur des verwendeten *E. coli* Stammes DH5 α angeimpft und am nächsten Morgen 500 µl davon in 200 ml LB-Medium verdünnt. Bei einer OD₆₀₀ von 0,3-0,4 wurde die Kultur durch 10 min Zentrifugation bei 500 x g und 4 °C geerntet. Alle folgenden Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Die abzentrifugierten Bakterien wurden in 20 ml Lösung A [(10 mM MOPS (3-N-Morpholinopropansulfonsäure) pH 5,8, 0,3 M KAc, 10 mM RbCl, 15 % Glycerin] resuspendiert und erneut abzentrifugiert. Nun wurden die Bakterien in 20 ml Lösung B (10 mM MOPS pH 6,5, 10 mM RbCl, 50 mM

CaCl₂ x 2 H₂O, 15% Glycerin) resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Bakterien in 5 ml Lösung B unter Zusatz von 750 µl Glycerin (85 %) resuspendiert und in 200 µl Aliquots in -20 °C vorgekühlte Eppendorf-Gefäße abgefüllt. Die Lagerung erfolgte bei -70 °C. Um die Fähigkeit der Bakterien, DNA aufzunehmen (Kompetenz) zu prüfen, wurde eine Probetransformation mit pUC18 Plasmid-DNA durchgeführt. Nach Inkubation der Agarplatten über Nacht bei 37 °C wuchsen Kolonien (10⁷-10⁹ Transformanten / µg Plasmid), während bei der Kontroll-Transformation, bei der das Plasmid durch Wasser ersetzt wurde, keine einzige Kolonie zu finden war.

Transformation der Bakterien

200 µl kompetente Bakterien wurden auf Eis aufgetaut und mit 10-20 µl DNA 45 min auf Eis inkubiert. Nach 2 min Hitzeschock bei 42 °C und anschließender 5 min Inkubation auf Eis wurden 500 µl LB₀-Medium zugegeben. Dieser Transformationsansatz wurde 1-2 h im Bakterienrüttler bei 200 rpm geschüttelt, damit die Bakterien ihre plasmidkodierte Resistenz ausbilden konnten. Je 200 µl des Transformationsansatzes wurden auf Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37 °C bebrütet. Am nächsten Tag wurden Einzelkolonien der Transformanten in 5 ml LB_{amp} angeimpft, anschließend die Plasmid-DNA isoliert, und durch Restriktionsenzymverdaу charakterisiert.

2.2.2.2 Elektroporation-Methode

Herstellung kompetenter Bakterien

Diese Methode eignet sich besonders gut für die effiziente Aufnahme von großen Plasmiden (hier EBV mit einer Größe von 170 kbp) in Bakterien.

Zur Herstellung elektrokompetenter Bakterien wurden 400 ml SOB-Medium (Sambrook *et al.*, 1989) mit 1 ml einer ÜN-Bakterienkultur (DH5α) angeimpft. Nach Erreichen einer optischen Dichte (OD) von 0,7 bei einer Wellenlänge von 600 nm wurde die Bakterienkultur 10 min bei 500 x g und 4 °C sedimentiert. Die Bakterien wurden 3 mal mit 400 ml 4 °C kaltem, 10 %igem Glycerin gewaschen und bei 8300 x g und 4 °C 10 min zentrifugiert. Die Bakterien wurden in 2-2,25 ml / l Ausgangskultur 10 % Glycerin resuspendiert, in 100 µl Portionen auf Trockeneis / EtOH aliquotiert, und bei -70 °C weggefroren.

Transformation der Bakterien

Die elektrokompenten Bakterien wurden auf Eis aufgetaut, mit 1 µg zu transformierender DNA gemischt, und dieser Ansatz 5 min auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde in auf 4 °C vorgekühlte Elektroporationsküvetten (peqlab, 2mm-Küvetten) überführt und in einem Elektroporationsgerät (Biorad) einem Puls von 1000 V und 25 µF bei einem Widerstand von 200 Ω ausgesetzt. Anschließend wurden sofort 500 µl SOB-Medium zugegeben und die Bakterien 45 min bei 37 °C geschüttelt. Nach 10 min Zentrifugation bei 3300 rpm und RT wurde der Transformationsansatz vollständig auf Selektionsplatten ausplattiert und ÜN im Brutschrank inkubiert. Aus Einzelkolonien der Transformanten wurde Plasmid-DNA isoliert und durch Restriktionsenzymverdau charakterisiert.

2.2.3 Aufbewahrung von Bakterienkulturen

Charakterisierte Bakterienklone wurden in der logarithmischen Wachstumsphase mit 50 % Glycerin versetzt und in *Cryo –Tubes* (Nunc) bei –70 °C gelagert.

2.3 Arbeiten mit Zellkulturen

2.3.1 Transfektion von eukaryotischen Zellen

Transfektion von Suspensionszellen mittels Elektroporation

Das Einbringen von DNA in eukaryotische Suspensionszellen erfolgt besonders effizient durch Elektroporation mittels Doppelpuls. Zu diesem Zweck wurden Suspensionszellen am Tag vor der Elektroporation auf eine Zelldichte von $0,4 \times 10^6$ verdünnt, damit sich die Zellen am Tag der Elektroporation in der logarithmischen Wachstumsphase ($0,6 \times 10^6$ - $0,8 \times 10^6$) befanden. Pro Transfektionsansatz wurden $1-2 \times 10^7$ Zellen eingesetzt. In einer Hettich-Tischzentrifuge wurden die Zellen bei RT und 1200 rpm 10 min abzentrifugiert, zweimal mit PBS gewaschen, und die entsprechende Zellzahl pro Transfektion in 400 µl PBS aufgenommen. Diese Zellsuspension wurde in eine Transfektionsküvette, in der sich bereits 40-60 µg der zu transfizierende DNA in 100 µl PBS befand, überführt und die Mischung 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz in der Küvette im Elektroporationsgerät (peqlab 4mm Küvetten) folgendem Doppelpuls ausgesetzt:

700 V / 25 µF // 150 V / 1500 µF

Anschließend wurden die Zellen in eine 6-Loch-Platte (Falcon[®], Heidelberg) mit RPMI 1640 überführt und bis zur Auswertung nach 48 h im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

Transfektion adhärenter Zellen

Transfektion von Tera 9117 und H1299 mittels DOTAP liposomal transfection reagent (Roche Molecular Biochemicals)

Adhärente Zellen lassen sich effizient durch Liposomen transfizieren. Dabei entstehen mit DNA beladene Phospholipid-Partikel, deren Inhalt durch Endozytose aufgenommen wird. Zum Zweck der Transfektion wurden am Tag zuvor Zellen in einer Dichte von 3×10^5 pro Loch einer 6-Loch-Platte (Falcon[®], Heidelberg) in 5 ml geeignetem Medium ausgesät und über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. So wurde zum Zeitpunkt der Transfektion ein Zellrasen mit einer Dichte von ca. 60 %-80 % erreicht. Mit 20 mM HEPES / KOH-Puffer, pH 7,3 wurden pro Transfektion 2,5 µg DNA auf ein Volumen von 25 µl, sowie 15 µl DOTAP auf ein Volumen von 50 µl verdünnt. Anschließend wurde die DNA-Lösung vorsichtig mit der Liposomenlösung gemischt und 10-15 min bei RT inkubiert. Von den zu transfizierenden Zellen wurde das Medium abgezogen, 1 ml frisches Medium zugegeben und die DOTAP-DNA-Mischung unter Schwenken zugetropft. Nachdem die Zellen 4-6 h inkubiert worden waren, wurden erneut 4 ml Medium zugegeben und die Zellen bis zur Auswertung der Transfektion 48 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Diese Transfektionsmethode wurde bei den Zelllinien Tera 9117 und H1299 eingesetzt.

Transfektion von 293-Zellen mit Lipofectamin[™]-Reagent (Gibco BRL)

Bei der Transfektion mit Lipofectamin handelt es sich um eine von der DOTAP-Methode etwas abweichenden Transfektionsart, die aber auf dem gleichen Prinzip beruht. Die Entscheidung, welches Transfektions-Reagenz benutzt wird, hängt von der maximal erzielten Transfektionseffizienz der jeweiligen Zelllinie ab. Diese Methode wurde zur Transfektion der 293-Zellen mit dem rekombinanten EBV-Genom verwendet.

Die 293-Zellen wurden am Tag vor der Transfektion so ausgesät, daß sie am folgenden Tag eine Zelldichte von 50 %-80 % hatten. Für die Transfektion wurde zunächst das RPMI 1640-Medium abgezogen und die Zellen 2 h in 1 ml OPTIMEM (Gibco BRL) inkubiert. In der Zwischenzeit wurden der Transfektions-Mix pipettiert: 1 µg DNA und 6 µl Lipofectamin / µg DNA wurden getrennt in OPTIMEM in einem Volumen von je 250 µl verdünnt.

Anschließend wurden die beiden Lösungen vorsichtig miteinander gemischt und 30 min bei RT inkubiert, damit sich die DNA-beladenen Phospholipid-Partikel ausbilden konnten. Von den Zellen wurden 500 µl OPTIMEM abgezogen und durch den Transfektions-Mix ersetzt. Nach 4 h Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ wurden 4 ml RPMI 1640 zugegeben und die Zellen weitere 48 h kultiviert.

2.3.2 Nachweissysteme für Reporterproteine

Zur Analyse der transienten Expression viraler Proteine in eukaryotischen Zellen mußten die Zellen bzw. Zellkulturüberstände geerntet und aufgearbeitet werden. Als Reporterproteine wurden je nach experimentellem Ansatz die „lösliche alkalische Phosphatase“ (SEAP), „*firefly*-Luciferase“ oder das BZLF-1-Protein gemessen. Je nach Reporterprotein wurden entweder die transfizierten Zellen selbst (bei BZLF-1 und Luciferase-Test) oder der Zellkulturüberstand (bei SEAP-Test) zur Auswertung herangezogen.

2.3.2.1 Dual Luciferase™ Assay System (Promega) und Western Blot Nachweis von BZLF-1-Protein

Die Messung des Reporterproteins „*firefly*-Luciferase“ wurde nach Angaben des Herstellers im Dual Luciferase™ Assay System durchgeführt. Die *firefly*-Luciferaseaktivität wurde in einem Luminometer Lumat 9501 (Berthold) gemessen.

Bei Suspensionszellen wurden 48 h nach Transfektion 2 ml Kultur aus den Transfektionsschalen entnommen und bei 3000 rpm 10 min in einer Eppendorf-Tischzentrifuge abzentrifugiert. Zum Nachweis der Luciferase (oder auch zur Westernblot-Analyse, Nachweis von BZLF-1-Protein) wurden die Zellen 2 mal mit PBS ohne bivalente Kationen (PBS_(ohne)) gewaschen und entweder für eine SDS-PAGE-Analyse vorbereitet (Kapitel 2.4.3) oder in das *Dual Luciferase™ Assay System* (Promega) nach Angaben des Herstellers eingesetzt (Kapitel 2.3.2.1).

Bei adhärent wachsenden Zellen wurde der Zellrasen 2 mal mit PBS_(ohne) gewaschen, mit 1 ml Trypsin / EDTA-Lösung abgelöst und die Zellen durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren vereinzelt. Nach Zugabe von 4 ml Medium wurden die Zellen bei 1200 rpm 10 min in einer Hettich-Tischzentrifuge bei RT abzentrifugiert, 2 mal mit PBS_(ohne) gewaschen, und wie oben in die entsprechenden Nachweissysteme eingesetzt.

2.3.2.2 Chemilumineszenzmessung

Als weiteres Reportergen diente die sekretierbare plazentale, alkalische Phosphatase (SEAP). Der Vorteil dieses Reportersystems liegt in der Hitzestabilität der SEAP. Dadurch sind endogene, hitzesensitive alkalische Phosphatasen, die den Test verfälschen würden, leicht auszuschließen. SEAP wird in den Zellüberstand sekretiert, wodurch ein Aufschließen der Zellen zur Messung der Enzymaktivität vermieden wird. Somit ist die Möglichkeit gegeben, über einen längeren Zeitraum hinweg Messungen vorzunehmen. Das System erreicht 48-72 h nach der Transfektion sein Maximum. Durch die Verwendung von CSPD® (Lumineszenz) als Substrat und Emerald™ als Lumineszenz-Verstärker erreicht das System eine sehr hohe Sensitivität. Die Nachweisgrenze liegt bei 10 Femtogramm SEAP ($\approx 3,3 \times 10^4$ Moleküle).

Zur Messung der SEAP-Konzentration wurde der Zellkulturüberstand nach Angaben des Herstellers (Perkin Elmer-Tropix) in das Testsystem eingesetzt und in einem Luminometer Lumat 9501 (Berthold) vermessen.

Bei Suspensionszellen wurden 48 h nach Transfektion 2 ml Kultur aus den Transfektionsschalen entnommen und bei 3000 rpm 10 min in einer Eppendorf-Tischzentrifuge abzentrifugiert. Für den Nachweis von SEAP wurde der Zellkulturüberstand verwendet und in den SEAP-Test von Tropix eingesetzt. Bei adhärent wachsenden Zellen wurde für den Nachweis der Zellkulturüberstand abgenommen, 10 min bei 1200 rpm in der Hettich-Tischzentrifuge abzentrifugiert und in den SEAP-Test eingesetzt.

2.3.3 Chemische Induktion der lytischen Replikation von EBV

Chemische Agentien sind in der Lage, EBV in latent infizierten Lymphozyten in den lytischen Vermehrungszyklus zu treiben. Hierfür wurde zu logarithmisch wachsenden Kulturen 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetat (TPA) in einer Endkonzentration von 40 ng / ml und 3 mM Buttersäure (beide Sigma) zugegeben. Nach 48 h wurden die Zellen geerntet.

2.3.4 Aufbewahrung von Zellkulturen

5×10^6 Zellen wurden bei 1200 rpm in einer Hettich-Tischzentrifuge bei Raumtemperatur geerntet und in eiskaltem Einfriermedium [90 % FKS und 10 % DMSO (Dimethylsulfoxid, Sigma)] aufgenommen. In einem Styroporbehälter wurden die Zellen zunächst über Nacht bei -80°C langsam eingefroren und anschließend in flüssigem Stickstoff endgelagert.

2.4 Arbeiten mit Proteinen

2.4.1 Gekoppelte *in vitro*-Transkription und Translation (Promega, Mannheim)

Die *in vivo*-Expression rekombinanter Proteine in eukaryotischen Zellen wird von verschiedenen Faktoren wie Transkriptions-, bzw. Translationseffizienz, RNA-Stabilität, RNA-Export und Protein-Stabilität beeinflusst. Mit Hilfe der *TNT[®]-Coupled-Reticulocyte-Lysate*-Methode kann dagegen die (T7- oder SP6-Promotor-abhängige) Synthese des Fremdproteins in einem *in vitro*-System und somit weitgehend unabhängig von den oben genannten Faktoren untersucht werden. Ein weiterer Vorteil des Systems ist, daß die so gewonnenen Proteine relativ sauber sind und bei der Synthese markiert werden können. Für die *in vitro*-Expression rekombinanter Proteine wurde nach Angaben des Herstellers in einem 25 µl Ansatz zu 500 ng gereinigte Plasmid-DNA, *TNT[®]-Rabbit Reticulocyte Lysate*, *TNT[®]-Reaction buffer*, *TNT[®]-T7-DNA-Polymerase*, Aminosäure-Mix und wahlweise unmarkiertes oder 10 µCi ³⁵S-Methionin gegeben und für 60 min bei 30 °C inkubiert. Der Einbau der radioaktiv-markierten Aminosäuren während der Proteinsynthese und die anschließende Auftrennung des Proteins über ein SDS-Polyacrylamid-Gel erlaubte dessen Nachweis mittels Autoradiographie. Unmarkiertes Protein wurde für Gelretardations-Assays hergestellt.

2.4.2 Expression von Zta-Protein in Bakterien

Zur Expression des viralen Transaktivatorproteins Zta in Bakterien wurde das Plasmid pET 5c ZcDNA in den Bakterienstamm BL21 DE3 transformiert. Die Bakterien wurden bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 bei 37 °C kultiviert und anschließend mit dem Allolaktose-Analogon IPTG in einer Endkonzentration von 0,8 mM die Proteinexpression induziert. Um festzustellen, ob das Protein in löslicher Form oder in Einschlußkörperchen exprimiert wurde, wurden nach 1h, 2h und 3h Proben entnommen und nach Angaben des QIAEXPRESS-Protokolls 4 (Expression von Proteinen) die Lokalisation des Proteins überprüft. Durch diese Methode konnte gezeigt werden, ob sich die exprimierten Proteine löslich im Zytoplasma, in Einschlußkörperchen, oder im Intermembranraum befinden. Da sich nach 3h genügend Protein in der löslichen Fraktion befand, konnte auf eine weitere Reinigung verzichtet werden.

2.4.3 Analyse von Proteinen mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) werden Proteingemische in Gegenwart eines hohen SDS-Überschusses elektrophoretisch nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Dabei lagert sich das negativ-geladene SDS in konstanten Gewichtsverhältnissen an die Proteine an und kompensiert deren Eigenladungen, so daß alle Proteine mit einer ihrer Größe entsprechenden Geschwindigkeit zur Anode wandern können. Nach Laemmli (Laemmli, 1970) werden die Probenproteine unter Verwendung eines diskontinuierlichen Puffersystems (Fling und Gregerson, 1986) zunächst in einem niederprozentigen Sammelgel an der Pufferlaufront konzentriert, von welchem alle Polypeptide gemeinsam in das eigentliche Trenngel übergehen.

Der Aufbau der verwendeten Gelapparaturen (Biometra, Göttingen) und das Gießen der Gele sind der Beschreibung der Gerätehersteller zu entnehmen. Die genaue Zusammensetzung der Gellösungen ist in Tabelle 2 zusammengefaßt. Die Elektrophorese erfolgte in einem speziellen SDS-Page Laufpuffer (25 mM Tris / HCl pH 7,5, 190 mM Glycin, 0,1 % SDS) 3 mA / cm. Es wurde Protein von etwa $1-2 \times 10^5$ Zellen pro Spur aufgetragen.

	Trenngel			Sammelgel
Protogel™ (Biozym), (30 % Acrylamid, 0,8 % Bisacrylamid)	7,5 %	10 %	12,5 %	5 %
Acrylamid-Lösung (ml)	4,5	6	7,5	0.99
1,88 M Tris / HCl, pH 8,8	3,6	3,6	3,6	
0,625 M Tris / HCl, pH7,5				1,2
0,5 % SDS (ml)	3,6	3,6	3,6	1,2
H ₂ O (ml)	6,3	4,8	3,3	2,61
10 % APS (µl)	90	90	90	30
Temed (µl)	15	15	15	6

Tabelle 2 Zusammensetzung der SDS-Gele.

2.4.4 Western Blot-Analyse

Der Transfer von aufgetrennten Proteinen aus einem Polyacrylamid-Trenngel auf eine Membran (*Millipore Immobilon NC pure*, Millipore, Bedford) erfolgte in einer *Fast-Blot*

„semidry“-Apparatur (Biometra, Göttingen) mit dem BioRad-Transferpuffer (150 mM Glycin, 25 mM Tris pH 8,3, 10 % Methanol) nach Angabe des Herstellers für 30 min bei einer Stromstärke von 5 mA / cm². Zur Überprüfung des erfolgten Proteintransfers und zur Markierung der Molekulargewichtsstandards (*low- und high-molecular-weight*-Marker, SIGMA, Deisenhofen, *bench mark*, Gibco) wurden die Proteine reversibel mit Ponceaurot S-Lösung (Serva) (Sambrook *et al.* 1989) angefärbt und anschließend durch Waschen mit TTBS- Puffer (150 mM NaCl, 10 mM Tris / HCl pH 7,5, 0,02 M Tween 20) wieder entfärbt. Anschließend wurden die geblotteten Proteine immunhistochemisch nachgewiesen. Zur Vermeidung unspezifischer Bindung von Antikörpern erfolgte nach dem Proteintransfer die Absättigung freier Bindungsstellen auf der Nitrocellulose für mindestens 1 h bei Raumtemperatur mit einer 5 %-igen Magermilch-TBS-Lösung (150 mM NaCl, 10 mM Tris / HCl pH 7,5). Danach wurde der Filter kurz mit TBS gewaschen, bevor er über Nacht mit dem primären Antikörper inkubiert wurde. Danach wurde der Blot 3 x 10 min mit TTBS gewaschen und anschließend mindestens 2 h mit dem 1:1000 (bzw. nach der entsprechenden Vorschrift) verdünnten alkalischer Phosphatase (AP)-bzw. Meerrettichperoxidase (HRP)-gekoppelten Antikörper geschüttelt. Nachdem der Blot erneut 3 x 10 min mit TTBS gewaschen war, folgte der Nachweis gebundener Antikörper durch Färbung mit den chromogenen Substraten der alkalischen Phosphatase [68 µl NBT, 70 µl BCIP in 20 ml AP-Puffer: 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂, 100 mM Tris (Sambrook *et al.* 1989)] bzw. Meerrettich-Peroxidase (50 mM Tris / HCl pH 7,5, 1 Spatelspitze 3,3'-Diaminobenzidin, 30 µl 30 % H₂O₂, auf 50 ml mit H₂O_{bid.}). Die Färbereaktionen wurden jeweils durch Waschen des Filters mit H₂O_{bidest} abgestoppt.

2.4.5 Proteinmengenbestimmung

Die quantitative Messung von Proteinkonzentrationen erfolgte mit dem *BioRad-Protein-Assay* (BioRad, München) nach Angaben des Herstellers. Als Referenz wurde eine Eichkurve mit definierten Mengen Rinderserumalbumins (BSA) erstellt.

2.4.6 Gelretardations-Experimente (*Bandshift*)

2.4.6.1 Herstellung von Proteinextrakten

Proteinextrakte wurden aus der adhärennten Zelllinie Tera 9117 und den Suspensionszelllinien BJAB und P3HR1 Klon 16 hergestellt. Die Ernte der Zellen erfolgte gemäß Kapitel 2.1.4.1

bzw. Kapitel 2.1.4.2 mit der Abänderung, daß adhärenente Zellen nicht mit Trypsin / EDTA, sondern schonender mit PBS_{ohne} / 10 mM EDTA abgelöst wurden. Die Zellen wurden in PBS_{ohne} resuspendiert und erneut bei 1300 rpm für 10 min in einer Hettich-Tischzentrifuge abzentrifugiert. Nachdem der Waschpuffer vollständig abgezogen war, wurde das Volumen der verdichteten Zellen (PCV: *packed cell volume*) bestimmt und 10 PCV Lysepuffer (10 mM Tris pH 8, 60 mM NaCl, 1 mM EDTA pH 8, 0,5 % NP40, 1 mM DTT, 100 mM PMSF) zugegeben. Nach 2,5 min Inkubation bei 4 °C wurde 2 min bei 4 °C und 1300 rpm in der Hettich-Tischzentrifuge zentrifugiert und die Zellkerne mit 5 ml Lysepuffer ohne NP 40 gewaschen. Nach Zugabe von 1 PVC Kernpuffer (20 mM HEPES pH 7,9, 0,75 mM Spermidin, 0,2 mM EDTA, 20 % Glycerin, 0,4 M NaCl, 10 mM DTT, 1 mM PMSF) wurde 30 min bei 4 °C im Überkopfschüttler zur Elution der Kernproteine geschüttelt. Anschließend wurde bei 13000 rpm in einer Eppendorf-Kühlzentrifuge 10 min zentrifugiert und der Überstand, der die Kernproteine enthielt, in 100 µl Aliquots bei –70 °C gelagert.

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration des Kernextrakts wurde ein Aliquot 1:10 in Kernpuffer verdünnt und die Absorption bei 260 nm und 230 nm in einem Photometer (UVICON 930, Kontron Instruments) gemessen. Nach der Formel

$$(187 \times OD_{230}) - (81,7 \times OD_{260}) = \text{mg Protein} / \mu\text{l}$$

wurde der Proteingehalt der Präparation berechnet.

2.4.6.2 Herstellung doppelsträngiger Oligonukleotide

Für die Verwendung im Gelretardations-Experiment mußten die Oligonukleotide doppelsträngig vorliegen. Zur Hybridisierung komplementärer Oligonukleotide wurde deren Konzentration photometrisch bestimmt und diese dann im Verhältnis 1:1 gemischt. Nach Zugabe von 1 / 10 Vol Restriktionsenzym-Puffer M (Boehringer, Mannheim) wurde das Gemisch 5 min auf 95 °C erhitzt und anschließend im abgeschalteten Heizblock langsam auf RT abgekühlt. Die erfolgreiche Hybridisierung wurde auf einem nicht denaturierenden 15 % Polyacrylamidgel (15 ml Protogel 19 : 1, 25 ml 2 x TBE, ad H₂O 50 ml; pro 10 ml Gellösung 10 µl TEMED, 50 µl 10 % APS) überprüft.

2.4.6.3 Markierung von Oligonukleotiden

Zur Markierung der Oligonukleotide am 5'-Ende mit ³²P wurden 10 pmol der hybridisierten Oligonukleotide mit 2,5 µl Polynukleotidkinase (PNK)-Puffer, 1 µl PNK (Boehringer, Mannheim) und 5 µl γ³²P-ATP (Amersham) in einem Gesamtvolumen von 25 µl 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde das Enzym 10 min bei 75 °C inaktiviert und der Ansatz mit

110 µl EtOH (100 %), 26 µl 4 M Ammoniumacetat und 1 µl t-RNA (Boehringer, Mannheim) über Nacht bei -20 °C gefällt. Nach Waschen mit ETOH (75 %) wurden die markierten Oligonukleotide in 100 µl Wasser aufgenommen (Endkonzentration 100 fmol / µl).

2.4.6.4 Gelretardations-Experimente

Zum Nachweis von Protein-DNA-Wechselwirkungen wurden Gelretardations-Experimente durchgeführt. Dafür wurden markierte Oligonukleotide mit Kernextrakten inkubiert und auf einem 5 % Acrylamid-Gel (Tabelle 3) analysiert. Es wurden 5 %ige Gele mit einer Dicke von 1,5 mm und einer Lauflänge von 13 cm verwendet. Als Laufpuffer diente 0,5 x TBE. Folgende Ansätze wurden pipettiert:

Zwingend:

unspezifischer Kompetitor dAdT oder dIdC (Sigma)	3 µg
BSA	5 µg
HB500 (500 mM NaCl, 50 mM HEPES pH 7,5, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0,2 mM PMSF)	9 µl
Kernextrakt bzw. gereinigtes / <i>in vitro</i> translatiertes Protein	5 µg bzw. 0,5 µg
Wasser	ad 30 µl

Zusätzlich:

spezifische / unspezifische Kompetitoren	bis zu 500-facher Überschuß
Antikörper für <i>Supershift</i>	2 µl

Die Ansätze wurden 30 min bei RT inkubiert, um unspezifisch bindende Proteine mittels dAdT oder dIdC wegzufangen. Anschließend wurden 100 fmol markiertes Oligonukleotid zugegeben und weitere 15 min bei RT inkubiert. Die Proben wurden mit 1 / 10 Vol. 10 x Auftragspuffer (250 mM Tris / HCL pH 7,5; 0,2 % Bromphenolblau; 0,2 % Xylencyanol; 40 % Glycerin) versetzt und auf das Gel geladen. Der Gellauf erfolgte bei 40 mA für ca. 2 h. Das Gel wurde auf *Whatman*-Papier getrocknet und die Banden mittels Autoradiographie nachgewiesen.

Gelkonzentration	5 %
Protogel 37,5 : 1 (Biozym)	10 ml
2 x TBE	15 ml
Ammoniumpersulfat (10 %)	500 µl
TEMED	100 µl

Tabelle 3 Zusammensetzung der Bandshiftgele ($V_{ges.} = 60\text{ ml}$)

2.4.7 Immunfluoreszenz

Zum Nachweis der Expression viraler Proteine aus dem lytischen Replikationszyklus von EBV wurden Immunfluoreszenz-Analysen durchgeführt. Dafür wurden Zellen 3 Tage nach Transfektion mit *Lipofectamin*TM-*Reagent* geerntet, 2 x mit PBS_(ohne) gewaschen und in 50 µl PBS_(ohne) aufgenommen. Ca. $0,5 \times 10^5$ Zellen wurden pro Feld eines Immunfluoreszenz-Objektträgers aufgetragen, und bei RT getrocknet. Anschließend wurden die Zellen 20 min bei RT in Aceton fixiert, getrocknet und dann 30 min bei 37 °C mit einem 1 : 1000 (oder nach einer entsprechenden Vorschrift) in PBS mit 5% FKS (zu Absättigung unspezifischer Bindestellen) verdünnten ersten Antikörper inkubiert. Nachdem 2 x 10 min mit PBS gewaschen worden war, wurde 1h mit dem 1 : 100 in PBS verdünnten, mit einem Rhodaminderivat (*Texas Red*, Dako) gekoppelten zweiten Antikörper bei Dunkelheit und 37 °C 1 h inkubiert. Nach erneutem Waschen mit PBS (3 x 10 min) wurden die Zellen in *Mounting-Medium* (EnerGene) eingebettet und in einem Fluoreszenz-Mikroskop (Olympus) betrachtet.

2.5 Arbeiten mit DNA

2.5.1 Isolierung von DNA

2.5.1.1 Schnelle Isolierung von Plasmid-DNA mittels alkalischer Lyse

Zur Charakterisierung von Plasmid-DNA erfolgte die Isolierung der Plasmid-DNA nach dem Protokoll der alkalischen Schnellyse (Birnboim und Doly, 1979).

2.5.1.2 Minipräparation zur Charakterisierung rekombinanter EBV-DNA

Zur Charakterisierung rekombinanter Klone wurden Einzelkolonien mit einem abgeflachten Zahnstocher auf LB_{cam/tc} Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Bakterien wurden am nächsten Tag von der Platte gekratzt und in 200 µl TE-Puffer resuspendiert. Bei allen Arbeiten mit rekombinanter Virus-DNA durften aufgrund der Größe (170 kbp) nur gekappte Pipettenspitzen verwendet werden, um ein Zerreißen des Genoms zu verhindern. Nach Zugabe von 200 µl Puffer 2 (0,2 N NaOH, 1 % SDS) lysierten die Bakterien während einer Inkubationsdauer von 5 min bei Raumtemperatur. Es folgte die Zugabe von 200 µl Puffer 3 (3 M Kaliumacetat, 10 % Eisessig) und Inkubation von 10 min bei 4 °C zur Abtrennung genomischer DNA und von Proteinen. Nach Zentrifugieren für 10 min bei 20000 x g wurde der klare Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die DNA mit 1 Vol. Isopropanol gefällt, 10 min bei 20000 x g sedimentiert, mit 80 % Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert und sofort in einem Gemisch aus 86 µl H₂O, 10 µl BamHI-Puffer, 4 µl BamHI (beide NEB) und 1 µl RNase A (Boehringer, Mannheim) resuspendiert. Nach Inkubation für vier Stunden bei 37 °C wurde der Verdau gelelektrophoretisch in einem 0,8 % TAE Gel über Nacht bei 1,5 V / cm aufgetrennt und anschließend das Bandenmuster analysiert und mit wt-EBV verglichen.

2.5.1.3 Isolierung von Plasmid-DNA mit *Nucleobond*-Säulen (Macherey & Nagel)

Für Klonierungen, Sequenzierung sowie Transfektionen in eukaryotische Zellen wurde die benötigte Plasmid-DNA über *Nucleobond*-Säulen (Anionenaustauscherchromatographie) nach Angaben des Herstellers gereinigt. Je nach gewünschter Ausbeute wurden Midi- (*Nucleobond-Tip 100* für bis zu 100 mg DNA), Maxi- (*Nucleobond-Tip 500* für bis zu 500 mg DNA) oder Mega- (*Nucleobond-Tip 2000* für bis zu 2000 mg DNA) Säulen verwendet.

2.5.1.4 Isolierung von Plasmid-DNA über CsCl-Gradienten

Diese Methode zur Isolierung von Plasmid-DNA wurde zur Gewinnung von hochgereinigter *supercoiled*-DNA bei der Herstellung der rekombinanten EB-Viren verwendet.

5 l Bakterienkultur aus dem Fermenter (Kapitel 2.2.1) wurden in 1 l Bechern 40 min bei 4500 rpm zentrifugiert, und die Bakterien anschließend im Bakterienschüttler bei 37 °C in 50 ml Lösung 1 (50 mM Glucose, 25 mM Tris / HCl pH 8, 10 mM EDTA pH 8) resuspendiert. Es folgte die Zugabe von 50 ml Lösung 2 (0,2 N NaOH, 1 % SDS) und 10-minütige Inkubation

auf Eis zur alkalischen Lyse der Bakterien. Nach Zugabe von 74 ml Lösung 3 (3 M Kaliumacetat pH 4,8, 10 % Eisessig) und 10-minütiger Inkubation auf Eis wurden Proteine und genomische DNA im GS3-Rotor (Kontron Instruments) bei 9000 rpm 10 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die klare Lösung wurde in neue GS3-Becher filtriert und die DNA mit Isopropanol 30 min auf Eis gefällt. Nach erneuter Zentrifugation bei 9000 rpm für 10 min bei RT wurde die DNA in einem Endvolumen von 100 ml Tris / EDTA-Puffer (TE 10.1: 10 mM Tris, pH 8, 1 mM EDTA) resuspendiert und 110 g CsCl darin gelöst. Die DNA-CsCl-Lösung wurde in 4 Polyallomer-Röhrchen (30 ml Volumen), in denen sich 800 µl EtBr (10 mg / ml) befanden, überführt. Anschließend wurden die Röhrchen mit CsCl-Lösung (1,55 g / cm³) bis zum Rand aufgefüllt, verschlossen und 70 h bei 35000 rpm in der Ultrazentrifuge (Kontron Instruments) in einem Typ 70TI Rotor bei 20 °C zentrifugiert. Unter UV-Licht sichtbar gemacht, wurde die untere DNA-Bande, die die *supercoiled*-DNA enthielt, mit einer Kanüle abgesaugt. Für eine größere Reinheit der DNA wurde der UZ-Lauf in einem kleineren Volumen (11,4 ml Polyallomer-Röhrchen) wiederholt. Die untere Bande wurde wieder abgezogen. Das in die DNA interkalierte Ethidiumbromid wurde durch dreimalige Extraktion mit CsCl-gesättigtem Isopropanol entfernt. Nach Zugabe von 1 Volumen TE-Puffer wurde die DNA mit 1 Volumen Isopropanol gefällt, bei 6500 rpm 30 min in einem HS4-Rotor zentrifugiert, mit 80 % Ethanol gewaschen, und in 200 µl TE-Puffer aufgenommen. Die DNA-Konzentration wurde photometrisch bestimmt (Kapitel 2.5.2).

2.5.1.5 Isolierung von genomischer DNA aus Zellkulturmaterial

Für die Präparation von genomischer DNA aus eukaryotischen Zellkulturen wurde der *QIAamp Blood Kit* von Qiagen verwendet. Nach Angaben des Herstellers wurde die genomische DNA präpariert (Ausbeute ca. 3 µg DNA aus 1 x 10⁷ Zellen), in 100 µl Tris / HCl pH 8,5 aufgenommen und zur Amplifikation bestimmter Bereiche der viralen DNA mittels PCR (Kapitel 2.5.7) eingesetzt.

2.5.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration der präparierten Nukleinsäuren wurde photometrisch bestimmt. Dazu wurde ein Absorptionsspektrum im Bereich zwischen 220 nm und 300 nm aufgenommen (Uvikon-Photometer). Nukleinsäuren besitzen durchschnittlich ein Absorptionsmaximum bei 258 nm, Proteine bei 280 nm. Die zu messende DNA / RNA wurde 1:50-1:100 mit H₂O_{bid}.

verdünnt und in 100 µl Quarzglasküvetten vermessen. Aus der Extinktion bei 258 nm ließ sich der Nukleinsäure-Gehalt direkt nach folgender Formel berechnen:

$$A_{258} \times f \times \text{Verdünnung} = \mu\text{g Nukleinsäure} / \text{ml}$$

Der Faktor *f* ist abhängig von der Nukleinsäure-Struktur: für doppelsträngige DNA beträgt er 47,5, für RNA 40. Die Reinheit der Präparation kann über das Verhältnis $A_{258} : A_{280}$ bestimmt werden, dessen Wert größer als 2,0 sein sollte.

2.5.3 Restriktionsenzymverdau von Plasmid-DNA

Zur Charakterisierung der aus Bakterien isolierten Plasmid-DNA sowie für präparative Zwecke wurde die DNA mit Restriktionsendonukleasen enzymatisch geschnitten. Eine Einheit [U] bezeichnet dabei die Enzymaktivität, die benötigt wird, um 1 µg λ-DNA in einer Stunde bei geeigneter Temperatur und optimalen Puffer- bzw. pH-Bedingungen vollständig zu spalten.

100 ng-500 ng gereinigter Plasmid-DNA wurden mit 10 U Restriktionsendonuklease (Boehringer, Mannheim; New England Biolabs, Schwalbach / Taunus), 1 µl RNase A (10 µg / µl), und 1 / 10 Volumen Restriktionspuffer in einem 10 µl Ansatz geschnitten.

Für präparative Zwecke wurde in einem Standardansatz 5 µg bis 10 µg Plasmid-DNA mit je 50 U Restriktionsenzym in einem Gesamtvolumen von 50 µl ebenfalls mit 1 / 10 Volumen Restriktionspuffer für mindestens 2 h inkubiert.

Zur Charakterisierung des rekombinanten EBV (170 kBp) wurden 10 µg DNA mit 4 µl *Bam*HI (New England Biolabs) in einem 100 µl Ansatz 4 h bei 37 °C verdaut.

2.5.4 Gelelektrophorese von DNA

Die Auftrennung linearisierter DNA-Fragmente (0,1 kBp bis 10 kBp) hinsichtlich ihres Molekulargewichts erfolgte bei konstanter Spannung (50 V bis 150 V) in einer Flachbettgelapparatur (Fa. Hölzel). Je nach erwarteter Größe der DNA-Fragmente wurde zwischen 0,8 % und 2,0 % Agarose in TAE-Puffer (40 mM Tris / HCl pH 8,0, 20 mM NaAc, 2 mM EDTA) unter Aufkochen gelöst und mit Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 10 ng / ml versetzt. Die DNA-Fragmente wurden mit 1 / 10 Volumen DNA-Auftragspuffer [0,25 % Bromphenolblau, 0,25 % Xylencyanol, 40 % (w / v) Saccharose]

versetzt und zur Abschätzung der Fragmentgröße zusammen mit entsprechenden Molekulargewichtsmarkern (DNA-Standard VII von Boehringer, Mannheim, PCR-Marker von USB, oder 1 kbp-Leiter von Gibco BRL) aufgetragen. Der Nachweis der DNA erfolgte mit Hilfe eines UV-Durchlichtschirms (Bachhofer Laboratoriumsgeräte, Reutlingen) bei einer Wellenlänge von 312 nm, dem Absorptionsmaximum des DNA-interkalierenden Ethidiumbromids.

2.5.5 DNA-Extraktion und Aufreinigung aus Agarosegelen

Für die Extraktion von DNA-Molekülen mit einer Größe von 200 Bp bis 10 kbp eignete sich die *QIAquick Gel Extraction*-Methode (QIAGEN, Düren), bei der die DNA unter Hochsalzbedingungen an die Silikat-Säulenmatrix gebunden und anschließend bei Niedrigsalzbedingungen mit 10 mM Tris / HCl pH 8,5, nach Angaben des Herstellers von der Säule eluiert wurde.

2.5.6 Southern Blot

2.5.6.1 DNA-Transfer auf die Membran (*Southern Blot*)

Die auf einem Agarosegel aufgetrennten DNA-Proben wurden mit Hilfe der Saugblot-Technik auf eine positiv geladene Nylon Hybond N⁺ Membran (Amersham) übertragen. Zunächst wurde das Gel mit den DNA-Proben fotografiert und der Molekulargewichtsstandard zur späteren Identifizierung mit Tusche markiert. Das Gel wurde dann für 30 min in 0,25 M HCl, anschließend 1 h in Denaturierungslösung (0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl, pH 13) bei Raumtemperatur geschwenkt. Zum DNA-Transfer auf die Membran wurde das Gel mit der Oberseite nach unten auf eine an dem Tisch festgeklebten Plastikfolie gelegt. Auf das Gel wurde die Nylonmembran gelegt, und darauf drei Lagen in Denaturierungslösung getränkter *Whatmann*-Papiere sowie einer dicken Lage saugfähigen Papiers. Während des 1 stündigen Blot –Vorgangs wurde das saugfähige Papier alle 20 min gewechselt. Anschließend wurde die Membran 30 min in Wasser mit wenig 20 x SSC gewaschen.

2.5.6.2 Markierung der Sonde

50 ng einer DNA-Sonde wurden mit dem *Random Priming Kit* (Boehringer, Mannheim) nach Angabe des Herstellers radioaktiv markiert. Anschließend wurde die markierte Sonde über eine Sephadex-G50-Säule (Pharmacia Biotec) von nicht eingebauten Nukleotiden getrennt.

Dazu wurde die Säule zunächst mit 3 ml TE-Puffer äquilibriert und dann die markierte Sonde auf die Säule gegeben. Zur Elution wurden 2 x 400 µl TE-Puffer auf die Säule gegeben, wobei die ersten 400 µl als Durchlauf verworfen wurden und sich die gereinigte Sonde in den zweiten 400 µl TE-Puffer befand.

2.5.6.3 Hybridisierung des *Southern Blots*

Zur Hybridisierung der geblotteten DNA mit der radioaktiv markierten DNA-Sonde wurde die Membran zunächst in 5 ml 65 °C warmen Church-Puffer [89 g Na₂HPO₄, 4 ml Ortho-Phosphorsäure (85 %), 2 ml EDTA (0,5 M), 700 ml SDS (10 %), ad 1l H₂O, pH 7,2] für drei Stunden im Rollerschrank prähybridisiert. Anschließend wurden 400 µl markierte einzelsträngige Sonde zum Prähybridisierungspuffer gegeben und über Nacht bei 65 °C hybridisiert. Zum Nachweis der hybridisierten Sonden auf dem Blot wurde die Membran zunächst 5 min bei 65 °C und anschließend 2 mal 30 min bei 60 °C mit Waschpuffer (1 % SDS, 0,1 x SSC) gewaschen, in Folie gewickelt und die Radioaktivität durch Auflegen eines Röntgenfilms (X-OMAT[®], Kodak) für wenigstens 2 h nachgewiesen. Filme wurden im automatischen Filmentwickler von Kodak entwickelt.

2.5.7 Amplifikation von DNA mittels PCR (Polymerase-Ketten-Reaktion)

Zur Amplifikation bestimmter Bereiche viraler DNA wurde das *Expand High Fidelity* PCR System der Firma Boehringer verwendet. Es enthält ein Gemisch aus Taq- und PWO-Polymerase, das höhere Ausbeuten und durch einen Korrekturmechanismus (*proof reading*) der PWO-Polymerase eine höhere Genauigkeit als Taq-Polymerase alleine erzielt. Sie generiert PCR-Produkte mit überhängenden 3'Adeninresten, was eine effektive Klonierung in den pCR II[™] TOPO-Vektor der Firma Invitrogen ermöglicht. Folgender Standardansatz wurde zur Amplifikation verwendet:

2 µg	genomische DNA
10 µl	10 x PCR-Puffer
100 pmol	3'- <i>Primer</i>
100 pmol	5'- <i>Primer</i>
10 µl	2 mM je Nukleotid dNTP-Mix
1 µl	<i>Expand High Fidelity</i> Polymerase
ad 100 µl	H ₂ O

Die PCR wurde in einem Thermocycler *Gene Amp PCR System 9600* der Firma Perkin Elmer nach folgendem Protokoll durchgeführt. Die *Primer* wurden so gewählt, daß in der Regel die Hybridisierungstemperatur zwischen 55 °C und 65 °C lag.

2 min	95 °C	Aufschmelzen des Doppelstranges
35 Zyklen :		
30 sec	95 °C	Aufschmelzen des Doppelstranges
45 sec	55 °C-65 °C	Anhybridisieren der <i>primer</i>
1 min 45 sec	72 °C	Auffüllen zum Doppelstrang
10 min	72 °C	Vervollständigen der Auffüllreaktion
∞ 4 °C		

Die PCR-Produkte wurden auf einem 2 % igen Agarosegel aufgetrennt (Kapitel 2.5.4), mittels *QIAQuick Gel Extaktion Kit* aufgereinigt (Kapitel 2.5.5), in den Vektor pCR II™ Topo TA kloniert und anschließend mit geeigneten *Primern* sequenziert.

2.5.8 Zielgerichtete *in vitro* Mutagenese mittels PCR (*QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit*, Stratagene, Heidelberg)

Diese Methode eignet sich zum Einfügen oder Entfernen von Punktmutationen in definierte Bereiche doppelsträngiger Plasmid-DNA. Mit Hilfe zweier komplementärer, 30 Bp bis 45 Bp langer Oligonukleotid-*Primer* mit GC-reichen Enden, die in ihrer Sequenz den gewünschten Austausch enthielten, wurde in einer PCR-Reaktion methylierte Plasmid-DNA aus DH5α als Matrize verwendet und durch die Pfu-DNA-Polymerase (3'-5'Exonuklease-Aktivität) amplifiziert. Die Entfernung der methylierten, nicht mutierten Ausgangs-DNA wurde durch

die Zugabe von 10 U des Restriktionsenzym *DpnI* gewährleistet. *DpnI* erkennt spezifisch die Sequenz 5'-G^{m6}ATC-3' und spaltet sie endonukleolytisch. Die mutierte zirkuläre, nicht-methylierte und noch unverknüpfte dsDNA wurde nach der Transformation von *E. coli* durch die bakterielle DNA-Ligase kovalent geschlossen.

Laut Herstellerangaben wird die PCR-vermittelte, ortsgerichtete Mutagenese ausgehend von 25 bis 50 ng Ziel-DNA in einem 50 µl Ansatz (2,5 U Pfu-DNA-Polymerase, 0,25 mM dNTP-Mix, 125 ng *sense-Primer*, 125 ng *antisense-Primer*, 1 x Reaktionspuffer) unter den angegebenen Standard-Bedingungen durchgeführt:

Schritt	Temperatur	Dauer
Initiation	94 °C	3 min
3-Stufen-PCR: 16 Zyklen		
Denaturierung	94 °C	1 min
Hybridisierung	55 °C	45 Sek.
Verlängerung	68 °C	2 min / kB
Endverlängerung	68 °C	10 min
∞ 4 °C		

Quick change für Austausch längerer DNA-Sequenzen

Um den unmutierten Promotor von BZLF-1 in dem Plasmid pCR-II-BZLF-1 gegen mutierte Bereiche auszutauschen, wurde eine abgewandelte Form des *quick change*-Protokolls durchgeführt. Nach Angaben des Herstellers ist die *quick change*-Methode (Kapitel 2.5.8) geeignet, Punktmutationen in definierte Bereiche doppelsträngiger Plasmid-DNA einzuführen. In diesem Fall sollte jedoch ein Bereich von 266 Bp, der den distalen Promotor enthielt, ausgetauscht werden. Von mutierten Promotoren auf den Plasmiden pLucZpγ* und pLucZpO* (Vierfach Mutante) wurden zunächst mittels PCR (Kapitel 2.5.7.) mit den *Primern* PCR-BZLF-1* *forward* und PCR-BZLF-1* *reverse* doppelsträngige DNA-Produkte, die den Bereich, der eingesetzt werden sollte, umfaßten, hergestellt. Danach wurden diese PCR-Produkte durch Aufschmelzen bei 95 °C für 5 min einzelsträngig gemacht und die Einzelstränge als *Primer* in die *quick change*-Reaktion eingesetzt. Aufgrund der Länge der *Primer* (256 Bp) wurde die PCR zur besseren Hybridisierung wie nachfolgend beschrieben durchgeführt:

Schritt	Temperatur	Dauer
Initiation	95 °C	3 min
3-Stufen-PCR: 16 Zyklen		
Denaturierung	95 °C	30 sec.
	78 °C	30 Sek.
Hybridisierung durch Verzögerung auf	10 min 68 °C	
Verlängerung	68 °C	2 min / kB
Endverlängerung	68 °C	20 min
	4 °C	∞

Die Produkte der Mutagenese wurden auf einem präparativen Agarosegel (Kapitel 2.5.4.) gelelektrophoretisch aufgetrennt und anschließend mit dem QIAquick Kit (Kapitel 2.5.6) gereinigt. Es entstanden zwei Produkte die den Namen pCR II BZLF-1 γ^* und pCR II BZLF-1 O* (Anhang) erhielten.

2.5.9 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzanalyse von Plasmid-DNA erfolgte durch automatisierte, nicht-radioaktive Fluoreszenzsequenzierung, die auf der Basis der Dideoxynukleotid-vermittelten Kettenabbruchmethode (Sanger *et al.*, 1977) beruht.

Je Ansatz wurden in einem Endvolumen von 12 μ l 500 ng DNA mit 6 pmol des entsprechenden Oligonukleotidprimer versetzt. Die Sequenzierreaktion erfolgte unter Zuhilfenahme des PRISM[®] Ready Reaction DyeDeoxy[®] Terminator Cycle Sequencing Kits (Applied Biosystems, Weiterstadt). Die entstandenen markierten DNA-Fragmente wurden über ein denaturierendes 7 %iges Harnstoff-Polyacrylamidgel im 377A-DNA-Sequenzierapparat (Applied Biosystems, Weiterstadt) aufgetrennt und mit Hilfe des SeqEd[®]-Programms (Version 1.03, Applied Biosystems) auf einem *Apple-Macintosh*-Computer ausgewertet.

2.5.10 Klonierungen

2.5.10.1 Klonierung von PCR Fragmenten

Zur Klonierung von PCR-Fragmenten wurde der Vektor pCR-II-TOPO (Invitrogen) verwendet. Dieses Klonierungssystem beruht auf der Fähigkeit der Taq-Polymerase, während der PCR einen Adeninrest an das 3'-Ende der PCR-Produkte zu hängen. Der Klonierungsvektor verfügt über komplementäre überhängende 3'-Thymidin-Reste. Während der Ligationsreaktion verknüpft die mit dem Vektor assoziierte Topoisomerase diesen mit der Insert-DNA. Die Ligation wurde 5 min bei RT durchgeführt. Anschließend wurde das Klonierungsprodukt nach Angaben des Herstellers in den mitgelieferten, bereits kompetenten Bakterienstamm Top10 transformiert. Positive Klone wurden durch Restriktionsenzymverdau und anschließend durch Sequenzieren charakterisiert.

2.5.10.2 *Sticky-end*-Klonierung

Bei der Ligation von überhängenden, komplementären Enden wurde ein Vektor-Insert-Verhältnis von 1:4 verwendet. Dabei wurden vom Vektor ca. 100 ng eingesetzt. Die Menge wurde durch Gelelektrophorese abgeschätzt. Die Ligation wurde in einem Volumen von 10 µl durchgeführt. Es wurden je 1 µl T4-DNA-Ligase (400 U / µl) und 1 µl 10 x Ligasepuffer (*New England Biolabs*) verwendet. Die Ligation fand innerhalb einer Stunde bei RT statt.

2.5.10.3 *Blunt-end* Klonierung

Die meisten der verwendeten Restriktionsenzyme erzeugen 3' oder 5'-überhängende Enden. War beabsichtigt, nichtkompatible einzelsträngige Enden miteinander zu verknüpfen, wurden diese mit der sogenannten Klenow-Reaktion zu Doppelsträngen aufgefüllt bzw. abgedaut und ohne 3'- oder 5'-Überhänge direkt verknüpft (*blunt-end*). Klenow-Enzym (Boehringer) ist die große Untereinheit der bakteriellen DNA-Polymerase I, der die 5'→3' Exonukleaseaktivität des nativen Enzyms fehlt. Da das Enzym in allen Restriktions-Puffern von Boehringer arbeitet, konnte es direkt in den Restriktionsansatz gegeben werden. Zu 10 µl DNA-Ansatz wurden 1 µl dNTPs (Endkonzentration 2 mM je Nukleotid) sowie 1 U Klenow-Enzym (2 U/µl) gegeben. Nun wurde 1 h bei 20 °C inkubiert und anschließend das Enzym durch Erhitzen auf 65 °C für 20 min inaktiviert.

Für die Ligation von *blunt-end* Fragmenten wurden Vektor (ca. 100 ng) und Insert in äquimolaren Mengen eingesetzt. Die Ligationsreaktion fand über Nacht bei 14 °C mit Hilfe

der T4-DNA-Ligase statt. Anschließend wurde die Orientierung des Inserts durch Restriktionsenzymverdau bestimmt.

2.6 Arbeiten mit RNA

2.6.1 Isolierung von Gesamt-RNA mit *RNAzol B*

Pro 1×10^7 Zellen aus Zellkultur wurde 1 ml *RNAzol B* (WAK-Chemie) zugegeben, und diese durch Auf-und Abpipettieren darin aufgelöst. Es wurde 1 Volumen Chloroform zugegeben und nach gutem Durchmischen 5 min auf Eis inkubiert. Nach 30 minütiger Zentrifugation mit 15000 rpm bei 4 °C in einer Eppendorf-Tischzentrifuge wurde der klare wässrige Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die RNA mit einem Volumen Isopropanol für 2 h bei -70 °C gefällt. Die RNA wurde durch Zentrifugation mit 15000 rpm bei 4 °C sedimentiert, mit 70 % Ethanol gewaschen, und in 50 µl DEPC-Wasser aufgenommen. Zur Stabilisierung der RNA wurde 1 µl RNasin (40 U / µl) und 1 µl 5 mM DTT (beide Promega) zugesetzt. Zur längeren Aufbewahrung wurde die RNA 1:1 mit 100 % Ethanol versetzt und bei -70 °C eingefroren.

2.6.2 Denaturierende Gelelektrophorese

Die Auftrennung von RNA nach deren Molekulargewicht erfolgte in einem denaturierenden Formaldehyd –Agarosegel (Sambrook *et al.*, 1989). Für ein 1% Formaldehyd-Agarosegel wurden 1,6 g *Ultrapure* Agarose (Gibco BRL) mit 32 ml 5 x MOPS (0,1 M MOPS / NaOH pH 7,0, 5 mM EDTA, pH 8,0, 40 mM Natriumacetat) und 99 ml DEPC-behandeltem Wasser gemischt und in einem Mikrowellengerät aufgeköcht. Während diese Lösung im Wasserbad auf 56 °C abkühlte, wurde die Gelapparatur sowie der Kamm mit 70 % EtOH (RNase-frei) gespült, um das Zersetzen der RNA durch RNasen zu verhindern. Zur ca. auf 56 °C temperierten Gellösung wurden 28 ml Formaldehyd gegeben und das Gel zügig gegossen. Zur Probenvorbereitung wurde die aufzutrennende RNA mit zwei Volumen RNA- Probenpuffer (10 ml Formamid, 3,5 ml 37 % Formaldehyd, 2 ml 5 x MOPS) versetzt, 5 min bei 65 °C denaturiert, und anschließend auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 1 / 10 Volumen Gel-Auftragspuffer (50 % Glycerin, 1 mM EDTA, 0,25 % Bromphenolblau, 0,25 % Xylencyanol) und 0,5 µl Ethidiumbromid (10 mg / ml) erfolgte die Auftrennung unter einem Digestorium mit 1 x MOPS als Laufpuffer bei 10 V / cm in ca. 3 h in einer Horizontal-Gelelektrophorese-

Apparatur (Hölzel) mit einer Laufstrecke von 16 cm. Als Größenstandard dienten definierte RNA-Fragmente der Firma Sigma[®] (0,2 kBp-10 kBp).

2.6.3 Northern Blot-Analyse

2.6.3.1 Northern Blot

Unter oben genannten Bedingungen liegt die RNA im Gel bereits im denaturierten Zustand vor. Daher war nach dem Gellauf lediglich ein Waschen in DEPC-behandeltem Wasser für eine Stunde bei Raumtemperatur nötig, um Formaldehyd und Ethidiumbromid zu entfernen. Anschließend wurde das Gel 30 min in Transferpuffer (20 x SSC, 876,5 g NaCl, 441 g Natriumcitrat, ad 5 l mit H₂O_{DEPC}) äquilibriert. Dann wurde das Gel mit der Oberseite nach unten auf eine mit drei Lagen *Whatman*-Papier (Schleicher & Schüll) bestückte, erhöhte Plattform, die sich in einem Vorratsbehälter für 20 x SSC-Transferpuffer befand, gelegt. Durch Kapillarkwirkung wurde die RNA im Flüssigkeitsstrom mit Hilfe von *Whatman*-Papier und einer dicken Lage saugfähigem Papier über Nacht in die aufgelegte Nylonmembran (Biodyne plus, Pall) übertragen. Am folgenden Tag wurde die RNA durch UV-Bestrahlung mit einer Energie von 120 mJ (Stratalinker, Stratagene) mit der Membran quervernetzt und dann zur Kontrolle eine Methylenblaufärbung durchgeführt. Dazu wurde die Membran 45 sec in 0,03 % Methylenblau in 0,3 M Natriumacetat, pH 5,2 geschwenkt. Anschließend wurde durch zweiminütiges Waschen in Wasser wieder entfärbt.

2.6.3.2 Markierung der Sonde für Northern Blot

Die Markierung der Hybridisierungs-Sonde erfolgte nach Angaben aus *Current Protocols* für die 5' Markierung von Oligonukleotiden mit γ -³²P-ATP (Kapitel 2.6.3.2.). Zur Abtrennung von nicht eingebauten Nukleotiden wurden CENTRI • SPIN™ –10 COLUMNS (Princeton Separations) nach Angaben des Herstellers verwendet.

2.6.3.3 Hybridisierung des *Northern Blots*

Zur Hybridisierung des *Northern Blots* mit der ^{32}P -markierten Sonde wurde die Membran zunächst über Nacht in 5 ml SSPE-Hybridisierungspuffer [12,5 ml 100 x SSPE (3,6 M NaCl, 0,2 M Na_2HPO_4 pH 7, 7,2 mM EDTA) 25 ml Formamid, 2,5 ml 100 x Denhards-Lsg. (10 g Ficoll, 10 g Polyvinylpyrrolidon, 10 g BSA, ad H_2O 500 ml), 2,5 ml 10 % SDS, ad H_2O 50 ml; pro 10 ml 4 mg t-RNA] zur Absättigung freier Bindestellen bei RT inkubiert. Die markierte Sonde (Kapitel 2.6.3.2) wurde 5 min bei 95 °C in 500 µl Hybridisierungspuffer denaturiert, zur Prähybridisierungslösung gegeben und erneut über Nacht bei RT inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Membran 2 x 5 min in RNA Waschpuffer I (2 x SSC, 0,1 % SDS) und 2 x 15 min in RNA-Waschpuffer II (0,1 x SSC, 0,1 % SDS) bei RT gewaschen. Schließlich wurde die Membran in Folie eingeschweißt und für 48 h mit einem X-OMAT Röntgenfilm (Kodak) zum Nachweis der gebundenen Sonde exponiert.

2.6.4 Primer Extention-Experiment

Beim *Primer Extention*-Experiment handelt es sich um ein analytisches Verfahren zur Bestimmung des 5' Endes einer RNA. Man verwendet ein kurzes 5'-endmarkiertes Oligonukleotid, das zu einem Bereich 3' zum 5'- Ende der zu charakterisierenden RNA komplementär ist. Dieses Oligonukleotid wird mit der RNA hybridisiert. Ausgehend von dem doppelsträngigen DNA-RNA Hybridbereich wird das anhybridisierte Oligonukleotid enzymatisch mit reverser Transkriptase in Gegenwart nicht markierter Desoxyribonukleotide bis zum 5'-Ende des Transkripts verlängert. Die Länge des Oligonukleotidprimers wird durch Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen bestimmt. Das *Primer Extention*-Experiment wurde leicht abgewandelt nach dem Protokoll von *Current Protocols* (Unit 4.8) durchgeführt. Es wurde nach Kapitel 2.6.1 isolierte Gesamt-RNA aus transfizierten H1299 Zellen (mit pCR II-BZLF-1 Konstrukten und pCMVZ) verwendet.

2.6.4.1 Hybridisierung des radioaktiv markierten Oligonukleotids mit RNA

50 µg Gesamt-RNA wurden mit 1,5 µl 10 x Hybridisierungspuffer (1,5 M KCl, 0,1 M Tris / HCl pH 8,3, 10 mM EDTA) und 3,5 µl markiertem Oligonukleotid (ca. 500 fmol) in einem 15 µl Ansatz 90 min bei 55 °C zur Hybridisierung inkubiert und anschließend langsam auf RT abgekühlt.

2.6.4.2 Primer Extension-Reaktion

Pro Hybridisierungsansatz wurden jeweils 30,33 µl Reaktionsmix folgender Zusammensetzung pipettiert:

0,9 µl	1 M Tris / HCl pH 8,3
0,9 µl	0,5 M MgCl ₂
0,25 µl	1 M DTT
6,75 µl	1 mg / ml Actinomycin D (Boehringer, Mannheim)
1,33 µl	5 mM 4 dNTP Mix
19,7 µl	H ₂ O _{DEPC}
0,5 µl	MULV-Polymerase (50 U/µl) (Boehringer, Mannheim)

Davon wurden 30 µl zu jedem 15 µl Hybridisierungsansatz gegeben. Die *Primer Extension*-Reaktion fand eine Stunde bei 42 °C statt. Im anschließenden RNase-Verdau durch Zugabe von 105 µl *RNase reaction mix* (100 µg Fischsperma DNA, 20 µg / ml RNase A in H₂O) wurde die Gesamt-RNA degradiert, so daß das markierte Einzelstrang-DNA-Produkt zurück blieb. Das Reaktionsprodukt wurde mit 150 µl Phenol / Chloroform / Isoamylalkohol ausgeschüttelt und mit 100 % Ethanol gefällt.

2.6.4.3 Analyse des Reaktionsprodukts

Das Reaktionsprodukt wurde in 5 µl Stop- / Auftragspuffer (0,05 % Bromphenolblau, 0,05 % Xylencyanol, 20 mM EDTA in Formamid) aufgenommen, 5 min bei 65 °C denaturiert und auf ein 9 %iges Acrylamid / 7 M Harnstoff Gel in einer *Multi long* Apparatur (Biometra) aufgetragen (Tabelle 4).

Gelkonzentration	9%
Protogel 19 : 1 (Biozym)	13,5 ml
10 x TBE	6 ml
Harnstoff	25,2,g
Ammoniumpersulfat (10%)	200 µl
TEMED	60 µl

Tabelle 4 Zusammensetzung des Acrylamid / Harnstoff Gels.

Material & Methoden

Nach der Elektrophorese bei konstant 40 mA wurde das Gel auf *Whatman*-Papier getrocknet und autoradiographisch analysiert.

3 Ergebnisse

3.1 Transfektionsstudien zur Funktion und Bedeutung der HI-Motive

Experimenteller Ansatz

In dieser Arbeit sollte die Wirkung der HI-Motive im Bezug auf die Basalaktivität des BZLF-1-Promotors und auf dessen Transaktivierbarkeit durch Zta untersucht werden. Frühere Experimente unserer Arbeitsgruppe (Schwarzmann *et al.*, 1994) deuteten auf eine *silencer*-Wirkung dieser Promotorelemente im Kontext des distalen BZLF-1-Promotoranteils hin. Daher wurden weitere Promotorkonstrukte in Transfektionsexperimenten (Kapitel 2.3.1) getestet. Hierbei handelte es sich einerseits um Minimalpromotorkonstrukte abgeleitet vom c-fos-Promotor. Bei diesen Konstrukten lagen die HI-Motive isoliert von ihrer natürlichen Umgebung vor. Somit konnte die Wirkung der HI-Motive unabhängig von benachbarten Promotorelementen untersucht werden. Andererseits wurden Reporterkonstrukte mit dem Originalpromotor von BZLF-1 ausgetestet, um Wechselwirkungen mit anderen Promotorelementen zu untersuchen. Die Testpromotoren wurden alleine oder in Kombination mit einem Expressionsplasmid für Zta in drei verschiedene Zelllinien transient eingebracht. Zum einen handelte es sich um die EBV-negative Burkitt's Lymphom-Zelllinie DG 75. In lymphoiden Zellen persistiert EBV in der Regel latent. Zum anderen wurden die epitheliale Teratokarzinom-Zelllinie Tera 9117 und die epitheliale Lungenkarzinom-Zelllinie H1299 verwendet. Beide Zelllinien sind EBV-negativ. Epithelzellen sind ein Ort der lytischen Vermehrung von EBV. Um die eingebrachten DNA-Mengen konstant zu halten, wurde das Plasmid ohne Promotor „pGL2-basic“ (Promega) kotransfiziert. Um die Ergebnisse verschiedener Transfektionsexperimente mit möglicherweise ungleichmäßigen Transfektionseffizienzen vergleichen zu können, wurden als interner Standard eine Reihe konstitutiv aktiver Reporterplasmide mit unterschiedlichen Reporterproteinen, sowie unterschiedlichen Promotoren *co*-transfiziert und getestet. Da der Transaktivator Zta jedoch auf alle verwendeten Promotoren der Kontrollplasmide wie z.B. den Thymidin-Kinase-Promotor (pRL-TK), den CMV-Promotor (pCMV-SEAP) oder den SV-40-Promotor (pSV- β -Gal) aktivierend wirkte, konnte keine interne Standardisierung vorgenommen werden. Aus diesem Grund wurden je Transfektionsexperiment mindestens zwei Parallelansätze gemessen

und die Experimente mindestens zweimal wiederholt. Somit konnte eine statistische Auswertung vorgenommen werden.

3.1.1 Untersuchungen mit künstlichen Minimalpromotoren zeigten positiv- und negativ-regulatorische Eigenschaften der HI-Motive.

Verwendete Minimalpromotorkonstrukte

Für die Untersuchungen an isolierten HI-Motiven wurden zwei bereits vorhandene SEAP-Konstrukte verwendet (siehe Diplomarbeit Heide Sommer, Universität Regensburg, 1995). Diese Konstrukte enthielten den minimalen *c-fos*-Promotor mit der TATA-Box aus dem Plasmid pC3G5 [Position 283 (*Hind* III) bis Position 44 (*Xho* I)], in den die ZIIIB Bindestelle für die Autoregulation durch das Zta-Protein vor dem SEAP-Gen (*secreted placental alkaline phosphatase*) einkloniert wurde. Das Plasmid pC3G5 wurde freundlicherweise von Herrn Dr. Thomas Dobner (Universität Regensburg) zur Verfügung gestellt. Das Konstrukt mit HI-Motiven enthielt im Gegensatz zum Konstrukt ohne HI-Motive zusätzlich 5 HI-Motive in Folge (siehe Abb. 6).

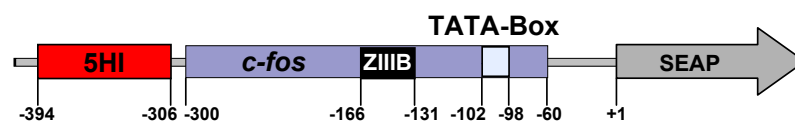


Abb. 6 *Schematische Darstellung des Minimalpromotors.*
5xHI = 5 HI-Motive in Reihe; *c-fos* = minimaler *c-fos* Promotor aus pC3G5 ;
ZIIIB = Bindestelle für das Zta-Protein; TATA = TATA-Box aus *c-fos* Promotor;
SEAP = lösliche alkalische Phosphatase als Reportergen;

Ergebnisse der Experimente mit Minimalpromotorkonstrukten

Frühere Ergebnisse aus unserer Arbeitsgruppe mit dem distalen Promotoranteil des BZLF-1-Promotors, der 4 HI-Motive einschließt (Position -221 bis -551) vor dem SV40 *Enhancer* / Promotor (Schwarzmann *et al.*, 1994) deuteten darauf hin, daß es sich bei den HI-Motiven um *silencer*-Elemente handelt. Dieses Ergebnis konnte bei der Untersuchung der isolierten HI-Konsensussequenz 5'-ACAGATGA-3' im Minimalpromotor im Rahmen meiner Diplomarbeit bestätigt werden (Diplomarbeit Heide Sommer, Universität Regensburg, 1995). Der negativ-regulatorische Effekt auf die Basalaktivität des *c-fos* Promotors war nur dann zu

beobachten, wenn der Promotor ohne HI-Motive eine Mindestaktivität aufwies. Da der BZLF-1-Promotor in latent infizierten Zellen eine nur sehr geringe Aktivität aufwies, jedoch neben einer Reihe von zellulären Faktoren auch durch das Genprodukt von BZLF-1 selbst autokrin hochreguliert werden konnte (Flemington und Speck, 1990b), untersuchten wir den Einfluß der HI-Motive auf die autokrine Transaktivierung des BZLF-1-Promotors durch Zta. Zu diesem Zweck wurden Promotorkonstrukte mit (pSEAP/T/Z/G/5HI) und ohne HI-Motive (pSEAP/T/Z/G) zusammen mit einem Expressionsplasmid für Zta (pCMVZ') in die oben beschriebenen Zelllinien DG 75, Tera 9117 und H1299 transfiziert und nach 48 Stunden die Ansätze auf die Expression des Reporterproteins (lösliche alkalische Phosphatase) hin ausgewertet.

Die Ergebnisse sind in Abb. 7 dargestellt. Die Basalaktivitäten der Plasmide mit und ohne HI-Motive waren vergleichbar gering (Spur 3, 5, 9, 11, 15 und 17). Desweiteren wurden die Minimalpromotorkonstrukte mit und ohne HI-Motive zusammen mit dem Expressionsplasmid für Zta transfiziert (Spuren 4, 6, 10, 12, 16 und 18). Es zeigte sich, daß bei den Promotoren ohne HI-Motive keine signifikante Aktivierung durch Zta meßbar war (Spur 4, 10, 16). Enthalten die Promotoren dagegen fünf HI-Motive in Reihe, war in allen drei Zelllinien koaktivierende Wirkung der HI-Motive auf den durch Zta transaktivierten Promotor zu beobachten (Spur 6, 12, 18). Sehr deutlich zeigte sich dieser Effekt in der BL-Zelllinie DG 75 (Abb. 7 links) sowie in der Lungenkarzinom-Zelllinie H1299 (Abb. 7 rechts) bezogen auf die Basalaktivität der Promotoren. Die Aktivierbarkeit des Promotors stieg um den Faktor achteinhalb bzw. acht gegenüber dem HI-negativen Promotoren an. In der Epithelzelllinie Tera 9117 (Abb. 7 mitte) war dieser Effekt nicht so deutlich, aber auch hier konnte im Durchschnitt eine vierfach bessere Aktivierbarkeit des Promotors gemessen werden.

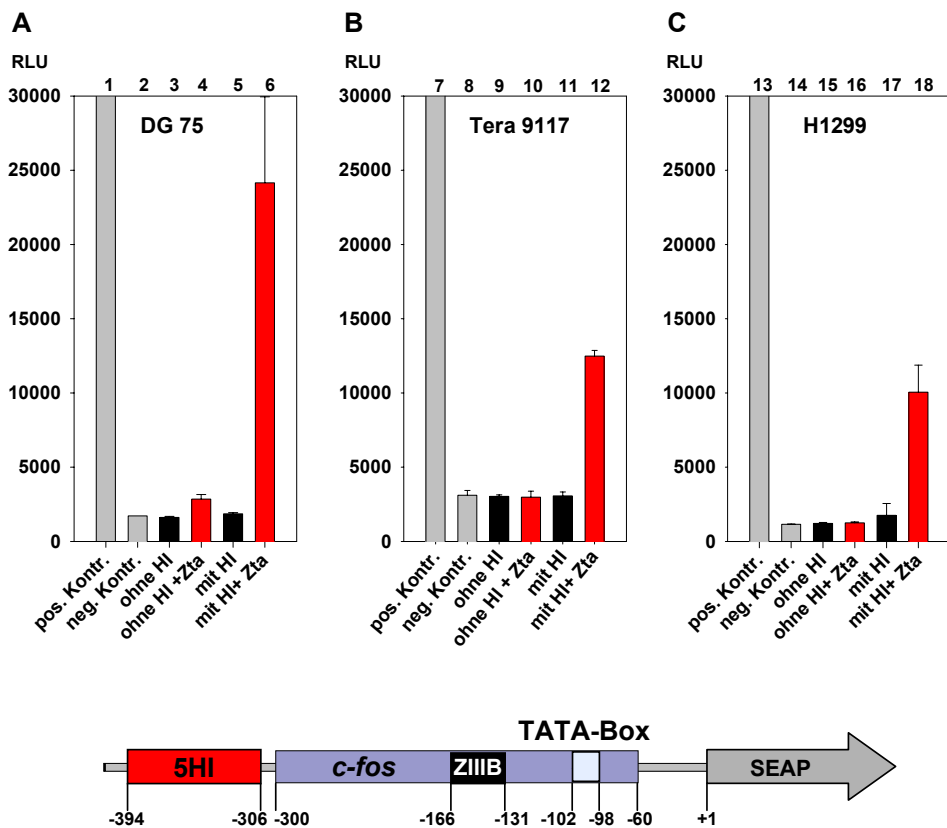


Abb. 7 *In einem künstlichen Minimalpromotor unterstützen die HI-Motive die Transaktivierung durch Zta.*

Reporterplasmide mit einem künstlichen, von *c-fos* abgeleiteten Minimalpromotor mit (Spuren 5, 6, 11, 12, 17 und 18) und ohne (Spuren 3, 4, 9, 10, 15 und 16) HI-Motive wurden in die drei EBV-negativen Zelllinien DG 75, Tera 9117 und H1299 transfiziert. Eine Hälfte der Ansätze wurde mit einem Expressionsplasmid für Zta kotransfiziert (Spuren 4 und 6, 10 und 12, 16 und 18). Nach drei Tagen wurde die Aktivität der Promotoren anhand der Expression des SEAP-Reporterproteins gemessen.

Die Transfektionsexperimente mit den Minimalpromotoren machten deutlich, daß die HI-Motive neben den früher beobachteten negativ-regulatorischen Eigenschaften auch positiv-regulatorisch wirken können, indem sie die Transaktivierung des Promotors durch Zta verstärken. Über die reprimierenden Eigenschaften konnte in den hier beschriebenen Experimenten aufgrund der niedrigen Basalaktivitäten, die sich nur unwesentlich über denen der Negativkontrolle befanden, keine Aussage getroffen werden. Die HI-Motive sind im Originalpromotor von einer Reihe anderer regulatorischer Motive, mit denen sie eventuell wechselwirken können, umgeben. Daher stellte sich die Frage, ob der beobachtete koaktivierende Effekt auch in der natürlichen Umgebung der HI-Motive im BZLF-1-

Promotor zu beobachten sein würde, oder ob Wechselwirkungen mit anderen benachbarten Motiven im Promotor diesen koaktivierenden Effekt kompensieren würden.

3.1.2 Im Kontext des Originalpromotors reprimieren die HI-Motive die Basalaktivität und die Transaktivierung durch Zta

Subklonierung des distalen Bereichs des BZLF-1-Promotors zur Herstellung von Mehrfachmutanten in den HI-Motiven

Um die Funktion der HI-Motive im Kontext des Originalpromotors in Transfektions-Experimenten untersuchen zu können, mußten Konstrukte hergestellt werden, die den gesamten BZLF-1-Promotor (Position –551 bis Position +1) vor einem Reportergen enthielten. Zu diesem Zweck wurde der distale Promotorbereich aus den vorhandenen Plasmiden pSSVHbs J*, L* und O* in den Vektor pLuc Zp* subkloniert (siehe Abb. 8, Tabelle 5). Die pSSVHbs-Plasmide enthielten den distalen Promotor von BZLF-1 (Position –551 bis –221) mit verschiedenen Kombinationen an Mutationen in den verschiedenen HI-Motiven (Tabelle 5) vor dem SV40-*immediate-early-Enhancer*-Promotor. Der Expressionsvektor pLucZp* ist eine Variante des kommerziell erhältlichen Vektors pGL2 basic (Promega). Der DNA-Bereich, der den Originalpromotor von BZLF-1 (Position +1 bis –551) einschließt, wurde mittels PCR mit Hilfe der *Primer* ON *Bgl*II und ON *Kpn*I aus dem Genom des EBV-Stamms B95-8 isoliert und vor das Luciferase-Gen kloniert. Desweiteren wurde an Position –245 eine *Nhe*I Schnittstelle eingeführt. Das Plasmid pLuc Zp* wurde mit den Restriktionsenzymen *Nhe*I und *Kpn*I verdaut und somit der distale nicht mutierte Promotorbereich (siehe Abb. 8) von Position –245 bis Position –551 herausgeschnitten. Mittels PCR wurden die entsprechenden unterschiedlich mutierten Promotorbereiche mit Hilfe der PCR-*Primer* ON *Nhe*I und ON *Kpn*I aus den pSSVHbs-Vektoren nach dem Standard-PCR-Protokoll (Kapitel 2.5.7) isoliert und die PCR-Produkte mit den Restriktionsendonukleasen *Kpn*I und *Nhe*I an deren Enden nachgeschnitten. Anschließend wurden die verschiedenen mutierten Promotorbereiche in den präparierten Vektor pLucZp* einkloniert (Abb. 8, Tabelle 5).

In dem Ausgangsplasmid pSSVHbsO* (Vierfach Mutante) war die HI δ -Mutation nicht vorhanden und wurde nachträglich über *quick-change* (Kapitel 2.5.8) eingeführt. Dabei wurde ein Motiv generiert, das nicht 100 %ig mit den anderen Mutanten (Einfach-, Zweifach, und Dreifachmutanten) übereinstimmte.

Folgende Promotorkonstrukte wurden hergestellt:	
pLuc ZpJ* ($\alpha^*\gamma^*$)	enthält den Promotor von BZLF-1 mit Mutationen in den HI-Motiven α und γ aus pSSVHbs J*
pLuc ZpL* ($\alpha^*\beta^*\gamma^*$)	enthält den Promotor von BZLF-1 mit Mutationen in den HI-Motiven α , β und γ aus pSSVHbs L*
pLuc Zp O* ($\alpha^*\beta^*\gamma^*\delta^*$)	enthält den Promotor von BZLF-1 mit Mutationen in den HI-Motiven α , β ; γ und δ aus pSSVHbs O*
Promotorkonstrukte vorhanden aus Vorarbeiten:	
pluc Zp α^*	enthält den Promotor von BZLF-1 mit Mutationen im HI-Motiv α aus pSSVHbsD*
pluc Zp β^*	enthält den Promotor von BZLF-1 mit Mutationen im HI-Motiv β aus pSSVHbsC*
pluc Zp γ^*	enthält den Promotor von BZLF-1 mit Mutationen im HI-Motiv γ aus pSSVHbsA*
pluc Zp δ^*	enthält den Promotor von BZLF-1 mit Mutationen im HI-Motiv δ aus pSSVHbsE*

Tabelle 5 Promotorkonstrukte für Transfektionsexperimente

Bei den pSSVHbs-Konstrukten handelt es sich um die am Institut vorhandenen Promotor-Donatoren, die zur Herstellung der pLucZp-Konstrukte verwendet wurden.

Alle Konstrukte wurden durch Restriktionsanalysen und Sequenzierungen überprüft.

HI-Motiv	Originalsequenz	Mutierte Sequenz	Eingeführte / zerstörte Schnittstelle
HI α	ACAGATGA	CAAGCTTA	<i>Hind</i> III
HI β	ACATATGG	CATATGAC	<i>Nde</i> I
HI γ	CCATCTGT	AAGCTTGC	<i>Hind</i> III
HI δ	ATGACAGAGGA	Bei Einzel/ Doppel/ 3-fach- Mutation: AGAATTCAGA Bei Vierfach-Mutation: GAATTCGAGGA	<i>Eco</i> RI

Tabelle 6 Übersicht über die Mutationen in den HI-Motiven

Eingeführte bzw. zerstörte Endonuklease-Schnittstellen sind fett gedruckt.

Das Motiv HI- δ war in dem Konstrukt pLucZp O* (Vierfach Mutante) im Vergleich zu den anderen Konstrukten anders mutiert.

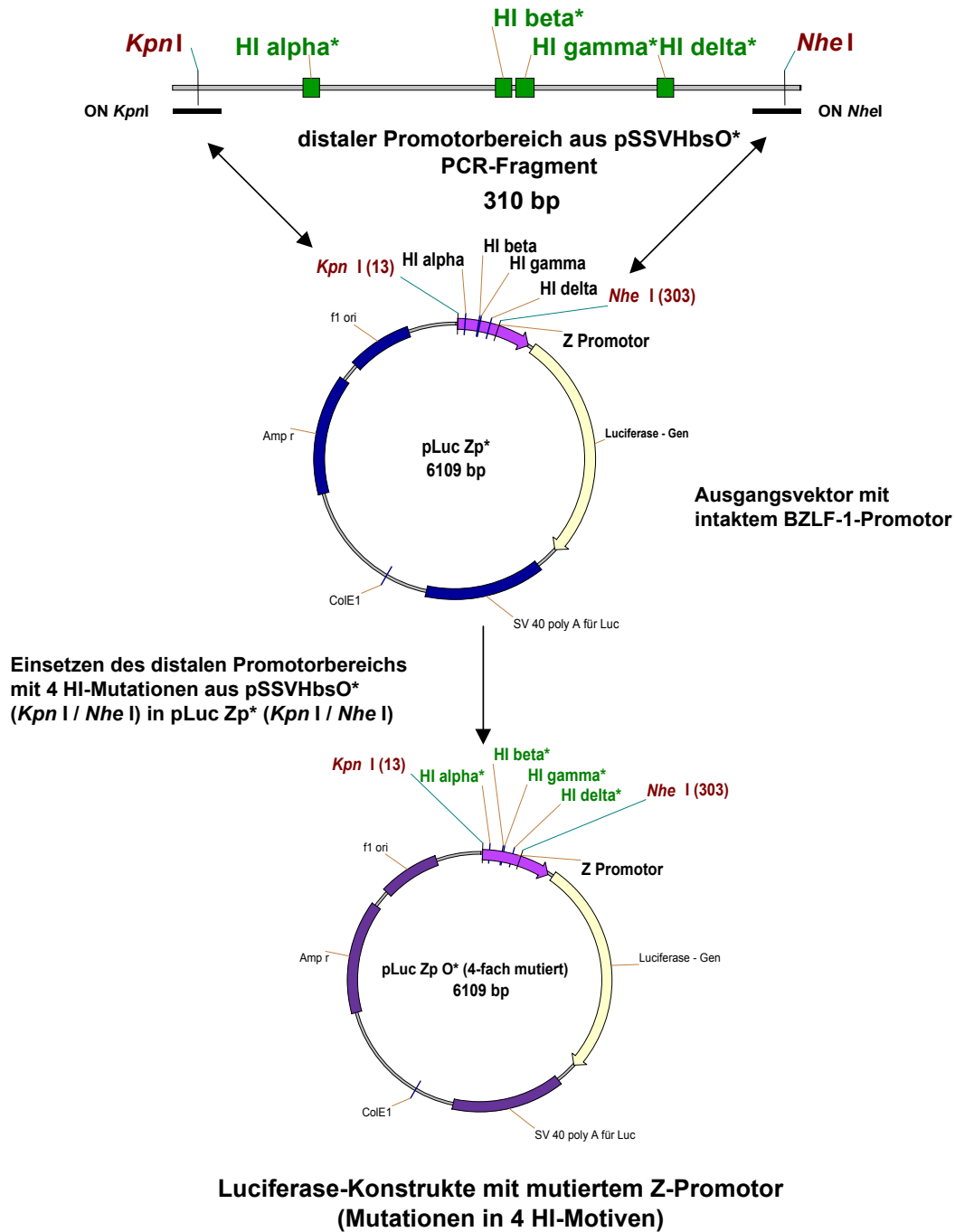


Abb. 8 *Klonierung der BZLF-1-Luciferase Reporterkonstrukte mit Mutationen in den HI-Motiven am Beispiel der Vierfach Mutante.*

Mittels PCR wurde der distale in vier HI-Motiven mutierte BZLF-1-Promotoranteil mit Hilfe der Primer ON KpnI und ON NheI aus dem Vektor pSSVHbsO* isoliert und mit den Restriktionsendonukleasen KpnI und NheI geschnitten. Anschließend wurde das PCR-Fragment in den ebenfalls mit oben genannten Enzymen verdauten Ausgangsvektor pLucZp* kloniert.

Einfluß der HI-Motive auf die Aktivität des BZLF-1-Promotors in lymphoiden Zellen (DG 75)

Die Promotorregion von BZLF-1 enthält eine Reihe von Proteinbindungsmotiven, darunter AP-1, SRE (*serum response element*), Anti-IgG-sensitive Motive, YY-1, sowie zwei ZRE's (*Zta responsive elements*). Um eine mögliche Wechselwirkungen zwischen den HI-Motiven und diesen regulatorischen Sequenzen zu untersuchen, wurde eine Serie von BZLF-1-Reporterkonstrukten mit verschiedenen Einfach-, Zweifach-, Dreifachmutanten sowie einer Vierfachmutante (Abb. 8, Tabelle 6) in den HI-Motiven erzeugt. Die Plasmide wurden in die lymphoide Zelllinie DG75 transfiziert und nach 48 Stunden die Konzentration des Reporterproteins (Luciferase) gemessen. In Abb. 9 sind die Ergebnisse dieser Transfektionsexperimente dargestellt. Abb. 9A zeigt, daß tendenziell alle Mutationen in HI-Motiven, egal ob einzeln oder in Kombination, zu einer Steigerung der Basalaktivität des BZLF-1-Promotors führten. Auffällig war dabei der Effekt bei Mutation im HI γ -Motiv (gamma*), die zu einer fast zwölffachen Steigerung der Basalaktivität führte. Die anderen untersuchten Einzelmutationen (alpha* oder beta*) führten nur zu einer vierfachen Steigerung. Eine Doppelmutation (2-fach*; alpha* / gamma*) führte zu einer achtfachen Steigerung, während die Dreifach Mutation (3-fach*; alpha* / beta* / gamma*), die Basalaktivität nur verdoppelte. Im Gegensatz zu früheren Ergebnissen (Schwarzmann *et al.*, 1994), bei denen die vierfach Mutante (4-fach*) in LCLs keinen Effekt zeigte, war hier eine fünffache Steigerung der Basalaktivität zu beobachten. Die Ursache für diesen Unterschied wird später näher erläutert.

Abb. 9B zeigt den Einfluß der HI-Motive bzw. der Mutationen dieser Motive auf die Transaktivierbarkeit des BZLF-1-Promotors. Die oben genannten Plasmide wurden mit dem Expressionsplasmid für Zta kotransfiziert und nach 48 Stunden die Konzentration des Reporterproteins gemessen. Es zeigten sich vergleichbare Ergebnisse wie bei den Basalaktivitäten der Promotoren: Mutationen in den HI-Motiven führten zu einer deutlich stärkeren Aktivierbarkeit des BZLF-1-Promotors im Vergleich zum unmutierten Promotor (Zp + Zta). Wiederum zeigte die Mutation im HI γ -Motiv (gamma* + Zta) den stärksten Effekt.

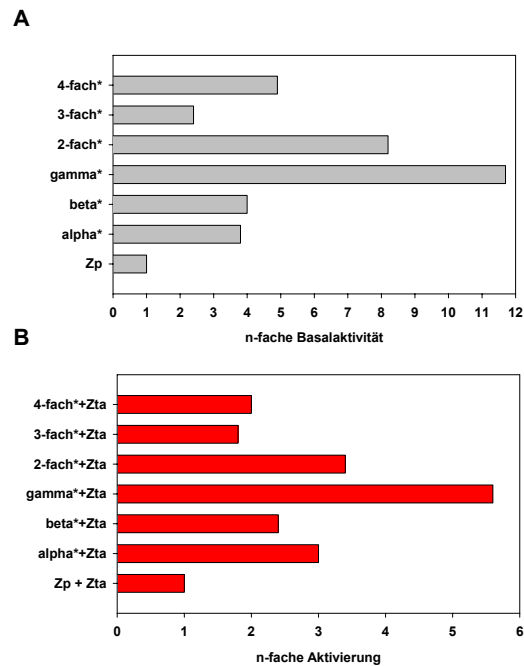


Abb. 9 *Einfluß der HI-Motive im Kontext des BZLF-1-Promotors auf die Basalaktivität (A) und auf die Transaktivierbarkeit (B) in der lymphoiden BL-Zelllinie DG 75.*

A: zeigt die Basalaktivität der Testpromotoren nach der Mutation einzelner oder von Kombinationen an HI-Motiven.

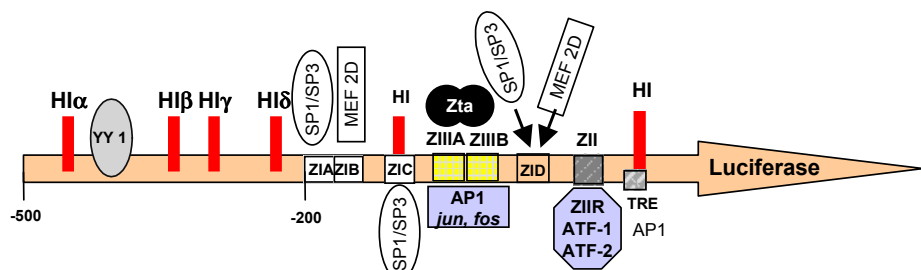
B: zeigt die Aktivität der Promotoren nach co-Transfektion mit einem Expressionsplasmid für das Transaktivatorprotein Zta.

Zp = unmutierter Promotor; n* = in den jeweiligen HI-Motiven mutierter Promotor;

2-fach* = alpha* / gamma*; 3-fach* = alpha* / beta* / gamma*; 4-fach* = alpha* / beta* / gamma* / delta*;

Vergleich des Einfluß der HI-Motive in lymphoiden (DG 75) und epithelialen (Tera 9117, H1299) Zelllinien

Da sich epitheliale und lymphoide Zellen in ihrer Permissivität für die Virusvermehrung unterscheiden, wurde der Effekt der HI-Mutationen auf die Basalaktivität und auf die Transaktivierbarkeit des BZLF-1-Promotors auch in nicht lymphoiden (epithelialen) Zelllinien getestet. Die Ergebnisse dieser Transfektionsexperimente werden im folgenden exemplarisch an der Mutante im HI γ -Motiv, sowie der Vierfach-Mutante (HI α^* , β^* , γ^* und δ^*) dargestellt (siehe Abb. 10, Abb. 11 und Abb. 12). Reporterplasmide wurden entweder alleine (schwarze Balken) oder zusammen mit einem Expressionsplasmid für Zta (rote Balken) in die Zelllinien Tera 9117 und H1299 transfiziert und nach 48 Stunden die Konzentration des Reporterproteins gemessen. In Abb. 10 sind die Absolutwerte der Experimente zusammengefaßt.



BZLF-1-Promotors in verschiedenen Zelllinien.

Promotorkonstrukte mit Mutation in HI-Motiven wurden alleine (Spuren 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17) oder zusammen mit einem Expressionsplasmid für Zta (Spuren 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18) in die Zelllinien DG 75, Tera 9117 und H1299 transfiziert. Dargestellt sind die Absolutwerte der Messung des Reporterproteins Luciferase.

Im Gegensatz zur lymphoiden Zelllinie DG 75 (A), wo eine deutlich erhöhte Transaktivierbarkeit beider mutierter Promotoren zu erkennen war (Spuren 4 und 6), hatte in den epithelialen Zelllinien Tera 9117 (B) und H1299 (C) nur die Mutation des H1 γ -Motivs (Spuren 10 bzw. 16) nicht aber die Vierfach Mutation (Spuren 12 bzw. 18) eine gesteigerte Transaktivierung durch Zta bewirkt. Im Fall der Vierfach-Mutation sank die Transaktivierbarkeit nahezu auf das Niveau des unmutierten Promotors (Spuren 8 bzw. 14).

In allen drei untersuchten Zelllinien zeigte die Mutation im HI γ -Motiv einen deutlichen Einfluß auf die Basalaktivität der Reporterkonstrukte (Abb. 11). So stieg die Basalaktivität in

der lymphoiden BL-Zelllinie DG 75 (A) bei mutiertem HI γ -Motiv (gamma*) um den Faktor zwei, in den epithelialen Zelllinien Tera 9117 (B) und H1299 (C) sogar um die Faktoren 26 bzw. 45 bezüglich des unmutierten Promotors an. Der Promotor mit Vierfach-Mutation (4-fach*) zeigte hingegen in keiner der untersuchten Zelllinien einen Effekt auf die Basalaktivität, was mit früheren Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe übereinstimmt (Schwarzmann *et al.*, 1994).

In Abb. 12 ist der Einfluß der HI-Motive bzw. der Mutationen auf die Transaktivierbarkeit des Promotors als relative Aktivitätsveränderung im Vergleich zur Aktivität des unmutierten Promotors dargestellt. Bei Kotransfektionen mit einem Expressionsplasmid für Zta wurden die Promotoren mit zerstörtem HI γ -Motiv (gamma* + Zta) in den Zelllinien Tera 9117 (B) und H1299 (C) etwa 15 mal bzw. sechs mal stärker aktiviert, als der Promotor mit intaktem HI γ -Motiv (Zp + Zta). In der lymphoiden Zelllinie DG 75 (A) betrug die Steigerung nur dreieinhalb mal. Der Vierfach-mutierte Promotor (4-fach* + Zta) hingegen ließ sich nur in der lymphoiden Zelllinie DG 75 um das zweieinhalbfache besser aktivieren als der unmutierte Promotor Zp. In den epithelialen Zelllinien Tera 9117 und H1299 konnte kein signifikanter Effekt beobachtet werden. Doppel- und Dreifachmutationen verhielten sich wie Einfachmutationen, und wurden aus diesem Grund hier nicht dargestellt. In allen drei untersuchten Zelllinien zeigte die Mutation im HI γ -Motiv einen deutlichen Einfluß auf die Basalaktivität der Reporterkonstrukte. So stieg die Basalaktivität in der lymphoiden BL-Zelllinie DG 75 bei mutiertem HI γ -Motiv um den Faktor zwei, in den epithelialen Zelllinien Tera 9117 und H1299 sogar um die Faktoren 26 bzw. 45 bezüglich des unmutierten Promotors an. Der Promotor mit Vierfach-Mutation zeigte hingegen in keiner der untersuchten Zelllinien einen Effekt auf die Basalaktivität, was mit früheren Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe übereinstimmt (Schwarzmann *et al.*, 1994).

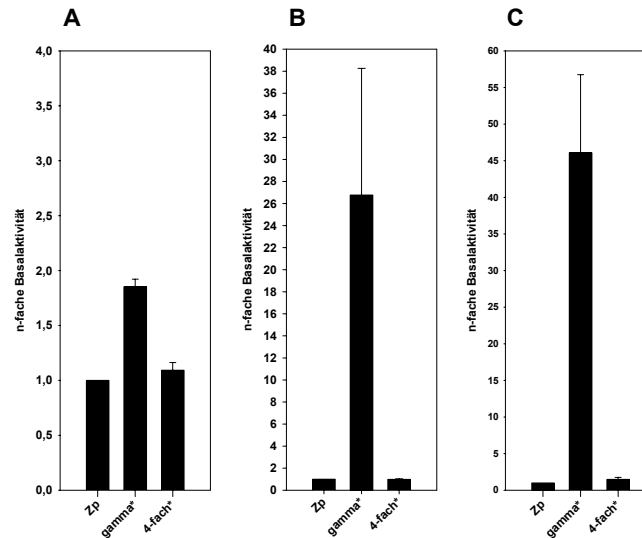


Abb. 11 Die HI-Motive reprimieren die Basalaktivität des BZLF-1-Promotors. Dargestellt sind die Basalaktivitäten in der lymphoiden BL-Zelllinie DG 75 (A) und den epithelialen Zelllinien Tera 9117 (B) und H1299 (C) normiert auf Zp = 1.

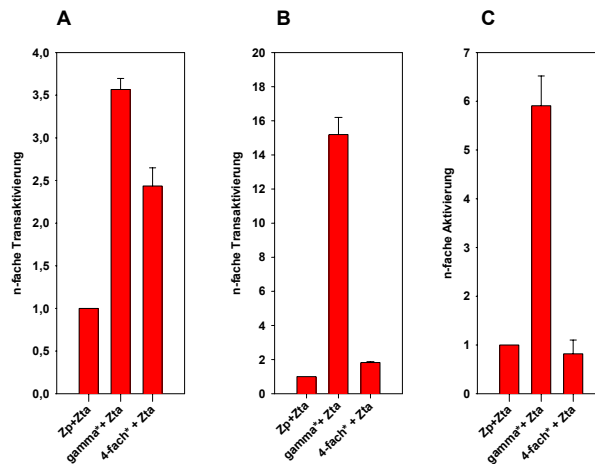


Abb. 12 Die HI-Motive unterdrücken die Transaktivierung des BZLF-1-Promotors durch das Transaktivatorprotein Zta.

Gezeigt ist die Aktivität der Testpromotoren nach co-Transfektion mit einem Expressionsplasmid für das Transaktivatorprotein Zta in den Zelllinien DG 75 (A), Tera 9117 (B) und H1299 (C) normiert auf Zp + Zta = 1.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß die HI-Motive im Kontext des BZLF-1-Promotors reprimierende Eigenschaften sowohl auf die Basalaktivität, als auch auf die autokrine Stimulation des Promotors durch das BZLF-1-Protein besitzen. Ein positiv regulatorischer Effekt der HI-Motive, wie bei den Minimalpromotorkonstrukten mit isolierten

HI-Motiven, konnte im originalen Kontext des Promotors in Transfektionsexperimenten nicht bestätigt werden. Somit zeigten sich eine starke Abhängigkeit der Funktion der HI-Motive von der Umgebung innerhalb des Promotors.

3.1.3 Im Kontext des Originalgens (BZLF-1-Promotor und –Leserahmen) *co*-stimulieren die HI-Motive eine Transaktivierung durch Zta.

Nachdem die Funktion der HI-Motive an gängigen Reporterplasmiden getestet worden war, sollte nun ihr Einfluß auf den Lebenszyklus von EBV und eventuelle Wechselwirkungen mit anderen viralen Genen untersucht werden. Rekombinante EB-Viren wurden als für diesen Zweck am geeignetsten angesehen. Zur Herstellung dieser rekombinanten EBVs mußten zunächst spezielle Rekombinationsplasmide hergestellt werden, die die mutierten BZLF-1-Promotoren mit jeweils *upstream* und *downstream* 1000 Bp langen Originalsequenzen zur homologen Rekombination in das Virus enthielten. Bevor diese Konstrukte für die Rekombination in Bakterien eingesetzt werden konnten, wurden sie zunächst in transienten Transfektionsexperimenten auf ihre Funktion hin getestet. Dabei diente das BZLF-1-Protein welches im Western Blot immunhistochemisch nachgewiesen wurde als Reporter.

Klonierung des Original-Gens von BZLF-1 (Promotor und ORF) in den Vektor pCR-IIITMTOPO

Zur Herstellung rekombinanter EB-Viren, die Mutationen in den HI-Motiven im Promotor von BZLF-1 enthielten, wurden spezielle Rekombinationsplasmide konstruiert, die das BZLF-1-Gen (mutierter Promotor und ORF) und flankierende Bereiche zur Rekombination trugen (Abb. 13). Zu diesem Zweck wurde aus genomischer DNA des EBV-Stammes B95-8 ein 2595 Bp langes Genom-Fragment von Position 102176 bis 104774 unter Verwendung der PCR-Primer BZLF-1 *forward* und BZLF-1 *reverse* mittels PCR isoliert. Dieses Fragment umfaßte den BZLF-1-Promotor, sowie beidseitig je 1000 Bp, wobei die 1000 Bp von +1 bis +1000 dem BZLF-1-ORF entsprachen. Diese Bereiche links und rechts des Promotor wurden zur Herstellung rekombinanter EB-Viren als Bereiche für die homologe Rekombination benötigt. Das PCR-Produkt wurde in den Vektor pCR-IIITMTOPO (Invitrogen) einkloniert. Das Konstrukt wurde pCR-III-BZLF-1 genannt. Zur Einführung von Mutationen in den HI-Motiven, die auch in den Plasmiden pLucZp- und pSSVHbs verwendet wurden, wurden unter Verwendung der Primer PCR-BZLF-1* *forward* und PCR-BZLF-1* *reverse* der 266 Bp lange, distale Teil des Promotors mit den HI-Mutationen aus den Konstrukten pLucZp γ^* und

pLucZp O* ($\alpha^*\beta^*\gamma^*\delta^*$) mittels PCR isoliert und mit Hilfe der abgewandelten *quick-change*-Methode (Kapitel 2.5.8) in das Konstrukt pCRIITMBZLF-1 eingeführt. Daraus resultierten die Konstrukte pCR-II-TOPO-BZLF-1/ γ^* und pCR-II-TOPO-BZLF-1/O*. In Abb. 13 sind die einzelnen Schritte der Klonierung dargestellt.

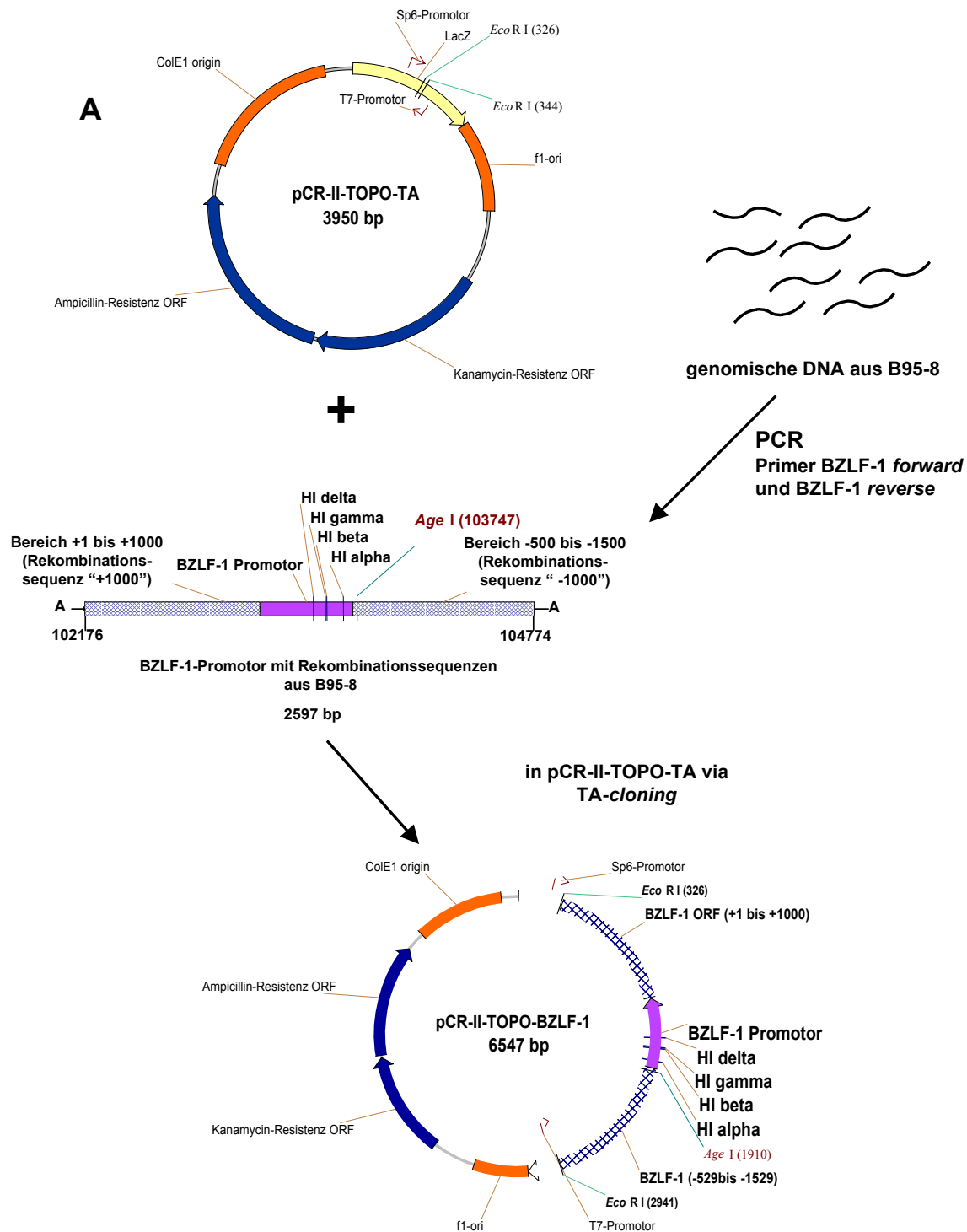
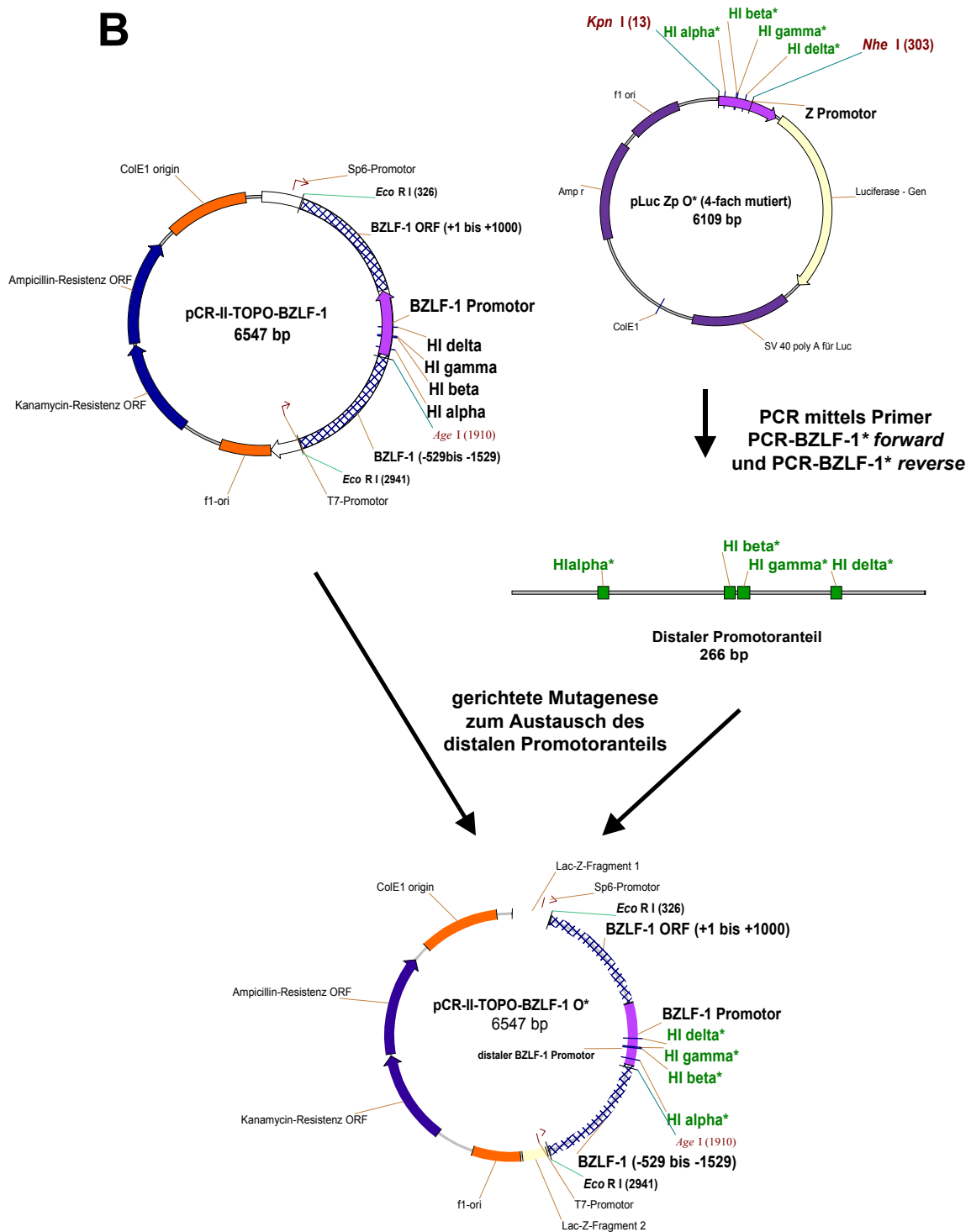


Abb. 13 Herstellung von Rekombinationsplasmiden mit dem Originalgen von BZLF-1 und HI-Mutationen im Promotor (am Beispiel der vierfach Mutante).

A: Mittels PCR wurde der Bereich von 102176 bis 104774, der den BZLF-1-Promotor, 1000 Bp vor dem Promotor, sowie der BZLF-1-ORF (1000 Bp nach dem Promotor) enthält, mit Hilfe der Primer BZLF-1 forward und BZLF-1 reverse aus genomischer DNA des EBV-Stammes B95-8 isoliert und in den Vektor pCR™-II-TOPO (Invitrogen) kloniert.

B



B: Der nicht mutierte distale Promotoranteil (Position -243 bis -541) mittels gerichteter Mutagenese gegen den mutierten distalen Promotoranteil, der mit Hilfe der Primer PCR-BZLF-1* forward und PCR-BZLF-1* reverse aus den jeweiligen pLuc-Plasmiden gewonnen wurde, ausgetauscht.

Um die Funktion der Rekombinationsplasmide zu kontrollieren, wurden diese alleine oder zusammen mit einem Expressionsplasmid für Zta (pCMVZ') in die epitheliale Lungenkarzinom-Zelllinie H1299 transfiziert (Abb. 14). 48 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen geerntet und ausgezählt. Für die quantitative Auswertung wurden gleich viele Zellen jedes Ansatzes auf einem SDS-Gel aufgetragen und anschließend über Westernblot-Analysen mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers gegen Zta die Aktivität der Promotoren gemessen. Um zu zeigen, daß nicht nur das vom Expressionsplasmid für Zta stammende Protein nachgewiesen wurde, wurden das Expressionsplasmid für Zta alleine in die Zellen transfiziert (Spur 6 und 7). Da die Sensitivitätsgrenze für das von dem Expressionsplasmid stammenden Zta-Protein nicht sicher war, wurden zwei verschiedene Mengen des Expressionsplasmids transfiziert um einen Nachweis desselben sicherzustellen. Spur 6 zeigt die Menge des Proteins alleine, die auch zu den Rekombinationsplasmiden zur Aktivierung des Promotors zutransfiziert wurde, Spur 7 stellt die doppelte Menge dar.

Es war deutlich zu erkennen, daß sowohl der nicht mutierte (Spur 9), als auch in HI-Motiven mutierte BZLF-1-Promotor (Spur 10 und 11) in der epithelialen Zelllinie H1299 keine Aktivität zeigte. Dies stimmte mit den Ergebnissen der Luciferasereporter überein, die eine negativ-regulatorische Wirkung der HI-Motive auf die Basalaktivität zeigten. Nach Kotransfektion mit einem Expressionsplasmid für Zta war eine deutliche Aktivierung des nicht mutierten Promotor zu beobachten (Spur 3). Dabei war deutlich sichtbar, daß das nachgewiesene Zta-Protein nicht ausschließlich der Menge des vom zutransfizierten Expressionsplasmid (Spur 6) stammenden entsprach. Im Gegensatz zu den Luciferase-Reportern führten Mutationen in den HI-Motiven nicht zu einer stärkeren Expression von Zta-Protein, sondern im Gegenteil zu einer drastischen Reduktion (Spuren 4 und 5). Auch hier zeigte die Mutation im HI γ Motiv (Spur 4) den weitaus stärkeren Effekt als die Vierfach-Mutante (Spur 5). Die Expression der Negativkontrolle erreichte in etwa das Niveau des nicht-transaktivierten Reporterplasmids.

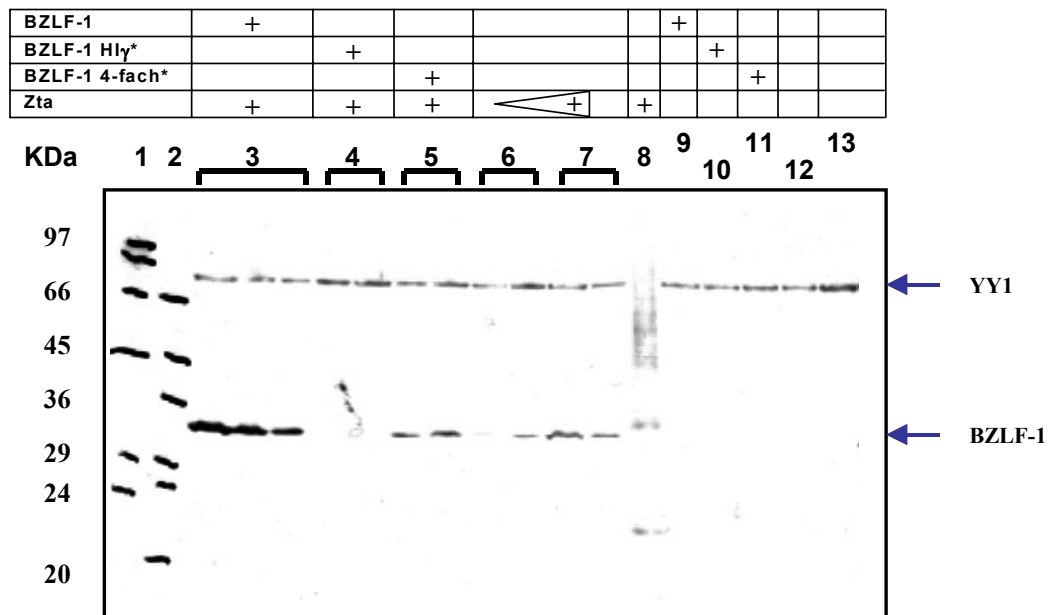


Abb. 14 *HI-Motive verstärken eine Transaktivierung über das Transaktivatorprotein Zta im epithelialen Lungenzellkarzinom H1299.*

48 Stunden nach Transfektion der Reporterplasmide alleine oder zusammen mit einem Expressionsplasmid für Zta wurde das Gesamtprotein aus 2×10^5 Zellen mittels einer SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und anschließend mittels Western Blot-Analyse das Zta-Protein durch einen monoklonalen Antikörper nachgewiesen. Als Positivkontrolle diente ein rekombinantes bakterielles Zta-Protein (Spur 8), das eine geringfügig langsamere Laufgeschwindigkeit zeigt als Zta in den Extrakten. Als Negativkontrolle wurden die Reporterplasmide pCR-II-BZLF1 (ohne Mutation, Spur 9), pCR-II-BZLF1 γ^* (HI γ mutiert, Spur 10) und pCR-II-BZLF1 4-fach* (vierfach mutiert, Spur 11) ohne das Expressionplasmid für Zta transfiziert. Spur 12 und 13 zeigen Kontrolltransfektionen ohne Reporterplasmide und ohne Zta. Spur 6 und 7 zeigen Transfektionen mit unterschiedlichen Mengen des Expressionsplasmids für Zta, pCMVZ', ohne Reporterplasmide wobei Spur 6 der kotransfizierten Menge entspricht. Kotransfektionen der Reporterplasmide mit dem Expressionsplasmid sind in Spur 3 (nicht mutierter Promotor), Spur 5 (im HI γ mutierter Promotor) und Spur 6 (in 4 HI-Motiven mutierter Promotor) gezeigt. Zur Kontrolle gleicher Mengen an Proteinextrakt wurde ein monoklonaler Antikörper gegen das zelluläre Protein YY1 verwendet.

3.1.4 Untersuchungen zur unterschiedlichen Funktion der HI-Motive in zwei verschiedenen Reportersystemen

Es stellte sich nun die Frage, wodurch die unterschiedliche Funktion der HI-Motive in dem Reporterplasmid pLucZp*, in dem eine Mutation der HI-Motive zu einer stark erhöhten

Transaktivierung durch Zta führte (Abb. 14) und dem Reporterplasmid pCR-II-TOPO-BZLF-1 (Abb. 14), wo eine Mutation die Transaktivierbarkeit stark reduzierte, zustande kam. Dafür wurden zunächst die Unterschiede zwischen beiden Reporterkonstrukten untersucht

Im Bereich der Promotoren konnten keinerlei Unterschiede gefunden werden. Beide Promotorbereiche stammten aus der DNA des Labor-EBV-Stammes B95-8. Im Falle des Konstruktes mit dem gesamten BZLF-1-Gen (Promotor und Leserahmen) beinhaltete das Konstrukt 2500 Bp der Original-EBV-DNA. Bei den Luciferase-Konstrukten wurde der Promotor von -551 bis +1 mittels PCR isoliert, einkloniert und sequenziert. Für die unterschiedlichen Auswirkungen der Mutationen der HI-Motive kamen daher nur Sequenzen im Bereich der Reportergene in Frage. Bei genauer Betrachtung des Startbereichs des BZLF-1-Gens fiel auf, daß sich neben dem regulären Startkodon für die Translation (ATGATG) in Position +40 im BZLF-1-Gen ein weiteres ATG in Position + 68 befindet. Die Positionsangaben beziehen sich jeweils auf den Transkriptionsstart von BZLF-1. Im Plasmid mit dem Luciferasegen als Reporter befindet sich hingegen nur ein ATG-Codon im 5'-untranslatierten Bereich.

Unsere Arbeitshypothese, dargestellt in Abb. 15, war nun, daß die HI-Motive an der richtigen Positionierung der Transkriptionsmaschinerie beteiligt sein könnten und durch eine Mutation diese so verschoben würde, daß das reguläre ATG (+40) bei der Translation nicht benutzt werden könnte. Stattdessen würde das nachfolgende ATG (+68) verwendet. Dies würde jedoch zu einer Leserahmenverschiebung führen, was zu einem vorzeitigen Abbruch der Translation und somit zu einem nicht funktionellen Protein führen würde. Eine autokrine Transaktivierung des Promotors wäre folglich nicht mehr möglich. Bei anderen Reporterplasmiden wie z.B. den Luciferase- oder den SEAP-Plasmiden scheint die Positionierung der Transkriptionsmaschinerie von den HI-Motiven unabhängig zu sein. Dies würde auf eine BZLF-1 spezifische Wirkungsweise der HI-Motive hinweisen. Um dies zu untersuchen, wurden *Primer Extension*-Experimente durchgeführt (Kapitel 2.6.4), um möglicherweise BZLF-1-Transkripte mit unterschiedlichen 5'-Enden nachzuweisen, die durch falsche Positionierung der Polymerase entstanden sein könnten.

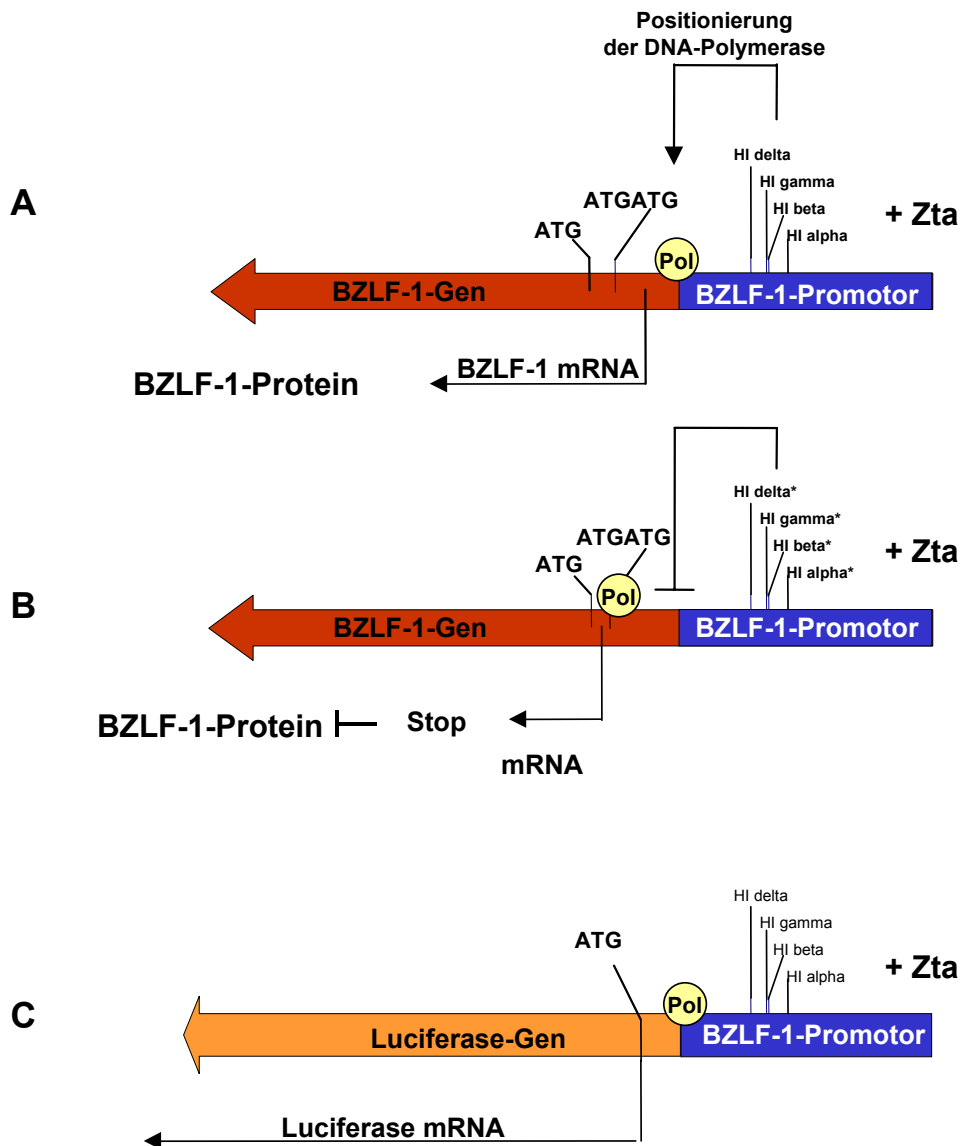


Abb. 15 Hypothese zur Regulation des BZLF-1-Gens durch die HI-Motive im Promotor.

A zeigt den intakten BZLF-1-Promotor. Der 5'-untranslatierte Bereich des Gens verfügt über zwei dicht beieinander gelegene Startpunkte der Translation (ATG in Position +40 und +68). Durch richtige Positionierung der RNA-Polymerase wird eine mRNA generiert, die das AUG in Position +40 beinhaltet und von der aus ein intaktes Zta Protein translatiert werden kann.

B zeigt den in HI-Motiven mutierten Promotor. Die RNA-Polymerase kann nicht mehr richtig positioniert werden. Bei der Translation wird das nächste, außerhalb des Leserahmens bei Position +68 liegende, AUG als Translationsstart benutzt, wodurch kein intaktes Zta Protein mehr generiert wird.

C zeigt das Luciferase-Reporterplasmid. Hier ist die Positionierung der RNA-Polymerase unabhängig von HI-Motiven, da nur ein ATG existiert. Somit kann nur das intakte Luciferase-Protein translatiert werden.

Zur Etablierung des *Primer Extention*-Experimentes für die genaue Bestimmung des 5'-Endes der BZLF-1-mRNA wurden H1299-Zellen mit den Reporterplasmiden pCR-II-TOPO-BZLF-1 (intakter Promotor), pCR-II-TOPO-BZLF-1 γ^* (HI γ mutiert) und pCR-II-TOPO-BZLF-1 O* (Vierfach mutiert) alleine oder zusammen mit dem Expressionsplasmid für Zta transfiziert, und nach 48 Stunden die Gesamt-RNA mit Hilfe von *Tri-Reagent*TM von Sigma (Kapitel 2.6.1) isoliert. Da die nachzuweisenden RNAs nur zu einem sehr geringen Anteil in der Gesamt-RNA vorlagen, wurden je 50 μ g in den Hybridisierungsansatz eingesetzt. Um Sekundärstrukturen möglichst zu vermeiden und so die Hybridisierung spezifischer zu gestalten, wurde den Ansätzen 10 % DMSO zugesetzt. Nach Hybridisierung (Kapitel 2.6.4.1) mit dem 5'-³²P markierten *Extention-Primer* (5'-AAG GCA CCT GGT ATG GGT CAG G-3') wurde die Verlängerungs (*Extention*)-Reaktion durchgeführt. Dabei wurde der anhybridisierte *Primer* durch die MULV-Reverse Transkriptase in Richtung 5'-Ende der nachzuweisenden mRNA verlängert. Unterschiedliche Startpunkte der Transkription, beispielsweise aufgrund der Mutation der HI-Motive, sollten unterschiedlich lange RT-*Primer* erzeugen (Abb. 17).

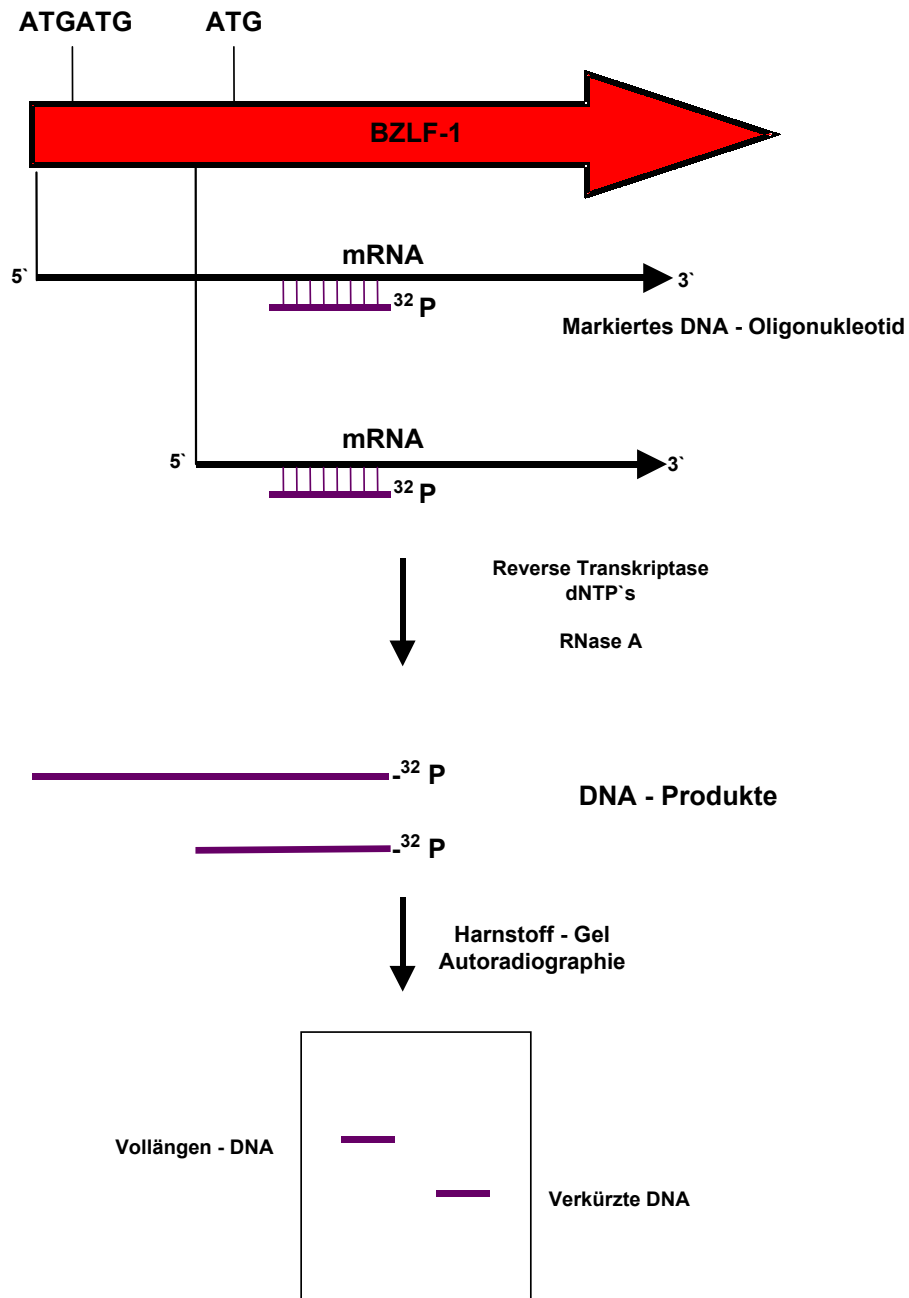


Abb. 16 Das Prinzip des Primer-Extension-Experiments.
mRNA wurde aus unterschiedlichen Zellen und Transfektionsansätzen isoliert. Nach Hybridisierung der mRNAs mit einem DNA-Oligonukleotid, das nahe dem 5'-Ende der zu untersuchenden mRNA bindet, wurde dieses in einer reversen Transkriptase-Reaktion bis zum 5'-Ende der mRNA verlängert. Nach Verdau mit RNase A blieben im Falle unterschiedlicher 5'-Enden unterschiedlich lange DNA-Produkte übrig, die gelelektrophoretisch auf einem Harnstoffgel aufgetrennt und anschließend autoradiographisch detektiert wurden.

Bei intakten HI-Motiven wurde ein DNA-Produkt mit einer Länge von 102 Bp erwartet. Sollte die Hypothese zutreffen, und die HI-Motive den Startpunkt der Transkription beeinflussen, so sollte sich bei mutierten HI-Motiven ein um mindestens 45 Bp kürzeres Produkt ergeben. Die Ansätze wurden auf einem 8 %-Harnstoffgel aufgetrennt und anschließend autoradiographisch detektiert (Abb. 17).

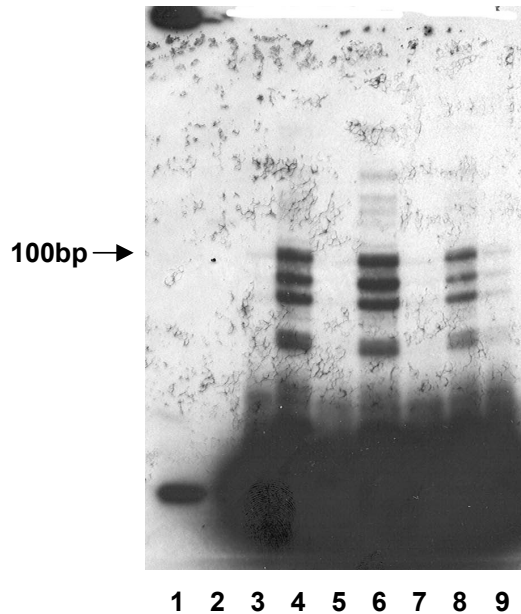


Abb. 17 *Primer-Extension-Experiment zur exakten Bestimmung des 5'-Endes von BZLF-1-mRNAs*

Die Reporterplasmide *pCR II-BZLF-1*, *pCR II-BZLF-1 γ^** und *pCR II-BZLF-1O** (vierfach mutiert) wurden alleine oder zusammen mit dem Expressionsplasmid für *Zta* in H1299 Zellen transfiziert. Nach 48 h wurde die Gesamt-RNA isoliert und je 50 μ g in den Primer-Extension-Assay eingesetzt. Die resultierenden DNA-Produkte wurden auf einem 8 % Harnstoffgel aufgetrennt und autoradiographisch detektiert

Spur 1 = Extension Primer; Spur 2 = leer;

Spur 3 = *pCR-II-TOPO-BZLF-1*; Spur 4 = *pCR-II-TOPO-BZLF-1* + *Zta*;

Spur 5 = *pCR-II-TOPO-BZLF-1/ γ^** ; Spur 6 = *pCR-II-TOPO-BZLF-1/ γ^** + *Zta*;

Spur 7 = *pCR-II-TOPO-BZLF-1/O**; Spur 8 = *pCR-II-TOPO-BZLF-1/O** + *Zta*;

Spur 9 = *Zta*;

100 Bp = Laufhöhe eines 100 Bp Markers, extrapoliert aus einem anderen Versuch; entspricht der Vollängen-DNA.

Abb. 17 zeigt das Ergebnis des *Primer Extension*-Experiments. Alle drei nicht transaktivierten Promotoren zeigten keinerlei DNA-Produkte (Spur 3, 5, 7). Wurden die Promotoren hingegen

zusammen mit dem Expressionsplasmid für Zta transfiziert, konnte deutlich DNA nachgewiesen werden (Spur 4, 6, 8). Um auszuschließen, daß die nachgewiesene DNA von der vom Expressionsplasmid für Zta stammenden RNA synthetisiert worden war, wurde als Kontrolle das Expressionsplasmid alleine ohne Reporterkonstrukte transfiziert und in gleicher Weise wie die anderen Transfektionen ausgewertet. Das Ergebnis ist in Spur 9 zu sehen. Man kann erkennen, daß zwar Banden der gleichen Länge detektiert wurden, diese aber deutlich schwächer in der Intensität waren. Daher kann man davon ausgehen, daß eine Transaktivierung der Promotorkonstrukte durch das Expressionsplasmid stattgefunden hat, und die detektierte DNA vom Reporterplasmid stammte. Allerdings war kein Unterschied in der Länge der detektierten DNA beim unmutierten Promotor (Spur 4), bei dem im HI γ mutierten Promotor (Spur 6) oder bei dem in allen 4 HI-Motiven mutierten Promotor (Spur 8) zu erkennen. Somit konnte die Hypothese, daß die unterschiedliche Expression von Zta bei intakten und mutierten HI-Motiven auf eine Verschiebung des Transkriptionsstartpunktes zurückzuführen sei, nicht bestätigt werden.

Neben den von BZLF-1 stammenden Banden wurden bei den Reporterplasmiden (Spur 4, 6, 8) im Gegensatz zu dem Expressionsplasmid noch weitere, längere DNA-Fragmente nachgewiesen. Wir gehen davon aus, daß hier der *Extention-Primer* auch unspezifisch im Plasmid gebunden hat, und die zusätzlichen Banden daher stammen.

3.2 Herstellung rekombinanter Epstein-Barr-Viren

Traditionell wurden rekombinante Epstein-Barr-Viren durch homologe Rekombination von DNA-Fragmenten oder Plasmiden, die das mutierte Allel trugen, in infizierten eukaryotischen Zellen hergestellt. Bei dieser Methode ist die Fähigkeit der Viren, B-Zellen zu immortalisieren, essentiell. Daher konnten bisher auf diese Methode keine Gene, die an der Immortalisierung von B-Zellen beteiligt sind, untersucht werden.

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Herstellung rekombinanter Epstein-Barr-Viren nach einem von Dr. H.-J. Delecluse (Delecluse *et al.*, 1998) (Abb. 18) modifizierten System der Methode von Messerle (Messerle *et al.*, 1997) in *E.coli*. Diese Methode bietet gegenüber der traditionellen Methode den Vorteil, daß prinzipiell jede denkbare Veränderung des EBV-Genoms, auch in essentiellen Genen des Virus, vorgenommen werden kann. Das hierfür verwendete BAC (*bacterial artificial chromosome*) 2089, das Plasmid pCP16 (Cherepanov und Wackernagel, 1995) sowie pBZLF1 (Hammerschmidt und Sugden, 1988) wurden uns freundlicherweise von Dr. Delecluse (GSF, München) zur Verfügung gestellt. Die gesamten

Klonierungs-, Rekombinations- und Selektionsschritte finden dabei zunächst in *E.coli* statt und sind von der immortalisierenden Eigenschaft des EBV unabhängig. Das hierbei verwendete BAC 2089, welches das gesamte EBV (B95-8)-Genom umfaßt, kodierte außerdem für EGFP und vermittelte Hygromycinresistenz, wodurch eine spätere Selektion auf EBV-positive Zellen möglich war. Die Technik zur Herstellung rekombinanter EB-Viren nach Delecluse *et al.* ist in Abb. 18 schematisch dargestellt:

Ein Rekombinationsplasmid, das mutierte und zum Zweck der homologen Rekombination von wt-EBV flankierte EBV-Sequenz enthält (A), wird in den Bakterienstamm BJ 5183, der den EBV-Klon 2089 (HygR, F-Faktor, GFP) trägt, transformiert (B). Über die wt-EBV-Sequenzen findet homologe Rekombination statt (C). Bakterienklone mit einrekombinierten DNA-Sequenzen können durch Zugabe von Tetracyclin selektioniert werden (D). Um Rückrekombination zu vermeiden, wird das rekombinante EBV in den *recA*⁻ Bakterienstamm DH10B transformiert (E). Um die Funktionsfähigkeit des mutierten EBV zu testen, wird das Genom des rekombinanten EBV in 293-Zellen transfiziert und eine Hygromycinselektion durchgeführt (F). Durch das im Genom enthaltene GFP wachsen grüne Kolonien mit mutierter EBV-Sequenz heran (G) die dann weiter kultiviert werden.

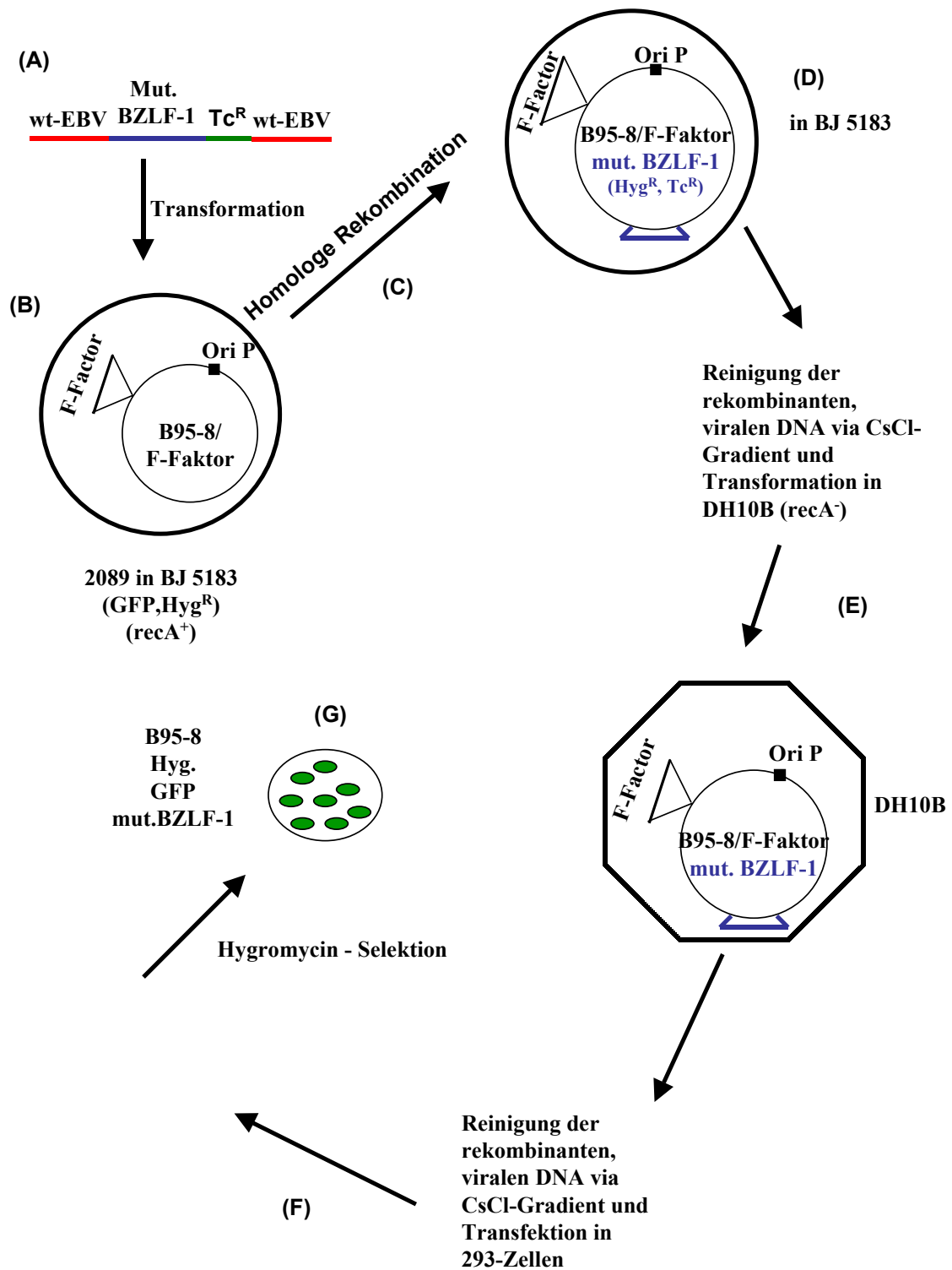


Abb. 18 Schematische Übersicht des Systems zur Herstellung rekombinanter EB-Viren. Beschreibung siehe vorangehender Text.

3.2.1.1 Ausgangsplasmide für die homologe Rekombination

Ziel war es, in den HI-Motiven mutierte EBV-Varianten herzustellen. Aufgrund der deutlich zu beobachtenden Auswirkungen der HI γ - und der Vierfach Mutante in transienten Transfektionsexperimenten, sollten diese Mutation bzw. die Kombination von Mutationen auch zur Herstellung der rekombinanten EB-Viren verwendet werden. Die Herstellung der Plasmide zur Rekombination ist in Abb. 19 schematisch dargestellt. Ausgangspunkt für die homologe Rekombination in *E.coli* waren die Plasmide pCR-II-TOPO-BZLF-1 γ^* (mutiert in HI γ) und pCR-II-TOPO-BZLF-1 O* (Vierfach mutiert) (Kapitel 3.1.3). Diese enthielten den mutierten BZLF-1-Promotor flankiert von beidseitig je 1000 Bp wt-EBV-Sequenz. Für die Selektion der rekombinanten Viren in Bakterien wurde eine Tetracyclin-Resistenz-Kassette aus dem Plasmid pCP16 eingebracht, welche von FRT-DNA-Motiven flankiert ist. Diese Motive bewirken in Hefe den Wechsel zwischen den *mating types* α und α . In *E. coli* kann das System dazu genutzt werden, um über die transiente Expression der dafür verantwortlichen Flp-Rekombinase die Motiv-spezifische Rekombination zwischen den FRT-Bereichen zu initiieren. Dadurch kann der zwischen den FRT-Motiven liegende DNA-Abschnitt zirkularisiert und aus der Ursprungssequenz nach gelungener Rekombination und Selektion wieder entfernt werden (Cherepanov und Wackernagel, 1995).

Mit Hilfe der Restriktionsendonukleasen *Sma* I und *Hind* III wurde die Tetracyclin-Resistenz-Kassette ausgeschnitten und durch Klenowbehandlung die überhängenden Enden aufgefüllt. Das DNA-Fragment wurde in die mit dem Restriktionsenzym *Age* I linearisierten Vektoren pCR-II-TOPO-BZLF-1 γ^* und pCR-II-TOPO-BZLF-1O* *blunt-end*, direkt neben die mutierten Promotoren, einkloniert (Abb. 19). Dadurch war sichergestellt, daß das Resistenzgen später gemeinsam mit der mutierten DNA-Sequenz in das BAC 2089 einrekombinierte. Die resultierenden Plasmide wurden mit pCR-II-TOPO-BZLF-1 γ^* / tc und pCR-II-TOPO-BZLF-1 O* / tc bezeichnet.

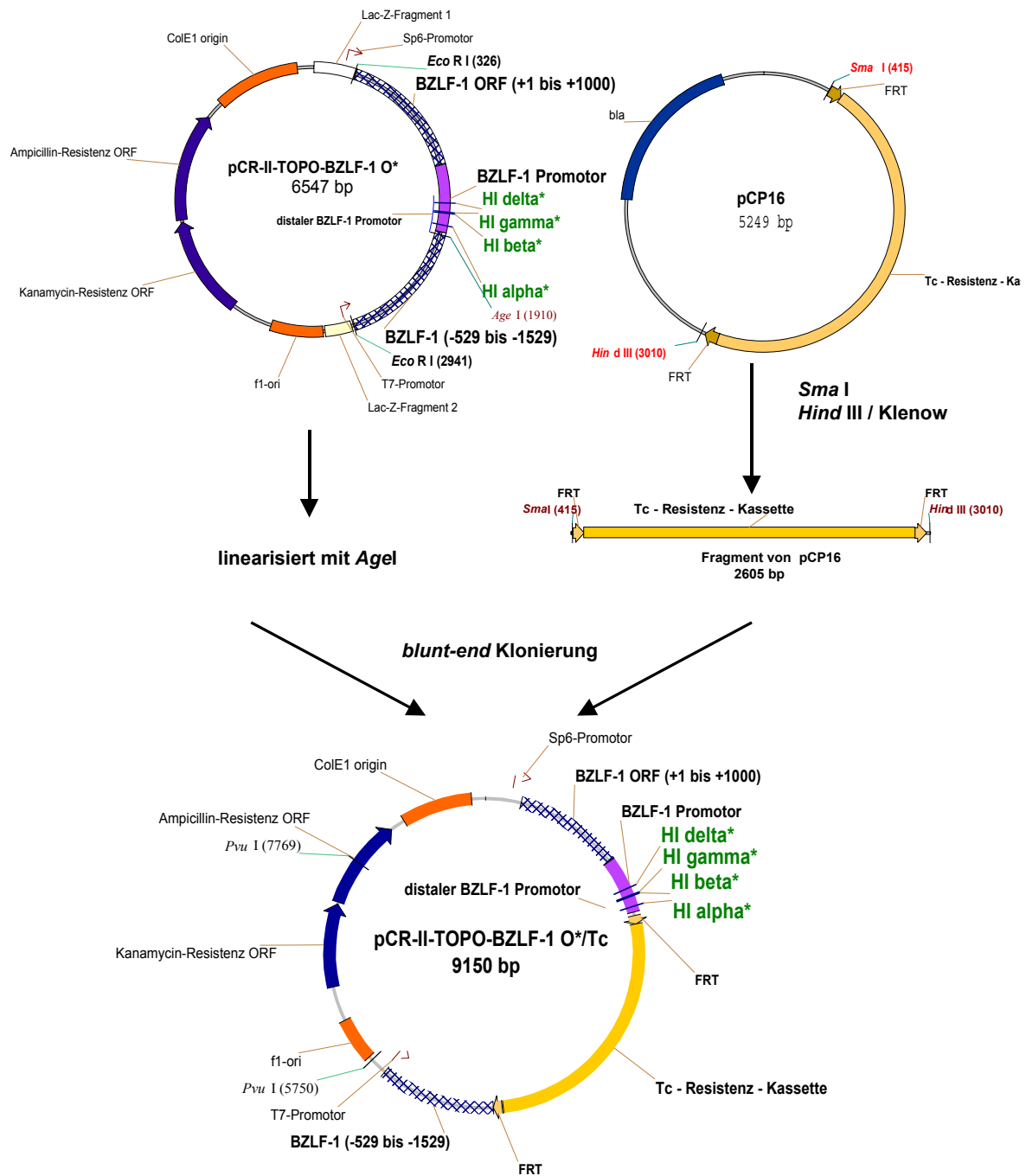


Abb. 19 *Klonierung der Vektoren für die homologe Rekombination in E.coli am Beispiel der Vierfach Mutante.*

Aus dem Plasmid pCP16 wurde mit Hilfe der Restriktionsendonukleasen *Sma* I und *Hind* III die Tetracyclin-Resistenz-Kassette ausgeschnitten und überhängende Enden mit Klenow-Polymerase aufgefüllt. Das DNA-Fragment wurde in den mit *Age* I linearisierten Vektor pCR-II-TOPO-BZLF-1 O*, der den mutierten BZLF-1-Promotor und beidseitig flankierende wt-EBV-Sequenz trägt, eingesetzt. Analog wurde das Konstrukt pCR-II-TOPO-BZLF-1 γ^* hergestellt.

Homologe Rekombination in *E.coli*

Die entsprechenden pCR-II-TOPO-BZLF-1-Konstrukte wurden mit *Pvu* I gespalten, so daß jeweils ein lineares Fragment von 7100 Bp Länge erhalten wurde, welches den mutierten Promotor sowie die flankierenden Sequenzen zur Rekombination enthielten. Diese DNA-Fragmente wurden über die Hitzeschock-Methode in *E. coli* BJ5183-2089 transformiert. In diesem *recA*⁺ Bakterienstamm fand die homologe Rekombination über die flankierenden Sequenzen statt (siehe Abb. 20).

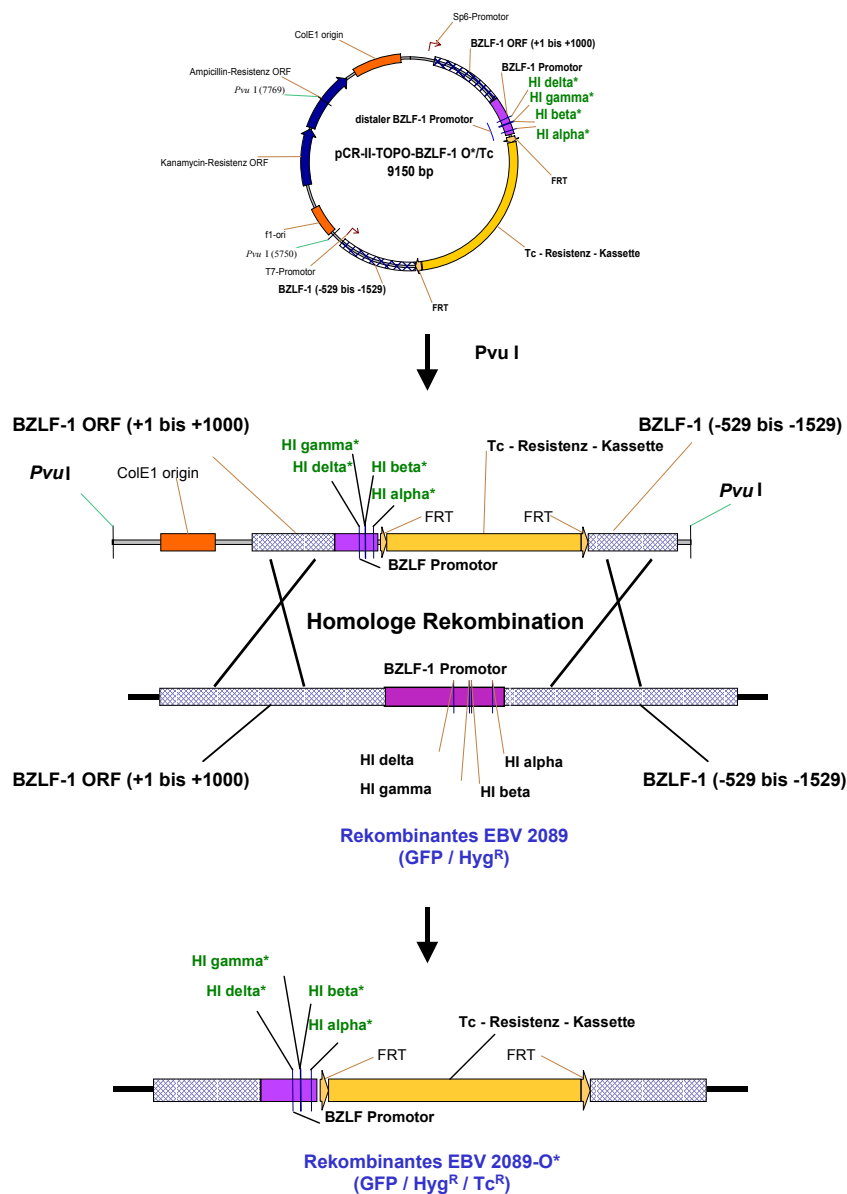


Abb. 20 Schematische Darstellung der homologen Rekombination in BJ5183. Beschreibung siehe Text.

Die Anzucht von BAC-haltigen *E. coli*-Klonen erfolgte stets durch Kultivierung auf Platten, da sich in Flüssigkultur sehr schnell Rekombinationsmutanten etablieren, welche Deletionen vor allem in Wiederholungssequenzen des *Bam*W-Fragments von EBV aufwiesen. Die analytische Präparation von BACs erfolgte nach einem modifizierten Verfahren der alkalischen Lyse (Kapitel 2.5.1.1). Nach Selektion rekombinanter Klone über *Bam*HI-Verdau wurden die BAC-DNA-positiven Klone über einen CsCl-Gradienten (Kapitel 2.5.1.4) präpariert. Da sehr große Plasmide in BJ5183-Zellen sehr instabil sind, wurden von intakten rekombinanten BACs CsCl-DNA in den rekombinations-inkompetenten *E. coli*-Stamm DH10B durch Elektroporation eingebracht und Chloramphenicol-Tetracyclin-resistente Klone erneut auf Vollständigkeit der rekombinanten 2089-BACs mittels Restriktionsverdau (Abb. 21) getestet. Da die Tetracyclin-Resistenz in das *Bam*HI g-Fragment (80 Bp) einkloniert wurde, war im *Bam*HI-Restriktionsmuster rekombinanter Klone eine zusätzliche Bande bei ca. 2700Bp gegenüber der wt-EBV-DNA zu sehen.

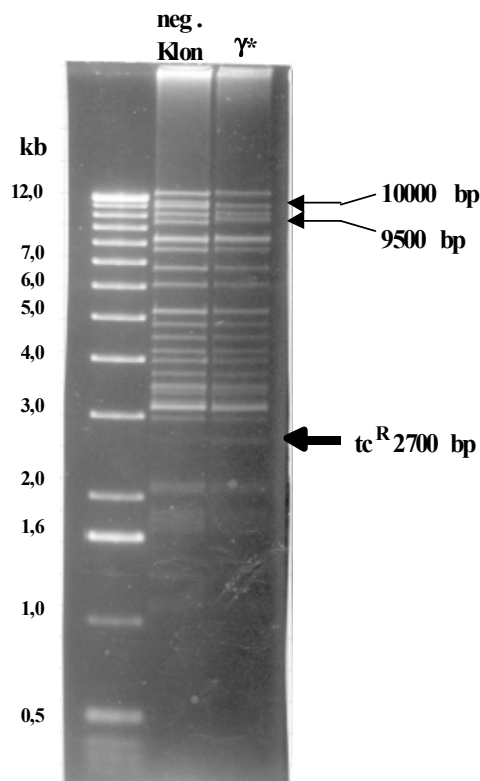


Abb. 21 *Bam*HI-Restriktionsmuster rekombinanter 2089-*tc*^R-DNA.

Zwei 2089-*tc*^R- γ^* -Klone wurden nach *Bam*HI-Spaltung elektrophoretisch aufgetrennt. Das in der wt-DNA 80 Bp lange *Bam*HI-g-Fragment läuft aufgrund der Insertion der Tetracyclin-Resistenz bei ca. 2700 Bp (dicker Pfeil). Der neg. Klon zeigt bei ca. 11000 Bp eine Doppelbande und bei ca. 9500 Bp eine zusätzliche Bande. Positive Klone wurden durch Vergleich mit vorhandenen wt 2089-*Bam* HI-Restriktionsmustern detektiert.

Um größere Mengen dieser BACs zu präparieren wurden diese in einem 5 l Fermenter gezogen. Die Bakterien wurden bei einer OD₆₀₀ von ca. 2 durch Zentrifugation geerntet, die DNA über einen CsCl-Gradienten gereinigt und in 100 µl TE-Puffer aufgenommen. Die Endkonzentration der Lösungen betrug 1-2 µg/µl. Die so gewonnene DNA der rekombinanten BAC-Klone 2098-γ* und 2098-O* konnte zur Virusvermehrung in 293 Zellen verwendet werden.

Virusvermehrung in 293-Zellen

Mit Hilfe von Lipofektamin (Gibco) wurden 293-Zellen mit den BAC-DNAs 2089, 2098-γ* bzw. 2098-O* transfiziert und anschließend positive Klone über Hygromycin selektioniert. Die auf dem BAC-2089 codierte Hygromycin-Resistenz stellte sicher, daß nur transfizierte Zellen unter diesen Bedingungen überleben konnten. Die EBV-spezifischen DNA-Elemente OriP und das EBNA-1-Genprodukt erlaubten weiterhin eine Zellzyklus-synchrone Replikation des Episoms sowie dessen Weitergabe an die Tochterzellen. Ein spontaner Übergang des Virus in den lytischen Zyklus und die Produktion von Viruspartikeln ist in 293-Zellen jedoch bisher nicht beschrieben worden. 3 Wochen nach Transfektion hatten sich die ersten Klone aus Einzelzellen gebildet, von denen 80 % im Fluoreszenz-Mikroskop EGFP-positiv waren (Abb. 22). Diese wurden mit sterilen 200 µl-Pipettenspitzen in wenig RPMI resuspendiert und in 6-Loch-Platten überführt. Nach weiteren 2 Wochen wurden die Zellen in 176 cm²-Zellkulturschalen mit 30 ml RPMI_{Hyg} ausgesät und bis zur Konfluenz wachsen gelassen.

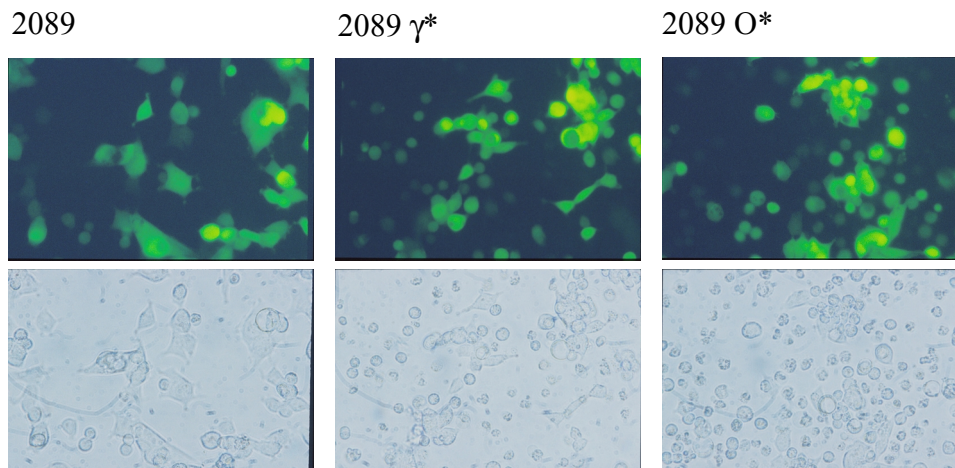


Abb. 22 **Rekombinante EB-Viren in 293-Zellen**

Oben: Fluoreszenzaufnahme der EGFP-positiven 293-Zelllinien, die das rekombinante EBV-Episom 2089 (wt-EBV), 2089- γ^ oder 2089-O* tragen.*

Unten: Phasenkontrastaufnahme der selben Zellen.

Die Zellen wurden für die Induktion der Virusproduktion weiterkultiviert. Ein Teil wurde zur dauerhaften Lagerung in flüssigem Stickstoff weggefroren.

3.2.2 Erste Untersuchungen zur Replikationskompetenz der rekombinanten EBV-Varianten.

Die Mutation der HI-Motive verhindert die Induktion der lytischen Replikation.

Nach Hygromycinselektion positiver 293-Klone sollte die rekombinanten EB-Viren auf ihre Funktion hin untersucht werden. Dabei sollte zunächst untersucht werden, ob es möglich war, in den 293-Zellen, die das rekombinante Genom von EBV enthielten, die lytische Kaskade auszulösen. Die Induktion erfolgte durch Transfektion der Zellen mit dem Expressionsplasmid für das virale Genprodukt Zta (pBZLF-1). Falls der lytische Lebenszyklus von EBV durchlaufen würde, sollte das späte Protein VCA mittels Immunfluoreszenz nachweisbar sein. Es zeigte sich, daß bei keiner der HI-Mutanten das späte Strukturprotein nachweisbar war. Daraus war abzuleiten, daß es zu keinem vollständigen Übergang von der Latenz zur lytischen Replikation gekommen war. Somit konnten auch keine infektiösen Virionen gebildet werden. Erste Infektionen von Raji-Zellen mit Virusüberstand aus den transfizierten 293-Zellen waren ebenfalls negativ. Weitere

Ergebnisse

Untersuchungen müssen zeigen, ob die Mutationen in den HI-Motiven dafür verantwortlich sind, daß der Übergang des Virus in den lytischen Lebenszyklus verhindert wird.

4 Diskussion

4.1 Die Bedeutung des BZLF-1-Gens für die lytische Virusvermehrung und experimenteller Ansatz der Arbeit.

Nach einer Epstein-Barr-Virus-Infektion persistiert das Virus lebenslang im Organismus. In nicht permissiven Zellen wird die lytische Virusvermehrung auf verschiedenen Wegen und Ebenen kontrolliert. Das virale Gen BZLF-1 spielt dabei eine zentrale Rolle, da sein Genprodukt Zta in der Lage ist, in B-Lymphozyten die Latenz des Virus zu beenden und die lytische Replikation einzuleiten (Grogan *et al.*, 1984; Countryman *et al.*, 1987). Aufgrund der Schlüsselstellung des BZLF-1-Gens wird dessen Aktivität während der Latenz des Virus auf allen Ebenen der Genexpression stark kontrolliert. In Vorarbeiten wurde von unserer Arbeitsgruppe eine posttranskriptionelle Regulation des BZLF-1-Gens gezeigt (Prang *et al.*, 1995). Durch eine *Antisense*-vermittelte Komplexierung der ungespleißten RNA von BZLF-1 mit einem Intron von EBNA-1 wird die Expression von Zta und die nachfolgende Kaskade von Genen des lytischen Zyklus verhindert. Auf posttranslationaler Ebene wurde eine Regulation durch Modifikationen oder durch heterologe Wechselwirkungen mit zellulären Faktoren beschrieben (Sista *et al.*, 1993; Gutsch *et al.*, 1993), (Elshiekh *et al.*, 1994).

Die Regulation auf Transkriptionsebene wird als wichtigster Schritt angesehen. Diese erfolgt sowohl durch aktive Repression während der Latenz (Prang *et al.*, 1995) als auch durch Transaktivierung während der lytischen Replikation. Repression erfolgt durch negativ regulatorische Sequenzen hauptsächlich im distalen Promotorbereich von BZLF-1. So wurden dort zwei Bereiche ZIVA und ZIVB identifiziert (Montalvo *et al.*, 1995), über die der zelluläre Transkriptionsfaktor YY1 mehrfach an die DNA binden kann. Die von unserer Arbeitsgruppe lokalisierten HI-Motive, die in sechsfacher Kopienzahl im Promotor von BZLF-1 vorhanden sind, stellen weitere regulatorische Sequenzen dar. Versuche mit dem distalen Promotoranteil vor dem SV40-*immediate-early-enhancer*-Promotor zeigten einen negativ-regulatorischen Effekt der HI-Motive auf die Promotoraktivität (Schwarzmann *et al.*, 1994).

In weiterführenden Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurde nun untersucht, ob diese Motive aufgrund ihrer negativ-regulatorischen Eigenschaften in nicht permissiven Zellen die Latenz des Virus durch Herabregulieren der Transkription von BZLF-1 stabilisieren.

Aus diesem Grund wurden die HI-Motive mutiert und auf ihre Wirkung im natürlichen Umfeld anderer regulatorischer Elemente hin untersucht. Zu diesem Zweck wurden verschiedene Reporterplasmide mit dem gesamten Promotor von BZLF-1 mit unterschiedlichen Kombinationen von Mutationen in den HI-Motiven vor dem Luciferase-Gen hergestellt. Um den Einfluß der HI-Motive auf die Aktivität des BZLF-1-Gens auch im Kontext anderer viraler Gene, die möglicherweise auf posttranskriptioneller oder posttranslationaler Ebene mit der Expression von BZLF-1 wechselwirken zu untersuchen, wurden durch Rekombination neue Epstein-Barr-Virus-Varianten hergestellt. Mit den so generierten rekombinanten Viren sollte der Einfluß der HI-Motive auf die Kontrolle der lytischen Virusvermehrung hin untersucht werden.

4.2 Die Bedeutung der HI-Motive *in vivo* und *in vitro*

Die Basalaktivität des BZLF-1-Promotors unterscheidet sich in vivo und in vitro.

Bei Transfektionsexperimenten mit Reporterplasmiden war der BZLF-1-Promotor nahezu inaktiv und zeigte keine von der Negativkontrolle (promotorloses Plasmid) signifikant abweichende Aktivität. In der parallel zu meiner Arbeit durchgeführten Dissertation von Arnd Dankesreiter (Universität Regensburg, 2000) wurden mit den selben Reporterplasmiden *in vitro*-Transkriptionsexperimente durchgeführt. In diesem experimentellen Ansatz zeigte der BZLF-1-Promotor im Gegensatz zu den hier beschriebenen *in vivo*-Studien eine sehr hohe, dem CMV-Promotor vergleichbare Basalaktivität. Es stellte sich die Frage, wodurch dieser Unterschied zustande kam. Eine mögliche Erklärung könnte in einer unterschiedlichen Organisation der DNA im Bereich des BZLF-1-Promotors liegen.

In den letzten Jahren zeigte sich deutlich, daß eine veränderte Nukleosomenstruktur der DNA aufgrund von Acetylierung bzw. Deacetylierung der *core*-Histone einen wichtigen Regulationsmechanismus der Aktivität von Genen darstellt (Randhawa *et al.*, 1990; von Baehr *et al.*, 1999; Knowles *et al.*, 1995). So binden nach Deacetylierung die Histone H3 und H4 fester an die DNA und verhindern somit die Auflockerung der Nukleosomenstruktur. Dadurch wird eine Wechselwirkung mit dem Transkriptionskomplex erschwert oder sogar verhindert (Ziegler *et al.*, 1984). Die Deacetylase wird durch Faktoren, die nach Bindung an spezifische *silencer*-Motive mit dem Korepressor mSin3 wechselwirken, der wiederum mit

Histonacetylasen assoziiert ist, an ihren Wirkungsort gebracht (Pazin und Kadonaga, 1997; Kadosh und Struhl, 1997).

Eine aktuelle Arbeit der Arbeitsgruppe um Paul Farrell besagt, daß die geringe Aktivität des BZLF1-Promotors in der Latenz *in vivo* auf einer repressiven Chromatinstruktur beruht, die nach Induktion der Virusvermehrung, ausgelöst durch Ig-Quervernetzung und vermittelt durch ZI-Elemente, in einen transkriptions-begünstigenden Zustand übergeht. Aus der Literatur war bekannt, daß die EBV-DNA in latent infizierten Zellen in Nucleosomen organisiert vorliegt (Shaw *et al.*, 1979; Dyson und Farrell, 1985). Die Arbeitsgruppe von Paul Farrell konnte außerdem zeigen, daß auch der BZLF-1-Promotor auf Plasmiden in einer Nucleosomen-assoziierten Form der DNA vorliegt (Jenkins *et al.*, 2000).

Die *in vitro*-Transkriptionsexperimente von Arnd Dankesreiter wurden mit Kernextrakten durchgeführt. Darin waren niedermolekulare Proteinfractionen, in denen u.a. Histon-Proteine vertreten sind, unterrepräsentiert. Bei den *in vitro*-Transkriptionen lag die DNA deshalb in nicht-komplexierter Form vor (Sierra *et al.*, 1990).

Falls das zuvor beschriebene Modell zur Regulation des BZLF-1-Promotors von EBV zutrifft, wäre es vorstellbar, daß der Promotor in den *in vitro*-Transkriptionsexperimenten in aktivierter Form vorliegt und nicht durch Histone reprimiert wird.

Eine andere Erklärung für die Unterschiede zwischen den Ergebnissen der *in vitro*-Transkriptionsexperimente und der transienten Transfektionen (*in vivo*) könnte sein, daß den Kernextrakten für die *in vitro*-Transkriptionsexperimente neben den hemmenden Histon-Proteinen auch noch weitere, negativ-regulatorische Faktoren gefehlt haben, was die unerwartet hohe Promotoraktivität *in vitro* erklären würde.

Ein dritter Regulationsmechanismus, der auf CpG-abhängiger Methylierung des Promotors beruht, konnte ausgeschlossen werden, da in beiden experimentellen Ansätzen Plasmid-DNA aus Bakterien verwendet wurde, die keine entsprechende Modifikation der Fremd-DNA durchführen.

Die Wirkung der HI-Motive unterscheidet sich in vivo und in vitro.

Bei Transfektionsexperimenten mit Reporterkonstrukten, die Mutationen in einzelnen oder in Kombinationen von HI-Motiven trugen, konnte deutlich eine *silencer*-Funktion dieser Motive nachgewiesen werden. Besonders auffällig war die ausgeprägte Steigerung der Basalaktivität des BZLF-1-Promotors bei mutiertem HI γ -Motiv sowohl in der lymphoiden Zelllinie DG75 als auch in den epithelialen Zelllinien Tera9117 und H1299. Doppel- und Dreifach-Mutationen führten zu keiner zusätzlichen Steigerung der Promotoraktivität. Daraus kann man ableiten,

daß die HI-Motive nicht additiv wirken. Offensichtlich reicht die Mutation bestimmter einzelner HI-Motive, wie die des HI γ -Motivs, um ihre reprimierende Eigenschaft zu zerstören. Möglicherweise handelt es sich um einen kooperativen Effekt, der beispielsweise mit der palindromischen Anordnung der HI-Motive im Promotor zusammenhängen könnte. Durch diese spezielle Anordnung wäre die Ausbildung einer Sekundärstruktur denkbar, die die Bindung eines reprimierenden Faktors ermöglicht und / oder die Bindung eines aktivierenden Faktors verhindert.

Im originalen Promotor haben die HI-Motive *in vivo* demnach reprimierende Eigenschaften in Bezug auf dessen Basalaktivität. Dies stimmt mit den Ergebnissen mit künstlichen Minimalpromotoren (Diplomarbeit Heide Sommer, Universität Regensburg 1995) und mit den früheren Arbeiten mit distalen Promotoranteil (Schwarzmann *et al.*, 1994) überein.

Vergleicht man die Ergebnisse der Transfektionsexperimente hinsichtlich der Wirkung der HI-Motive auf die Basalaktivität mit den Ergebnissen aus den *in vitro*-Transkriptionsexperimenten von Arnd Dankesreiter, so zeigt sich, daß Mutationen in diesen Motiven in beiden Ansätzen genau entgegengesetzte Auswirkungen hatten.

Die Mutation einzelner HI-Motive führte bei *in vitro*-Transkriptionsexperimenten zu einer starken Verminderung der Aktivität des Promotors, was auf eine positiv-regulatorische Eigenschaft der HI-Motive schließen ließ. Da die HI-Motive, wie oben gezeigt, in Transfektionsexperimenten eindeutig *silencer*-Funktion zeigten, deutete dies auf eine duale Funktionsweise der HI-Motive hin, die schon in früheren Experimenten unserer Arbeitsgruppe mit künstlichen Promotorkonstrukten beobachtet werden konnte (Diplomarbeit Heide Sommer, Universität Regensburg, 1995). So scheinen sie *in vivo*, unter Bedingungen, die eine Komplexierung der DNA mit Histonen möglich macht, negativ-regulatorisch zu wirken. *In vitro* hingegen, wenn diese Struktur aufgelöst war, zeigen die Motive positiv-regulatorische Eigenschaften. Die Wirkungsweise der HI-Motive wäre folgendermaßen vorstellbar:

Liegt die DNA in einer Nukleosomenstruktur vor, so fungieren die HI-Motive als oben beschriebene *silencer*-Motive. Durch die Bindung eines Faktors, der beispielsweise für die Rekrutierung einer Deacetylase verantwortlich ist könnten sie die Nukleosomenstruktur der DNA stabilisieren, und somit die Repression des BZLF-1-Promotors bewirken. Dieser Zustand spiegelt die Latenz des Virus wieder. Von weiteren *silencer*-Motiven z.B. im LMP-1-Promotor (Sjoblom-Hallen *et al.*, 1999) konnte gezeigt werden, daß sie Deacetylasen binden,

und so das Abdissoziieren der Histone von der DNA verhindern (Sjoblom-Hallen *et al.*, 1999).

Nach Auflockerung der repressiven Nukleosomenstruktur könnte die zweite, positiv-regulatorische Funktion der HI-Motive durch das Zusammenspiel mit weiteren zellulären oder viralen Faktoren zum Tragen kommen. Diese ermöglicht dann die Expression des BZLF-1-Proteins und die damit verbunden autokrine Stimulation des Promotors und den Eintritt des Virus in die lytische Replikationsphase. Diesen Zustand spiegeln die *in vitro*-Transkriptionsexperimente von Arnd Dankesreiter wieder.

Demnach bestünden die HI-Motive aus mehreren, unterschiedlich regulatorischen Bereichen. Gestützt wird diese Hypothese auch durch Ergebnisse aus der Dissertation von Arnd Dankesreiter (Universität Regensburg, 2000). Mit einer Reihe von Mutationen konnte er am HI δ -Motiv eine 5'-*upstream*- und eine *core*-Region mit unterschiedlich regulatorischen Funktionen nachweisen. Daß sich der aktivierende Effekt in den Transfektionsexperimenten nicht zeigte, deutet darauf hin, daß die beiden Effekte durch Bindung unterschiedlicher Faktoren vermittelt werden. Aufgrund sterischer Hinderung durch die Histone bzw. die Nukleosomenstruktur könnte die Bindung eines aktivierenden Faktors verhindert werden. Dies würde sowohl mit der Hypothese der fehlenden Histonbindung und damit dem Verlust der Repression der Basalaktivität, als auch mit der Hypothese der fehlenden negativ-regulatorischen Faktoren in den Kernextrakten bei *in vitro*-Transkriptionsexperimenten übereinstimmen. Dies unterstützt die Hypothese einer dualen Funktion der HI-Motive, die sowohl von der Struktur der DNA als auch von der Verfügbarkeit von bestimmten Transkriptionsfaktoren abhängt.

Dieses Modell, sowie die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen deutlich, daß die Entscheidung über latente oder lytische Replikation des EB-Virus ein komplexer Vorgang ist, der nicht auf der Funktion eines einzelnen Promotorelements, sondern auf dem richtige Zusammenspiel vieler verschiedenartiger regulatorischer Motive und Faktoren beruht.

Die Silencer-Funktion der HI-Motive: Wechselwirkung mit anderen regulatorisch aktiven Bereichen im Promotor von BZLF-1

Bei Betrachtung der Ergebnisse der Transfektionsexperimente in den drei untersuchten Zelllinien DG75 (lymphoide Zelllinie), Tera9117 und H1299 (beide epitheliale Zelllinien) fiel auf, daß die Mutation des HI γ -Motivs jeweils den stärksten Einfluß auf die Aktivität des BZLF-1-Promotors hatte. Sequenzunterschiede in den HI-Motiven scheinen für diesen Effekt

keine Rolle zu spielen. Vergleicht man die Sequenzen der vier HI-Motive, so zeigt sich kein auffälliger Sequenzunterschied des HI γ -Motivs im Vergleich zu den anderen HI-Motiven:

HI α	ACAGATGA
HI β	ACA T ATG G
HI γ	ACAGATG G
HI δ	ACAGA G GA

Des weiteren konnte Arnd Dankesreiter in *Bandshift*-Experimenten zeigen, daß an die HI-Motive α , β und γ das selbe E-Box-Protein E2-2 bindet. Dabei handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor aus der Familie basischer *Helix-Loop-Helix*-Proteine.

Möglicherweise spielen andere regulatorische Elemente in der näheren Umgebung des HI γ -Motivs eine Rolle für seine besonders starken regulatorischen Eigenschaften. Das HI γ -Motiv schließt direkt an das HI β -Motiv an. Von diesem Motiv konnte gezeigt werden, daß es mit einer Bindestelle für den zellulären Transkriptionsfaktor YY1 weitgehend überlappt (Montalvo *et al.*, 1995). An viralen Promotoren konnte für YY1 mit einer Ausnahme bislang nur reprimierende Wirkung gezeigt werden. Möglicherweise beeinflusst die Mutation des HI γ -Motivs aufgrund der räumlichen Nähe auf bisher nicht bekannte Weise auch die Bindung von YY1 an HI β und führt so zu dem ausgeprägten Effekt der HI γ -Mutation.

Einen Hinweis auf eine Wechselwirkung der HI-bindenden Faktoren mit YY1 gaben wieder die Untersuchungen von Arnd Dankesreiter, der eine bisher unbekannte regulatorisch wirksame Sequenz im 5'-Bereich des HI δ -Motivs identifizierte. Er konnte zeigen, daß an diesen Bereich der zelluläre Transkriptionsfaktor YY1 bindet. Im Promotor von BZLF-1 waren bereits drei weitere Bindestellen für YY1 lokalisiert und eine reprimierende Wirkung dieses ubiquitären Faktors auf die Transkription, nachgewiesen worden (Montalvo *et al.*, 1995). Somit konnte davon ausgegangen werden, daß das im 5'-Bereich des HI- δ -Motivs bindende YY1 ebenfalls negativ-regulatorisch wirkt.

Durch die Mutationen waren unterschiedliche Bereiche bzw. Domänen des HI δ -Motivs betroffen. Denkbar wäre, daß durch die Mutation des 5'-Bereichs von HI δ in der Vierfach-Mutante kein Bindung von YY1 mehr möglich war, aber statt dessen nun in der unmutierten *core*-Region ein Aktivator binden konnte.

Auch auf die autokrine Aktivierung des Promotors konnte in allen untersuchten Zelllinien ein deutlicher Einfluß der HI-Motive gezeigt werden. Die HI-Motive hemmten die Aktivität des mittels BZLF-1-Protein transaktivierten Promotors in DG75-Zellen im gleichen Maße wie die

Basalaktivität. Dies ließ auf einen Zusammenhang zwischen Basalaktivität und Transaktivierbarkeit der Promotoren schließen.

Dagegen zeigte die Vierfach-Mutante in den epithelialen Zelllinien H1299 und Tera9117 keine erhöhte Aktivität im Vergleich zum unmutierten Promotor. Es ist denkbar, daß der oben erwähnte Aktivator zelltypspezifisch oder differenzierungsabhängig exprimiert wird, und daher in den epithelialen Zelllinien fehlt.

Es konnte gezeigt werden, daß die regulatorische Funktion der HI-Motive nicht unabhängig vom Kontext des Promotors von BZLF-1 wirkt, sondern daß eine Interaktion mit anderen regulatorischen Sequenzen oder daran bindenden Faktoren stattfindet. Im Umkreis der HI-Motive konnten verschiedenste Faktoren nachgewiesen werden, mit denen die HI-Motive oder an sie bindende Faktoren wechselwirken könnten. So binden die Transkriptionsfaktoren MEF2D, Sp1 und ATF/CREB, die nach Induktion eine Aktivierung am proximalen BZLF1-Promotor vermitteln, bereits im nicht-induzierten Zustand (Borras *et al.*, 1996; Liu *et al.*, 1998; Adamson *et al.*, 2000). Von Sp1 und einer Vielzahl von Vertretern der ATF / CREB-Familie ist eine direkte Wechselwirkung mit YY1 bekannt. Wie wir zeigen konnten, beinhalten zumindest die HI-Motive β und δ Bindestellen für YY1. Die Interaktion von YY1 mit Sp1 spielt eine Rolle bei der Transkriptions-Initiation (Lee *et al.*, 1993). Im *c-fos*-Promotor konnte eine Unterdrückung der aktivierend wirkenden ATF / CREB-Faktoren durch direkte Wechselwirkung mit der Repressordomäne von YY1 nachgewiesen werden (Zhou *et al.*, 1995). Diese Funktion könnte auch am BZLF1-Promotor wirksam sein. Möglicherweise übt YY1 seine Repressorfunktion durch Unterdrückung der ATF / CREB-Faktoren aus.

Dies wurde auch im unterschiedlichen Verhalten des Minimalpromotors gegenüber dem Originalpromotor deutlich. Im Minimalpromotor zeigten isolierte HI-Motiven eine kotransaktivierende Wirkung auf die Aktivierung durch Zta.

Die aktivierende Funktion der HI-Motive: Im Original-Gen (Promotor und Leserahmen) von BZLF-1 ermöglichen die HI-Motive die Expression des Z-Transaktivators.

Von großem Interesse war die Bedeutung der HI-Motive für die Regulation des BZLF-1-Gens im Kontext des Gesamtgenoms von EBV. Zu diesem Zweck wurden rekombinante EB-Viren mit Mutationen in den HI-Motiven hergestellt. Transfektionsexperimente mit Plasmiden, die das Original-Gen (Promotor und BZLF-1-Leserahmen) trugen, zeigten überraschenderweise, daß im Gegensatz zu den zuvor verwendeten Plasmiden mit Luciferase als Reporter die HI-

Motive die Expression des BZLF-1-Proteins erst ermöglichten. Eine Mutation von HI-Motiven führte zu einer starken Abnahme der Aktivität des Promotors. Bei mutiertem HI γ -Motiv konnte sogar überhaupt kein Reporterprotein mehr nachgewiesen werden.

Auf welche Weise die Mutation der HI-Motive im Promotor von BZLF-1 auf die Expression des pCMVZ'-Plasmids wirken kann, ist bisher nicht bekannt.

Unklar war, auf welcher Ebene der Genexpression, Transkriptions- oder Translationsebene, der Block lag. Ergebnisse der *in vitro*-Transkriptionsexperimente von Arnd Dankesreiter zeigten bei mutierten HI-Motiven im BZLF-1-Promotor eindeutig, daß die Aktivität des Promotors stark herabgesetzt war, und folglich deutlich weniger mRNA des Reporters synthetisiert wurde.

Es gab mehrere Hypothesen, auf welche Art und Weise die Mutation der HI-Motive die Expression des BZLF-1-Proteins beeinflussen könnten.

Eine Hypothese ergab sich aus der Anordnung der HI-Motive im BZLF-1-Promotor. Aufgrund der palindromischen Anordnung wäre es möglich, daß ihre Wirkung durch eine Veränderung der DNA-Struktur vermittelt würde. Dies könnte allerdings nur im Kontext des Original-BZLF-1-Leserahmens zur Wirkung kommen. In Abb. 23 ist das hypothetische Modell einer solche strukturvermittelten Wirkung der HI-Motive dargestellt. Die palindromische Anordnung der HI-Motive könnte eine Schleifenbildung der DNA ermöglichen. Dadurch könnte ein weiter *upstream* gelegenes, positiv-regulatorisches Motiv (Y) in den 5'-untranslatierten Bereich des BZLF-1-ORF gebracht werden. Über den dort direkt oder indirekt wechselwirkenden Faktor X würde die Transkription der BZLF-1 mRNA aktiviert. Welche Bedeutung den einzelnen HI-Motiven bei dieser Strukturgebung zukäme, ist unklar. Die Ergebnisse der Transfektionsexperimente zeigten eindeutig, daß die einzelnen HI-Motive eine unterschiedlich wichtige Rolle bei der Regulation spielen. Sie deuten darauf hin, daß dem HI γ -Motiv eine dominante Rolle innerhalb der HI-Motive zukommt. Diese Wirkungsweise der HI-Motive wäre spezifisch für das BZLF-1-Gen und könnte in den Luciferasereportern durch den unterschiedlichen 5'-untranslatierten Bereich nicht zur Geltung kommen.

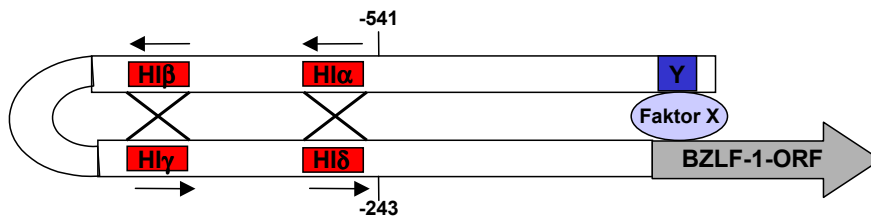


Abb. 23 *Hypothetisches Modell der strukturvermittelten Wirkung der HI-Motive im BZLF-1-Gen.*

Zahlen = Positionsangaben bezogen auf den Transkriptionsstart +1;

HIα-δ = HI-Motive im distalen Promotoranteil von BZLF-1;

Faktor X = Hypothetischer Faktor zur Aktivierung der BZLF-1-Expression in vivo;

Y = Hypothetisches regulatorisches Motiv, das durch die Strukturgebung der HI-Motive in die Umgebung des 5'-nichttranslatierten Bereichs des BZLF-1-ORF gebracht wird.;

Eine weitere Hypothese geht von einer unkorrekten Positionierung der RNA-Polymerase nach Mutation der HI-Motive aus. In deren Folge wird der Transkriptionsstart verschoben, was eine veränderten *Leader*-Sequenz zur Folge hat. Dies wiederum könnte zu einem *frame shift* bei der Translation führen, was ein nichtfunktionelles Protein zur Folge hätte. Aus einem Vortrag am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Regensburg (Hengst Ludger, November 1999) war bekannt, daß dies eine mögliche Wirkungsweise regulatorischer Sequenzmotive ist.

Primer-Extension-Experimente zeigten, daß die entstandenen DNA-Produkte der unmutierten, wie auch der mutierten Promotoren in der Länge der DNA-Fragmente identisch waren. Damit konnte ausgeschlossen werden, daß die Mutation der HI-Motive zu einer Verschiebung des Transkriptionsstarts führt und somit durch Verwendung des alternativen Startcodons (AUG) der Translation kein intaktes Zta-Protein generiert wird.

Der experimentelle Ansatz des *Primer-Extension*-Assays ermöglichte auch eine Beurteilung, ob die HI-Motive Einfluß auf die Menge oder die Stabilität der synthetisierten mRNA nehmen würden. Bei gleichen Mengen eingesetzter mRNA war die Intensität der Banden der DNA-Produkte mit oder ohne Mutationen in den HI-Motiven nahezu gleich. Daraus wurde geschlossen, daß bei allen Ansätzen die gleiche Menge an mRNA synthetisiert wurde. Weiterhin konnte aufgrund der experimentellen Vorgehensweise davon ausgegangen werden, daß sich die entstandenen mRNAs in ihrer Stabilität nicht unterschieden. Somit konnte angenommen werden, daß die beobachtete Regulation nicht auf Ebene der Transkription lag.

Da nach Mutation des HI γ -Motivs keine Expression des BZLF-1-Proteins mehr zu beobachten war, die Menge der zuvor synthetisierten mRNA jedoch vergleichbar mit der des unmutierten Promotors war, liegt die Vermutung nahe, daß die Regulation auf posttranskriptionaler oder translationaler Ebene liegt. Der Mechanismus ist jedoch noch völlig unklar.

4.3 Rekombinante Epstein-Barr-Viren: Die Wirkungsweise der HI-Motive im Kontext des Gesamtgenoms von EBV.

Um die Bedeutung der HI-Motive für die lytische Vermehrung und die Latenz des EBV zu untersuchen, wurden in Zusammenarbeit mit dem Labor von H.-J. Delecluse in München (GSF) rekombinante EB-Viren hergestellt. Weder eine Überinfektion von Rajizellen mit Kulturüberstand aus Zelllinien, die mit dem rekombinanten Virus infiziert waren, noch immunhistochemische Untersuchungen der latent infizierten 293-Zelllinie nach Stimulation der Virusvermehrung brachten Hinweise auf eine Einleitung des lytischen Zyklus und eine Produktion von Nachkommenviren.

Eine mögliche Erklärung für diese Ergebnisse war die Tatsache, daß bei der Klonierung der Tetracyclin-Resistenz in das Genom von EBV der BRLF-1 Leserahmen zerstört worden war. Dies war unvermeidbar, da der Leserahmen von BRLF-1 mit dem Promotor von BZLF-1 überlappt. Auch eine Koexpression beider Transaktivatoren erbrachte jedoch keinerlei lytische Replikation. Daher war auszuschließen, daß das Fehlen des R-Transaktivators Ursache der Replikationsunfähigkeit der Viren war. Somit konnte davon ausgegangen werden, daß die Mutationen in den HI-Motiven eine Transaktivierung über Zta, und somit den Übergang in den reproduktiven Zyklus verhindern. Diese Ergebnisse stimmen mit den vorher beschriebenen Ergebnissen der Transfektionen mit dem Originalgen von BZLF1 überein. Auch dort war nach Mutation des HI γ Motivs im Western-Blot keinerlei Z-Protein mehr nachweisbar.

Zusammenfassung

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß die Funktion der HI-Motive im Promotor von BZLF-1 stark von der Umgebung, in der sich diese Motive befinden abhängt. Im Kontext des Original-BZLF-1-Gens wirken sie deutlich positiv-regulatorisch auf die Expression von Zta und ermöglichen somit in den untersuchten epithelialen Zellen den Übergang in den lytischen Zyklus. Aufgrund der in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse ergibt sich eine wichtige

Diskussion

Funktion der HI-Motive hinsichtlich der lytischen Vermehrung von EBV. Im Zusammenspiel mit anderen, noch nicht genauer erforschten Elementen im Promotor von BZLF-1 ermöglichen die HI-Motive erst die Expression von Zta und somit die Autoregulation des Gens.

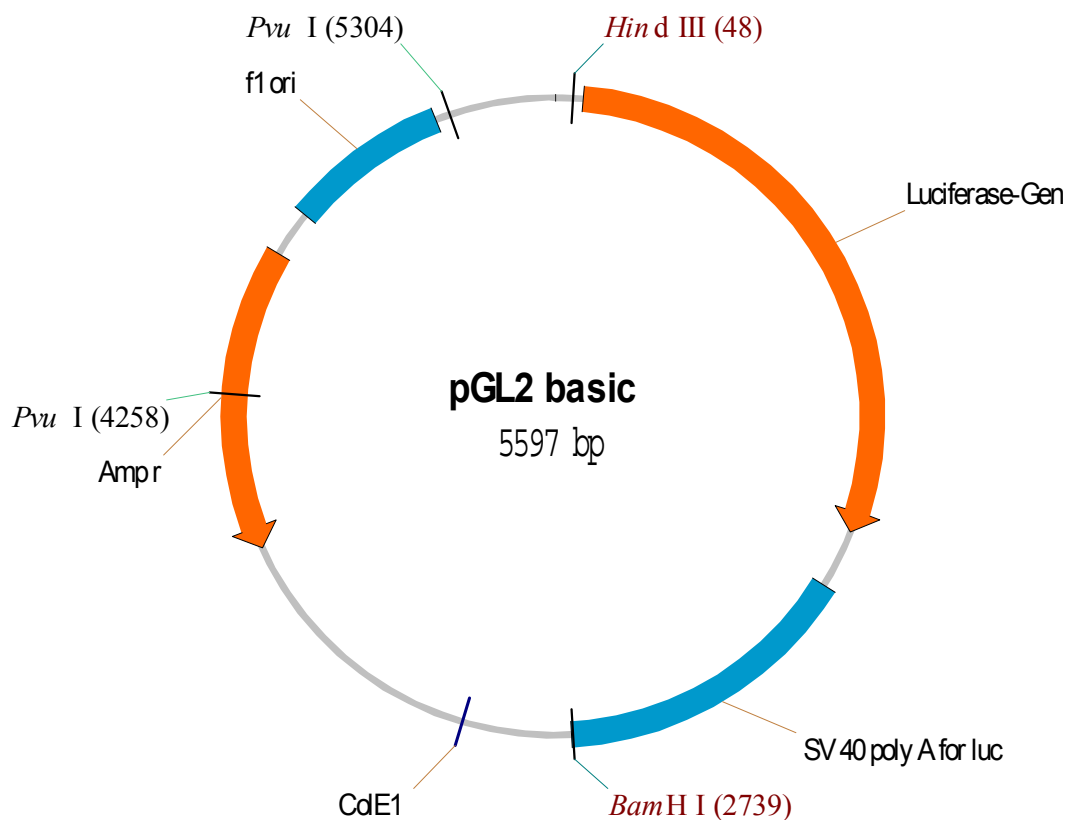
Anhang

Verwendete Ausgangs- und Expressionsplasmide

pGL2 basic (Promega)

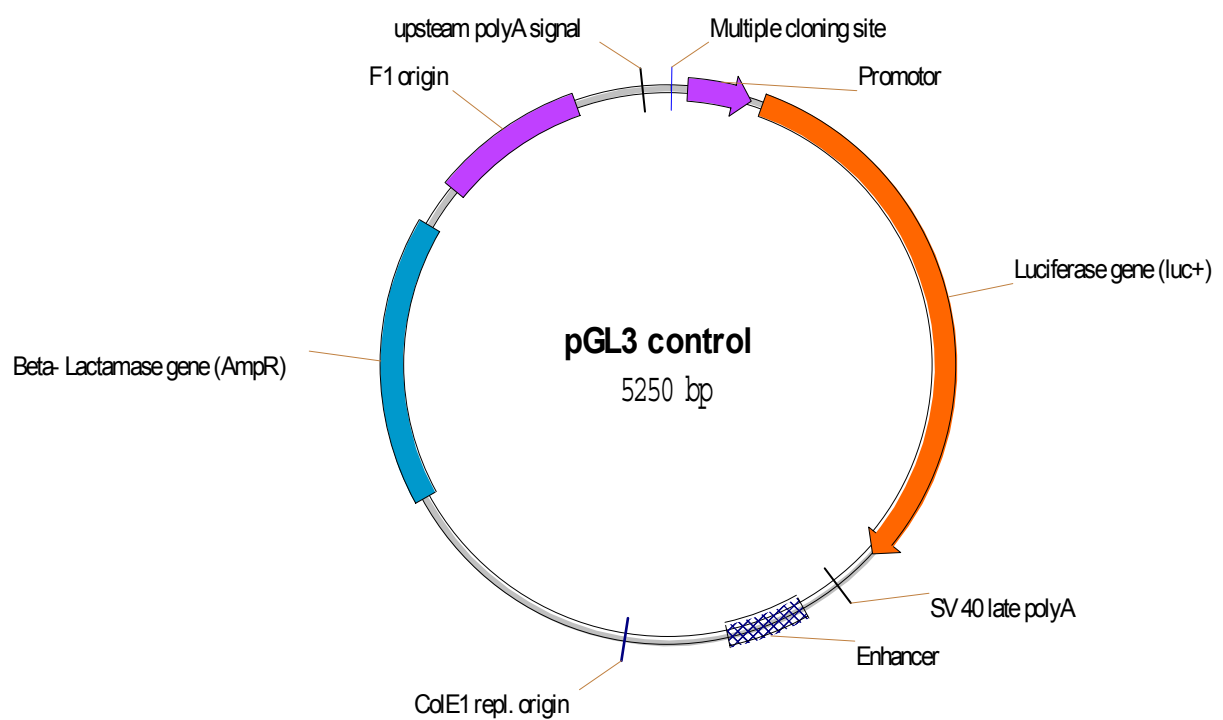
Der Vektor der Firma Promega wurde für die Klonierung des Originalpromotors von BZLF-1 und verschiedener Mutationen der darin enthaltenen HI-Motiven verwendet. Der Vektor trägt das Reportergen *firefly*-Luciferase, das jedoch aufgrund des Fehlens eines entsprechenden Promotors nicht exprimiert wird. Durch Einsetzen geeigneter Promotorfragmente dient die Expression des Reportergens als Maß für die Promotoraktivität.

Bei Transfektionsexperimenten diente der Grundvektor als Negativkontrolle.



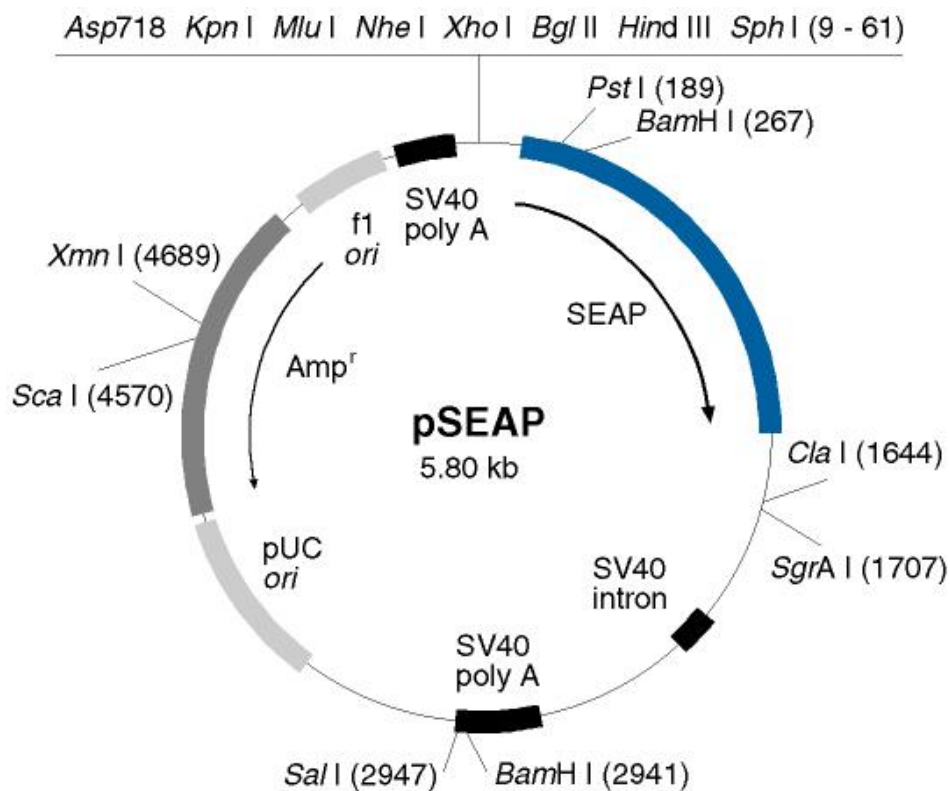
pGL3 control (Promega)

Der Vektor diente in Transfektionsexperimenten als Positivkontrolle, da durch den starken SV40-Promotor das Luciferase-Gen konstitutiv hoch exprimiert wird.



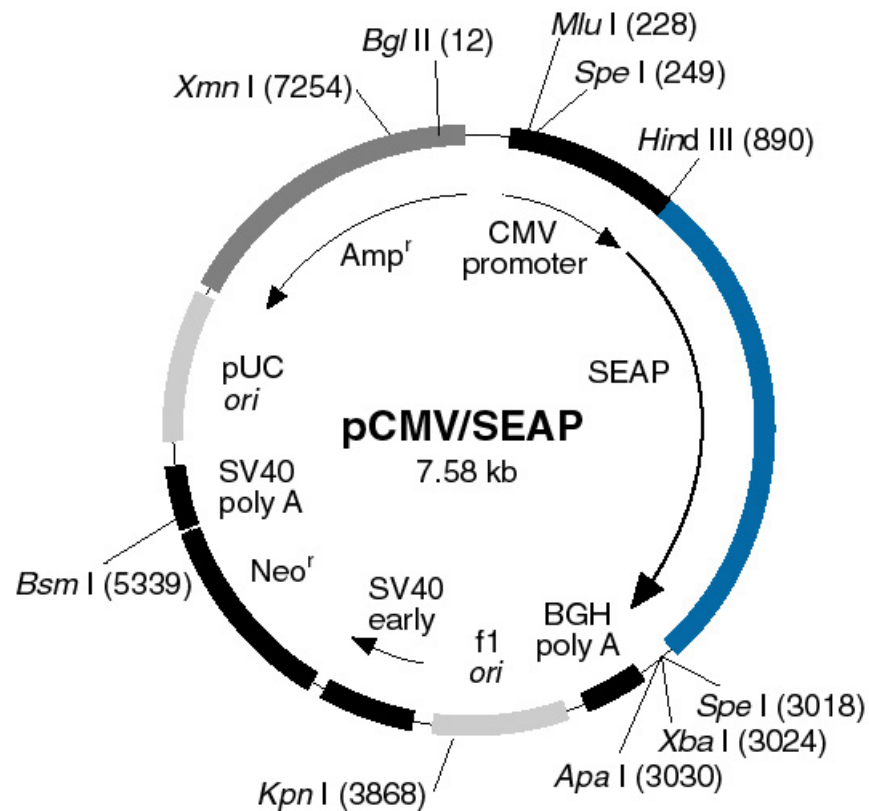
pSEAP (Tropix)

Dieser Vektor der Firma Perkin–Elmer / Tropix wurde für die Klonierung der Minimalpromotorkonstrukte verwendet (Kapitel 3.1. Diplomarbeit Heide Sommer). Er enthält das Gen für die sekretierbare plazentale alkalische Phosphatase, das jedoch wegen des Fehlens eines entsprechenden Promotors nicht exprimiert wird.



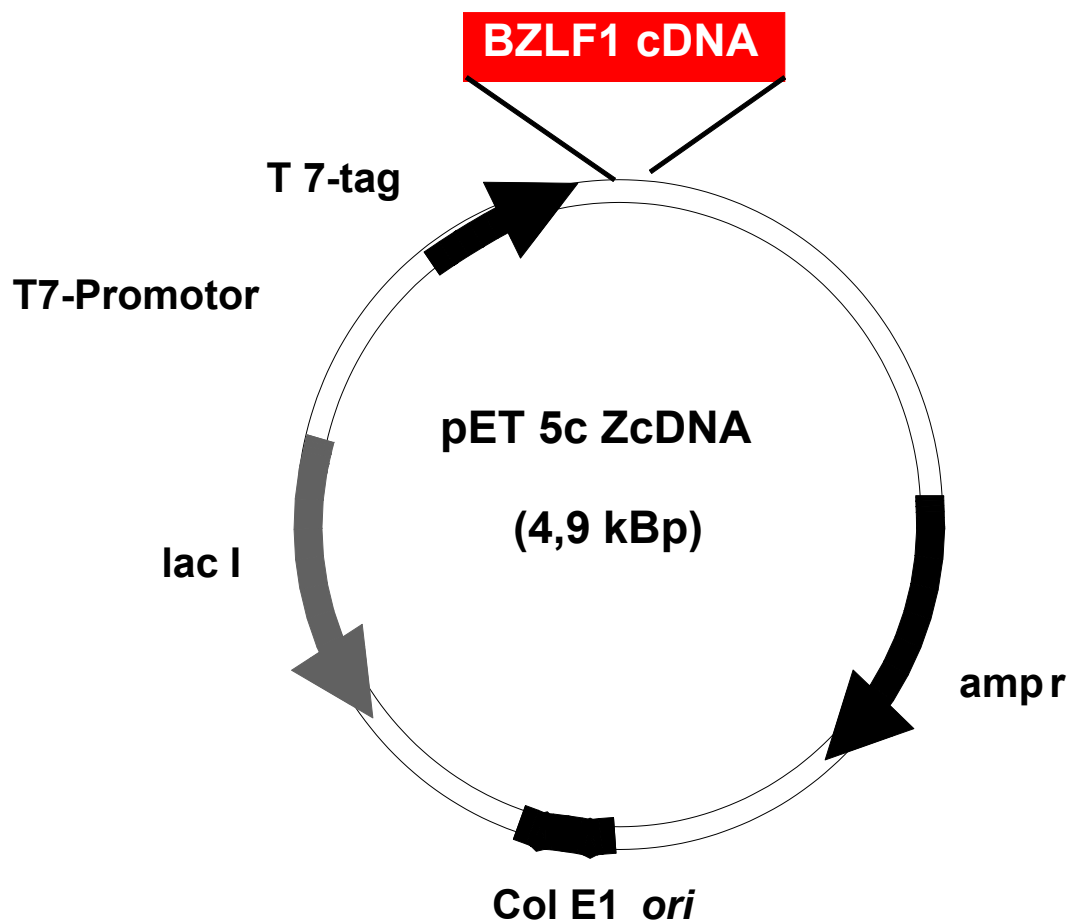
pCMV-SEAP (Tropix)

In diesem Expressionsplasmid steht die plazentale lösliche, alkalische Phosphatase unter der Kontrolle des eukaryotischen CMV-Promotors. Somit wird das Gen konstitutiv hoch exprimiert und wurde als Kontrolle der Transfektionseffizienz eingesetzt



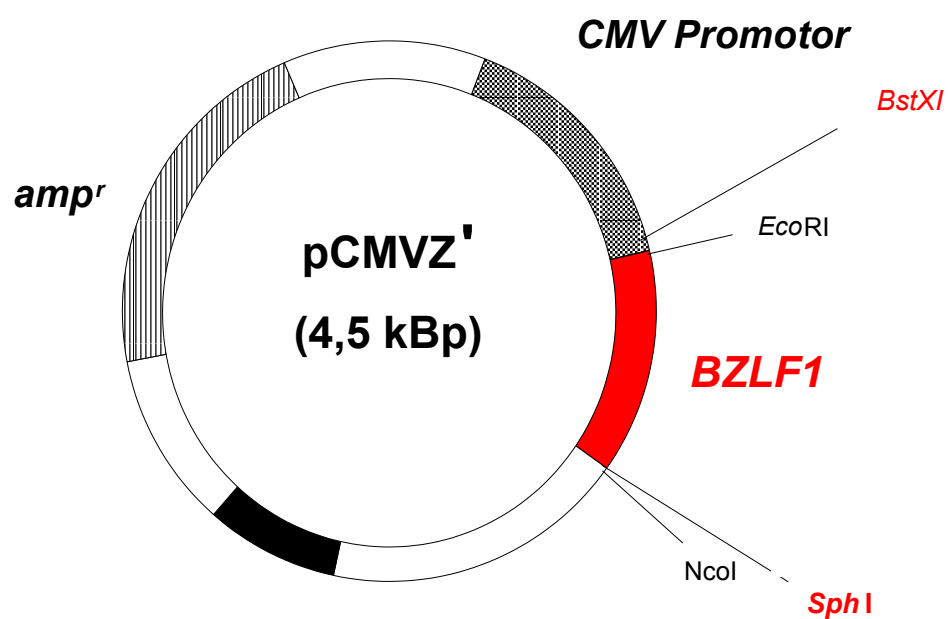
pET 5c ZcDNA (Novagen)

In das bakterielle Expressionsplasmid pET 5c (Novagen) wurde die cDNA für das Zta-Protein einkloniert (Promotion Nadja Prang). Das Plasmid enthält den T7-Promotor, die Initiationsstelle für die T7-RNA-Polymerase, eine starke Ribosomen-Bindestelle aus dem T7-Phagenkapsidprotein 10, die codierende Sequenz für die β -Lactamase (amp^r), und den Col E1-Origin (Graphische Darstellung von Nadja Prang).



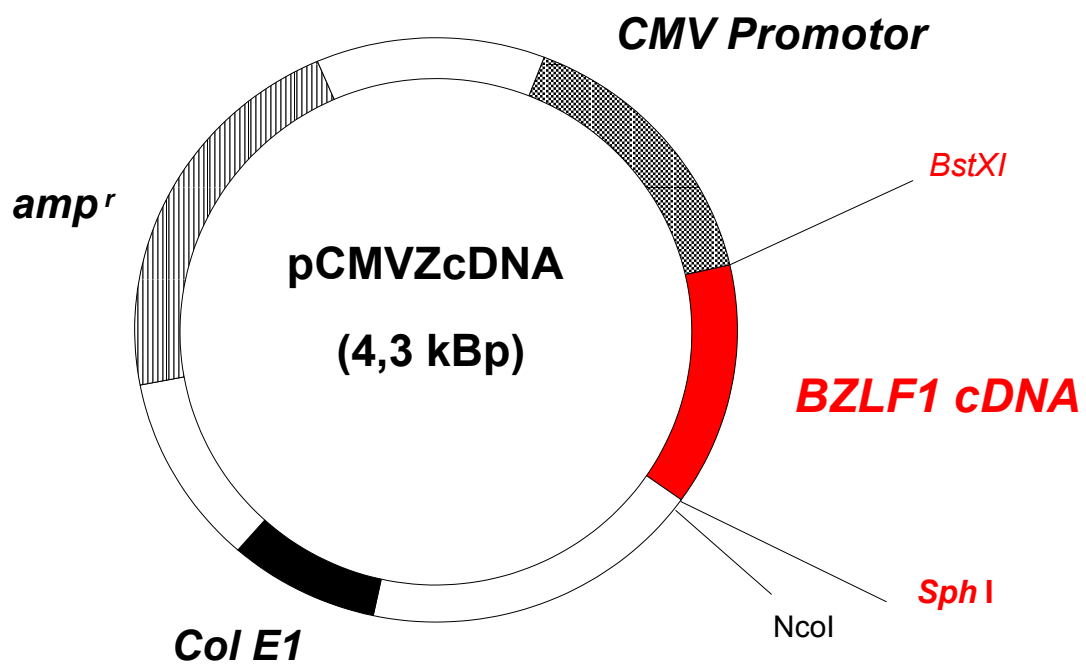
pCMV-Z'

Dieses Expressionsplasmid für das Transaktivator-Protein Zta (Promotion Nadja Prang) fand bei transienten Transfektionen in eukaryotische Zellen Verwendung. Es basiert auf dem Vektor pcDNA I Amp (Invitrogen) (Graphische Darstellung von Nadja Prang).



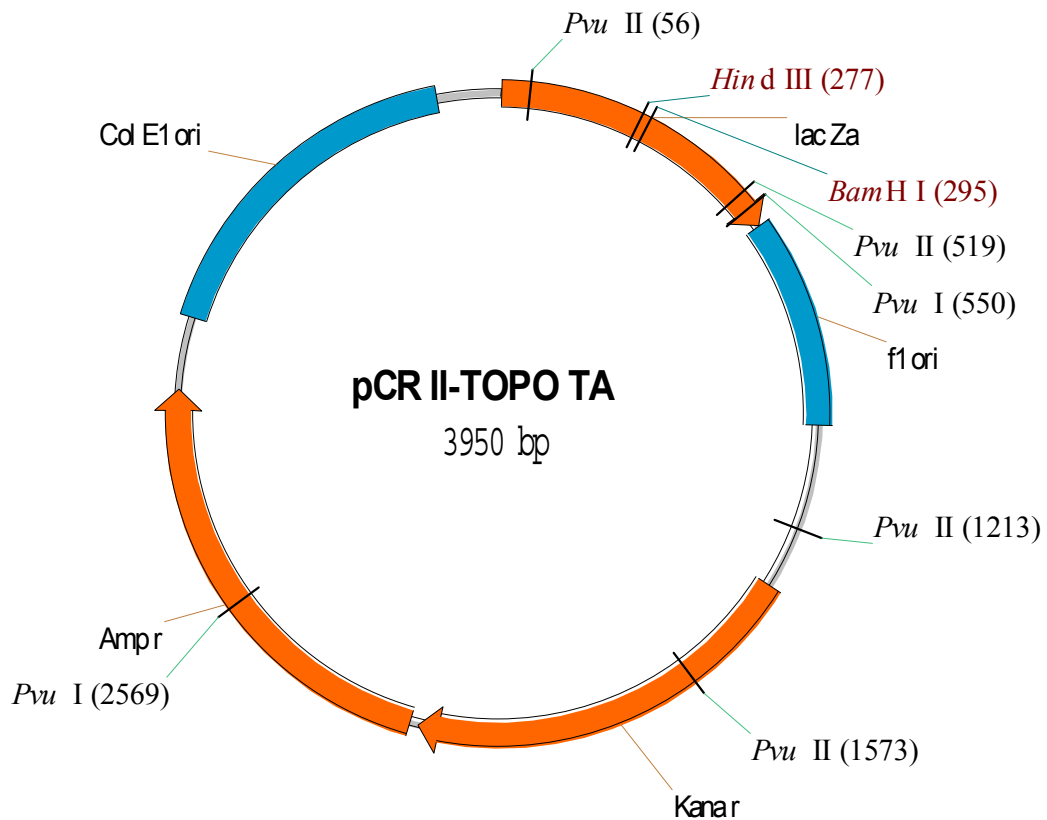
pCMVZcDNA

Dieses in der Arbeitsgruppe vorhandene Plasmid basiert auf dem Vektor pCMVZ' (Promotion Nadja Prang). Es enthält die cDNA des Zta-Proteins aus B95-8 unter der Kontrolle des T7-Promotors und diente zur *in vitro* Transkription des BZLF-1 Proteins in Reticulocytenlysaten (Promega) (Graphische Darstellung von Nadja Prang).



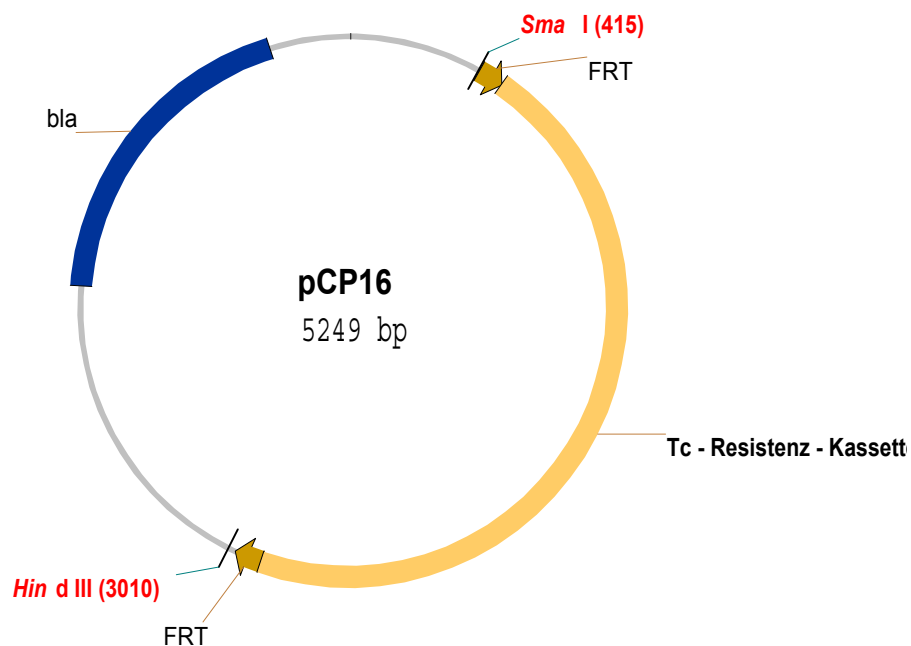
pCR II™ TOPO (Invitrogen)

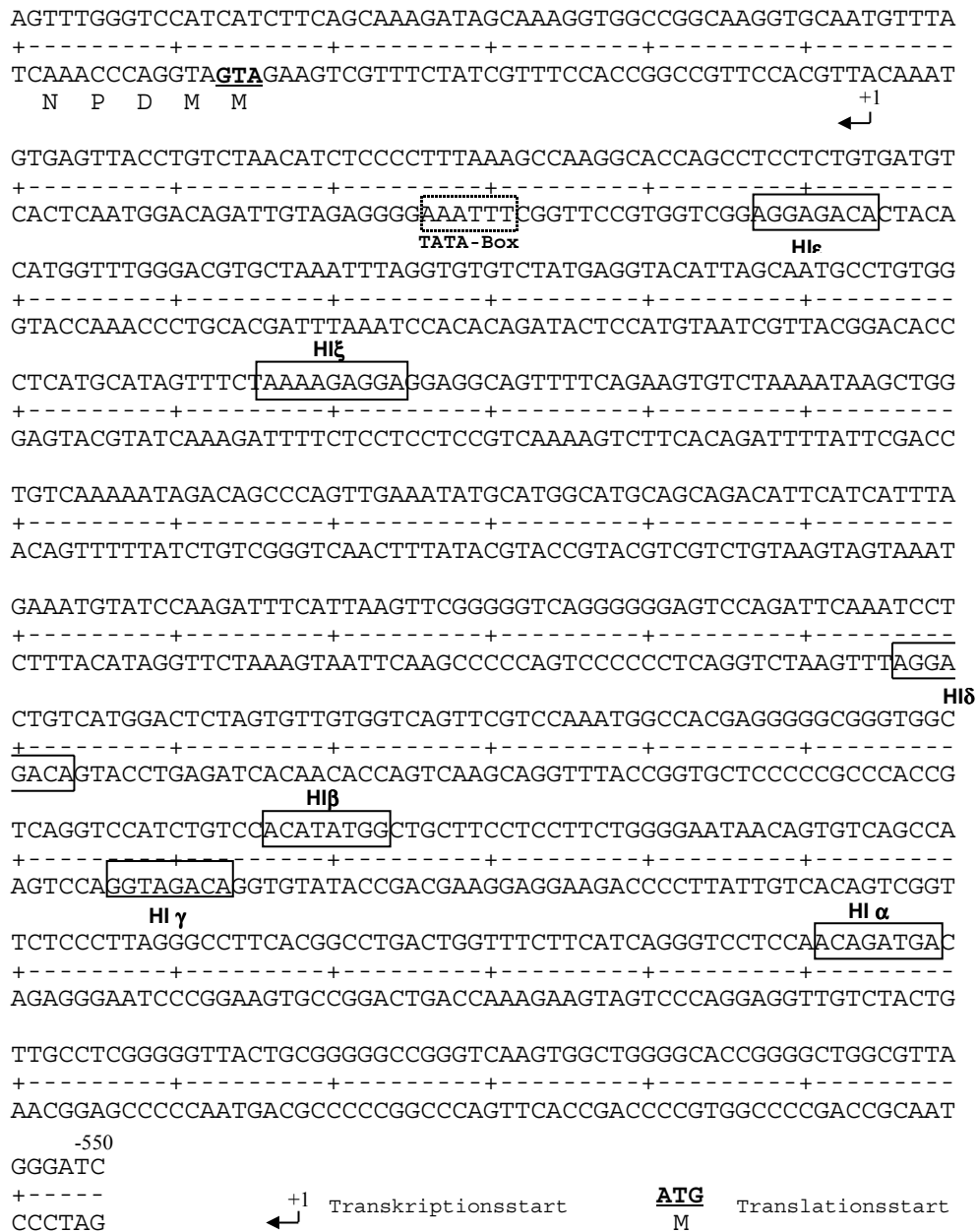
Dieser Vektor ermöglicht die effiziente Klonierung von PCR-Produkten, die über von der Taq-Polymerase angehängte 3'-Adeninreste verfügt. Der Vektor besitzt die dazu komplementären 3'-überhängende Thymidinreste. Durch die Klonierung in das lacZ-Gen ist eine Blau-Weiß-Selektion möglich. Dieser Vektor war Ausgangspunkt für die Herstellung des rekombinanten EBV.



pCP16 (Cherepanov & Wackernagel, 1995)

Dieses Plasmid wurde freundlicherweise von H.-J. Delecluse, GSF, München überlassen. Basierend auf pUC 19 enthält es eine Kassette mit dem Tetracyclinresistenzgen aus dem Transposon Tn10, flankiert von zwei FRT-Sequenzen. Diese Zielsequenzen für die flp-Rekombinase ermöglichen, die einklonierte Resistenz nach Abschluß der Selektion bei Bedarf wieder aus zu rekombinieren. Die Tc^R-FRT-Kassette kann durch Restriktionsenzymverdau mit *Hind III* und *Sma I* herausgeschnitten werden.



BZLF1-Promotorsequenz**Abb. 24 Promotorsequenz des Leserahmens BZLF1.**

Die HI-Elemente sind durchgehend gerahmt und beschriftet. Die TATA-Box wurde durch einen gestrichelten Rahmen markiert. Transkriptions- und Translationsstart sind wie in der Legende gezeigt markiert.

5 Literaturverzeichnis

- Adamson, A.L., Darr, D., Holley-Guthrie, E., Johnson, R.A., Mauser, A., Swenson, J., and Kenney, S.(2000). Epstein-Barr virus immediate-early proteins BZLF1 and BRLF1 activate the ATF2 transcription factor by increasing the levels of phosphorylated p38 and c-Jun N-terminal kinases. *J Virol* **74**, 1224-1233.
- Alfieri, C., Birkenbach, M., and Kieff, E.(1991). Early events in Epstein-Barr virus infection of human B lymphocytes. *Virology* **181**, 595-608.
- Allday, M.J., Crawford, D.H., and 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.
- Arrand, J.R. and Rymo, L.(1982). Characterization of the major Epstein-Barr virus-specific RNA in Burkitt lymphoma-derived cells. *J Virol* **41**, 376-389.
- Babcock, G.J., Decker, L.L., Freeman, R.B., and Thorley-Lawson, D.A.(1999). Epstein-barr virus-infected resting memory B cells, not proliferating lymphoblasts, accumulate in the peripheral blood of immunosuppressed patients. *J Exp Med* **190**, 567-576.
- Baer, R., Bankier, A.T., Biggin, M.D., Deininger, P.L., Farrell, P.J., Gibson, T.J., Hatfull, G., Hudson, G.S., Satchwell, G.C., Seguin, C., Tuffnell, P.S., and Barrell, B.G.(1984). DNA sequence and expression of the B95-8 Epstein-Barr virus genome. *Nature* **310**, 207-211.
- Bauer, G., Hofler, P., and zur Hausen, H.(1982). Epstein-Barr virus induction by a serum factor. I. Induction and cooperation with additional inducers. *Virology* **121**, 184-194.
- Baumann, M., Mischak, H., Dammeier, S., Kolch, W., Gires, O., Pich, D., Zeidler, R., Delecluse, H.J., and Hammerschmidt, W.(1998). Activation of the Epstein-Barr virus transcription factor BZLF1 by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced phosphorylation. *J Virol* **72**, 8105-8114.

- Bayliss, G. and Wolf, H.(1981). An Epstein-Barr virus early protein induced cell fusion. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **78**, 7162-7165.
- Bayliss, G.J. and 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.
- Becker, J., Leser, U., Marschall, M., Langford, A., Jilg, W., Gelderblom, H., Reichart, P., and Wolf, H.(1991). Expression of proteins encoded by Epstein-Barr virus trans- activator genes depends on the differentiation of epithelial cells in oral hairy leukoplakia. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **88**, 8332-8336.
- Biggin, M., Bodescot, M., Perricaudet, M., and Farrell, P.(1987). Epstein-Barr virus gene expression in P3HR1-superinfected Raji cells. *J.* **61**, 3120-3132.
- Birnboim, H.C. and Doly, J.(1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**, 1513-1523.
- Bogedain, C., Wolf, H., Modrow, S., Stuber, G., and Jilg, W.(1995). Specific cytotoxic T lymphocytes recognize the immediate-early transactivator Zta of Epstein-Barr virus. *J.Virol.* **69**, 4872-4879.
- Bonnet, M., Guinebretiere, J.M., Kremmer, E., Grunewald, V., Benhamou, E., Contesso, G., and Joab, I.(1999). Detection of Epstein-Barr virus in invasive breast cancers [see comments]. *J Natl Cancer Inst* **91**, 1376-1381.
- Borras, A.M., Strominger, J.L., and Speck, S.H.(1996). Characterization of the ZI domains in the Epstein-Barr virus BZLF1 gene promoter: role in phorbol ester induction. *J Virol* **70**, 3894-3901.
- Braun, M., Melchers, I., Peter, H.H., and Illges, H.(1998). Human B and T lymphocytes have similar amounts of CD21 mRNA, but differ in surface expression of the CD21 glycoprotein. *Int Immunol* **10**, 1197-1202.
- Buchwald, D., Goldenberg, D.L., Sullivan, J.L., and Komaroff, A.L.(1987). The "chronic, active Epstein-Barr virus infection" syndrome and primary fibromyalgia. *Arthritis Rheum.* **30**, 1132-1136.

- Buisson, M., Manet, E., Trescol Biemont, M.C., Gruffat, H., Durand, B., and 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.
- Burkitt, D.(1958). A sarcoma involving the jaws in african children. *Br.J.Surg.* **46**, 218-224.
- Burkitt, D.(1962). A children's cancer dependent on climatic factors. *Nature* **194**, 232-234.
- Callan, M.F., Tan, L., Annels, N., Ogg, G.S., Wilson, J.D., O'Callaghan, C.A., Steven, N., McMichael, A.J., and Rickinson, A.B.(1998). Direct visualization of antigen-specific CD8+ T cells during the primary immune response to Epstein-Barr virus In vivo. *J Exp Med* **187**, 1395-1402.
- Cayrol, C. and Flemington, E.K.(1996). The Epstein-Barr virus bZIP transcription factor Zta causes G0/G1 cell cycle arrest through induction of cyclin-dependent kinase inhibitors. *EMBO J* **15**, 2748-2759.
- Chang, R.S. and Chang, Y.Y.(1980). Activation of lymphocytes from Epstein-Barr virus-seronegative donors by autologous Epstein-Barr virus-transformed cells. *J Infect.Dis.* **142**, 156-162.
- Chatila, T., Ho, N., Liu, P., Liu, S., Mosialos, G., Kieff, E., and Speck, S.H.(1997). The Epstein-Barr virus-induced Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase type IV/Gr promotes a Ca(2+)-dependent switch from latency to viral replication. *J.Virol.* **71**, 6560-6567.
- Chen, H.L., Lung, M.M., Sham, J.S., Choy, D.T., Griffin, B.E., and Ng, M.H.(1992). Transcription of BamHI-A region of the EBV genome in NPC tissues and B cells. *Virology* **191**, 193-201.
- Cherepanov, P.P. and Wackernagel, W.(1995). Gene disruption in Escherichia coli: TcR and KmR cassettes with the option of FLP-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant. *Gene* **158**, 9-14.
- Chevallier-Greco, A., Manet, E., Chavrier, P., Mosnier, C., Daillie, J., and Sergeant, A.(1986). Both Epstein-Barr virus (EBV)-encoded trans-acting factors, EB1 and EB2,

- are required to activate transcription from an EBV early promoter. *EMBO J* **5**, 3243-3249.
- Clemens, M.J.(1994). Functional significance of the Epstein-Barr virus-encoded small RNAs. *Epstein-Barr Virus Report* **5**, 107-111.
- Coffey, A.J., Brooksbank, R.A., Brandau, O., Oohashi, T., Howell, G.R., Bye, J.M., Cahn, A.P., Durham, J., Heath, P., Wray, P., Pavitt, R., Wilkinson, J., Leversha, M., Huckle, E., Shaw-Smith, C.J., Dunham, A., Rhodes, S., Schuster, V., Porta, G., Yin, L., Serafini, P., Sylla, B., Zollo, M., Franco, B., and Bentley, D.R.(1998). Host response to EBV infection in X-linked lymphoproliferative disease results from mutations in an SH2-domain encoding gene [see comments]. *Nat Genet* **20**, 129-135.
- Cooper, N.R., Bradt, B.M., Rhim, J.S., and Nemerow, G.R.(1990). CR2 complement receptor. *J Invest.Dermatol.* **94**, 112S-117S.
- Countryman, J., Jenson, H., Seibl, R., Wolf, H., and Miller, G.(1987). Polymorphic proteins encoded within BZLF1 of defective and standard Epstein-Barr viruses disrupt latency. *J.Virol.* **61**, 3672-3679.
- Croce, C.M. and Nowell, P.C.(1985). Molecular basis of human B cell neoplasia. *Blood* **65**, 1-7.
- Daibata, M., Humphreys, R.E., and Sairenji, T.(1992). Phosphorylation of the Epstein-Barr virus BZLF1 immediate-early gene product ZEBRA. *Virology* **188**, 916-920.
- Deacon, E.M., Matthews, J.B., Potts, A.J., Hamburger, J., Bevan, I.S., and Young, L.S.(1991). Detection of Epstein-Barr virus antigens and DNA in major and minor salivary glands using immunocytochemistry and polymerase chain reaction: possible relationship with Sjogren's syndrome. *J.Pathol.* **163**, 351-360.
- Deacon, E.M., Pallesen, G., Niedobitek, G., Crocker, J., Brooks, L., Rickinson, A.B., and Young, L.S.(1993). Epstein-Barr virus and Hodgkin's disease: transcriptional analysis of virus latency in the malignant cells. *J.Exp.Med.* **177**, 339-349.

- Delecluse, H.J., Bartnizke, S., Hammerschmidt, W., Bullerdiek, J., and Bornkamm, G.W.(1993). Episomal and integrated copies of Epstein-Barr virus coexist in Burkitt lymphoma cell lines. *J Virol* **67**, 1292-1299.
- Delecluse, H.J., Hilsendegen, T., Pich, D., Zeidler, R., and Hammerschmidt, W.(1998). Propagation and recovery of intact, infectious Epstein-Barr virus from prokaryotic to human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 8245-8250.
- Dyson, P.J. and Farrell, P.J.(1985). Chromatin structure of Epstein-Barr virus. *J Gen Virol* **66** (Pt 9), 1931-1940.
- Elshiekh, N.A., Zhang, Q., Holley-Guthrie, E., and Kenney, S.(1994). Phosphorylation of the Epstein-Barr virus BZLF1 (Z) protein by DNA-dependent protein kinase (DNA-PK) in vitro. *Epstein-Barr virus & associated diseases, CSH, 7.-11.September, 1994* 25(Abstract)
- Epstein, M.A. and Barr, Y.M.(1964). Cultivation in vitro of human fibroblasts from Burkitt's malignant lymphoma. *Lancet* **1**, 252-253.
- Epstein, M.A. and Barr, Y.M.(1964). Virus particles in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. *Lancet* **1**, 702-703.
- Evans, A.S.(1978). Infectious mononucleosis and related syndromes. *Am.J.Med.Sci.* **276**, 325-339.
- Evans, A.S.(1982). The clinical illness promotion factor: a third ingredient. *Yale J Biol Med* **55**, 193-199.
- Facer, C.A. and Playfair, J.H.(1989). Malaria, Epstein-Barr virus, and the genesis of lymphomas. *Adv.Cancer Res* **53:33-72**, 33-72.
- Fahraeus, R., Fu, H.L., Ernberg, I., Finke, J., Rowe, M., Klein, G., Falk, K., Nilsson, E., Yadav, M., and Busson, P.(1988). Expression of Epstein-Barr virus-encoded proteins in nasopharyngeal carcinoma. *Int J Cancer* **42**, 329-338.
- Fahraeus, R., Jansson, A., Ricksten, A., Sjoblom, A., and Rymo, L.(1990). Epstein-Barr virus-encoded nuclear antigen 2 activates the viral latent membrane protein promoter

- by modulating the activity of a negative regulatory element. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **87**, 7390-7394.
- Farrell, M.J., Dobson, A.T., and Feldman, L.T.(1991). Herpes simplex virus latency-associated transcript is a stable intron. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **88**, 790-794.
- Farrell, P.J., Rowe, D.T., Rooney, C.M., and Kouzarides, T.(1989). Epstein-Barr virus BZLF1 trans-activator specifically binds to a consensus AP-1 site and is related to c-fos. *EMBO J.* **8**, 127-132.
- Fingerroth, J.D., Weis, J.J., Tedder, T.F., Strominger, J.L., Biro, P.A., and Fearon, D.T.(1984). Epstein-Barr virus receptor of human B lymphocytes is the C3d receptor CR2. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **81**, 4510-4514.
- Flemington, E. and Speck, S.(1990). Identification of phorbol ester response elements in the promoter of Epstein-Barr virus putative lytic switch gene BZLF1. *J.Virol.* **64**, 1217-1226.
- Flemington, E. and Speck, S.H.(1990b). Autoregulation of Epstein-Barr virus putative lytic switch gene BZLF1. *J.Virol.* **64**, 1227-1232.
- Flemington, E. and Speck, S.H.(1990). Epstein-Barr virus BZLF1 *trans* activator induces the promoter of a cellular cognate gene, *c-fos*. *J.Virol.* **64**, 4549-4552.
- Flemington, E. and Speck, S.H.(1990a). Evidence for coiled-coil dimer formation by an Epstein-Barr virus transactivator that lacks a heptad repeat of leucine residues. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **87**, 9459-9463.
- Flemington, E.K., Borrás, A.M., Lytle, J.P., and Speck, S.H.(1992). Characterization of the Epstein-Barr virus BZLF1 protein transactivation domain. *J.Virol.* **66**, 922-929.
- Fling, S.P. and Gregerson, D.S.(1986). Peptide and protein molecular weight determination by electrophoresis using a high-molarity tris buffer system without urea. *Anal Biochem* **155**, 83-88.
- Frade, R., Barel, M., Ehlin Henriksson, B., and Klein, G.(1985). gp140, the C3d receptor of human B lymphocytes, is also the Epstein-Barr virus receptor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **82**, 1490-1493.

- Fries, K.L., Sculley, T.B., Webster-Cyriaque, J., Rajadurai, P., Sadler, R.H., and Raab-Traub, N.(1997). Identification of a novel protein encoded by the BamHI A region of the Epstein-Barr virus. *J Virol* **71**, 2765-2771.
- Fruehling, S., Lee, S.K., Herrold, R., Frech, B., Laux, G., Kremmer, E., Grasser, F.A., and Longnecker, R.(1996). Identification of latent membrane protein 2A (LMP2A) domains essential for the LMP2A dominant-negative effect on B-lymphocyte surface immunoglobulin signal transduction. *J.Virol.* **70**, 6216-6226.
- Fruehling, S. and Longnecker, R.(1997). The immunoreceptor tyrosine-based activation motif of epstein- barr virus LMP2A is essential for blocking BCR-mediated signal transduction [In Process Citation]. *Virology* **235**, 241-251.
- Furnari, F.B., Zacny, V., Quinlivan, E.B., Kenney, S., and Pagano, J.S.(1994). RAZ, an Epstein-Barr virus transdominant repressor that modulates the viral reactivation mechanism. *J.Virol.* **68**, 1827-1836.
- Gentz, R., Rauscher, F.J., Abate, C., and Curran, T.(1989). Parallel association of Fos and Jun leucine zippers juxtaposes DNA binding domains. *Science* **243**, 1695-1699.
- Gerber, P. and Lucas, S.(1972). Epstein-Barr virus-associated antigens activated in human cells by 5-bromodeoxyuridine. *Proc Soc.Exp.Biol Med* **141**, 431-438.
- Gilligan, K., Rajadurai, P., Resnick, L., and Raab Traub, N.(1990). Epstein-Barr virus small nuclear RNAs are not expressed in permissively infected cells in AIDS-associated leukoplakia. *.Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **87**, 8790-8794.
- Giot, J.F., Mikaelian, I., Buisson, M., Manet, E., Joab, I., Nicolas, J.C., and Sergeant, A.(1991). Transcriptional interference between the EBV transcription factors EB1 and R: both DNA-binding and activation domains of EB1 are required. *Nucleic.Acids.Res.* **19**, 1251-1258.
- Given, D. and Kieff, E.(1979). DNA of Epstein-Barr virus. VI. Mapping of the internal tandem reiteration. *J Virol* **31**, 315-324.
- Gottlieb, T.M. and Jackson, S.P.(1993). The DNA-dependent protein kinase: requirement for DNA ends and association with Ku antigen. *Cell* **72**, 131-142.

- Graham, F.L., Smiley, J., Russell, W.C., and Nairn, R.(1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* **36**, 59-74.
- Grässer, F.A., Kremmer, E., Murray, P.G., Niedobitek, G., Young, L.S., Feiden, W., Delecluse, H.J., and Mueller-Lantzsch, N.(1995). The Epstein-Barr virus and its association with human diseases. *Biotest Bulletin* **5**, 201-210.
- Greenspan, J.S., Greenspan, D., Lenette, E.T., Abrams, D.I., Conant, M.A., Petersen, V., and Freese, U.K.(1985). Replication of Epstein-Barr virus within the epithelial cells of oral "hairy" leukoplakia, an AIDS associated lesion. *New Engl.* **313**, 1564-1571.
- Greifenegger, N., Jager, M., Kunz-Schughart, L.A., Wolf, H., and Schwarzmann, F.(1998). Epstein-Barr virus small RNA (EBER) genes: differential regulation during lytic viral replication. *J.Virol.* **72**, 9323-9328.
- Grierson, H. and Purtilo, D.T.(1987). Epstein-Barr virus infections in males with the X-linked lymphoproliferative syndrome. *Ann.Intern.Med.* **106**, 538-545.
- Grogan, E., Jenson, H., Countryman, J., Heston, L., Gradoville, L., and Miller, G.(1984). Transfection of a rearranged viral DNA fragment, WZhet, stably converts latent Epstein-Barr virus infection to productive infection in lymphoid cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **84**, 1332-1337.
- Gutsch, D., Holley Guthrie, E., Zhang, Q., and Kenney, S.(1993). NF-kB can physically interact with the Epstein-Barr virus Z protein and inhibit Z function. *XIII.International.Herpesvirus.Workshop, Juli.25.30.* -30
- Gutsch, D.E., Holley-Guthrie, E.A., Zhang, Q., Stein, B., Blonar, M.A., Baldwin, A.S., and 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.
- Hammerschmidt, W. and Sugden, B.(1988). Identification and characterization of oriLyt, a lytic origin of DNA replication of Epstein-Barr virus. *Cell* **55**, 427-433.
- Hammerschmidt, W. and Sugden, B.(1989). Genetic analysis of immortalizing functions of Epstein-Barr virus in human B lymphocytes. *Nature* **340**, 393-397.

- Hanahan, D.(1983). Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J Mol Biol* **166**, 557-580.
- Hanto, D.W., Sakamoto, K., Purtillo, D.T., Simmons, R.L., and Najarian, J.S.(1981). The Epstein-Barr virus in the pathogenesis of post-transplant lymphoproliferative disorders. Clinical, pathologic and virologic correlation. *Surgery* **90**, 204-213.
- Henderson, A., Ripley, S., Heller, M., and Kieff, E.(1983). Chromosome site for Epstein-Barr virus DNA in a Burkitt tumor cell line and in lymphocytes growth-transformed in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**, 1987-1991.
- Henderson, S., Rowe, M., Gregory, C., Croom Carter, D., Wang, F., Longnecker, R., Kieff, E., and Rickinson, A.(1991). Induction of bcl-2 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., and Peterson, M.G.(1994). Mediation of Epstein-Barr virus EBNA2 transactivation by recombination signal-binding protein J kappa. *Science* **265**, 92-95.
- Henle, G. and Henle, W.(1966). Studies on cell lines derived from Burkitt's lymphoma. *Trans.N Y.Acad Sci* **29**, 71-79.
- Henle, G., Henle, W., Clifford, P., Diehl, V., Kafuko, G.W., Kirya, B.G., Klein, G., Morrow, R.H., Munube, G.M., Pike, P., Tukei, P.M., and Ziegler, J.L.(1969). Antibodies to Epstein-Barr virus in Burkitt's lymphoma and control groups. *J Natl Cancer Inst* **43**, 1147-1157.
- Henle, G., Henle, W., and Diehl, V.(1968). Relation of Burkitt's tumor-associated herpes-type virus to infectious mononucleosis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **59**, 94-101.
- Herbst, H., Niedobitek, G., Kneba, M., Hummel, M., Finn, T., Anagnostopoulos, I., Bergholz, M., Krieger, G., and Stein, H.(1990). High incidence of Epstein-Barr virus genomes in Hodgkin's disease. *Am J Pathol* **137**, 13-18.

- Hildebrandt, M. and Nellen, W.(1992). Differential antisense transcription from the Dictyostelium EB4 gene locus: Implications on antisense-mediated regulation of mRNA stability. *Cell* **69**, 197-204.
- Hitt, M.M., Allday, M.J., Hara, T., Karran, L., Jones, M.D., Busson, P., Tursz, T., Ernberg, I., and Griffin, B.E.(1989). EBV gene expression in an NPC-related tumour. *EMBO J.* **8**, 2639-2651.
- Honess, R.W. and Watson, D.H.(1977). Unity and diversity in the herpesviruses. *J.Gen.Virol.* **37**, 15-37.
- Howe, J.G. and Steitz, J.A.(1986). Localization of Epstein-Barr virus-encoded small RNAs by in situ hybridization. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **83**, 9006-9010.
- Hudewentz, J., Delius, H., Freese, U.K., Zimmer, U., and Bornkamm, G.W.(1982). Two distant regions of the Epstein-Barr virus genome with sequence homologies have the same orientation and involve small tandem repeats. *EMBO J* **1**, 21-26.
- Ishihara, S., Tawa, A., Yumura Yagi, K., Murata, M., Hara, J., Yabuuchi, H., Hirai, K., and Kawa Ha, K.(1989). Clonal T-cell lymphoproliferation containing Epstein-Barr (EB) virus DNA in a patient with chronic active EB virus infection. *Jpn.J.Cancer Res.* **80**, 99-101.
- Itin, P.H.(1993). Oral hairy leukoplakia--10 years on. *Dermatology.* **187**, 159-163.
- Jarrett, R.(1998). Epstein-Barr virus and Hodgkin's Disease. *Epstein-Barr Virus Report* **5**, 77-85.
- Jenkins, P.J., Binne, U.K., and Farrell, P.J.(2000). Histone acetylation and reactivation of Epstein-Barr virus from latency. *J Virol* **74**, 710-720.
- Jiang, W.Q., Szekely, L., Wendel-Hansen, V., Ringertz, N., Klein, G., and 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.
- Kadosh, D. and Struhl, K.(1997). Repression by Ume6 involves recruitment of a complex containing Sin3 corepressor and Rpd3 histone deacetylase to target promoters. *Cell* **89**, 365-371.

- Kallin, B., Luka, J., and Klein, G.(1979). Immunochemical characterization of Epstein-Barr virus-associated early and late antigens in n-butyrate-treated P3HR-1 cells. *J Virol* **32**, 710-716.
- Karimi, L., Crawford, D.H., Speck, S., and Nicholson, L.J.(1995). Identification of an epithelial cell differentiation responsive region within the BZLF1 promoter of the Epstein-Barr virus. *J.Gen.Virol.* **76**, 759-765.
- Katz, D.A., Baumann, R.P., Sun, R., Kolman, J.L., Taylor, N., and Miller, G.(1992). Viral proteins associated with the Epstein-Barr virus transactivator, ZEBRA. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **89**, 378-382.
- Kawa-Ha, K., Ishihara, S., Ninomiya, T., Yumura-Yagi, K., Hara, J., Murayama, F., Tawa, A., and Hirai, K.(1989). CD3-negative lymphoproliferative disease of granular lymphocytes containing Epstein-Barr viral DNA. *J.Clin.Invest.* **84**, 51-55.
- Kempkes, B., Pich, D., Zeidler, R., Sugden, B., and Hammerschmidt, W.(1995). immortalization of human B lymphocytes by a plasmid containing 71 kilobase pairs of Epstein-Barr virus DNA. *J Virol* **69**, 231-238.
- Kenney, S., Kamine, J., Holley Guthrie, E., Lin, J.C., Mar, E.C., and Pagano, J.(1989). The Epstein-Barr virus (EBV) BZLF1 immediate-early gene product differentially affects latent versus productive EBV promoters. *J.Virol.* **63**, 1729-1736.
- Khochbin, S. and Lawrence, J.-J.(1989). An antisense RNA involved in p53 mRNA maturation in murine erythroleukemia cells induced to differentiate. *EMBO J.* **8**, 4107-4114.
- Kieff, E. and Liebowitz, D.(1990). *Fields Virology* (Fields, B.N., Knipe, D.M., and Howley, P.M., Eds.) 2 edition. Raven Press, New York. 1889-1920.
- Kienzle, N., Buck, M., Greco, S., Krauer, K., and Sculley, T.B.(1999). Epstein-Barr virus-encoded RK-BARF0 protein expression. *J Virol* **73**, 8902-8906.
- Kimelman, D. and Kirschner, M.W.(1989). An antisense mRNA directs the covalent modification of the transcript encoding fibroblast growth factor in *Xenopus* oocytes. *Cell* **59**, 687-696.

- Kintner, C.R. and Sugden, B.(1979). The structure of the termini of the DNA of Epstein-Barr virus. *Cell* **17**, 661-671.
- Klein, G., Lindahl, T., Jondal, M., Leibold, W., Menezes, J., and Sundström, C.(1974). Continuous lymphoid cell lines with characteristics of B-cells (bone marrow derived), lacking Epstein-Barr virus genome and derived from three human lymphomas. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **8**, 3283-3286.
- Knecht, H., Brousset, P., Bachmann, E., Sandvej, K., and Odermatt, B.F.(1993). Latent membrane protein 1: a key oncogene in EBV-related carcinogenesis? *Acta Haematol* **90**, 167-171.
- Knowles, D.M., Cesarman, E., Chadburn, A., Frizzera, G., Chen, J., Rose, E.A., and Michler, R.E.(1995). Correlative morphologic and molecular genetic analysis demonstrates three distinct categories of posttransplantation lymphoproliferative disorders. *Blood* **85**, 552-565.
- 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.
- Kolman, J.L., Taylor, N., Marshak, D.R., and Miller, G.(1993). Serine-173 of the Epstein-Barr virus ZEBRA protein is required for DNA binding and is a target for casein kinase II phosphorylation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **90**, 10115-10119.
- Laemmli, U.K.(1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Landschulz, W.H., Johnson, P.F., and McKnight, S.L.(1988). The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science* **240**, 1759-1764.
- Laux, G., Perricaudet, M., and Farrell, P.J.(1988). A spliced Epstein-Barr virus gene expressed in immortalized lymphocytes is created by circularization of the linear viral genome. *EMBO J.* **7**, 769-774.

- Lee, C.L., Uniyal, S., Fernandez, L.A., Lee, S.H., and Ghose, T.(1993). Growth and spread in nude mice of Epstein-Barr virus transformed B-cells from a chronic lymphocytic leukemia patient. *Cancer Res.* **46**, 2497-2501.
- Lee, R.S., Schlumberger, M., Caillou, B., Pages, F., Fridman, W.H., and Tartour, E.(1996). Phenotypic and functional characterisation of tumour-infiltrating lymphocytes derived from thyroid tumours. *Eur J Cancer* **32A**, 1233-1239.
- Lenoir, G.M. and Bornkamm, G.W.(1987). Burkitt's lymphoma, a human cancer model for the study of the multistep development of cancer: Proposal for a new scenario. *Advances.in Viral.Oncology*
- Lewin, N., Aman, P., Akerlund, B., Gustavsson, E., Carenfelt, C., Lejdebom, L., Klein, G., and Klein, E.(1990). Epstein-Barr virus-carrying B cells in the blood during acute infectious mononucleosis give rise to lymphoblastoid lines in vitro by release of transforming virus and by proliferation. *Immunol Lett* **26**, 59-65.
- Lieberman, P.M. and Berk, A.J.(1990). In vitro transcriptional activation, dimerization, and DNA-binding specificity of the Epstein-Barr virus Zta protein. *J Virol* **64**, 2560-2568.
- Liu, P., Liu, S., and Speck, S.H.(1998). Identification of a negative cis element within the ZII domain of the Epstein-Barr virus lytic switch BZLF1 gene promoter. *J.Virol.* **72**, 8230-8239.
- Liu, S., Borrás, A.M., Liu, P., Suske, G., and Speck, S.H.(1997). Binding of the ubiquitous cellular transcription factors Sp1 and Sp3 to the ZI domains in the Epstein-Barr virus lytic switch BZLF1 gene promoter. *Virology* **228**, 11-18.
- Lu, S.J., Day, N.E., Degos, L., Lepage, V., Wang, P.C., Chan, S.H., Simons, M., McKnight, B., Easton, D., and Zeng, Y.(1990). Linkage of a nasopharyngeal carcinoma susceptibility locus to the HLA region. *Nature* **346**, 470-471.
- Lupton, S. and Levine, A.J.(1985). Mapping genetic elements of Epstein-Barr virus that facilitate extrachromosomal persistence of Epstein-Barr virus-derived plasmids in human cells. *Mol Cell Biol* **5**, 2533-2542.

- Manet, E., Gruffat, H., Trescol Biemont, M.C., Moreno, N., Chambard, P., Giot, J.F., and Sergeant, A.(1989). Epstein-Barr virus bicistronic mRNAs generated by facultative splicing code for two transcriptional trans-activators. *EMBO J.* **8**, 1819-1826.
- Mann, K.P., Staunton, D., and Thorley-Lawson, D.A.(1985). Epstein-Barr virus-encoded protein found in plasma membranes of transformed cells. *J Virol* **55**, 710-720.
- Manolov, G. and Manolova, Y.(1972). Marker band in one chromosome 14 from Burkitt lymphomas. *Nature* **237**, 33-34.
- Masucci, M.G. and Ernberg, I.(1994). Epstein-Barr virus: adaptation to a life within the immune system. *Trends.Microbiol* **2**, 125-130.
- Mayer, J., Reischl, U., Schwarzmann, F., and Wolf, H.(1993). Pathobiology and Epstein-Barr virus related diseases. *Biotest Bulletin* **5**, 3-12.
- Messerle, M., Crnkovic, I., Hammerschmidt, W., Ziegler, H., and Koszinowski, U.H.(1997). Cloning and mutagenesis of a herpesvirus genome as an infectious bacterial artificial chromosome. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **94**, 14759-14763.
- Mitchell, T. and Sugden, B.(1995). Stimulation of NF-kappa B-mediated transcription by mutant derivatives of the latent membrane protein of Epstein-Barr virus. *J.Virol.* **69**, 2968-2976.
- Mitsudomi, T., Steinberg, S.M., Nau, M.M., Carbone, D., D'Amico, D., Bodner, S., Oie, H.K., Linnoila, R.I., Mulshine, J.L., and Minna, J.D.(1992). p53 gene mutations in non-small-cell lung cancer cell lines and their correlation with the presence of ras mutations and clinical features. *Oncogene* **7**, 171-180.
- Miyashita, E.M., Yang, B., Babcock, G.J., and Thorley-Lawson, D.A.(1997). Identification of the site of Epstein-Barr virus persistence in vivo as a resting B cell [published erratum appears in J Virol 1998 Nov;72(11):9419]. *J Virol* **71**, 4882-4891.
- Montalvo, E.A., Cottam, M., Hill, S., and Wang, Y.-C.J.(1995). YY1 binds to and regulates *cis*-acting negative elements in the Epstein-Barr virus BZLF1 promoter. *J.Virol.* **69**, 4158-4165.

- Montalvo, E.A., Shi, Y., Shenk, T.E., and Levine, A.J.(1991). Negative regulation of the BZLF1 promoter of Epstein-Barr virus. *J.Virol.* **65**, 3647-3655.
- Mosialos, G., Hanissian, S.H., Jawahar, S., Vara, L., Kieff, E., and Chatila, T.A.(1994). A Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase, CaM kinase-Gr, expressed after transformation of primary human B lymphocytes by Epstein-Barr virus (EBV) is induced by the EBV oncogene LMP1. *J.Virol.* **68**, 1697-1705.
- Okano, M., Matsumoto, S., Osato, T., Sakiyama, Y., Thiele, G.M., and Purtilo, D.T.(1991). Severe chronic active Epstein-Barr virus infection syndrome. *Clin.Microbiol.Rev.* **4**, 129-135.
- Pazin, M.J. and Kadonaga, J.T.(1997). What's up and down with histone deacetylation and transcription? *Cell* **89**, 325-328.
- Poirier, S., Bouvier, G., Malaveille, C., Ohshima, H., Shao, Y.M., Hubert, A., Zeng, Y., De The, G., and Bartsch, H.(1989). Volatile nitrosamine levels and genotoxicity of food samples from high-risk areas for nasopharyngeal carcinoma before and after nitrosation. *Int.J.Cancer* **44**, 1088-1094.
- Polack, A., Hortnagel, K., Pajic, A., Christoph, B., Baier, B., Falk, M., Mautner, J., Geltinger, C., Bornkamm, G.W., and Kempkes, B.(1996). c-myc activation renders proliferation of Epstein-Barr virus (EBV)-transformed cells independent of EBV nuclear antigen 2 and latent membrane protein 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 10411-10416.
- Pope, J.H., Achong, B.G., Epstein, M.A., and Biddulph, J.(1967). Burkitt Lymphoma in New Guinea: Establishment of a line of lymphoblasts in vitro and description of their fine structure. *J.* **39**, 933-945.
- Prang, N., Marschall, M., Wolf, H., and Schwarzmam, F.(1995). Epstein-Barr virus lytic replication is controlled by a post-transcriptional regulation mechanism for the immediate early protein Zta (BZLF1). *Abstractbook: The 20th International Herpesvirus Workshop, July 29 - August 3, 1995* 209(Abstract)
- Prang, N., Reischl, U., Arndt, R., Meier, T., Mayer, J., Schwarzmam, F., and Wolf, H.(1993). Identification of Epstein-Barr virus transactivator BZLF1 mRNA in uncultured

- peripheral blood Lymphocytes by RT-polymerase chain reaction. *Methodische Entwicklungen in der Mikrobiologischen Nukleinsäure-Diagnostik, 1993* (Abstract)
- Prang, N., Wolf, H., and Schwarzmann, F.(1995). Epstein-Barr virus lytic replication is controlled by a posttranscriptional mechanism of BZLF1. *J.Virol.* **69**, 2644-2648.
- Prang, N., Wolf, H., and Schwarzmann, F.(1999). Latency of Epstein-Barr virus is stabilized by antisense-mediated control of the viral immediate-early gene BZLF-1. *J Med Virol* **59**, 512-519.
- Pulvertaft, R.J.V.(1964). Cytology of Burkitt's tumor (African lymphoma). *Lancet* **1**, 238-240.
- Purtilo, D.T.(1985). Epstein-Barr virus-induced diseases in the X-linked lymphoproliferative syndrome and related disorders. *Biomed.Pharmacother.* **39**, 52-58.
- Purtilo, D.T., Cassel, C.K., Yang, J.P., and Harper, R.(1975). X-linked recessive progressive combined variable immunodeficiency (Duncan's disease). *Lancet* **1**, 935-940.
- Qu, L. and Rowe, D.T.(1992). Epstein-Barr virus latent gene expression in uncultured peripheral blood lymphocytes. *J.Virol.* **66**, 3715-3724.
- Raab-Traub, N., Hood, R., Yang, C.S., Henry, B., and Pagano, J.S.(1983). Epstein-Barr virus transcription in nasopharyngeal carcinoma. *J Virol* **48**, 580-590.
- Raleigh, E.A., Trimarchi, R., and Revel, H.(1989). Genetic and physical mapping of the mcrA (rglA) and mcrB (rglB) loci of Escherichia coli K-12. *Genetics* **122**, 279-296.
- Randhawa, P.S., Markin, R.S., Starzl, T.E., and Demetris, A.J.(1990). Epstein-Barr virus-associated syndromes in immunosuppressed liver transplant recipients. Clinical profile and recognition on routine allograft biopsy. *Am J Surg Pathol* **14**, 538-547.
- Rawlins, D.R., Milman, G., Hayward, S.D., and Hayward, G.S.(1985). Sequence-specific DNA binding of the Epstein-Barr virus nuclear antigen (EBNA-1) to clustered sites in the plasmid maintenance region. *Cell* **42**, 859-868.

- Reisman, D., Yates, J., and Sugden, B.(1985). A putative origin of replication of plasmids derived from Epstein-Barr virus is composed of two cis-acting components. *Mol.Cell Biol.* **5**, 1822-1832.
- Rickinson, A.B. and Moss, D.J.(1997). Human cytotoxic T lymphocyte responses to Epstein-Barr virus infection. *Annu.Rev.Immunol.* **15:405-31**, 405-431.
- Roizman, B.(1996). The function of herpes simplex virus genes: a primer for genetic engineering of novel vectors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 11307-11312.
- Roizman, B., Carmichael, L.E., Deinhardt, F., de-The, G., Nahmias, A.J., Plowright, W., Rapp, F., Sheldrick, P., Takahashi, M., and Wolf, K.(1981). Herpesviridae. Definition, provisional nomenclature, and taxonomy. The Herpesvirus Study Group, the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Intervirology* **16**, 201-217.
- Rooney, C., Howe, J.G., Speck, S.H., and Miller, G.(1989). Influence 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.
- Rosa, M.D., Gottlieb, E., Lerner, M.R., and Steitz, J.A.(1981). Striking similarities are exhibited by two small Epstein-Barr virus- encoded ribonucleic acids and the adenovirus-associated ribonucleic acids VAI and VAII. *Mol.Cell Biol.* **1**, 785-796.
- Sadler, R.H. and Raab-Traub, N.(1995). Structural analyses of the Epstein-Barr virus BamHI A transcripts. *J Virol* **69**, 1132-1141.
- Sample, J., Henson, E.B., and Sample, C.(1992). The Epstein-Barr virus nuclear protein 1 promoter active in type I latency is autoregulated. *J.Virol.* **66**, 4654-4661.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R.(1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 5463-5467.
- Sato, H., Takeshita, H., Furukawa, M., and Seiki, M.(1992). Epstein-Barr virus BZLF1 transactivator is a negative regulator of Jun. *J Virol* **66**, 4732-4736.
- Sawtell, N.M. and Thompson, R.L.(1992). Herpes simplex virus type I latency-associated transcription unit promotes anatomical site-dependant establishment and reactivation from latency. *J.Virol.* **66**, 2157-2169.

- Schaefer, B. and Speck, S.H.(1994). Redefining the EBNA1 promoter and transcription initiation site in group I Burkitt's lymphoma cell lines. *Epstein-Barr Virus & Associated Diseases, Cold Spring Harbor Meeting on Cancer Cells 7.-11.9.1994* 192(Abstract)
- Schwarzmann, F., Prang, N., Reichelt, B., Rinkes, B., Haist, S., Marschall, M., and Wolf, H.(1994). Negative cis-acting elements in the distal part of the promoter of Epstein-Barr virus trans-activator gene BZLF1. *J.Gen.Virol.* **75**, 1999-2006.
- Segouffin, C., Gruffat, H., and Sergeant, A.(1996). Repression by RAZ of Epstein-Barr virus bZIP transcription factor EB1 is dimerization independent. *J Gen Virol* **77 (Pt 7)**, 1529-1536.
- Sharp, T.V., Schwemmle, M., Jeffrey, I., Laing, K., Mellor, H., Proud, C.G., Hilse, K., and Clemens, M.J.(1993). Comparative analysis of the regulation of the interferon-inducible protein kinase PKR by Epstein-Barr virus RNAs EBER-1 and EBER-2 and adenovirus VAI RNA. *Nucleic.Acids.Res.* **21**, 4483-4490.
- Shaw, J.E., Levinger, L.F., and Carter, C.W.J.(1979). Nucleosomal structure of Epstein-Barr virus DNA in transformed cell lines. *J Virol* **29**, 657-665.
- Shimizu, N. and Takada, K.(1994). Analysis of the BZLF1 promoter of Epstein-Barr virus: Identification of an anti-immunoglobulin response sequence. *J.Virol.* **67**, 3240-3245.
- Sierra, F., Tamone, F., Mueller, C.R., and Schibler, U.(1990). Differential in vitro transcription from the promoter of a rat alpha 2u globulin gene in liver and spleen nuclear extracts. *Mol Biol Med* **7**, 131-146.
- Sinclair, A.J., Palmero, I., Peters, G., and 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.
- Sista, N.D., Pagano, J.S., Liao, W., and Kenney, S.(1993). Retinoic acid is a negative regulator of the Epstein-Barr virus protein (BZLF1) that mediates disruption of latent infection. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **90**, 3894-3898.

- Sixbey, J.W., Lemon, S.M., and Pagano, J.S.(1986). A second site for Epstein-Barr virus shedding: The uterine cervix. *The.Lancet* **2**, 1122-1124.
- Sixbey, J.W., Nedrud, J.G., Raab Traub, N., Hanes, R.A., and Pagano, J.S.(1984). Epstein-Barr virus replication in oropharyngeal epithelial cells. *N.Engl.J.Med.* **310**, 1225-1230.
- Sjoblom-Hallen, A., Yang, W., Jansson, A., and Rymo, L.(1999). Silencing of the epstein-barr virus latent membrane protein 1 gene by the max-Mad1-mSin3A modulator of chromatin structure [In Process Citation]. *J.Virol.* **73**, 2983-2993.
- Skare, J.C., Milunsky, A., Byron, K.S., and Sullivan, J.L.(1987). Mapping the X-linked lymphoproliferative syndrome. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **84**, 2015-2018.
- Srinivas, S.K. and Sixbey, J.W.(1995). Epstein-Barr virus induction of recombinase-activating genes RAG1 and RAG2. *J.Virol.* **69**, 8155-8155.
- Strockbine, L.D., Cohen, J.I., Farrah, T., Lyman, S.D., Wagener, F., DuBose, R.F., Armitage, R.J., and Spriggs, M.K.(1998). The Epstein-Barr virus BARF1 gene encodes a novel, soluble colony-stimulating factor-1 receptor. *J Virol* **72**, 4015-4021.
- Struhl, K.(1987). The DNA-binding domains of the jun oncoprotein and the yeast GCN4 transcriptional activator protein are functionally homologous. *Cell* **50**, 841-846.
- Studier, F.W. and Moffatt, B.A.(1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* **189**, 113-130.
- Sullivan, J.L. and Woda, B.A.(1989). X-linked lymphoproliferative syndrome. *Immunodeficiency.Rev.* **1**, 325-347.
- Tanner, J., Weis, J., Fearon, D., Whang, Y., and Kieff, E.(1987). Epstein-Barr virus gp350/220 binding to the B lymphocyte C3d receptor mediates adsorption, capping, and endocytosis. *Cell* **50**, 203-213.
- Tanner, J., Whang, Y., Sample, J., Sears, A., and Kieff, E.(1988). Soluble gp350/220 and deletion mutant glycoproteins block Epstein-Barr virus adsorption to lymphocytes. *J Virol* **62**, 4452-4464.

- Tao, Q., Srivastava, G., Chan, A.C., Chung, L.P., Loke, S.L., and Ho, F.C.(1995). Evidence for lytic infection by Epstein-Barr virus in mucosal lymphocytes instead of nasopharyngeal epithelial cells in normal individuals. *J.Med.Virol.* **45**, 71-77.
- Taylor, N., Countryman, J., Rooney, C., Katz, D., and Miller, G.(1989). Expression of the BZLF1 latency-disrupting gene differs in standard and defective Epstein-Barr viruses. *J Virol* **63**, 1721-1728.
- Thorley-Lawson, D.A., Miyashita, E.M., and Kahn, G.(1996). Epstein-Barr virus and the B-cell: That's all it takes. *Trends Microbiol.* **4**, 204
- Tobi, M. and Straus, S.E.(1982). Chronic Epstein-Barr virus disease: a workshop held by the National Institute of Allergy and Infectious Diseases. *Ann.Intern.Med.* **103**, 951-953.
- Tomkinson, B., Robertson, E., and Kieff, E.(1993). Epstein-Barr virus nuclear proteins EBNA-3A and EBNA-3C are essential for B-lymphocyte growth transformation. *J.Virol.* **67**, 2014-2025.
- Tovey, M.G., Lenoir, G., and Begon-Lours, J.(1978). Activation of latent Epstein-Barr virus by antibody to human IgM. *Nature* **276**, 270-272.
- Turner, R. and Tjian, R.(1989). Leucine repeats and an adjacent DNA binding domain mediate the formation of functional cFos-cJun heterodimers. *Science* **243**, 1689-1694.
- Uccini, S., Monardo, F., Stoppacciaro, A., Gradilone, A., Agliano, A.M., Faggioni, A., Manzari, V., Vago, L., Costanzi, G., and Ruco, L.P.(1990). High frequency of Epstein-Barr virus genome detection in Hodgkin's disease of HIV-positive patients. *Int J Cancer* **46** , 581-585.
- Vogt, P.K., Bos, T.J., and Doolittle, R.F.(1987). Homology between the DNA-binding domain of the GCN4 regulatory protein of yeast and the carboxyl-terminal region of a protein coded for by the oncogene jun. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 3316-3319.
- von Baehr, R., Wolf, H., Schwarzmann, F., Böhm, S., and Bieger, W.P.(1999). Ein Fall einer chronisch-aktiven EBV-Infektion. *Immun.Infekt.* **2**, 176-179.

- Wagner, E.K., Devi-Rao, G., Feldman, L.T., Dobson, A.T., Zhang, Y.F., Flanagan, W.M., and Stevens, J.G.(1988). Physical characterization of the herpes simplex virus latency-associated transcript in neurons. *J Virol* **62**, 1194-1202.
- Wang, D., Liebowitz, D., and Kieff, E.(1985). An EBV membrane protein expressed in immortalized lymphocytes transforms established rodent cells. *Cell* **43**, 831-840.
- Wang, F., Gregory, C., Sample, C., Rowe, M., Liebowitz, D., Murray, R., Rickinson, A., and Kieff, E.(1990a). 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 induce CD23. *J.Virol.* **64**, 2309-2318.
- Wang, F., Tsang, S.F., Kurilla, M.G., Cohen, J.I., and Kieff, E.(1990b). Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 transactivates latent membrane protein LMP1. *J.Virol.* **64**, 3407-3416.
- Wang, Y.C., Huang, J.M., and Montalvo, E.A.(1997). Characterization of proteins binding to the ZII element in the Epstein-Barr virus BZLF1 promoter: transactivation by ATF1. *Virology* **227**, 323-330.
- Watry, D., Hedrick, J.A., Siervo, S., Rhodes, G., Lamberti, J.J., Lambris, J.D., and Tsoukas, C.D.(1991). Infection of human thymocytes by Epstein-Barr virus. *J Exp Med* **173**, 971-980.
- Wightman, B., Ha, I., and Ruvkun, G.(1993). Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell* **75**, 855-862.
- Wildy, P. and Watson, D.H.(1968). Antiserum production using minute quantities of viral antigens. *Nature* **219**, 299-300.
- Wilson, J.B., Bell, J.L., and Levine, A.J.(1996). Expression of Epstein-Barr virus nuclear antigen-1 induces B cell neoplasia in transgenic mice. *EMBO J.* **15**, 3117-3126.
- Woisetschlaeger, M., Yandava, C.N., Furmanski, L.A., Strominger, J.L., and Speck, S.H.(1990). Promoter switching in Epstein-Barr virus during the initial stages of infection of B lymphocytes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **87**, 1725-1729.

- Wolf, H., Haus, M., and Wilmes, E.(1984). Persistence of Epstein-Barr virus in the parotid gland. *J.Virol.* **51**, 795-798.
- Wolf, H., Zurhausen, H., and Becker, V.(1973). EB viral genomes in epithelial nasopharyngeal carcinoma cells. *Nature New Biol.* **244**, 245-245.
- Woodcock, D.M., Crowther, P.J., Doherty, J., Jefferson, S., DeCruz, E., Noyer-Weidner, M., Smith, S.S., Michael, M.Z., and Graham, M.W.(1989). Quantitative evaluation of Escherichia coli host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. *Nucleic Acids Res* **17**, 3469-3478.
- Yates, J.L. and Guan, N.(1991). Epstein-Barr virus-derived plasmids replicate only once per cell cycle and are not amplified after entry into cells. *J.Virol.* **65**, 483-488.
- Yates, J.L., Warren, N., and Sugden, B.(1985). Stable replication of plasmids derived from Epstein-Barr virus in various mammalian cells. *Nature* **313**, 812-815.
- Young, L.S., Lau, R., Rowe, M., Niedobitek, G., Packham, G., Shanahan, F., Rowe, D.T., Greenspan, D., Rickinson, A.B., and Farrell, P.J.(1991). Differentiation-associated expression of the Epstein-Barr virus BZLF1 transactivator protein in oral hairy leukoplakia. *J.Virol.* **65**, 2868-2874.
- Zeng, Y., Zhong, J.M., Ye, S.Q., Ni, Z.Y., Miao, X.Q., Mo, Y.K., and Li, Z.L.(1994). Screening of Epstein-Barr virus early antigen expression inducers from Chinese medicinal herbs and plants. *Biomed Environ Sci* **7**, 50-55.
- Zhang, Q., Gutsch, D., and Kenney, S.(1994). Functional and physical interaction between p53 and BZLF1: implications for Epstein-Barr virus latency. *Mol.Cell Biol.* **14**, 1929-1938.
- Zhou, Q., Gedrich, R.W., and Engel, D.A.(1995). Transcriptional repression of the c-fos gene by YY1 is mediated by a direct interaction with ATF/CREB. *J.Virol.* **69**, 4323-4330.
- Ziegler, J.L., Bragg, K., Abrams, D., Beckstead, J., Cogan, M., Volberding, P., Baer, D., Wilkinson, L., Rosenbaum, E., and Grant, K.(1984). High-grade non-Hodgkin's lymphoma in patients with AIDS. *Ann N Y Acad Sci* **437**, 412-419.

Zimber Strobl, U., Suentzenich, K.O., Laux, G., Eick, D., Cordier, M., Calender, A., Billaud, M., Lenoir, G.M., and Bornkamm, G.W.(1991). Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 activates transcription of the terminal protein gene. *J.Virol.* **65**, 415-423.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Hans Wolf für die Bereitstellung des modernen Arbeitsplatzes und die Betreuung dieser Arbeit, aber besonders dafür, daß er an seinem Institut eine Atmosphäre geschaffen hat, in der man das Gefühl hat, nicht nur Forscher, sondern in erster Linie Mensch zu sein.

Herrn PD Dr. Rainer Deutzmann danke ich für die Übernahme des Erstgutachtens und die Vertretung der Arbeit vor der biologischen Fakultät.

Herrn PD Dr. Fritz Schwarzmann danke ich für die Bereitstellung des Themas, die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und seine Hilfsbereitschaft in den alltäglichen Sorgen einer Nachwuchsforscherin.

Natürlich bedanke ich mich bei allen anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe für das freundliche Arbeitsklima: Arnd Dankesreiter, Norbert Greifenegger, Susanne Schmaus, Ursula König, und Cornelia Thomas. Besonders danke ich Arnd Dankesreiter für die anregenden Diskussionen, die sich nicht nur auf unser sich teilweise überschneidendes Projekt bezogen.

Mein besonderer Dank gilt ThoDo (Thomas Dobner) und seinen Leuten im speziellen Dagi, Birgit, Andre, Helge und Tom, nicht nur für die immer produktive fachliche, sondern mehr noch für die seelisch-moralische Untersützung bei dieser Arbeit. Dasselbe gilt für Kurti und Ludi von den Wagners. Reich bin ich durch Eure Aktientips zwar noch nicht geworden, aber Eure Durchhalteparolen habe mich doch immer wieder aufrecht gehalten.

Danke auch an die Damen und Herren aus der Nährboden- und Spülküche, deren Unterstützung ich zu schätzen wußte.

Ich danke auch den Damen vom Sekreteriat, die immer ein offenes Ohr hatten und mir das Fax-Gerät notfalls auch zum 10ten mal erklärt haben.

Im speziellen möchte ich aber meiner „Lieblings-Chef-Tippse“ Bettina für ihre Freundschaft danken.

Danksagung

Besondere Dank gilt H.J. Delecluse und seinen Mitarbeiterinnen Anette Janz und Manuela Kost für die freundliche Aufnahme in ihrer Arbeitsgruppe bei der GSF in München und ihrer Hilfe bei der Herstellung der rekombinanten EB-Viren.

Meiner lieben Freundin Dagmar Büchner (Dagi) gilt mein ganz besonderer Dank. Ihre Unterstützung in allen Bereichen hat mir über die diversesten Krisen hinweggeholfen. Sie hat mir die Hoffnung erhalten, daß es in der heutigen Wegwerfgesellschaft noch so etwas wie echte Freundschaft gibt.

Allen anderen, nicht namentlich erwähnten Mitgliedern des Instituts danke ich für diverse Hilfen und Gespräche.